

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

Lehrstuhl: Stoffwechselbiochemie

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

**Analyse der Funktion und Regulation von
Proteinen mit Relevanz für Morbus Alzheimer
mittels massenspektrometrischer Methoden**



Dissertation

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

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sebastian Hogl

aus Herrenberg

2012

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

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Axel Imhof

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.13

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation „Analyse der Funktion und Regulation von Proteinen mit Relevanz für Morbus Alzheimer mittels massenspektrometrischer Methoden“ von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich habe mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Hilfen oder Quellen bedient.

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

--

Sebastian Hogl

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	4
2	EINLEITUNG	8
2.1	MORBUS ALZHEIMER	8
2.1.1	<i>Historische Betrachtung</i>	8
2.1.2	<i>Epidemiologische Betrachtung.....</i>	8
2.1.3	<i>Molekulare Pathologie des Morbus Alzheimer</i>	8
2.1.4	<i>Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese</i>	9
2.1.5	<i>Proteolytische Prozessierung des APP</i>	11
2.1.6	<i>Therapieansätze bei Morbus Alzheimer und Bedeutung von Biomarkern</i>	12
2.1.7	<i>Physiologische Funktion von APP und dessen Homologen.....</i>	13
2.2	MASSENSPEKTROMETRIE	15
2.2.1	<i>Grundlagen der Massenspektrometrie.....</i>	16
2.2.1.1	<i>Aufbau eines Massenspektrometers – der Probeneinlass</i>	17
2.2.1.2	<i>Aufbau eines Massenspektrometers – Ionenquellen.....</i>	18
2.2.1.3	<i>Aufbau eines Massenspektrometers – der Massenfilter.....</i>	21
2.2.1.4	<i>Aufbau eines Massenspektrometers – der Detektor</i>	24
2.2.1.5	<i>Tandem-Massenspektrometrie</i>	25
2.2.2	<i>Grundlagen der MS-basierten Proteomik.....</i>	25
2.2.2.1	<i>Bottom-up Proteomik.....</i>	26
2.2.2.2	<i>Quantitative Proteomik</i>	27
2.2.3	<i>Proteomik im Zebrafisch.....</i>	29
3	ZIELE DER ARBEIT	31
4	ERGEBNISSE	32
4.1	ANALYSE DER REGULIERTEN INTRAMEMBRAN-PROTEOLYSE (RIP) VON APLP2	32
4.1.1	<i>Bestimmung der relevanten Proteasen für die Ektodomänenspaltung von APLP2.....</i>	32
4.1.1.1	<i>Untersuchung des Laufverhaltens von APLP2 im Western Blot.....</i>	32
4.1.1.2	<i>Untersuchung der Glykosylierung von APLP2</i>	33
4.1.1.3	<i>Untersuchung der Ektodomänenspaltung von APLP2 mit pharmakologischen Inhibitoren</i>	35
4.1.1.4	<i>Bestimmung der Relevanz von ADAM10 und ADAM17 für die Ektodomänenspaltung von APLP2 in HEK293- und SH-SY5Y-Zellen</i>	35
4.1.1.5	<i>Untersuchung der Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen.....</i>	38
4.1.2	<i>Bestimmung der Schnittstellen von APLP2 durch α-, β- und γ-Sekretase.....</i>	40
4.1.2.1	<i>Bestimmung der α- und β-Sekretase Schnittstellen von APLP2.....</i>	41
4.1.2.2	<i>Bestimmung der γ-Sekretase-Schnittstellen von APLP2.....</i>	46
4.1.2.3	<i>Variabilität der γ-Sekretase Schnittstellen in Abhängigkeit einer familiären PS1-Mutation.....</i>	50
4.2	PROTEOMISCHE ANALYSE VON BACE1 -/- ZEBRAFISCHEN	51
4.2.1	<i>Identifikation von BACE1-Substraten im Gesamtproteinlysat von sechs Tage alten Zebrafischlarven</i>	52

4.2.2	<i>Identifikation von BACE1-Substraten im Gehirnlysats sechs Monate alter Zebrafischlarven</i>	58
5	DISKUSSION	64
5.1	ANALYSE DER REGULIERTEN INTRAMEMBRAN-PROTEOLYSE (RIP) VON APLP2	64
5.1.1	<i>sAPLP2 liegt als komplex glykosyliertes Protein vor</i>	65
5.1.2	<i>ADAM10 ist die konstitutive APLP2-α-Sekretase in verschiedenen Zelllinien und primären Neuronen</i>	67
5.1.3	<i>Bestimmung der Ektodomänenspaltstellen von APLP2</i>	71
5.1.4	<i>Analyse des heterogenen γ-Sekretase-Schnitts von APLP2</i>	76
5.1.5	<i>Relevanz der gefundenen Ergebnisse</i>	78
5.2	PROTEOMISCHE ANALYSE VON BACE1 -/- ZEBRAFISCHEN	79
5.2.1	<i>Identifikation von BACE1-Substraten im Gesamtproteinlysats von 6 Tage alten Zebrafischlarven</i>	81
5.2.2	<i>Identifikation von BACE1-Substraten im Gehirnlysats sechs Monate alter Zebrafischlarven</i>	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY	90
8	MATERIAL UND METHODEN	92
8.1	MATERIAL	92
8.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	92
8.1.1.1	Für allgemeine und molekularbiologische Arbeiten	92
8.1.1.2	Für proteinbiochemische Arbeiten	93
8.1.1.3	Für massenspektrometrische Arbeiten	93
8.1.1.4	Für Zellkultur-Arbeiten	94
8.1.2	<i>Chemikalien, Enzyme und Versuchskits</i>	94
8.1.2.1	Allgemeine Anmerkung	94
8.1.2.2	Für allgemeine und molekularbiologische Arbeiten	94
8.1.2.3	Für massenspektrometrische Arbeiten	95
8.1.2.4	Für Zellkulturarbeiten	95
8.1.3	<i>Puffer</i>	96
8.1.3.1	Für allgemeine und molekularbiologische Arbeiten	96
8.1.3.2	Für proteinbiochemische Arbeiten	97
8.1.4	<i>Antikörper</i>	98
8.1.4.1	Primäre Antikörper	98
8.1.4.2	Sekundäre Antikörper	99
8.1.5	<i>Primer</i>	99
8.1.6	<i>Plasmide</i>	100
8.2	METHODEN	100
8.2.1	<i>Klonierungen</i>	100
8.2.1.1	Klonierstrategie	100
8.2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	101
8.2.1.3	Restriktionsverdau	102
8.2.1.4	Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung	102

8.2.1.5	Ligation.....	102
8.2.1.6	Transformation von <i>E. coli</i>	102
8.2.1.7	Aufreinigung von Plasmiden aus der Flüssigkultur.....	103
8.2.1.8	Sequenzierung von klonierten Plasmiden.....	103
8.2.2	<i>Zellkultur und Zellkulturassays</i>	103
8.2.2.1	Verwendete Zelllinien.....	103
8.2.2.2	Kultivierung von Zellen.....	104
8.2.2.3	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin.....	104
8.2.2.4	Aussäen von Zellen.....	105
8.2.2.5	Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmiden für die Analyse der Ektodomänenspaltung mittels Western Blot.....	105
8.2.2.6	Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmiden für die massenspektrometrische Analyse der Ektodomänenspaltung.....	105
8.2.2.7	Transfektion von Zellen mit siRNA für die Analyse der Ektodomänenspaltung.....	106
8.2.2.8	Herstellung stabiler Zelllinien mittels Transfektion von Plasmiden.....	107
8.2.2.9	Herstellung von Zelllysaten.....	107
8.2.2.10	Präparation von Membranproteinen.....	107
8.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	108
8.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	108
8.2.3.2	Western Blot.....	108
8.2.3.3	Coomassie-Färbung von Gelen.....	109
8.2.4	<i>MALDI-TOF Massenspektrometrie</i>	109
8.2.4.1	Bestimmung der Schnittstellen der Ektodomänenspaltung von APLP2.....	109
8.2.4.2	Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstellen von APLP2.....	110
8.2.4.3	Aufnahme von Spektren mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer.....	110
8.2.4.4	Auswertung von MALDI-TOF Spektren.....	111
8.2.5	<i>LC-MS/MS Massenspektrometrie</i>	111
8.2.5.1	Filter assistierte Proben Vorbereitung (<i>filter aided sample preparation, FASP</i>).....	111
8.2.5.2	Dimethyl-Markierung (DMT-Labeling).....	112
8.2.5.3	StageTip.....	112
8.2.5.4	SAX-Fraktionierung.....	113
8.2.5.5	LC-MS/MS.....	114
8.2.5.6	Bioinformatische Auswertung Proteomik.....	116
8.2.5.7	Statistische Auswertung Proteomik.....	116
8.2.6	<i>Allgemeine Bioinformatik</i>	118
9	TABELLENVERZEICHNIS	119
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	120
11	ANHANG	122
11.1	PEPTIDMASSENÜBERSICHTEN.....	122
11.1.1	<i>Peptidmassentabelle für APLP2-TEV-FLAG</i>	122
11.1.2	<i>Peptidmassentabelle für HA-αAPLP2CTF-FLAG</i>	123
11.1.3	<i>Peptidmassentabelle für HA-sAPLP2CTF-FLAG</i>	124
12	LITERATURVERZEICHNIS	126

13 PUBLIKATIONEN..... 140

DANKSAGUNG..... 141

2 Einleitung

2.1 Morbus Alzheimer

2.1.1 Historische Betrachtung

Die erste Beschreibung eines Falles von Morbus Alzheimer, im Folgenden auch als Alzheimer-Krankheit bezeichnet, geht auf den Psychiater Alois Alzheimer zurück, der in seiner 1907 veröffentlichten Schrift „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ eine Fallstudie einer Patientin präsentierte, die unter zeitlicher und räumlicher Desorientierung, emotionaler Instabilität, Wahrnehmungsstörungen und einem schnell voranschreitenden Gedächtnisverlust bis hin zur „vollkommenen Verblödung“ litt (Alzheimer, 1907; Strassnig and Ganguli, 2005). Aus seinem ersten Patientengespräch ist die Aussage der Patientin überliefert: „ich habe mich vergessen“ – ein Satz in dem die kognitive Beeinträchtigung infolge der Erkrankung sehr treffend beschrieben ist. Bei der pathologischen Untersuchung des Gehirns der Patientin stellte Alois Alzheimer eine massive Atrophie des Gehirns ohne makroskopische Foci fest (Strassnig und Ganuli, 2005). Des Weiteren beschrieb er ungewöhnliche intrazelluläre Fibrillen, die er anfärben konnte und extrazelluläre Ablagerungen, welche er verteilt über den gesamten Cortex mit bloßem Auge sehen konnte (Strassnig und Ganuli, 2005). Diese drei pathologischen Kennzeichen, Atrophie, extrazelluläre Ablagerungen und intrazelluläre Fibrillen stellen die pathologischen Hauptmerkmale der nach Alzheimer benannten Alzheimer-Krankheit dar und werden bis heute zur *post mortem* Bestätigung der Diagnose herangezogen.

2.1.2 Epidemiologische Betrachtung

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Im Referenzjahr 2006 lag die Prävalenz bei 26,6 Millionen Patienten weltweit (Alzheimer's-Association, 2010; Brookmeyer et al., 2007; Glish and Vachet, 2003). Da das Altern als größter Risikofaktor für die Alzheimer-Erkrankung angesehen wird, wird mit einer Verdreifachung der Prävalenz bis zum Jahr 2050 gerechnet (Alzheimer's-Association, 2010; Brookmeyer et al., 2007; Chaib et al., 2012; WHO, 2012). Damit stellt die Alzheimer-Krankheit eine zunehmende soziale und ökonomische Belastung für die weltweite Bevölkerung, insbesondere in der westlichen Welt, dar (WHO, 2012).

2.1.3 Molekulare Pathologie des Morbus Alzheimer

Die molekulare Identität der von Alzheimer 1907 in Verbindung mit der Alzheimer-Krankheit beschriebenen extrazellulären Ablagerungen konnte erst knapp 80 Jahre nach ihrer Entdeckung biochemisch geklärt werden. So konnte ein circa 40 Aminosäu-

ren langes Peptid, das sogenannte A β -Peptid, als wichtige Komponente der extrazellulären Plaques ausgemacht und sequenziert werden (Glenner et al., 1984; Masters et al., 1985; Selkoe et al., 1986). Spätere Untersuchungen zeigten, dass eine C-terminal um 2 Aminosäuren längere, und damit 42 Aminosäuren lange, Version des A β -Peptids quantitativ die Hauptkomponente der extrazellulären Plaques darstellt. Während diffuse extrazelluläre Ablagerungen von A β auch bei Menschen, die ohne eine feststellbare Demenz gestorben sind, nachgewiesen werden können, werden fibrilläre A β -Ablagerungen fast ausschließlich bei Alzheimer-Patienten gefunden (Selkoe, 2011; Snowden, 1997; Weiner et al., 1998).

Die von Alzheimer beschriebenen intrazellulären Fibrillen konnten ebenfalls biochemisch charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um helikale Filamente, die hauptsächlich aus einer hyperphosphorylierten Form des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau bestehen, das unter physiologischen Bedingungen wichtig für die Stabilisierung axonaler Mikrotubuli ist (Friedhoff et al., 2000; Grundke-Iqbal et al., 1986; Terry et al., 1964). Unter pathologischen Bedingungen führt ein Ungleichgewicht zwischen Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten zu einer Hyperphosphorylierung von Tau, wodurch es zur Bildung der bei Morbus Alzheimer beobachtbaren Fibrillen, nach dem englischen Begriff für Fibrillen auch oft als „Tangles“ bezeichnet, kommt (Mandelkow and Mandelkow, 1998). Diese Tangles sind nicht ausschließlich bei Alzheimer-Patienten detektierbar, sondern können auch bei Patienten anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel Patienten mit bestimmten Subtypen der frontotemporalen Lobärdegeneration oder des Morbus Parkinson, beobachtet werden (Morris et al., 2001).

2.1.4 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Identifikation des Amyloid Precursor Proteins (APP) als molekularen Vorläufer des A β -Peptids gelang verschiedenen Arbeitsgruppen im Jahre 1987 auf der Grundlage genetischer Überlegungen und molekularbiologischer Experimente (Delabar et al., 1987; Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; St George-Hyslop et al., 1987; Tanzi et al., 1987). Das A β -Peptid stellt dabei eine Teilsequenz des APP dar, die durch die Prozessierung von APP durch Proteasen liberiert werden kann (Hardy and Higgins, 1992; Kang et al., 1987). Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurde die sogenannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese entwickelt, die bis heute in modifizierter Form als grundlegender molekularer Mechanismus der Alzheimer-Krankheit angesehen wird (Golde et al., 2011; Hardy and Selkoe, 2002; Hardy and Higgins, 1992). Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese besagt, dass bei Morbus Alzheimer eine erhöhte Freisetzung oder ein veringertes Abbau des A β -Peptids dazu führt, dass A β akkumuliert. Infolge der Oligomerisierung beziehungsweise der Plaquebildung des A β kommt es nach dieser Hypothese zu Neuroinflammation, Schädigung von Synapsen und einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, was wiederum zur Bildung intrazellulärer Fibrillen führt. Sowohl die

durch A β ausgelöste Neuroinflammation als auch die direkte Synapsenschädigung und die Tanglebildung werden als ursächlich für neuronale Fehlfunktionen und die daraus resultierende Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer angesehen (Hardy and Selkoe, 2002; Hardy and Higgins, 1992). Während Hardy und Higgins noch davon ausgingen, dass Plaques die einzige neurotoxische Spezies darstellen, gilt es mittlerweile als erwiesen, dass oligomere A β -Spezies ebenfalls neurotoxisch sind und sogar größeren Anteil an der Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer haben (Golde et al., 2011; Selkoe, 2011). Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

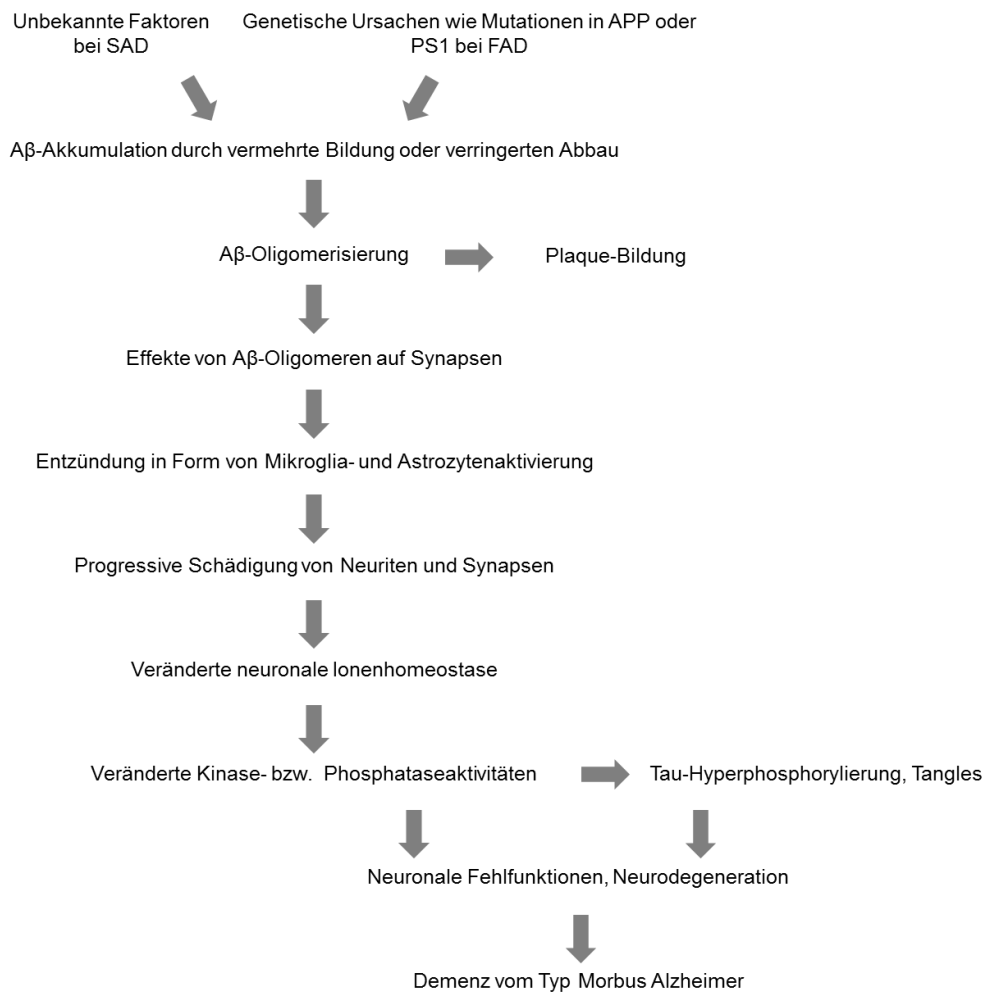


Abbildung 1: Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese in einer modifizierten Form nach Hardy und Selkoe (2002). Die initiale A β -Anreicherung wird nach der Hypothese im Fall der sporadischen Alzheimer-Demenz (SAD) von noch unbekanntem Faktoren ausgelöst, während für Fälle der familiären Alzheimer-Demenz (FAD) bekannt ist, dass Mutationen in APP oder PS1 die A β -Anreicherung beziehungsweise eine verstärkte A β -Aggregation auslösen. Die A β -Oligomerisierung führt zur Beeinträchtigung von Synapsen und löst so direkt oder indirekt eine Neuroinflammation aus. Es kommt zu einer fortschreitenden Schädigung von Neuriten und Synapsen und einer Dysregulation der neuronalen Ionenhomeostase und der neuronalen Kinase- und Phosphataseaktivitäten. Dies führt unter anderem über eine Hyperphosphorylierung des mikrotubulibindenden Proteins Tau zur Tanglebildung, die teilweise verantwortlich für die Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer ist.

2.1.5 Proteolytische Prozessierung des APP

Im Rahmen der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde die Existenz von APP-schneidenden Proteasen postuliert, die für die Generierung des A β verantwortlich sind. Diese werden als Sekretasen bezeichnet. Die Identität der N-terminal der A β -Sequenz schneidenden β -Sekretase konnte dem β -site APP-cleaving enzyme (BACE1) und die C-terminal der A β -Sequenz schneidende proteolytische Aktivität dem γ -Sekretase-Komplex zugeordnet werden (Edbauer et al., 2003; Francis et al., 2002; Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die Ektodomänenspaltung von APP durch BACE1 führt hierbei zur Produktion des 99 Aminosäuren langen C-terminalen APP-Fragments (C-99), das, im Gegensatz zum volle-Länge-APP, Substrat für den γ -Sekretase-Komplex ist. Die γ -Sekretase schneidet das C-99 in der Transmembrandomäne und führt somit zur Freisetzung des A β -Peptids in den extrazellulären Raum. Die Oligomerisierung des A β -Peptids führt dann zur Bildung der bei Morbus Alzheimer neurotoxischen Spezies, die weitere Aggregation der Oligomere zu dem bekannten pathologischen Kennzeichen des Morbus Alzheimer, den amyloiden Plaques (De Strooper et al., 2010). Diesen Weg der APP-Prozessierung bezeichnet man auf Grund der resultierenden Plaquebildung als amyloidogene Prozessierung des APP. Das Gegenstück hierzu bildet die nicht-amyloidogene Prozessierung des APP. Hierbei verhindert die Ektodomänenspaltung einer Metalloprotease-Aktivität (oft auch als α -Sekretase-Aktivität bezeichnet) in der A β -Domäne des APP die Bildung des A β -Peptids. Die Identität der physiologisch konstitutiven α -Sekretase konnte der A Disintegrin And Metalloproteinase 10 (ADAM10) zugeordnet werden (Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010). In Abbildung 2 ist die Prozessierung von APP durch α -, β - und γ -Sekretase schematisch abgebildet.

Für die Amyloid-Kaskaden-Hypothese sprechen eine Vielzahl von Beobachtungen. So führen zum Beispiel verschiedene Mutationen in APP oder Presinilin-1, die die Bildung oder die Aggregation von A β verstärken, zu Morbus Alzheimer (Goate and Hardy, 2012). Des Weiteren zeigen Personen mit Down-Syndrom, die drei chromosomale Kopien von APP aufweisen, sehr häufig klinische und neuropathologische Merkmale des Morbus Alzheimer (Millan Sanchez et al., 2012). Ein besonders überzeugendes Argument für die Amyloid-Kaskaden-Hypothese stellt des Weiteren die Identifikation einer Mutation in der Nähe der β -Sekretase-Schnittstelle von APP dar, die mit einer verringerten Prävalenz von Morbus Alzheimer in der Gruppe der Mutationsträger korreliert (Jonsson et al., 2012). Diese Mutation führt in Zellkulturanalysen zu einer signifikanten Verringerung der Produktion von sAPP β (Jonsson et al., 2012). Dies ist zumindest ein sehr starker korrelativer Hinweis darauf, dass die Amyloid-Kaskaden-Hypothese zutreffend ist. Ein endgültiger Beweis der Hypothese wird aber wohl erst durch die erfolgreiche Behandlung, beziehungsweise die Prävention, von Morbus Alzheimer durch eine Modulation der Produktion oder Aggregation von A β geführt werden können (Hardy, 2006; Selkoe, 2011).

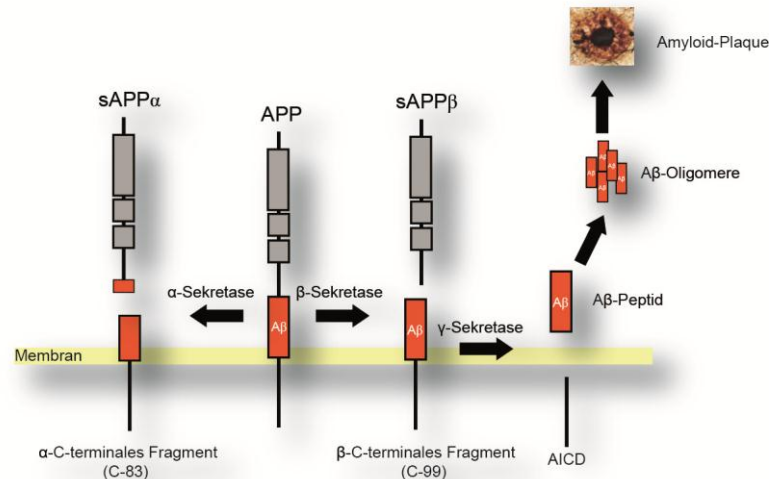


Abbildung 2: Proteolytische Prozessierung des APP. Das APP weist in seinem extrazellulären Bereich eine Heparin-bindende Domäne, eine Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne und eine Ox-2-Domäne auf. Eine von der β -Sekretase katalysierte Ektodomänenspaltung von APP führt zu einer Freisetzung der β -geschnittenen APP-Ektodomäne (sAPP β), ein C-terminales Fragment (C-99) verbleibt in der Membran. Dieses C-terminale Fragment ist ein Substrat für die γ -Sekretase und wird von dieser in der Transmembrandomäne geschnitten. Hierdurch werden das A β -Peptid und die APP-intrazelluläre Domäne (AICD) freigesetzt. Das A β -Peptid oligomerisiert infolge seiner hohen Hydrophobizität zu A β -Oligomeren. Aus den A β -Oligomeren bilden sich die für den Morbus Alzheimer typischen Amyloid-Plaques (Abbildung eines Plaques in modifizierter Form von Sánchez *et al.* (2011) übernommen). Die α -Sekretase-Aktivität kann APP im Bereich der A β -Sequenz schneiden. Dadurch kann die Bildung des A β -Peptids verhindert werden.

2.1.6 Therapieansätze bei Morbus Alzheimer und Bedeutung von Biomarkern

Verschiedene Therapieansätze gegen die Alzheimer-Erkrankung wurden bereits erwogen, wobei die meisten auf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese aufbauen (Ji and Ha, 2010). Diese Ansätze haben das Ziel, entweder die Produktion oder die Aggregation des A β -Peptids zu verhindern (Ji and Ha, 2010). In klinischen Phase-III-Studien wurden bereits der γ -Sekretase-Modulator R-Flurbiprofen, der γ -Sekretase-Inhibitor Semagacestat und der A β -Aggregations-Inhibitor Tramiprost getestet (Selkoe, 2011). Allerdings führte keiner dieser Wirkstoffe zu einem Behandlungserfolg (Golde et al., 2011; Ji and Ha, 2010; Selkoe, 2011). Auch BACE1-Inhibitoren wurden bereits in klinischen Phase-I-Studien mit Erfolg in Bezug auf die Verringerung von A β -40 und A β -42 im CSF von Studienteilnehmern getestet, allerdings wurde bisher keiner der Inhibitoren in einer Phase-II-Studie an Patienten untersucht (Strobel, 2011).

Neben diesen Wirkstoffen, die direkt auf die Produktion beziehungsweise das Aggregationsverhalten von A β abzielen, wurden auch Immuntherapien gegen Morbus Alzheimer in klinischen Studien getestet. Während eine Phase-II-Studie, bei der Patienten mit A β aktiv geimpft wurden, wegen Nebenwirkungen abgebrochen werden musste (Selkoe, 2011; Tabira, 2010), zeigte eine andere Studie mit dem gegen A β gerichteten Antikörper Bapineuzumab zumindest eine Reduktion von fibrillären Amyloid-Plaques im

Cortex (Rinne et al., 2010) und p-tau im CSF (Blennow et al., 2012). Allerdings erreichte auch diese Studie nicht ihre primären Endpunkte, d.h. es konnte keine signifikante Verbesserung der kognitiven Funktionen bei den behandelten Patienten festgestellt werden (Selkoe, 2011).

Diese klinischen Versuche lassen vermuten, dass die Amyloid-Kaskaden-Hypothese nicht zutreffend ist, da weder eine Inhibierung eines der ersten Schritte der Amyloid-Kaskade (siehe γ -Sekretase-Inhibitoren beziehungsweise Modulatoren) noch die erfolgreiche Reduktion von fibrillären Amyloid-Plaques zu einer Heilung der Erkrankten führt. Allerdings haben alle diese Versuche gemeinsam, dass Alzheimer-Patienten, das heißt Menschen, die bereits eine Neurodegeneration aufweisen, behandelt wurden. Möglicherweise ist in diesen Patienten bereits eine nicht mehr umkehrbare Kaskade an molekularen Prozessen angeschoben worden, an deren Anfang das A β -Peptid steht (Golde et al., 2011; Selkoe, 2011). Um diese Hypothese zu testen ist es notwendig, Menschen mit A β -verringernenden Medikamenten zu behandeln, die noch gar keine Patienten sind, die aber eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, innerhalb einer kurzen Zeit zu Alzheimer-Patienten zu werden, in anderen Worten also Präventionsversuche durchzuführen. Um Menschen mit einem hohen Risiko für Morbus Alzheimer zu identifizieren werden Biomarker benötigt. Zurzeit werden im klinischen Alltag hauptsächlich die Menge von A β -42, tau und p-tau im CSF gemessen, um die Diagnose Alzheimer zu bestätigen, wobei A β -42 bei Alzheimer-Patienten in der Regel reduziert und tau- und p-tau bei Alzheimer-Patienten erhöht gefunden werden (Prvulovic and Hampel, 2011). Zum Teil kommt auch Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit sogenannten Tracern, die amyloide Plaques binden und so in der Bildgebung markieren, zum Einsatz, um eine Alzheimer Diagnose zu bestätigen beziehungsweise eine Aussage zu treffen, ob ein Mensch mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (LKB) mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu einem Alzheimer-Patienten werden wird (Okello et al., 2009). Trotz einzelner Erfolge auf diesem Gebiet gibt es allerdings einen breiten Konsens, dass weitere Biomarker für die Alzheimer-Erkrankung gefunden werden müssen, um erfolgsversprechende Präventionsversuche durchzuführen, da keine der oben beschriebenen Methoden eine ausreichende Spezifität für die Transition von LKB zu manifestem Morbus Alzheimer aufweist (Golde et al., 2011; Selkoe, 2011).

2.1.7 Physiologische Funktion von APP und dessen Homologen

Die physiologische Funktion von APP ist noch weitgehend unbekannt. Auf der Grundlage der Domänenstruktur der APP-Ektodomäne kann aber auf eine Funktion von APP in der Zelladhäsion geschlossen werden (Behr et al., 1996; Multhaup, 1994). Des Weiteren lässt sich auf Grund der regulierten Intramembran-Proteolyse von APP eine Funktion von APP als Rezeptor vermuten, wobei sowohl vorstellbar ist, dass das lösliche sAPP in parakriner Weise für die Signalweiterleitung wichtig ist, als auch, dass die

liberierte intrazelluläre Domäne von APP Signale vermittelt (Cao and Sudhof, 2001; Kang et al., 1987; Lichtenthaler et al., 2011; Selkoe and Kopan, 2003).

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von APP wurden APP knock-out Mäuse generiert. Diese sind lebensfähig und zeigten in ersten Untersuchungen keine offensichtlichen Phänotypen (Muller et al., 1994; Zheng et al., 1995). Bei einer detaillierteren Analyse der Tiere wurden schwache Phänotypen in Bezug auf das Neuronenwachstum, die Bildung der Nervenfaserbündel im Vorderhirn, lokomotorische Fähigkeiten, Griffstärke und die Kupferhomöostase gefunden, womit eine Funktion von APP für die entsprechenden Prozesse postuliert worden ist (Heber et al., 2000).

APP hat zwei Homologe im Menschen, das Amyloid Precursor-Like Protein 1 (APLP1) und das Amyloid Precursor-Like Protein 2 (APLP2). Beide Proteine sind, wie APP auch, Typ-I Transmembranproteine. Während APLP1 ausschließlich in Neuronen exprimiert wird, wird APLP2 analog zu APP ubiquitär exprimiert. APLP1 und APLP2 haben eine ähnliche Domänenstruktur wie APP und sind auch Substrate für die regulierte Intramembran-Proteolyse (Jacobsen and Iverfeldt, 2009; Slunt et al., 1994; Thinakaran and Sisodia, 1994). Die Domänenstruktur von APP, APLP1 und APLP2 ist in Abbildung 3 dargestellt. APLP2 knock-out Mäuse sind genauso wie APLP1 knock-out Mäuse lebensfähig. Während für die APLP1 knock-out Mäuse als einziger Phänotyp eine Reduktion des Gewichts um circa 10 % beschrieben ist, ist für APLP2 knock-out Mäuse kein offensichtlicher Phänotyp beschrieben (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997).

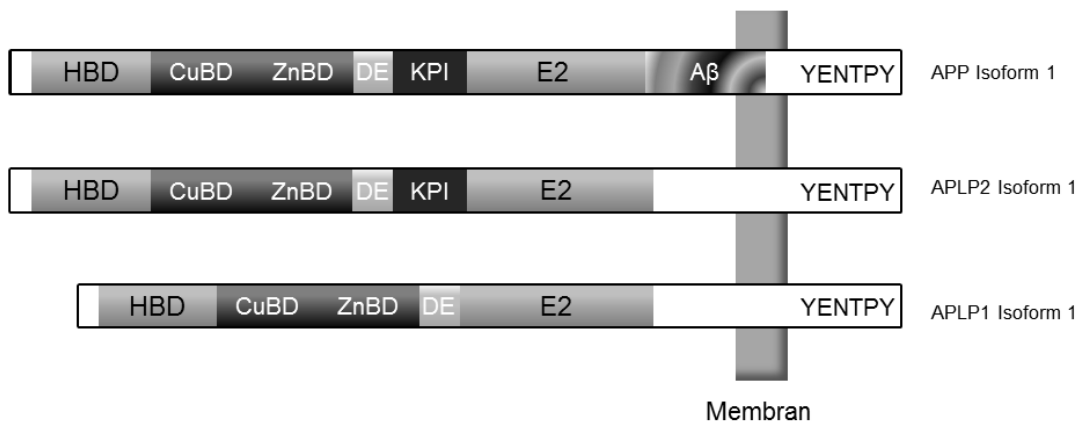


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der APP Familie. Das Amyloid Precursor Protein (APP) und seine zwei Homologen, das Amyloid Precursor-Like Protein 1 (APLP1) und das Amyloid Precursor-Like Protein 2 (APLP2) weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf. Neben einer Heparin-binde-Domäne (HBD), einer Kupfer-binde Domäne (CuBD), einer Zink-binde Domäne (ZnBD), einer sauren Domäne (DE) und einer weiteren Heparin-binde-Domäne (E2) weisen alle drei Proteine auch ein Proteinbinde-Motiv mit der Aminosäuresequenz YENTPY auf. Die Isoform 1 von APP und APLP2 weist des Weiteren noch eine Kunitz-Protease-Inhibitor Domäne auf. Die Aβ-Domäne ist nur in der Sequenz von APP enthalten (Abbildung modifiziert nach Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

Auf Grund der essentiellen Funktion von APPL (dem gemeinsamen Orhologen von APP, APLP1 und APLP2) für das Lernverhalten in *D. melanogaster* und wegen der hohen Homologie zwischen APP, APLP1 und APLP2 wurde eine redundante Funktion der Proteine vermutet. Um dies zu überprüfen, wurden „doppel-knock-out“ (dKO) Mäuse generiert, bei denen entweder APP und APLP1, APLP1 und APLP2 oder APLP2 und APP ausgeschaltet wurden. Während die APP^{-/-} APLP1^{-/-} dKO Mäuse lebensfähig sind, sterben APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} und APP^{-/-} APLP2^{-/-} dKO Mäuse perinatal (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997). Zur Überprüfung, ob die lösliche, α -geschnittene Ektodomäne von APP ausreichend ist, um die perinatale Letalität von APP^{-/-} APLP2^{-/-} Mäusen rückgängig zu machen, wurden APP^{-/-} APLP2^{-/-} dKO Mäuse generiert, die sAPP α anstelle von APP exprimieren. Bei diesen Mäusen ist die perinatale Letalität nicht mehr penetrant (Weyer et al., 2011). Hieraus lässt sich schließen, dass die lösliche Ektodomäne von APP eine physiologisch wichtige Funktion hat. Bei einem ähnlichen Experiment dagegen, bei dem sAPP β mit einem C-terminalen Flag-Tag versehen in APP^{-/-} APLP2^{-/-} dKO Mäusen exprimiert wurde, war die perinatale Letalität weiterhin penetrant (Li et al., 2010). Hieraus lässt sich schließen, dass die exakte Schnittstelle für die Vermittlung der Funktion des sAPP entscheidend ist. Ein anderer interessanter Versuch zur Analyse der Redundanz der APP-Familienmitglieder wäre die Überexpression von sAPLP2 α in APP^{-/-} APLP2^{-/-} dKO Mäusen. Aufgrund der Erkenntnis, dass α - und β -geschnittenes APP unterschiedliche Effekte haben, wird es hierfür entscheidend sein, die physiologische Version von sAPLP2 α überzuexprimieren. In diesem Zusammenhang ist eine Bestimmung der Schnittstellen von APLP2 essentiell, da diese bislang nicht bekannt sind (Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

2.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine mächtige Technik zur Identifizierung unbekannter Substanzen, zur strukturellen Analyse und Quantifizierung bekannter Substanzen sowie zur detaillierten Analyse molekularer Mechanismen (van Bramer, 1998). Damit sind die Anwendungen der Massenspektrometrie sehr vielfältig. Dies lässt sich am besten anhand einiger Beispiele darstellen: Altertumsforscher nutzten schon Massenspektrometrie zur Analyse des Alters historischer Artefakte wie des Turiner Grabtuchs (Damon et al., 1989), Astronomen zur extraterrestrischen Analyse von Wasser auf dem Mars (Hoffman et al., 2008), Forensiker zum Dopingnachweis bei Rennpferden (Eckers et al., 1982) und Lebensmittelchemiker zur Detektion von Pestiziden in Olivenöl (Ferrer et al., 2005). Neben diesen eher ausgefallenen Anwendungen der Massenspektrometrie gewinnt diese Technik aber auch in den Lebenswissenschaften zunehmend an Bedeutung (Bantscheff et al., 2012). Im folgenden Einleitungskapitel zur Massenspektrometrie sollen zunächst allgemein die Grundlagen dieser Technik erläutert und nachfolgend deren Anwendung im Bereich der Proteomik dargestellt werden. Des Weiteren wird der

aktuelle Stand der Technik in Bezug auf die quantitative massenspektrometrische Analyse des Zebrafischproteoms dargestellt.

2.2.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Stark vereinfacht gesprochen ist die Massenspektrometrie eine Technik zum Wiegen von Molekülen. Aufgrund des geringen Gewichts der zu untersuchenden Moleküle wird hierzu allerdings keine klassische Waage eingesetzt, sondern in der Regel die Bewegung der ionisierten Moleküle in einem elektrischen oder magnetischen Feld untersucht. Da die Bewegung eines geladenen Moleküls in einem elektrischen Feld sowohl von der Masse als auch von der Ladung des Moleküls abhängt, wird in der Massenspektrometrie strenggenommen nicht die Masse, sondern das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) der zu untersuchenden Moleküle bestimmt. Da die Ladung der zu untersuchenden Moleküle aber in der Regel sehr einfach aus dem Isotopenmuster bestimmbar ist, kann man aus dem massenspektrometrisch bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis recht einfach die Masse eines untersuchten Moleküls bestimmen (Abbildung 4).

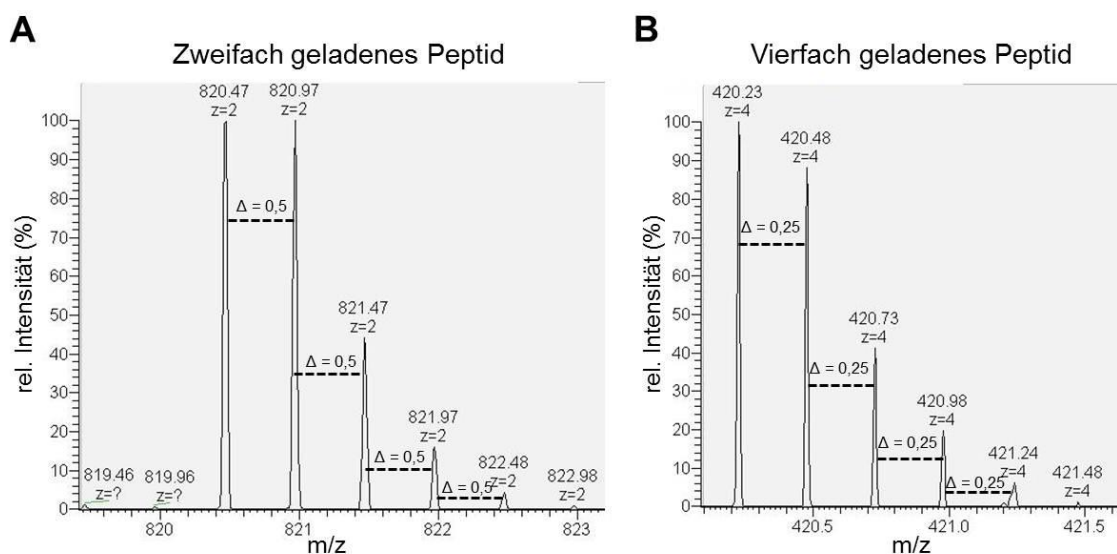


Abbildung 4: Bestimmung der Ladungszahl aus dem Isotopenmuster. (A) Beispiel eines Peptidspektrums, das mit einem ESI-Massenspektrometer aufgenommen wurde. Die relative Ladung ist gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetragen. Die Größe m/z wird typischerweise ohne Einheit angegeben, selten sieht man auch eine Umrechnung in Atommasseneinheiten pro Coulomb. Obwohl alle abgebildeten Peaks auf Peptide derselben Sequenz zurückzuführen sind, unterscheidet sich das Masse-zu-Ladungsverhältnis von zwei benachbarten Peaks jeweils um 0,5. Dies liegt darin begründet, dass die Peaks mit höheren Massen als 820,47 jeweils auf Peptidspezies zurückzuführen sind die „schwere“ Isotope eingebaut haben (zum Beispiel ^{13}C statt ^{12}C , ^{15}N statt ^{14}N oder ^2D statt ^1H). Damit ist bekannt, dass der Massenunterschied der Peptidspezies, die als benachbarte Peaks detektiert werden, genau der Masse eines Neutrons entspricht und somit eine Atommasseneinheit beträgt. Da ein Unterschied von $m/z=0,5$ zwischen benachbarten Peaks detektiert wird, kann auf eine Ladung von $z=2$ geschlossen werden. (B) Ein analoges Beispiel für ein Peptidspektrum eines Peptids der Ladung $z=4$.

Zur entscheidenden Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses gibt es verschiedene technische Realisierungen, schematisch sind sich die meisten Massenspektrometer aber sehr ähnlich. Alle Massenspektrometer weisen einen Probeneinlass auf, um die gasförmige, flüssige oder feste Probe in den Vakuumbereich des Instruments einzuführen. Im Gerät werden die zu untersuchenden Moleküle der Probe dann in einer Ionenquelle ionisiert und mittels eines elektrischen Felds in den Massenfilter beschleunigt. Der Massenfilter, das Herzstück eines jeden Massenspektrometers, dient zur Auftrennung der zugeführten Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis. Die aufgetrennten Ionen werden dann von einem Detektor detektiert und die erhaltenen Signale mittels eines Datenverarbeitungssystems ausgewertet. Der schematische Aufbau eines Massenspektrometers ist in Abbildung 5 dargestellt. Im Folgenden werden verschiedene technischen Realisierungen der einzelnen Elemente eines Massenspektrometers kurz aufgeführt und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten detailliert diskutiert.

2.2.1.1 Aufbau eines Massenspektrometers – der Probeneinlass

Der Probeneinlass eines Massenspektrometers dient zur Einbringung der in der Regel bei atmosphärischem Druck vorliegenden Proben in das Massenspektrometer, in dem normalerweise ein Vakuum oder sogar ein Hochvakuum herrscht. Probeneinlässe werden zum Beispiel durch die direkte Kopplung einer Gaschromatographiesäule an den Vakuumbereich eines Massenspektrometers oder durch das Einführen einer Platte mit kristallisierter Probe durch eine Vakuumschleuse realisiert. Für den Einlass von thermisch relativ instabilen Molekülen, die in Lösung vorliegen und die einen niedrigen Gasdruck aufweisen, wird in der Regel ein Flüssigkeitschromatographie-Einlass verwendet. Dabei wird die Flüssigkeit mit dem gelösten Probenmaterial in kleine Tropfen zerstäubt und mittels eines elektrischen Felds in einen Niedrigvakuumbereich des Instruments gezogen. Hier wird die die Probenmoleküle umgebende Flüssigkeit durch Zuführung eines Trockengases oder durch leichte Erwärmung verdampft, wobei die Probenmoleküle geladen und weiter in den Hochvakuumbereich des Instruments gezogen werden (Liuni and Wilson, 2011). Diese Form des Probeneinlasses stellt bereits eine Kombination aus einem Einlass und einer Ionenquelle dar, da die zu untersuchenden Probenmoleküle nach ihrer Einführung in das Massenspektrometer bereits ionisiert vorliegen.

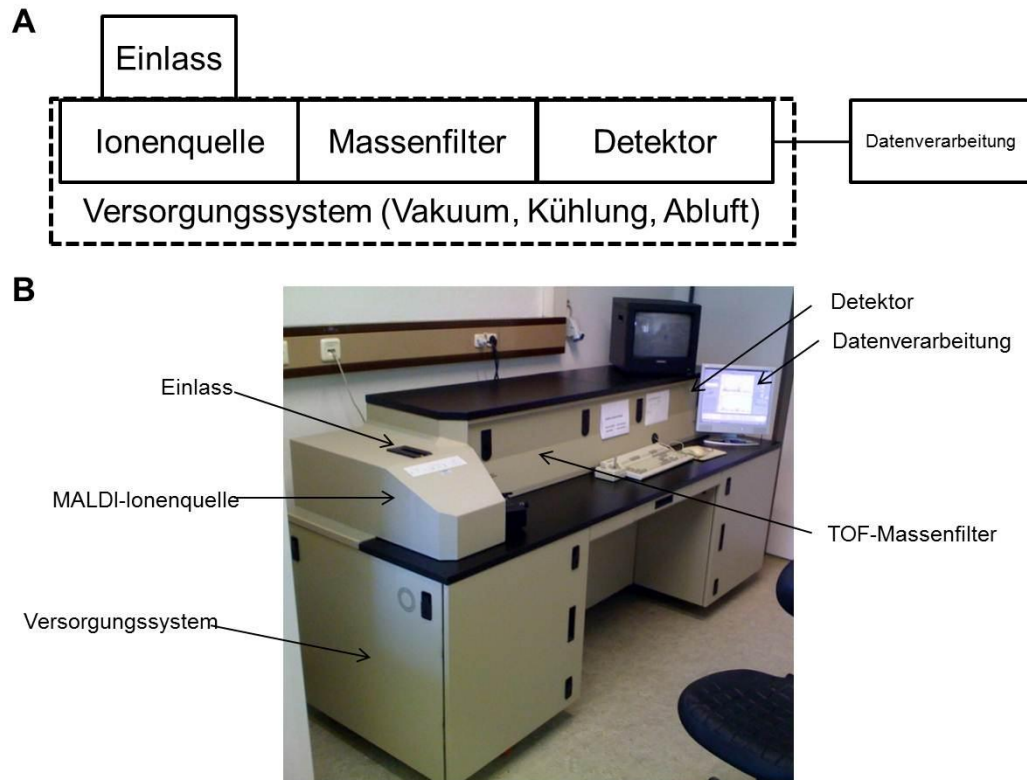


Abbildung 5: Aufbau eines Massenspektrometers. (A) Blockdiagramm des Aufbaus eines Massenspektrometers. Der Einlass dient zum Einbringen der Probe in den Vakuum- beziehungsweise Hochvakuumbereich des Instruments. Die Ionisierung der zu untersuchenden Probenmoleküle erfolgt in der Ionenquelle. Die ionisierten Moleküle werden daraufhin mittels eines in der Regel gepulsten elektrischen Felds in einen Massenfilter hinein beschleunigt und durch diesen in Abhängigkeit ihrer Masse und Ladung aufgetrennt. Die auf diese Weise aufgetrennten Moleküle werden mittels eines Detektors, technisch in aller Regel in Form eines Sekundärelektronenvervielfachers realisiert, ausgelesen und die erhaltenen Signale mit Hilfe eines Datenverarbeitungssystems in Spektren umgewandelt. (B) Analog des Blockdiagramms beschriftete Fotografie des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit „time of flight“-Massenfilter) Massenspektrometers.

2.2.1.2 Aufbau eines Massenspektrometers – Ionenquellen

Verschiedene Ionisationsmethoden werden in der Massenspektrometrie verwendet. Dazu zählen unter anderem die Elektronenionisation, die chemische Ionisation, das Fast Atom Bombardment, die Ionisation bei atmosphärischem Druck (in der Regel als Elektronenspray-Ionisation realisiert) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur Geräte mit Elektronenspray-Ionisation (ESI) oder Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) verwendet wurden, werden nur diese im Folgenden erläutert.

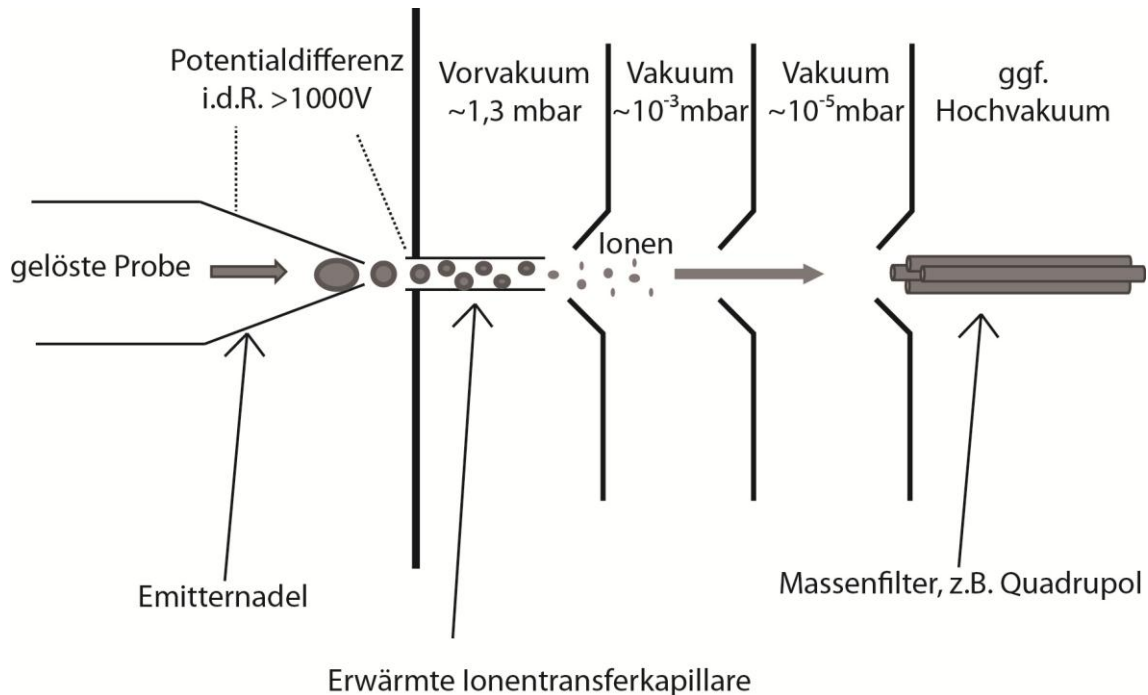


Abbildung 6: Elektronenspray-Ionisation. Bei der Elektronenspray-Ionisation (ESI) wird die gelöste Probe in kleinen Flüssigkeitstropfen von der Emitternadel emittiert. Zwischen der Emitternadel und der erwärmten Ionentransferkapillare des Massenspektrometers liegt eine Potentialdifferenz von in der Regel über 1000 V an. Die emittierten Flüssigkeitstropfen weisen auf Grund der angelegten Spannung und der in der Lösung befindlichen Säure eine Ladung auf und werden damit entlang des elektrischen Felds zwischen Emitter und Ionentransferkapillare in das Instrument hinein beschleunigt. Aufgrund der Wärme der Ionentransferkapillare und des in ihr herrschenden Vorvakuums verdampft das die Probenmoleküle umgebende Lösungsmittel schnell. Dabei wird das Verhältnis aus positiver Ladung pro Volumen beziehungsweise Oberfläche der Tropfen immer größer. Erreicht ein Tropfen das Rayleigh-Limit so „zerplatzt“ er. Dabei wird die in Form von Protonen in der Lösung enthaltene Ladung auf die Probenmoleküle verteilt, die daraufhin frei in der Gasphase vorliegen und entlang eines elektrischen Feldes weiter in das Gerät gezogen werden. Dabei passieren sie verschiedene Linsen, die die Kammern mit verschiedenen Vakua voneinander abgrenzen. Die so erzeugten ionisierten Probenmoleküle können direkt in einem Massenfilter nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt werden.

Die ESI ist die für die Analyse von komplexen Peptidmischungen am häufigsten angewendete Ionisationstechnik (Fenn et al., 1989; Yamashita and Fenn, 1984). Diese ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt und erklärt. Die ESI eignet sich besonders gut für Peptide, da diese auf Grund der Chemie der verschiedenen Seiten- und Endgruppen im sauren Milieu gut ionisiert werden können. Bei der ESI werden die Peptide beim „Zerplatzen“ der Flüssigkeitstropfen beim Erreichen des Rayleigh-Limits infolge des Verdampfens des Lösungsmittels in der Regel mehrfach protoniert. Deshalb ist es ein typisches Charakteristikum, dass Peptide in ESI-Messungen in Form von mehrfach geladenen Molekülen detektiert werden können (Glish and Vachet, 2003). Bei Peptiden mit einer Länge zwischen 5 und 15 Aminosäuren, wie sie typischerweise aus einem tryptischen Verdau von Proteinen resultieren, findet man typischerweise eine zwei- bis fünf-fache Protonierung, wobei in der Regel der N-Terminus und die Aminogruppen der Seitenketten der Peptide protoniert vorliegen. Dies hat einen großen Vorteil für die

Fragmentierung von tryptischen Peptiden, da zum Beispiel die Fragmentierung eines zweifach geladenen, tryptischen Peptids an einer Peptidbindung in jedem Fall zwei einfach geladene Produkte hervorbringt, die in der Regel beide massenspektrometrisch detektiert werden können. Ein weiterer Vorteil der ESI für die Analyse komplexer Peptidmischungen, wie diese typischerweise in der Proteomik vorkommen, ist, dass eine direkte Kopplung einer komplexitätsreduzierenden Flüssigkeitschromatographie direkt an eine ESI technisch äußerst einfach zu realisieren ist.

Bei der MALDI werden die zu untersuchenden Probenmoleküle aus der Festphase heraus ionisiert (Karas et al., 1987). Um die normalerweise in Lösung vorliegenden Probenmoleküle in die Festphase zu überführen, werden diese in der Regel in Anwesenheit von Matrix auf einer sogenannten „Targetplate“ (aus dem Englischen etwa „Zielplatte“) kristallisiert. Typischerweise werden für die Analyse von Peptiden hierbei Matrices wie Zimtsäure (*trans*-3-Phenylacrylsäure), Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure) oder Sinapinsäure ((2E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-Propensäure) verwendet (Tholey and Heinzle, 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Zimtsäure als Matrix verwendet, da diese in der Regel zu einer besonders homogenen Kristallisation führt (Szajli et al., 2008). Der Ionisationsmechanismus der MALDI beruht auf dem Beschuss der Probenmolekül-Matrixkristalle mit einem Laser. Die von den Matrixmolekülen dabei aufgenommene Energie führt zu einem „Herausschleudern“ von Matrix- und Probenmolekülen von der Oberfläche der Targetplate. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Stabilisierung der energetisch hoch angeregten Matrixmoleküle Kationen auf die Probenmoleküle M übertragen werden, so dass $[M+X]^+$ entstehen (in der Regel gilt $X=H$, aber auch $X=Na$ oder K kann beobachtet werden). In der Peptidanalytik werden bei der MALDI meist einfach positiv geladene Peptide generiert, die dann mittels eines elektrischen Feld in das Massenspektrometer beschleunigt werden können (Karas et al., 2000). Ein Vorteil der MALDI ist, dass die Targetplate über ein Schleusensystem direkt in den Vakuum beziehungsweise Hochvakuumbereich des Massenspektrometers eingebracht werden kann und die Ionisierung somit direkt im später auch für die Analyse verwendeten Vakuumbereich stattfinden kann. Wegen der niedrigen quantitativen Reproduzierbarkeit (Szajli et al., 2008) und der technisch nur „offline“ realisierbaren Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und MALDI (Hu and Mechref, 2012) wird die MALDI-basierte Massenspektrometrie fast ausschließlich für Proben niedriger Komplexität angewendet. Dies trifft auch auf die Anwendung im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu. Eine Ausnahme von dieser Regel stellt allerdings das MALDI-Imaging dar, bei dem hochkomplexe Proben mittels MALDI analysiert werden. Dabei werden die zu untersuchenden Moleküle direkt aus Gewebeschnitten heraus ionisiert. Die geringe räumliche Auflösung der Ionisierung und die hohe Komplexität der Proben stellen allerdings eine klare Limitierung dieser Anwendung dar (Seeley and Caprioli, 2011).

Für die Entwicklung der ESI und die Anwendung von MALDI auf Makromoleküle wurde John B. Fenn (ESI) und Koichi Tanaka (MALDI) im Jahr 2002 der Nobelpreis für Chemie verliehen.

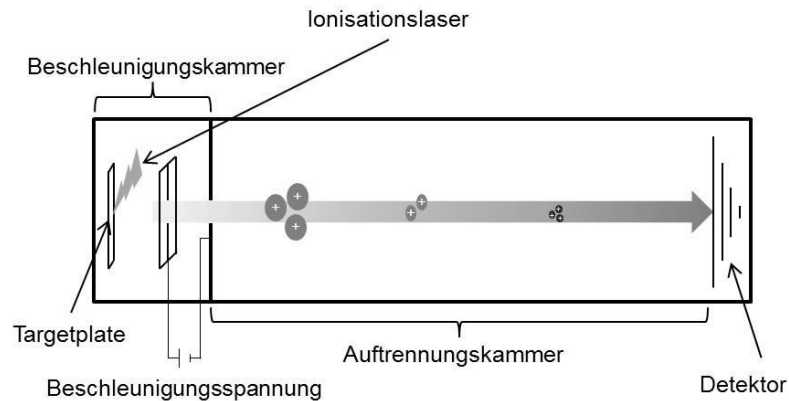
2.2.1.3 Aufbau eines Massenspektrometers – der Massenfilter

Aufgabe des Massenfilters in einem Massenspektrometer ist es, die verschiedenen Probenmoleküle nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufzutrennen. Dazu kommen verschiedene technische Realisierungen zum Einsatz. Unter anderem werden TOFs (kurz für „Time-of-flight“, aus dem Englischen etwa „Zeit des Flugs“), Quadrupole (Yost and Enke, 1978), Sektoren (Cottrell and Greathead, 1986), lineare Ionenfallen (Stafford et al., 1984), Fourier-Transformations-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Filter (Marshall et al., 1974) oder Orbitrap-Massenfilter (Makarov, 2000) verwendet (Glish and Vachet, 2003). Im Folgenden soll nur auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Massenfilter, das heißt den TOF-Massenfilter, die lineare Ionenfalle und den Orbitrap-Massenfilter, und deren physikalische Grundprinzipien eingegangen werden.

Im TOF-Massenfilter werden die zu untersuchenden ionisierten Probenmoleküle nach ihrer Geschwindigkeit aufgetrennt. Hierzu werden sie nach ihrer gepulsten Generierung, zum Beispiel durch MALDI, in einem elektrischen Feld definierter Länge und Stärke beschleunigt. Alle Ionen gleicher Ladung nehmen dabei die gleiche Menge Energie auf. Diese Energie wird in den Ionen hauptsächlich in Form kinetischer Energie gespeichert, die Ionen werden also beschleunigt. Die erreichte Endgeschwindigkeit hängt dabei von der Masse der Ionen und ihrer Ladung ab, wobei die Endgeschwindigkeit invers mit der Wurzel aus dem Masse-zu-Ladungsverhältnis des jeweiligen Ions korreliert. Die Geschwindigkeit der Ionen wird im TOF-Massenfilter dadurch bestimmt, dass die Zeit gemessen wird, die die Ionen benötigen, um eine definierte Strecke in einer Auftrennungskammer zurückzulegen (Glish and Vachet, 2003). Eine schematische Skizze des im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Voyager DE STR TOF-Massenspektrometers ist in Abbildung 7A dargestellt, eine Fotografie in Abbildung 5B.

Die lineare Ionenfalle ist ein weiterer für die vorliegende Arbeit verwendeter Massenfilter. In der linearen Ionenfalle werden die zu untersuchenden ionisierten Probenmoleküle in einem komplexen elektrischen Feld „eingefangen“. Ist eine gewisse Menge an Ionen erreicht, so wird das Feld mittels einer an die Begrenzungen der Falle angelegten, steigenden Wechselspannung so moduliert, dass die Ionen das Feld in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses in Richtung des Detektors verlassen und in diesem ausgelesen werden können. Dabei macht man sich die physikalische Eigenschaft der Ionen zu Nutze, dass diese mit einer umso amplitudenreicheren Schwingung auf das durch die Wechselspannung generierte Feld reagieren, je geringer ihre Masse

A



B

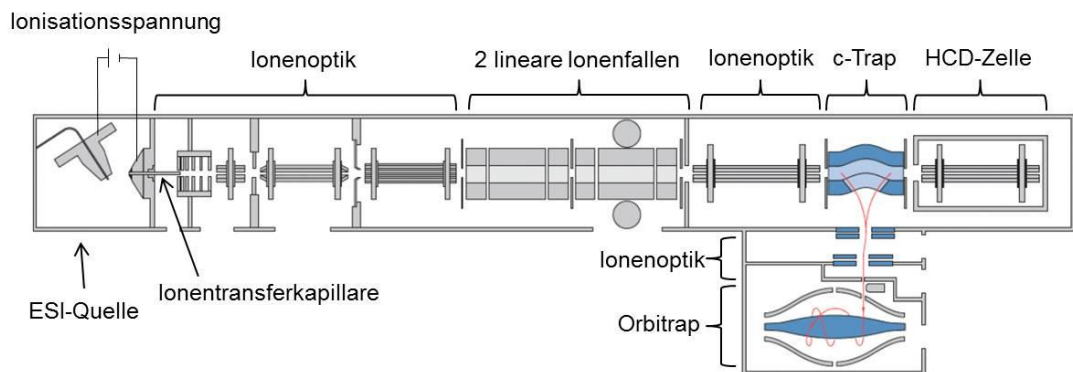


Abbildung 7: Schematische Skizze der verwendeten Massenspektrometer. (A) Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers. Die Ionisation der Proben findet durch einen Laserpuls des Ionisationslasers statt. Die ionisierten Probenmoleküle werden in einem definierten elektrischen Feld beschleunigt und in die Auftrennungskammer geschossen. Hier werden die ionisierten Probenmoleküle nach ihrer Geschwindigkeit aufgetrennt. Da die Geschwindigkeit der Ionen invers proportional zur Wurzel aus deren Masse-zu-Ladungsverhältnis ist, kann aus der für die Strecke in der Auftrennungskammer benötigte Zeit das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ionen bestimmt werden. Das Schema entspricht dem linearen Modus des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Voyager DE STR Massenspektrometers (B) Schematischer Aufbau des im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten LTQ Velos Orbitrap Pro Massenspektrometers. Das Massenspektrometer wird in der Regel mit einer ESI- beziehungsweise einer Nanospray-Quelle verwendet. Die Ionen werden durch die beheizte Ionentransferkapillare in das Gerät transferiert. Mittels einer komplexen Ionenoptik werden die ionisierten Probenmoleküle weiter durch das Gerät in Kammern immer höheren Vakuums transferiert. Öffnungen in der Seite des Geräts stellen dabei Verbindungen zu den Vakuumpumpen, beziehungsweise im Falle der Orbitrap zu den Turbopakuumpumpen, dar. An die Ionenoptik schließen zwei lineare Ionenfallen an. Die erste Ionenfalle arbeitet dabei mit einem um circa den Faktor 10 höheren Druck als die zweite. Damit hat die erste Ionenfalle bessere Eigenschaften für die Isolation und Fragmentierung von Ionen, die zweite dagegen bessere Eigenschaften für das Auslesen der Ionen. Entsprechend ist auch nur die zweite lineare Ionenfalle mit Detektoren ausgestattet. Die Sekundärelektronenvervielfältiger sind hier als Kreise an den Seiten der zweiten linearen Ionenfalle dargestellt. Mittels einer weiteren Ionenoptik lassen sich die Ionen statt in den linearen Fallen ausgelesen zu werden auch in die C-Trap weiter transferieren. Die C-Trap wiederum dient zum Sammeln der Ionen und zum Einschleusen der Ionen in den Orbitrap-Massenfilter, der hochaufgelöste Spektren generiert. Das Schema ist modifiziert nach einer Präsentation des European Training Institutes von Thermo Fisher Scientific.

ist beziehungsweise je stärker sie geladen sind. Damit hängt die Schwingung linear von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ab, das aus der Zeitdauer zwischen dem Anlegen der steigenden Wechselfeldspannung und der Ionendetektion geschlossen werden kann (Glish and Vachet, 2003). Eine schematische Skizze des im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten LTQ Velos Orbitrap Pro ist in Abbildung 7B dargestellt. Hierbei sind auch die zwei verbauten linearen Ionenfallen mit den dazugehörigen Detektoren (als seitliche Kreise an der zweiten Ionenfalle dargestellt) schematisch dargestellt.

Der Massenfilter, der Aufnahmen mit der zurzeit höchstmöglichen Auflösung zulässt, ist der Fourier-Transformations-Ionen-Cyclotron-Resonanz-(FTICR)-Massenfilter. In einer technischen Realisierung mit einem Magneten der Stärke 9,4 Tesla sind hierbei Auflösungen von über 800,000 möglich (Kaiser et al., 2011). Die Auflösung ist dabei als Quotient der Breite eines Peaks (Δm) bei einer definierten Masse (m) definiert und hat damit keine Einheit:

$$\text{Auflösung} = \frac{\Delta m}{m}$$

Dem FTICR-Massenfilter liegt das physikalische Prinzip zugrunde, dass Ionen, die sich in einem magnetischen Feld bewegen, einen Strom in einem von ihnen passierten Plattenkondensator induzieren, dessen Frequenz invers mit ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis korreliert. Der Nachteil dieser Geräte ist, dass ihre Auflösung von der Stärke des verwendeten Magneten abhängt, das heißt, dass für hohe Auflösungen starke Magneten nötig sind, die sehr kostenintensiv sind. Der von Alexander Makarov entwickelte Orbitrap-Massenfilter (Hardman and Makarov, 2003; Makarov, 2000) beruht auf einem vergleichbaren physikalischen Prinzip und erlaubt ähnlich hohe Massenaufösungen, erfordert dabei jedoch keine Magnetfelder. Beim Orbitrap-Massenfilter werden die zu untersuchenden Ionen tangential auf eine Kreisbahn um eine zentrale Spindel gezwungen. Zur Analyse von Kationen weist die zentrale Spindel dabei eine hohe negative Ladung auf. Dadurch werden die Kationen auf eine Kreisbahn um die Spindel gezwungen. Die Ionen beschreiben allerdings keine reine Kreisbahn um die zentrale Spindel, sondern oszillieren zusätzlich in axialer Richtung der Spindel. Die axiale Oszillation wird dadurch erreicht, dass die Ionen nicht zentral in die Falle eingelassen werden sondern seitlich versetzt (siehe Abbildung 8). Die durch diese Oszillation der Ionen entlang der axialen Richtung der zentralen Spindel induzierte Spannung wird an dem fallenbegrenzenden Zylinder abgegriffen und mittels eines Verstärkers verstärkt. Nach einer Fourier-Transformation der verstärkten Spannung, lässt sich aus der Frequenz der Spannung auf das Masse-zu-Ladungsverhältnis der oszillierenden Ionen rückschließen (für genaue Berechnung siehe Makarov, 2000). Mit dieser Technologie lassen sich Auflösungen im Bereich von über 240.000 (bei 400 m/z) realisieren (Michalski et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein LTQ Velos Or-

bitrap Pro Massenspektrometer verwendet, das sowohl zwei lineare Ionenfallen wie auch einen Orbitrap-Massenfilter aufweist (Schemaskizze siehe Abbildung 7B).

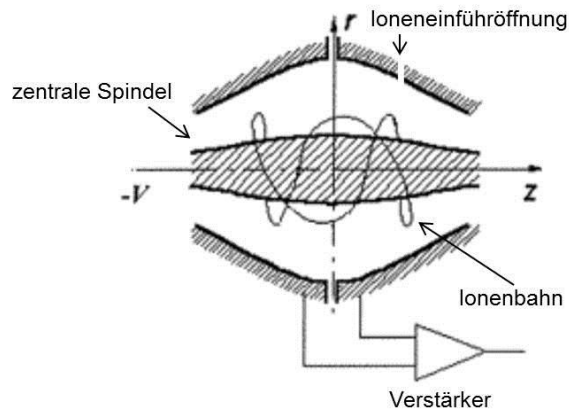


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Orbitrap-Ionenfalle. Prinzipskizze eines Orbitrap-Massenfilters im positiven Modus (nach Makarov, 2000). Dieser besteht aus einer zentralen Spindel, an der eine negative Spannung anliegt (-V). Umgeben ist die zentrale Spindel von der konisch zulaufenden zylinderförmigen Fallenbegrenzung. Diese hat eine Ioneneinführöffnung, die seitlich der geometrischen Mitte des Zylinders liegt. Kationen, die durch diese Öffnung schnell genug in die Falle eingebracht werden, bewegen sich auf einer Kreisbahn um die zentrale Spindel. Die Ionenbahn oszilliert außerdem in z-Richtung entlang der zentralen Spindel. Durch das Oszillieren der Ionen entlang der z-Achse wird eine Spannung in dem die Spindel umgebenden Zylinder induziert, die abgegriffen, verstärkt und mittels Datenverarbeitungsprogrammen ausgewertet werden kann. Aus der Frequenz dieser Spannung lässt sich mit hoher Auflösung auf das Masse-zu-Ladungsverhältnis der untersuchten Ionen rückschließen.

2.2.1.4 Aufbau eines Massenspektrometers – der Detektor

In Massenspektrometern verwendete Detektoren messen in der Regel die Ladung oder die Bewegung der zu detektierenden Ionen. Zur Messung der Ladung werden meist Elektronenvervielfacher genutzt. Beispiele hiervon sind Kopplungen aus Faraday-Bechern und Sekundärelektronenvervielfachern oder Ionen-zu-Photonen-Detektoren (Damon et al., 1989; Glish and Vachet, 2003). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Massenspektrometer nutzen Mikrokanalplatten zum Auslesen der zu analysierenden Ionen. Zur Messung der Bewegung beziehungsweise des Momentums der zu untersuchenden Ionen werden die durch die Bewegung der Ionen induzierten Spannungen von Kondensatoren abgegriffen (siehe auch Abbildung 8). Ein prinzipieller Unterschied zwischen diesen beiden Techniken ist, dass die Ionen beim Auslesen mittels eines Faraday-Bechers verbraucht werden, während sie beim Auslesen über einen induzierten Strom theoretisch noch weiter transferierbar sind (Makarov, 2000). Diese technische Möglichkeit ist allerdings in keinem der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte realisiert.

2.2.1.5 Tandem-Massenspektrometrie

Um bei der Massenspektrometrie neben der reinen Masseninformation auch strukturelle Informationen über ein zu untersuchendes Probenmolekül zu erhalten, wird die Tandem-Massenspektrometrie verwendet (Glish and Goeringer, 1984; Yost and Enke, 1978). Bei dieser wird zunächst ein Spektrum aller zu einem Zeitpunkt in das Massenspektrometer einströmenden Ionen aufgenommen. Anschließend werden die zu untersuchenden Ionen isoliert, fragmentiert und die resultierenden Fragmente dann in einem Massenfilter ausgelesen. Bei der Analyse von Peptiden erlaubt dies beispielsweise die Bestimmung der Peptidsequenz auf der Basis der produzierten Fragmente (Hunt et al., 1986). Beispiele für typischerweise verwendete Tandem- (oder analog sogar Triple-) Massenspektrometer sind TOF-TOFs, Quadrupol-TOFs, LTQ Orbitraps oder Triple-Quadrupole (Glish and Vachet, 2003; Olsen et al., 2009).

2.2.2 Grundlagen der MS-basierten Proteomik

Eine wichtige Anwendung findet die oben beschriebene Tandem-Massenspektrometrie in der Proteomik. Diese vor ungefähr zwanzig Jahren aufgekommene Disziplin der Lebenswissenschaften beschäftigt sich mit der qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen (Thelen and Miernyk, 2012). Die steigende Relevanz dieser Technik für die Lebenswissenschaften, beziehungsweise zumindest ihre Beliebtheit, lässt sich an der stetig steigenden Anzahl an Publikationen im Bereich der Proteomik ermessen (siehe Abbildung 9).

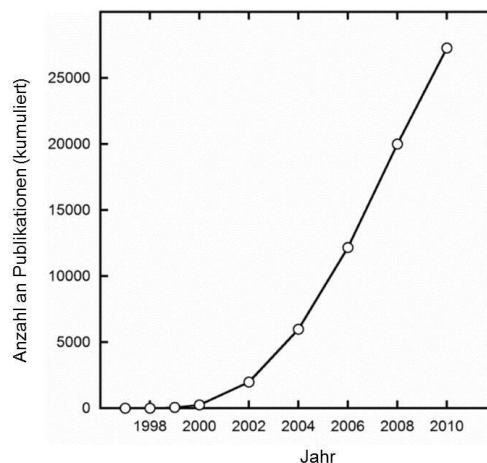


Abbildung 9: Anzahl an Publikationen in der Proteomik seit 1997. Die kumulierte Anzahl an Publikationen in der Proteomik wurde von Thelen und Miernyk (2012) mittels Suche in der Datenbank Pubmed mit dem Suchbegriff „proteomics“ ermittelt.

Während der Begriff der Proteomik wie oben definiert breit für alle Arten der qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen verwendet werden kann, wird er oft auch in einer engeren Definition für die auf Massenspektrometrie basierende Analyse von

Proteinen verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Begriff nachfolgend in dieser engeren Definition verwendet werden.

2.2.2.1 Bottom-up Proteomik

Ziel proteomischer Experimente ist es in der Regel, möglichst viele Proteine in einer Probe zu identifizieren und gegebenenfalls ihre Abundanz zwischen zwei Proben zu quantifizieren. Bei der hauptsächlich angewandten bottom-up (aus dem Englischen etwa „von unten nach oben“) Methode der Proteomik werden die in einer Probe vorhandenen Proteine hierfür zunächst *in vitro* mit der Protease Trypsin verdaut. Hierdurch erhält man kürzere Peptide, die massenspektrometrisch einfacher zu untersuchen sind als intakte Proteine (Han et al., 2008; Thelen and Miernyk, 2012). Diese Peptide werden dann gegebenenfalls präfraktioniert (zum Beispiel mittels isoelektrischer Fokussierung oder *offline* Anionenaustauschchromatographie) und die einzelnen Fraktionen in einer Kopplung aus einem Flüssigkeitschromatographen mit einem Tandem-Massenspektrometer (kurz LC-MSMS) analysiert. Hierbei werden sowohl Spektren der intakten Peptide aufgenommen (sogenannte MS1-Spektren) als auch die Fragmentspektren (sogenannte MS2-Spektren) von einzelnen, isolierten und fragmentierten Peptiden (siehe 2.2.1.5). Aus dem Masse-zu-Ladungsverhältnis des intakten Peptids und den dazugehörigen Fragmentspektren lässt sich bioinformatisch, auf Grundlage einer Proteindatenbank, die Identität des jeweiligen Peptids bestimmen und dem Protein zuordnen, aus dem es durch den tryptischen Verdau hervorgegangen ist. Häufig verwendete Algorithmen zur Identifikation von Peptiden aus Tandem-Massenspektrometriedaten sind Sequest (Eng et al., 1994) und Mascot (Perkins et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hierfür der Andromeda-Algorithmus verwendet, der zu ähnlich guten Ergebnissen wie der Mascot-Algorithmus führt (Cox et al., 2011). Der experimentelle Ablauf der bottom-up Proteomik wird in Abbildung 10 dargestellt.

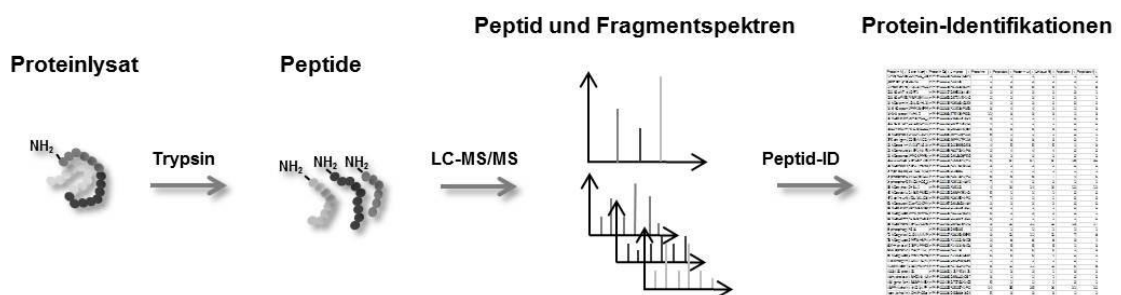


Abbildung 10: Experimenteller Ablauf der bottom-up Proteomik. Bei der bottom-up Analyse werden Proteine mittels eines proteolytischen Verdau, in der Regel mit einer rekombinanten Form von Trypsin, in durchschnittlich 6 bis 12 Aminosäuren lange Peptide geschnitten. Diese Peptide werden mittels LC-MS/MS analysiert. Die resultierenden MS1 und MS2 Spektren werden mit datenbankbasierten Peptididentifikationsalgorithmen wie Sequest, Mascot oder Andromeda ausgewertet. Hierdurch können die den jeweiligen Spektren zugrunde liegenden Peptide und deren Sequenzen bestimmt und dem jeweiligen Protein beziehungsweise der jeweiligen Proteingruppe zugeordnet werden.

2.2.2.2 Quantitative Proteomik

Zur quantitativen proteomischen Analyse können verschiedene Techniken verwendet werden. Man kann im Prinzip drei grundlegend unterschiedliche, häufig verwendete Techniken unterscheiden: 2D-Gelelektrophorese, markierungsfreie Massenspektrometrie und markierungsbasierte Massenspektrometrie. Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die intakten Proteine der zu vergleichenden Proben auf 2D-Gelen aufgetrennt, mittels Silbermarkierung sichtbar gemacht und die Intensitäten der Proteine an den verschiedenen Stellen zwischen den beiden Proben verglichen. Ist an einem Punkt die Intensität für eine der beiden Proben signifikant stärker, so wird ein diesen Punkt enthaltendes Stück aus dem Gel ausgeschnitten. Das enthaltene Protein wird mittels eines tryptischen Verdau einer massenspektrometrischen Analyse und damit einer Identifizierung zugänglich gemacht. Um eine exaktere Quantifizierung zwischen den beiden zu untersuchenden Proben zu ermöglichen, wurde die sogenannte 2D-differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) entwickelt, bei der die Proteine der zu vergleichenden Proben zunächst *in vitro* mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und dann auf demselben Gel analysiert werden können (Minden, 2012). Neueste Entwicklungen von 2D-DIGE Systemen erlauben die Darstellung und Quantifizierung von über 10.000 Punkten (Zabel and Klose, 2009), wobei die Identifizierung immer auf ein paar wenige Punkte beschränkt bleibt (Thelen and Miernyk, 2012).

Während bei der 2D-DIGE-Technologie ein Gel zur quantitativen Analyse verwendet wird, gibt es, wie oben bereits aufgeführt, mit der markierungsfreien und der markierungsbasierten Shotgun-Analyse auch gel-freie Techniken zur quantitativen Proteomik. Unter dem Begriff Shotgun-Analyse versteht man, dass vor dem tryptischen Verdau keine Vorfraktionierung der Proteine stattfindet.

Bei der markierungsbasierten Proteomik nutzt man eine Markierung einer oder mehrerer der zu untersuchenden Proben mit schwereren Isotopen, um diese nach einem Vermischen der Proben im Massenspektrometer aufgrund des Massenunterschieds voneinander unterscheiden zu können. Man unterscheidet dabei Techniken, bei denen die Isotopenmarkierung schon im intakten Organismus, beziehungsweise in der Zellkultur auf der Ebene der intakten Zelle, stattfindet von solchen, bei denen erst nach der Zell- beziehungsweise Gewebslyse eine Markierung vorgenommen wird. Ersteres ist durch die SILAC-Technik (stable isotope labeling in cell culture, engl. für „stabile Isotopenmarkierung in der Zellkultur“) möglich. Isotopenmarkierte Aminosäuren werden hierbei Zellen beziehungsweise ganzen Organismen gefüttert, um eine möglichst proteomweite Inkorporation zu erreichen (Kruger et al., 2008; Ong et al., 2002). Eine differentielle Markierung ist dabei möglich, da zum Beispiel die Aminosäure Lysin je nach experimenteller Bedingung „leicht“ (nur ^{12}C und ^{14}N , + 0 Da), „schwer“ (^{13}C und ^{14}N , + 6 Da) oder „super-schwer“ (^{13}C und ^{15}N , +8 Da) verfüttert werden kann. Zur quantitativen proteomischen Analyse mittels SILAC, kann man die Zellen beziehungsweise die zu

untersuchenden Gewebeproben der verschiedenen experimentellen Bedingungen noch vor der Herstellung der Proteinlysate vermischen. In der Massenspektrometrie kann man dann auf Grund des Massenunterschieds der von den Peptiden der verschiedenen Proben stammenden Peaks auf die relative Menge des jeweiligen Peptids in den einzelnen Proben rückschließen. Der große Vorteil der SILAC-Methode ist die Möglichkeit der frühen Probenvermischung, da sich Probenvorbereitungsunregelmäßigkeiten somit auf die unterschiedlichen Proben identisch auswirken und damit die Quantifizierung nicht verfälschen. Derzeit sind 2-plex und 3-plex SILAC Ansätze üblich (Mann, 2006).

Eine andere Möglichkeit der markierungsbasierten quantitativen Proteomik ist iTRAQ (kurz für „isobaric tags for relative and absolute quantitation“ aus dem Englischen etwa „Isobare Markierung für relative und absolute Quantifizierung“). Hierbei werden zunächst Proteinlysate der zu vergleichenden Proben hergestellt und freie Amine mit einem isobarischen Anhang versehen. Die Proben werden dann vermischt und per LC-MSMS analysiert. Bei der Fraktionierung im MS2-Schritt fällt von den Peptiden der unterschiedlichen Proben ein jeweils unterschiedlich schweres Fragment ab. Das Verhältnis der Intensitäten der Peaks der abgefallenen Fragmente gibt dabei das Verhältnis der zugrunde liegenden Peptide an. Vorteil dieser Methode ist es, dass bis zu 8-plex Markierungen möglich sind, das heißt bis zu 8 unterschiedliche Proben quantitativ verglichen werden können. Nachteil ist bei dieser Methode, dass sich Probenvorbereitungsunterschiede zwischen den zu vergleichenden Proben auf die Quantifizierung auswirken (Evans et al., 2012).

Bei einer weiteren markierungsbasierten Technik der quantitativen Proteomik, der Dimethyl-Markierung (DMT), modifiziert man ebenfalls freie Amino-Gruppen der Peptide der unterschiedlichen experimentellen Gruppen mittels Methylierung mit deuteriertem oder nicht-deuteriertem Formaldehyd. Dies führt bei der massenspektrometrischen Analyse der Proben zu einer möglichen Unterscheidung und Quantifizierung der Peptide der verschiedenen experimentellen Gruppen. Nachteil ist wie bei der ITRAQ-Methode, dass sich Probenvorbereitungsartefakte auf die Quantifizierung auswirken. Des Weiteren wird die Komplexität der Probe auf MS1-Ebene, wie bei der SILAC-Technik ebenfalls, um mindestens einen Faktor zwei erhöht. 2-plex und 3-plex Ansätze sind bei der DMT-basierten quantitativen Proteomik möglich (Boersema et al., 2009).

Bei der markierungsfreien quantitativen Proteomik werden die Proben der unterschiedlichen experimentellen Gruppen getrennt voneinander analysiert. Eine Quantifizierung zwischen den Proben beruht dabei entweder auf der Anzahl an Spektren die für ein Peptid in den unterschiedlichen Experimenten aufgenommen werden können (diese Methode wird im Englischen auch als „spectral counting“ bezeichnet) oder bei Massenspektrometern mit einer hohen Auflösung auf der Bestimmung der Intensität mit der ein Peptid detektiert werden kann. Für diese Form der Quantifizierung werden Algorithmen

benötigt, die in der Lage sind 3D-MS1-Spuren aus massenspektrometrischen Aufnahmen zu isolieren, deren Fläche zu berechnen und nach einer Normalisierung auf Grundlage der lokalen Gesamtintensität zwischen den einzelnen Proben zu quantifizieren. Während markierungsfreie Ansätze in der Vergangenheit noch nicht akkurat genug für die Analyse komplexer biologischer Proben waren, ist die Genauigkeit und Zuverlässigkeit heute ausreichend, um eine kostengünstige Alternative zur markierungsbasierten quantitativen Proteomik darzustellen (Neilson et al., 2011).

2.2.3 Proteomik im Zebrafisch

Der Zebrafisch, lateinisch *Danio rerio*, ist ein häufig eingesetzter Modellorganismus aus dem Unterstamm der Vertebraten, der vor allem zur Untersuchung entwicklungsbiologischer, aber zunehmend auch zellbiologischer, genetischer oder medizinischer Fragestellungen eingesetzt wird (Bakkers, 2011; Eimon and Ashkenazi, 2010; Kabashi et al., 2011). Proteomische Methoden zur Analyse des Zebrafisch-Proteoms werden seit ungefähr einer Dekade eingesetzt (Forné et al., 2010). Zur Quantifizierung wurde hierfür bisher fast exklusiv die 2D-Gelelektrophorese-Technik angewendet, die regelmäßig eine Quantifizierung von bis zu 100 Proteinen erlaubt. Um die in der Zwischengelvarianz der klassischen 2D-Gelelektrophorese begründeten Limitierungen zu überwinden, wird seit Neustem auch die oben erklärte 2D-DIGE-Technik zur quantitativen Analyse von Zebrafisch-Proteomen verwendet. Diese ermöglicht derzeit die Detektion von über 1.000 Gelpunkten ausgehend von Zebrafischproteomen (Gundel et al., 2012; Ponnudurai et al., 2012; Zhang et al., 2012). Die den Punkten zugrunde liegenden Proteine sollten theoretisch bestimmbar und deren differentielle Intensität für die meisten Gelpunkte quantifizierbar sein. Allerdings stellt die Identifizierung aller Gelpunkte auf Grund des hohen Aufwands bei der Probenvorbereitung und der Länge der benötigten Messzeit keine realistische Option dar (Thelen and Miernyk, 2012). Des Weiteren stellen auch die Reproduzierbarkeit, Maskierungseffekte durch hochabundante Proteine, Mikroheterogenität durch post-translationale Modifikationen und Proteindegeneration, neben der hohen benötigten Messzeit, klare Limitierungen der 2D-DIGE-Technik gegenüber markierungsbasierten oder auch markierungsfreien Shotgun-Analysen dar (Wu et al., 2006).

Während markierungsfreie Shotgun-Analysen, mit der Ausnahme einer Arbeit im Bereich der Phosphoproteomik (Soderblom et al., 2011) für den Zebrafisch noch nicht durchgeführt wurden, sind bereits zwei markierungsbasierte Analysen veröffentlicht worden (Lemeer et al., 2008; Westman-Brinkmalm et al., 2011). Westman-Brinkmalm et al. (2011) haben versucht, Zebrafische mit isotopenmarkierten Aminosäuren zu füttern und hierdurch eine SILAC-Markierung des Zebrafisch-Proteoms zu erreichen. Die proteomische Analyse führten sie sowohl mittels 1D-Gelelektrophorese als auch mittels in-Lösungs-Verdau durch. Allerdings zeigten nur bis zu 310 ihrer maximal 1015 identifizierten Proteine eine Inkorporation von markierten Aminosäuren und auch dies

nur mit einer Inkorporationseffizienz von 5 - 45 %, je nach untersuchtem Gewebe und biologischem Replikat (Westman-Brinkmalm et al., 2011). Lemeer et al. (2008) untersuchten das Zebrafisch-Proteom quantitativ mittels DMT mit einem Fokus auf der phosphoproteomischen Analyse. Ihre Probenvorbereitung führten sie ebenfalls mittels in-Lösungs-Verdau durch. Dieser Ansatz erlaubte ihnen die Quantifizierung von 348 Phosphorylierungsstellen und die Expressionsanalyse von 1400 Proteinen, die sie mit mindestens einem eindeutigen Peptid identifiziert haben (Lemeer et al., 2008).

In einer sehr zeit- und ressourcenintensiven, nicht quantitativen Studie des Zebrafisch-flossen-Proteoms konnten außerdem mittels in-Lösungs-Verdau-basierter Shotgun-Analyse 5716 Proteinidentifikationen erreicht werden (De Souza et al., 2009). Diese höchste bisher publizierte Anzahl an Proteinidentifikationen ist allerdings nicht vollständig mit den anderen publizierten Zahlen vergleichbar, da sie eine Falsch-Positiv-Rate von 5 % auf Peptidebene zuließ (De Souza et al., 2009).

3 Ziele der Arbeit

Die regulierte Intramembran-Proteolyse (RIP) ist ein zellulärer Mechanismus zur Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Die molekularen Schritte der RIP des Amyloid Precursor Proteins (APP) sind auf Grund der Relevanz dieses Prozesses für die Pathogenese des Morbus Alzheimer in der Vergangenheit sehr gut erforscht worden (Lichtenthaler et al., 2011). Dies trifft nicht in gleichem Maße für das Amyloid Precursor-Like Protein 2 (APLP2) zu, das zumindest teilweise funktionell redundant zu APP ist (Heber et al., 2000). So ist für APLP2 weder die genaue Identität der Enzyme bekannt, die die Ektodomänenspaltung katalysieren, noch sind die Schnittstellen und damit die exakten Fragmente bekannt, die bei der RIP von APLP2 entstehen (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). Ziel dieser Arbeit war es daher, die Identität der konstitutiven, physiologischen α -Sekretase bezüglich der Ektodomänenspaltung von APLP2 zu bestimmen. Außerdem sollten die exakten APLP2-Schnittstellen durch α -, β - und γ -Sekretase identifiziert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob familiäre Alzheimer-Mutationen der γ -Sekretase-Komponente Presenilin 1 prinzipiell zu einer Veränderung des Intramembranschnitts von APLP2 führen können.

Während im ersten Teil der Arbeit also eine kandidatenbasierte Analyse der RIP eines bestimmten Substrats durchgeführt werden sollte, war es das Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit, ein Screening-Verfahren zur Identifizierung von RIP-Protease-Substraten zu etablieren. Dabei sollten die Substrate möglichst *in vivo* identifiziert werden. Als Protease für einen solchen Screen wurde die RIP-Protease BACE1, die auch APLP2 schneidet, ausgewählt. Diese katalysiert den ersten Schritt der proteolytischen Kaskade, die zur Generierung des neurotoxischen A β -Peptids führt. Die Inhibierung von BACE1 stellt eine potentielle Therapieoption für Morbus Alzheimer dar, die derzeit klinisch erprobt wird (Selkoe, 2011). Die Identifizierung physiologischer BACE1-Substrate kann hierbei helfen, Nebenwirkungen einer Inhibierung von BACE1 zu antizipieren (Kandalepas and Vassar, 2012). Als Modellorganismus für einen unvoreingenommenen *in vivo* Screen nach BACE1-Substraten sollte der Zebrafisch genutzt werden, da diesem, unter anderem durch die kürzlich erst etablierte Zinkfingertechnologie zum Knock-out von Genen, eine wachsende Bedeutung für die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen zukommt (Bandmann and Burton, 2010; Meng et al., 2008). Damit kommt der Etablierung von Techniken zur proteomischen Analyse von Zebrafischgeweben, auch über das geplante Screening hinaus, eine hohe Bedeutung zu.

Zusammengefasst waren die Ziele dieser Arbeit damit die detaillierte Analyse der RIP des Substrats APLP2 und die unvoreingenommene Suche nach RIP-Substraten der APLP2-Protease BACE1.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der regulierten Intramembran-Proteolyse (RIP) von APLP2

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die für die regulierte Intramembran-Proteolyse von APLP2 relevanten Proteasen und deren Schnittstellen zu bestimmen.

4.1.1 Bestimmung der relevanten Proteasen für die Ektodomänenspaltung von APLP2

Die für die Ektodomänenspaltung von APLP2 relevanten Proteasen wurden in drei verschiedenen Modellen untersucht: Human embryonic kidney 293-Zellen (HEK293, aus dem Englisch etwa „humane embryonale Nierenzellen“), SH-SY5Y-Neuroblastom-Zellen und primäre Neuronen. Da APLP2 ubiquitär exprimiert wird, ist es möglich, die Prozessierung von APLP2 in diesen drei Modellen ohne eine Überexpression von APLP2 zu untersuchen (Slunt et al., 1994).

4.1.1.1 Untersuchung des Laufverhaltens von APLP2 im Western Blot

Zunächst wurde das Laufverhalten von APLP2 im Western Blot untersucht. Dazu wurden Zelllysate und Zellüberstände von SH-SY5Y-Zellen untersucht. Es wurde zunächst festgestellt, dass APLP2 unter Kontrollbedingungen in Form von drei Banden im Western Blot von Zelllysaten detektiert werden kann (Abbildung 11). Diese sind auf Proteinspezies mit einer Elektromobilität entsprechend einem molekularen Gewicht von circa 105 kDa bis 160 kDa zurückzuführen. Die zwei Banden der Proteinspezies mit der höheren Elektromobilität zeigen dabei ein scharfes Laufverhalten mit einem molekularen Gewicht von circa 105 kDa (***) beziehungsweise circa 120 kDa (**), während die dritte Proteinspezies ein diffuses, weniger scharfes Laufverhalten in Form einer oder mehrerer Banden mit einem Molekulargewicht von circa 130 kDa bis circa 160 kDa zeigt (*). Dabei stellt die weiße Auslassung, die die vermeintlich verschiedenen Banden der dritten Proteinspezies voneinander trennt, vermutlich ein Western Blot-Artefakt dar, da diese Auftrennung nicht reproduzierbar gesehen werden konnte. Die Elektromobilität der drei Proteinspezies im Zellüberstand ist höher als ihre Elektromobilität im Zelllysate, wobei der Unterschied etwa einem Molekulargewichtsunterschied von 15 kDa entspricht.

Die drei im Zelllysate und im Zellüberstand detektierbaren Banden sind APLP2-spezifisch, da sie im Zelllysate und im Zellüberstand von SH-SY5Y-Zellen mit einem siRNA-vermittelten APLP2 Knock-down nicht detektierbar sind.

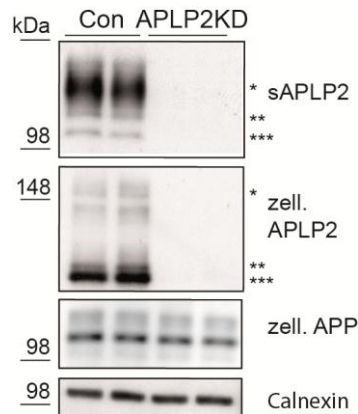


Abbildung 11: Analyse des Laufverhaltens von APLP2 und der Spezifität des APLP2-Antikörpers 2DII. SH-SY5Y-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (Con) beziehungsweise mit siRNA gegen APLP2 (APLP2KD) transfiziert und der Zellüberstand sowie das Zelllysate mittels Western Blot analysiert. Lösliches APLP2 (sAPLP2) wurde im Zellüberstand, volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2), APP (zell. APP) und Calnexin wurden im Zelllysate analysiert. Drei Banden können für sAPLP2 und zell. APLP2 detektiert werden: eine diffuse Bande (*) und zwei distinkte Banden (** beziehungsweise ***).

4.1.1.2 Untersuchung der Glykosylierung von APLP2

Wie schon in verschiedenen Arbeiten beschrieben, kann APLP2 isoformabhängig sowohl N- als auch O-glykosyliert vorliegen (Eggert et al., 2004; Slunt et al., 1994; Thinakaran and Sisodia, 1994). Außerdem können verschiedene Isoformen von APLP2 an Serin 614 eine Chondroitin-Sulfat-Glykosylierung (CS-GAG) aufweisen (Thinakaran and Sisodia, 1994). Die diffuse APLP2-Bande geht somit vermutlich auf die CS-GAG-modifizierten APLP2-Isoformen zurück (Eggert et al., 2004; Thinakaran and Sisodia, 1994). Die Frage, ob die zwei distinkten Banden von APLP2 auf unterschiedliche Glykosylierungszustände von APLP2 zurückzuführen sind oder ob sie auf unterschiedliche Isoformen zurückgehen, war aus der Literatur nicht ersichtlich (Eggert et al., 2004; Endres et al., 2005). Um diese Frage zu beantworten, wurden Deglykosylierungsexperimente durchgeführt. Zur Deglykosylierung *in vitro* wurden Endoglykosidase H (Endo H) und N-Glykosidase F (PNGase F) verwendet. Während Endo H nur die Abspaltung von N-glykosidisch gebundenen Zuckerresten des mannosereichen Typs katalysiert, führt die Behandlung mit PNGase F zu einer Abspaltung von N-Glykosylierungen des mannosereichen, des komplexen und des Hybrid-Typs (Maley et al., 1989; Trimble and Tarentino, 1991). Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Deglykosylierungsexperimenten wurde festgestellt, dass alle drei im Zellüberstand detektierbaren APLP2-Spezies resistent gegen eine Behandlung mit Endo H waren, während eine Behandlung der Zellüberstände mit PNGase F zu einer erhöhten Elektromobilität aller detektierbaren APLP2-Spezies führte (Abbildung 12). Sowohl nach der Deglykosylierung mit Endo H, als auch nach der Deglykosylierung mit PNGase F, konnten weiterhin drei Banden für APLP2 detektiert werden (Abbildung 12). Im Zelllysate führte sowohl eine Deglykosylierung mit Endo H, wie auch eine Deglykosy-

lierung mit PNGase F, zu einer Erhöhung der Elektromobilität der beiden klar detektierbaren APLP2-Spezies (Abbildung 12). Als Positivkontrolle wurde das Deglykosylierungsexperiment auch für das Zelllysate transient BACE1 überexprimierender Zellen durchgeführt (Abbildung 12). Diese Positivkontrolle war erfolgreich, da die Behandlung mit Endo H zu einer Deglykosylierung der nicht komplex glykosylierten, immaturren Form von BACE1 (##) führte, während die Behandlung mit PNGase F auch zu einer Deglykosylierung des komplex glykosylierten, maturaen BACE1 (#) führte (Huse et al., 2000).

Da die durchgeführten Deglykosylierungsexperimente, wie weiter unten ausführlich diskutiert, zeigen, dass die drei detektierbaren APLP2-Spezies auf unterschiedliche Isoformen zurückzuführen sind, werden sie im Folgenden nach ihrem Laufverhalten im Zellüberstand beziehungsweise nach ihrem Glykosylierungszustand benannt: die diffuse Bande (* in Abbildung 11) wird als CS-GAG Bande, die in der Mitte laufende Bande als 115 kDa Bande (** in Abbildung 11) und die niedriger laufende Bande als 100 kDa Bande (***) in Abbildung 11) bezeichnet.

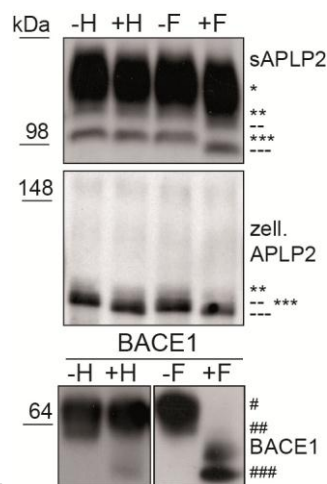


Abbildung 12: Deglykosylierungsstudien für APLP2. Zellüberstände und Zelllysate von SH-SY5Y-Zellen wurden gewonnen und *in vitro* entweder mit Endoglykosidase H (+H) oder N-Glykosidase F (+F) oder ohne das jeweilige Enzym (-H/-F) inkubiert. Lösliches APLP2 (sAPLP2) wurde im Zellüberstand, volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2) und BACE1 wurden im Zelllysate per Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde das Zelllysate von transient BACE1 überexprimierenden HEK293-Zellen entsprechend mit Endoglykosidase H oder N-Glykosidase F behandelt und anschließend per Western Blot analysiert. sAPLP2 zeigt in den nicht deglykosylierten sowie in den Endoglykosidase-H-behandelten Proben das typische Laufverhalten in Form von drei Banden (*, **, ***), während die Behandlung mit N-Glykosidase F zu einer Erhöhung der Elektromobilität der entsprechenden Proteinspezies führt (--, ---). Entsprechendes gilt für zell. APLP2, wobei hier sowohl die Endoglykosidase H- als auch die N-Glykosidase F-Behandlung zu einer Erhöhung der Elektromobilität der beiden detektierbaren Proteinspezies führt (*, ** und --, ---). BACE1 ist in Form von drei Banden detektierbar (#, ##, ###).

4.1.1.3 Untersuchung der Ektodomänenspaltung von APLP2 mit pharmakologischen Inhibitoren

Aus der Literatur war bekannt, dass APLP2 sowohl durch eine α -Sekretase als auch durch eine β -Sekretase prozessiert werden kann (Eggert et al., 2004; Endres et al., 2005; Li and Sudhof, 2004). Um selbst einen Eindruck zu gewinnen, welchen Einfluss die jeweilige proteolytische Aktivität auf die Ektodomänenspaltung von APLP2 hat, wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3, dem Metalloproteaseinhibitor TAPI-1, einer Kombination der beiden Inhibitoren und DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Bei C3-Behandlung der Zellen wurde keine signifikante Verringerung der sAPLP2-Menge festgestellt (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Zellen mit TAPI-1 beziehungsweise C3 und TAPI-1 zu einer signifikanten Reduktion der sAPLP2-Menge auf circa 20 % - 25 % ($p < 0,001$, $n=6$). Die Reduktion von sAPLP2 wurde für alle drei APLP2-Spezies gleichermaßen festgestellt.

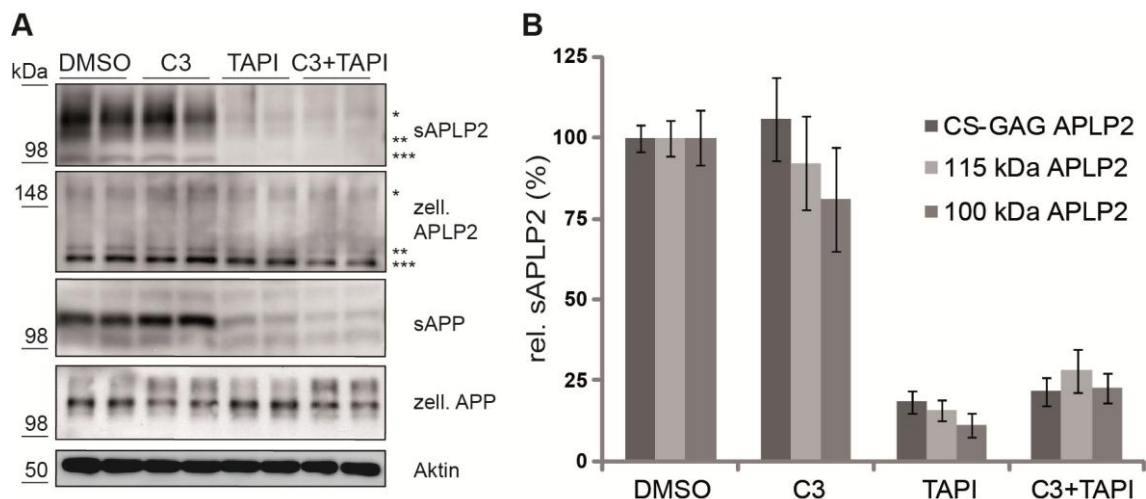


Abbildung 13: Untersuchung der Ektodomänenspaltung von APLP2 mittels pharmakologischer Inhibitoren. (A) SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 Stunden mit dem BACE1-Inhibitor C3 (1 μ M), dem Metalloproteaseinhibitor TAPI-1 (50 μ M), einer Kombination der beiden Inhibitoren oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Lösliches APLP2 (sAPLP2) und lösliches APP (sAPP) wurden im Zellüberstand, volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2), volle-Länge-APP (zell. APP) und Aktin im Zelllysat dieser Zellen per Western Blot detektiert (*: CS-GAG-APLP2, **: 115 kDa-APLP2, ***: 100 kDa APLP2). (B) Die sAPLP2-Menge (Mittelwert \pm SF) wurden per Densitometrie für alle drei detektierbaren Proteinspezies bestimmt. Die Verringerung der sAPLP2-Menge bei der TAPI-1-Behandlung und der kombinierten Behandlung der Zellen mit C3 und TAPI-1 war statistisch signifikant ($p < 0,001$ für alle drei Proteinspezies, $n=6$).

4.1.1.4 Bestimmung der Relevanz von ADAM10 und ADAM17 für die Ektodomänenspaltung von APLP2 in HEK293- und SH-SY5Y-Zellen

Die Experimente in 4.1.1.3 bestätigten die hohe Relevanz mindestens einer Metalloprotease für die Ektodomänenspaltung von APLP2. Es war bekannt, dass sowohl die Überexpression von ADAM10 als auch die Überexpression von ADAM17 zu einem Anstieg der Ektodomänenspaltung von APLP2 führt (Endres et al., 2005). Um zu be-

stimmen, welche der beiden Proteasen unter physiologischen Bedingungen, das heißt ohne eine artifizielle Überexpression, für die Ektodomänenspaltung von APLP2 verantwortlich ist, wurden beide Proteasen jeweils in SH-SY5Y-Zellen und in HEK293-Zellen per siRNA ausgeschaltet und die Ektodomänenspaltung per Western Blot analysiert. Sowohl der ADAM10, als auch der ADAM17 Knock-down, waren erfolgreich (Abbildung 14). Während der ADAM10 Knock-down zu einer signifikanten Verringerung des im Überstand detektierbaren sAPLP2 um circa 60 % - 80 % führte, hatte der Knock-down von ADAM17 keinen signifikanten Einfluss auf das sAPLP2 im Zellüberstand. Alle drei detektierbaren sAPLP2-Spezies wurden im Überstand der Zellen mit ADAM10 Knock-down gleichermaßen verringert gefunden. Die Verringerung der Ektodomänenspaltung von APLP2 infolge des Knock-downs von ADAM10 war damit fast so stark wie die Verringerung infolge der Behandlung mit dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1. Daraus lässt sich schließen, dass ADAM10 im Wesentlichen für die Metalloprotease-abhängige Ektodomänenspaltung von APLP2 verantwortlich ist.

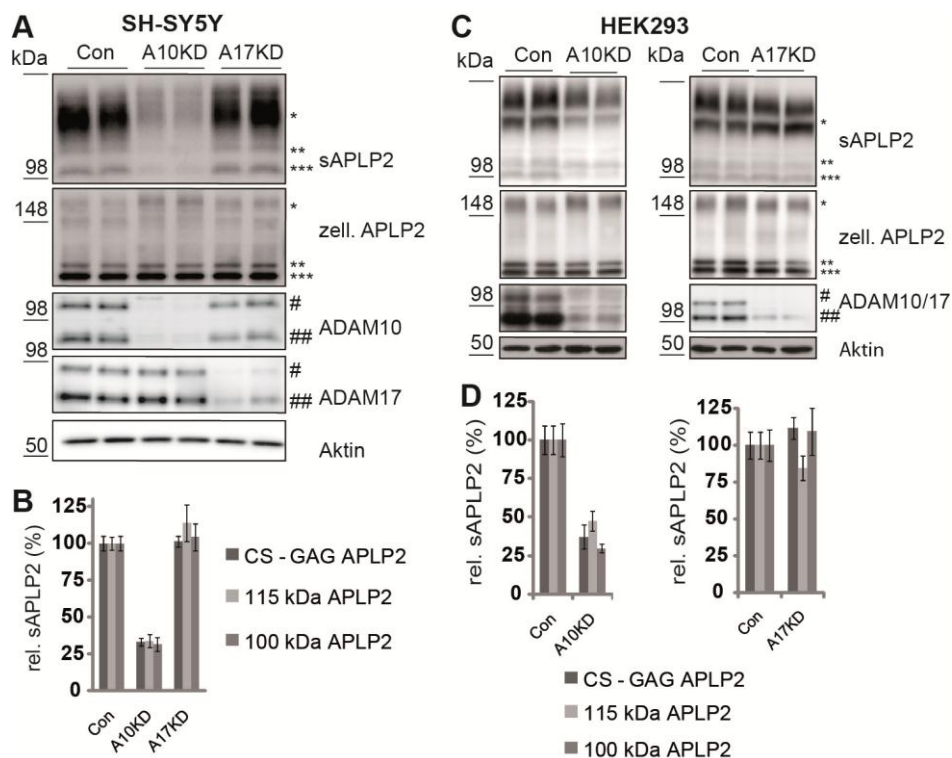


Abbildung 14: Bestimmung der Relevanz von ADAM10 und ADAM17 für die Ektodomänenspaltung von APLP2 in HEK293 und SH-SY5Y-Zellen. (A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit siRNA gegen ADAM10 (A10KD), gegen ADAM17 (A17KD) oder mit Kontroll siRNA (Con) transfiziert. Beide Proteasen wurden in Membranfraktionen detektiert (#: immature Form, ##: mature Form). Lösliches APLP2 (sAPLP2) wurde im Zellüberstand, volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2) und Aktin wurden im Zelllysate dieser Zellen detektiert (*: CS-GAG-APLP2, **: 115 kDa-APLP2, ***: 100 kDa APLP2). (B) Quantifizierung der sAPLP2-Menge (Mittelwert \pm SF) aus (A). Eine signifikante Reduktion aller sAPLP2-Spezies war in den Zellen mit ADAM10 Knock-down ($p < 0,001$, $n=6$), nicht aber in den Zellen mit ADAM17 Knock-down, detektierbar. (C) Experiment mit HEK293-Zellen wie in (A) durchgeführt. (D) Quantifizierung der sAPLP2-Menge (Mittelwert \pm SF) aus (B). Eine signifikante Reduktion aller sAPLP2-Spezies war in den Zellen mit ADAM10-Knock-down ($p < 0,001$ für CS-GAG APLP2 und 100 kDa APLP2, $p=0,001$ für 115 kDa APLP2, $n=6$), nicht aber in den Zellen mit ADAM17 Knock-down, detektierbar.

Um auszuschließen, dass die Reduktion von sAPLP2 in den Zellen mit einem Knock-down von ADAM10 auf einen „off-target“ Effekt der gegen ADAM10 gerichteten siRNAs zurückzuführen ist, wurde die Ektodomänenspaltung von APLP2 in SH-SY5Y-Zellen mit einem stabilen, shRNA-vermittelten Knock-down von ADAM10 (Kuhn et al., 2010) untersucht. Auch in diesem Versuch wurde mit zwei unabhängigen shRNAs festgestellt, dass der Knock-down von ADAM10 zu einer signifikanten Reduktion aller sAPLP2-Spezies führt ($p < 0,001$, $n=6$, Abbildung 15).

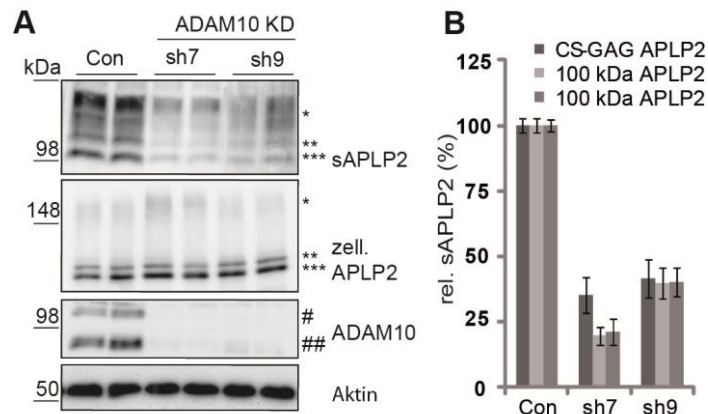


Abbildung 15: Analyse der Ektodomänenspaltung von APLP2 in SH-SY5Y-Zellen mit einem stabilen shRNA-vermittelten Knock-down von ADAM10. (A) SH-SY5Y-Zellen mit einer stabilen Expression von shRNAs gegen ADAM10 (sh7 und sh9) beziehungsweise einer Kontroll-shRNA wurden auf die Ektodomänenspaltung von APLP2 hin untersucht. ADAM10 (#: immature Form, ##: mature Form) wurde in der Membranfraktion, lösliches APLP2 (sAPLP2) im Zellüberstand und volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2) und Aktin wurden im Zelllysat dieser Zellen detektiert (*: CS-GAG-APLP2, **: 115 kDa-APLP2, ***: 100 kDa APLP2). (B) Quantifizierung der sAPLP2-Menge (Mittelwert \pm SF) aus (A). Eine signifikante Reduktion aller sAPLP2-Spezies war in den Zellen mit ADAM10 Knock-down ($p < 0,001$, $n=6$), nicht aber in den Zellen mit ADAM17 Knock-down, detektierbar.

Zur Untersuchung der Ektodomänenspaltung eines Transmembranproteins können neben der sekretierten Ektodomäne auch die in der Membran verbleibenden C-terminalen Fragmente (CTFs) untersucht werden. Im Falle von APLP2 werden diese CTFs unter physiologischen Bedingungen schnell von einer Intramembranprotease, der γ -Sekretase, in ihrer Transmembrandomäne geschnitten und infolge dessen schnell abgebaut (Eggert et al., 2004; Gu et al., 2001). Deshalb werden Zellen zur Analyse von APLP2-CTFs in der Regel mit einem γ -Sekretase-Inhibitor behandelt (Eggert et al., 2004).

Um die APLP2-CTF-Bildung in Abhängigkeit der Aktivität von ADAM10 zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt und zusätzlich entweder mit siRNAs gegen ADAM10 oder mit Kontroll-siRNAs transfiziert. Zusätzlich wurden SH-SY5Y-Zellen, mit und ohne siRNA-vermittelten Knock-down von ADAM10, mit DAPT und dem BACE1 Inhibitor C3 behandelt. Der ADAM10 Knock-down wurde durch die Reduktion der APLP2-Ektodomänenspaltung validiert (Abbildung 16).

Unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne den Knock-down von ADAM10 und ohne die Inhibierung von BACE1, waren im CTF-Western Blot drei Banden mit einem gegen den C-Terminus von APLP2 gerichteten Antikörper (CT-12) nachweisbar. Zwei dieser Banden waren in der Höhe eines scheinbaren Molekulargewichts von 10 kDa, eine in der Höhe eines scheinbaren Molekulargewichts von 7 kDa detektierbar (Abbildung 16). In den Zellen mit einem siRNA-vermittelten Knock-down von ADAM10 war die Intensität der unteren der beiden 10 kDa-Banden eindeutig reduziert. Dies zeigt, dass es sich bei dieser Bande um das APLP2- α -CTF handelt. Die obere 10 kDa-Bande konnte durch Behandlung der Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 stark reduziert werden. Dies zeigt, dass es sich bei dieser Bande um das APLP2- β -CTF handelt. Die bei circa 7 kDa laufende APLP2-CTF-Bande war sowohl beim ADAM10 Knock-down als auch bei der C3-Behandlung unverändert. In Vorversuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass diese Bande ohne DAPT-Behandlung nicht nachweisbar ist, d.h. dass es sich bei dieser Bande vermutlich auch um ein APLP2-CTF handelt.

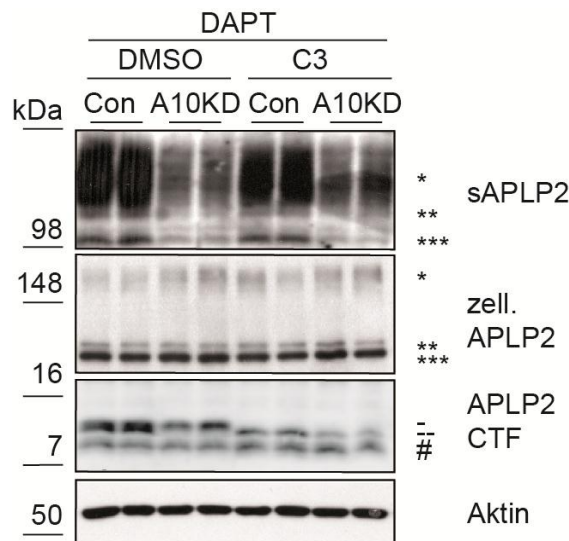


Abbildung 16: Analyse der APLP2-C-terminalen Fragmente. (A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (5 μ M) behandelt. Zusätzlich wurden sie entweder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder mit dem BACE1-Inhibitor C3 (1 μ M) behandelt. Außerdem wurden die Zellen mit siRNAs gegen ADAM10 (A10KD) oder mit Kontroll-siRNAs transfiziert. Lösliches APLP2 (sAPLP2) wurde im Zellüberstand und volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2) und Aktin wurden im Zelllysate dieser Zellen detektiert (*: CS-GAG-APLP2, **: 115 kDa-APLP2, ***: 100 kDa APLP2). Die APLP2-C-terminalen Fragmente (APLP2 CTF) konnten im Zelllysate nachgewiesen werden (-: APLP2 β -CTF, --: APLP2 α -CTF, #: weiterer APLP2 CTF).

4.1.1.5 Untersuchung der Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen

Nachdem in 4.1.1.4 gezeigt werden konnte, dass ADAM10 die konstitutive physiologische α -Sekretase für APLP2 in verschiedenen Tumorzelllinien ist, wurde die Relevanz von ADAM10 für die proteolytische Prozessierung von APLP2 in primären Neuronen

untersucht. Embryonale primäre Neuronen wurden aus dem Cortex von 16 Tage alten Mäuseembryonen präpariert. Zunächst wurde wiederum mit pharmakologischen Inhibitoren getestet, zu welchem Anteil eine α -Sekretase- und zu welchem eine β -Sekretase-Aktivität zur Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen beitragen. Im Zellüberstand der Neuronen waren wiederum drei APLP2-Spezies detektierbar, wobei das 115 kDa APLP2 das stärkste Signal zeigte. Quantifizierbar waren bei den Neuronen nur das 115 kDa sAPLP2 und das CS-GAG sAPLP2.

Die Behandlung der primären Neuronen mit dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 führte zu einer Reduktion der beiden quantifizierbaren sAPLP2-Spezies (CS-GAG APLP2 und 115 kDa APLP2) um circa 35 %, während eine Behandlung mit dem β -Sekretase-Inhibitor C3 zu einer Verringerung von sAPLP2 um circa 50 % - 60 % führte ($p < 0,001$ für C3, $p < 0,005$ für TAPI-1, $n=6$, Abbildung 17). Damit war gezeigt, dass circa 35 % der Ektodomänenspaltung von APLP2 Metalloprotease-abhängig ist.

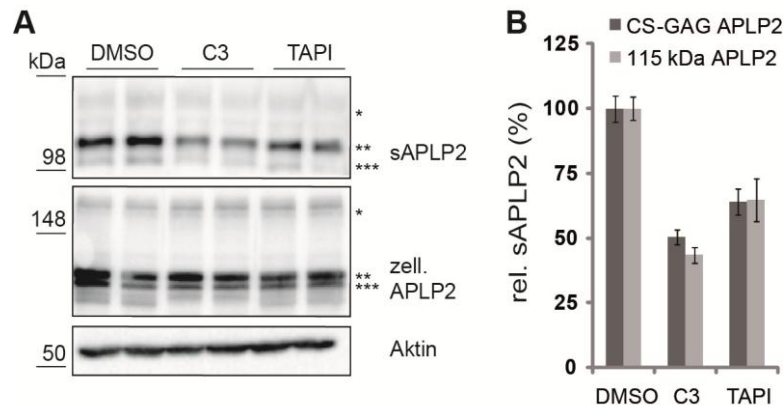


Abbildung 17: Analyse der Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen mittels pharmakologischer Inhibitoren. (A) E16 primäre kortikale Neuronen wurden mit dem BACE1-Inhibitor C3 (1 μ M), TAPI-1 (50 μ M) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Lösliches APLP2 (sAPLP2) wurde im Zellüberstand und volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2) und Aktin wurden im Zelllysat dieser Zellen detektiert (*: CS-GAG-APLP2, **: 115 kDa-APLP2, ***: 100 kDa APLP2). Eine klare Reduktion der sAPLP2-Menge war sowohl bei der C3-Behandlung als auch bei der Behandlung mit TAPI-1 erkennbar. (B) Quantifizierung der sAPLP2-Menge von CS-GAG APLP2 und 115 kDa APLP2 (Mittelwert \pm SF) aus (A). Die Reduktion von sAPLP2 war in den C3-behandelten Zellen ($p < 0,005$ für beide quantifizierbaren APLP2-Spezies, $n=6$), sowie in den mit TAPI-1-behandelten Zellen ($p < 0,005$ für beide quantifizierbaren APLP2-Spezies, $n=6$) signifikant.

Um zu untersuchen, ob ADAM10 wiederum den wesentlichen Anteil der Metalloprotease-abhängigen Ektodomänenspaltung von APLP2 katalysiert, wurden shRNA-basierte ADAM10 Knock-downs in primären Neuronen durchgeführt. Zur Transduktion der Neuronen mit den shRNA-Konstrukten wurden Lentiviren verwendet, die bereits früher für ähnliche Studien eingesetzt und in diesem Zusammenhang ausführlich beschrieben wurden (Kuhn et al., 2010). Die Transduktion der Neuronen mit zwei unabhängigen shRNAs gegen ADAM10 führte in beiden Fällen zu einer starken Reduktion von ADAM10 im Vergleich zu mit Kontroll-shRNAs transduzierten Neuronen

(Abbildung 18A). Dieser Knock-down von ADAM10 führte in den Neuronen zu einer Reduktion der sAPLP2-Menge um circa 30 % ($p < 0,005$, $n=6$, Abbildung 18). Dies entspricht in etwa der Reduktion um 35 %, die infolge der Behandlung der Neuronen mit dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 beobachtet werden konnte. Damit ist gezeigt, dass ADAM10 auch in Neuronen die Funktion der konstitutiven α -Sekretase für APLP2 erfüllt.

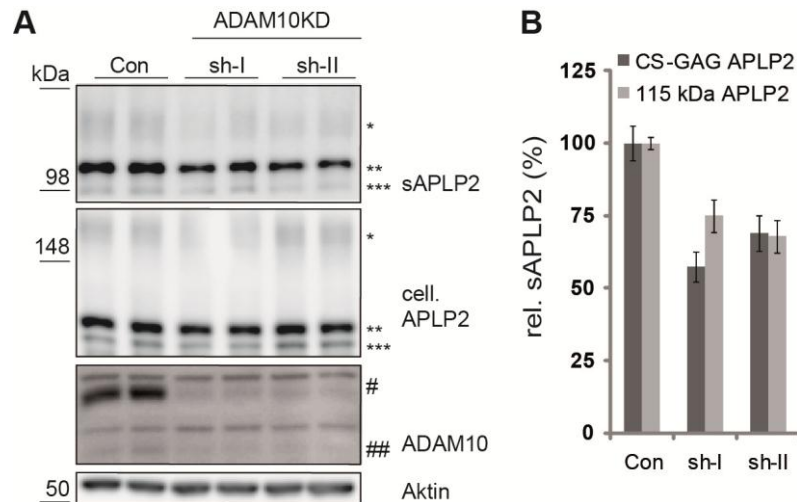


Abbildung 18: Analyse der ADAM10-abhängigen Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen. (A) E16 primäre kortikale Neuronen wurden mit Lentiviren transduziert, die shRNAs gegen ADAM10 (sh-I, sh-II) beziehungsweise Kontroll-shRNAs codieren. ADAM10 wurde in der Membranfraktion der Neuronen nachgewiesen (#: immature Form, ##: mature Form). Lösliches APLP2 (sAPLP2) wurde im Zellüberstand, ADAM10 (#: immature Form, ##: mature Form), volle-Länge-APLP2 (zell. APLP2) und Aktin wurden im Zelllysat der Neuronen detektiert (*: CS-GAG-APLP2, **: 115 kDa-APLP2, ***: 100 kDa APLP2). Eine Reduktion der sAPLP2-Menge war für beide gegen ADAM10 gerichteten shRNAs erkennbar. (B) Quantifizierung der sAPLP2-Menge von CS-GAG APLP2 und 115 kDa APLP2 (Mittelwert \pm SF) aus (A). Die Reduktion von sAPLP2 war für beide gegen ADAM10 gerichteten shRNAs signifikant ($p < 0,01$ für beide quantifizierbaren APLP2-Spezies, $n=6$).

4.1.2 Bestimmung der Schnittstellen von APLP2 durch α -, β - und γ -Sekretase

Obwohl schon seit über einem Jahrzehnt bekannt ist, dass APLP2 proteolytisch prozessiert wird, wurden die exakten Schnittstellen von APLP2 durch α -, β - und γ -Sekretase bisher nicht bestimmt (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). Durch die Analyse des Laufverhaltens von APLP2-CTFs wurde lediglich eine grobe Abschätzung der Ektodomänenspaltstellen vorgenommen (Eggert et al., 2004). Die ϵ -Schnittstelle wurde dagegen durch N-terminales Sequenzieren eines intrazellulären Fragments von APLP2 exakt bestimmt (Gu et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Massenspektrometrie-basierte Methoden angewandt, um die α -, β - und γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 exakt zu bestimmen.

4.1.2.1 Bestimmung der α - und β -Sekretase Schnittstellen von APLP2

Um die Schnittstellen der Ektodomänenspaltung von APLP2 exakt zu bestimmen, wurde ein im Labor bereits für APP erfolgreich angewendetes Verfahren verwendet (Kuhn et al., 2010). Hierfür wurde ein APLP2-Konstrukt kloniert, das einen Flag-Tag und eine TEV-Protease-Schnittstelle in der Juxtamembranregion von APLP2, N-terminal der vermuteten Schnittstellen, aufweist (APLP2-TEV-FLAG, Klonierung siehe 8.2.1.1). Die Expression dieses Konstrukts in HEK293-Zellen führt zu einer Freisetzung der durch Ektodomänenspaltung von APLP2-TEV-FLAG entstehenden Ektodomäne (sAPLP2-TEV-FLAG) in den Zellüberstand (Abbildung 19). Das lösliche sAPLP2 kann dann durch Immunopräzipitation aus dem Zellüberstand aufgereinigt werden. Durch einen proteolytischen *in vitro* Verdau des aufgereinigten sAPLP2 mit TEV-Protease entstehen zwei Fragmente: der komplex glykosylierte, längere N-terminale Teil von sAPLP2, der vom N-Terminus von APLP2 bis zur TEV-Schnittstelle reicht und ein kürzeres, nicht-glykosiliertes Fragment, dass vom Beginn des Flag-Tags bis zu der durch die Ektodomänenspaltung des volle-Länge-APLP2-TEV-FLAG entstandenen Schnittstelle, reicht (Abbildung 19). Dieses kürzere Fragment lässt sich wiederum durch eine Immunopräzipitation aufreinigen und dann massenspektrometrisch untersuchen.

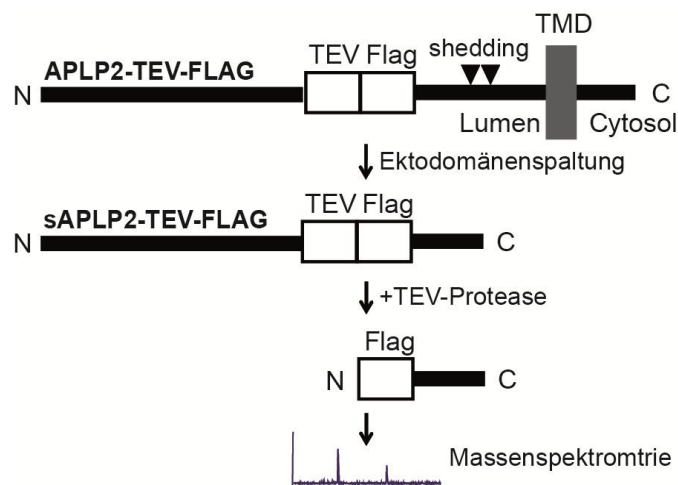


Abbildung 19: Schema des Verfahrens zur Bestimmung der Ektodomänenspaltungsschnittstellen von APLP2. Zur Bestimmung der APLP2 α - und β -Sekretase-Schnittstellen wurde ein APLP2-Konstrukt verwendet, das eine TEV-Protease-Schnittstelle (TEV) und einen Flag-Tag anschließend an das Methionin 653 der 763 Aminosäuren langen APLP2 Isoform 1 aufweist (APLP2-TEV-FLAG). Damit lag die artifizuell eingefügte Sequenz 39 Aminosäuren N-terminal vom vorhergesagten Beginn der Transmembran-Domäne (TMD). Die Ektodomänenspaltung des APLP2-TEV-FLAG-Proteins führte zur Freisetzung der APLP2-Ektodomäne (sAPLP2-TEV-FLAG) in den Zellüberstand. sAPLP2-TEV-FLAG wurde per Immunopräzipitation aufgereinigt und anschließend *in vitro* mit TEV-Protease verdaut. Das hierbei entstehende Flag-positive Peptid wurde wiederum durch eine Immunopräzipitation aufgereinigt und anschließend in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert.

Dieser Ansatz wurde gewählt, da er eine Schnittstellenbestimmung durch massenspektrometrische Untersuchung eines relativ kurzen, nicht-glykosilierten Peptids ermöglicht. Eine massenspektrometrische Untersuchung der gesamten APLP2-Ektodomäne wäre dagegen ungleich schwieriger, da zum einen die Glykosylierung auf Grund ihrer heterogenen Natur zu einer sehr hohen Anzahl an Peaks führen würde und zum anderen die hohe Masse der gesamten APLP2-Ektodomäne bei den meisten Massenspektrometern zu einem so hohen Massenfehler führen würde, dass eine aminosäuregenaue Bestimmung der Schnittstelle nicht möglich wäre.

Um zu überprüfen, ob APLP2-TEV-FLAG analog dem Wildtyp-APLP2 ein Substrat für die Ektodomänenspaltung ist, wurden HEK293-Zellen mit pcDNA3.1 APLP2-TEV-FLAG transfiziert und anschließend mit dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 behandelt. Wie für Wildtyp-APLP2 auch (Abbildung 13), wurde eine starke Reduktion der sAPLP2-TEV-FLAG-Menge infolge der TAPI-1-Behandlung festgestellt (Abbildung 20). Hieraus wurde geschlossen, dass APLP2-TEV-FLAG auch Substrat einer Metalloprotease-abhängigen Ektodomänenspaltung, und damit für die Bestimmung der APLP2-Schnittstellen verwendbar ist.

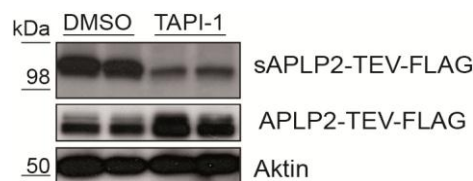


Abbildung 20: Analyse der proteolytischen Prozessierung von APLP2-TEV-FLAG in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit pcDNA3.1 APLP2-TEV-FLAG transfiziert und entweder mit dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 oder DMSO als Lademittelkontrolle behandelt. Die lösliche Ektodomäne des APLP2-TEV-FLAG Proteins (sAPLP2-TEV-FLAG) wurde im Zellüberstand, volle-Länge-APLP2-TEV-FLAG und Aktin im Zelllysate nachgewiesen. Die Western Blots für (s)APLP2-TEV-FLAG wurden mit Flag-M2-Antikörpern durchgeführt, so dass endogenes APLP2 nicht detektiert werden kann. In den mit TAPI-1 behandelten Zellen ist eine klare Reduktion der sAPLP2-TEV-FLAG-Menge und eine leichte Anreicherung der APLP2-TEV-FLAG-Menge zu erkennen.

Das Experiment zur Bestimmung der Schnittstellen wurde mit HEK293-Zellen durchgeführt, die jeweils transient mit APLP2-TEV-FLAG und entweder ADAM10, BACE1 oder, als Kontrolle, Luciferase co-transfiziert wurden. Die Western Blot-basierte Analyse der Zellüberstände dieser Zellen zeigte, dass eine Überexpression von ADAM10 beziehungsweise BACE1 erwartungsgemäß zu einem Anstieg der sAPLP2-TEV-FLAG-Menge führte (Abbildung 21A). Die Überexpression der Proteasen wurde per Western Blot bestätigt. Die Zellüberstände wurden des Weiteren wie in Abbildung 19 beschrieben prozessiert und die resultierenden Peptide per MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Eine Messung aller Spektren im Reflektormodus war möglich, so dass für alle Peaks das Isotopenmuster klar auflösbar war (Abbildung 22). Die Ladung der den Peaks zugrunde liegenden Moleküle ließ sich, auf der Grundlage des Abstandes von den Peaks eines Isotopenmusters von $m/z=1$, für alle detektierten Peaks mit $z=1$ be-

stimmen (Abbildung 22). Dabei waren ohne Überexpression einer Protease zwei Peaks mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von circa 2917 beziehungsweise circa 3073 detektierbar (Abbildung 21B). Die Massen dieser Peptide entsprachen mit einer Abweichung von weniger als 0,06 Dalton TEV-prozessierten APLP2-TEV-FLAG Peptiden mit C-Termini bei Arginin 670 beziehungsweise Glutamat 669 der 763 Aminosäuren langen APLP2 Isoform 1 (Abbildung 21C). Eine Auflistung der theoretisch für APLP2-TEV-FLAG erwartbaren Peptide, infolge einer Ektodomänenspaltung und einem nachfolgenden TEV-Verdau, sind in 11.1.1 mit ihren jeweiligen Massen, aufgeführt.

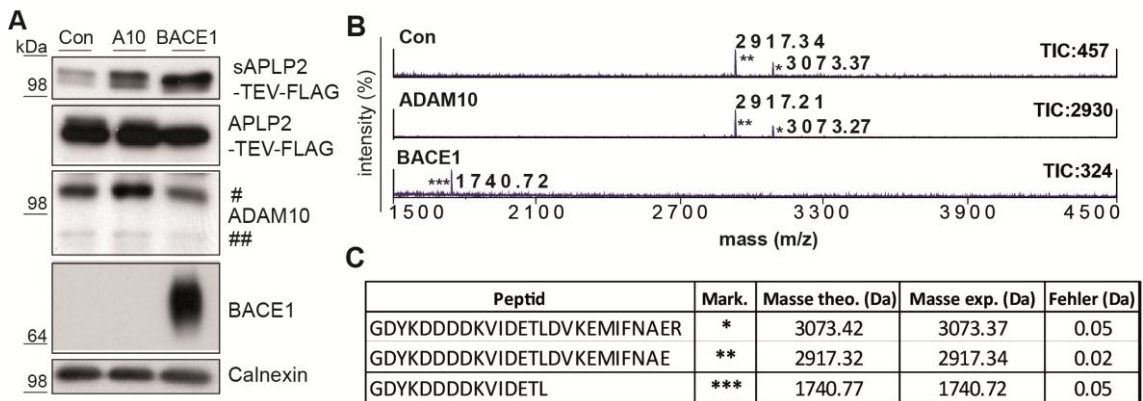


Abbildung 21: Massenspektrometrische Bestimmung der APLP2-Ektodomänen-Schnittstellen. (A) HEK293-Zellen wurden transient mit pcDNA 3.1 APLP2-TEV-FLAG und entweder peak12 Luciferase (Con), peak12 ADAM10 (A10) oder peak12 BACE1 (BACE1) co-transfiziert. sAPLP2-TEV-FLAG wurde im Zellüberstand, volle-Länge-APLP2-TEV-FLAG, Calnexin und BACE1 wurden im Zelllysat sowie ADAM10 in einer Membranpräparation der Zellen nachgewiesen. Ein klarer Anstieg der sAPLP2-TEV-FLAG-Menge war im Zellüberstand der mit ADAM10 beziehungsweise BACE1 co-transfizierten Zellen detektierbar. (B) Massenspektrometrische Analyse der Zellüberstände aus (A) nach dem in Abbildung 19 skizzierten Verfahren. Die Gesamtintensität („total ion count“ beziehungsweise kurz: TIC) ist für alle drei abgebildeten Spektren gegeben. Für die mit Luciferase und die mit ADAM10 co-transfizierten Zellen konnten zwei Peaks bei jeweils circa 2917 Da und 3073 Da (eigentlich m/z, aber z=1 konnte aus dem Isotopenmuster klar geschlossen werden) detektiert werden. Diese Peaks wurden in den mit BACE1 co-transfizierten Zellen nicht detektiert, dagegen war ein Peak bei 1740 Da klar nachweisbar. Alle Spektren wurden im Reflektormodus gemessen, die angegebenen Massen entsprechen der Masse des jeweils leichtesten detektierbaren Isotops des entsprechenden Isotopenmusters. (C) Die Massen der Peaks aus (B) konnten Peptiden aus dem APLP2-TEV-FLAG-Protein zugeordnet werden. Alle diese Peptide beginnen N-terminal mit dem beim TEV-Schnitt verbleibenden Glycin, gefolgt vom Flag-Tag (DYKDDDK) und der anschließenden APLP2-Sequenz bis zur jeweiligen Ektodomänenspaltstelle. Die theoretische, die jeweils experimentell bestimmte Masse und die resultierende Abweichung (Fehler) sind für die drei Peptide aufgelistet.

Die Überexpression von ADAM10 in den APLP2-TEV-FLAG exprimierenden HEK293-Zellen änderte qualitativ nichts an dem detektierbaren Spektrum. Wiederum waren zwei Peaks mit identischer Masse detektierbar, allerdings war die Gesamtintensität der Peaks erheblich höher als unter Kontrollbedingungen (Abbildung 21B). Die Überexpression der β -Sekretase BACE1 führte dagegen zu einer qualitativen Änderung des Spektrums. Während die zwei zuvor detektierbaren Peaks nicht mehr mit einem Signal-zu-Rauschverhältnis von mehr als 5 % nachweisbar waren, wurde ein Peak mit

einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von circa 1740 Da. detektiert. Dieser ließ sich einem TEV-prozessierten APLP2-TEV-FLAG-Peptid zuordnen, das auf das Leucin 659 der APLP2 Isoform 1 endet (Abbildung 21C). Auch hierbei beträgt die Abweichung zwischen der zu erwartenden und der detektierten Masse weniger als 0,06 Da. Aus diesen Überexpressionsexperimenten lässt sich schließen, dass der ADAM10-abhängige α -Schnitt von APLP2 nach Arginin 670 beziehungsweise Glutamat 669 der APLP2 Isoform 1 stattfindet, während der BACE1-abhängige β -Schnitt C-terminal vom Leucin 659 stattfindet. Das Fehlen der α -Peaks bei der BACE1-Überexpression lässt sich durch die Lokalisierung der BACE1-Aktivität im trans-Golgi-Netzwerk im Falle der Überexpression erklären. Durch die sehr starke Überexpression (siehe Abbildung 21A) kann BACE1 das APLP2-TEV-FLAG bereits im trans-Golgi-Netzwerk prozessieren, bevor es die Plasmamembran erreicht. Der an der Plasmamembran stattfindende α -Schnitt spielt infolge dessen keine wesentliche Rolle mehr.

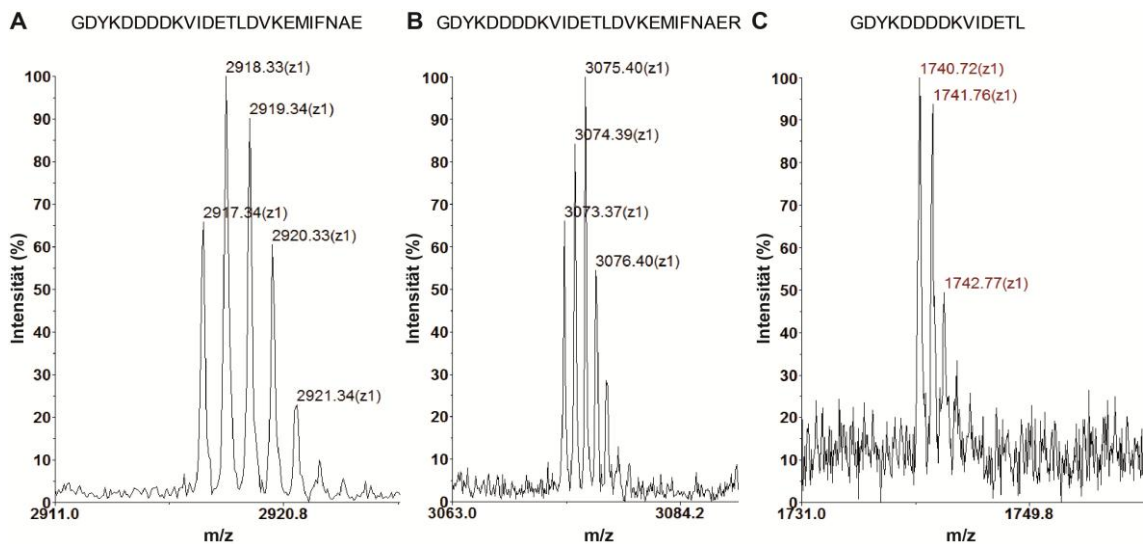


Abbildung 22: Detaillierte Ansicht der MALDI-TOF Spektren zur Bestimmung der APLP2 Ektodomänen-Schnittstellen. (A) Vergrößerung des Peaks „2917.34“ aus Abbildung 21B, der dem TEV-prozessierten APLP2-TEV-FLAG Peptid mit der angegebenen Sequenz zugeordnet werden konnte. (B) Vergrößerung des Peaks „3073.37“ aus Abbildung 21B, der dem TEV-prozessierten APLP2-TEV-FLAG Peptid mit der angegebenen Sequenz zugeordnet werden konnte. (C) Vergrößerung des Peaks „1740.72“ aus Abbildung 21B, der dem TEV-prozessierten APLP2-TEV-FLAG Peptid mit der angegebenen Sequenz zugeordnet werden konnte. (A-C) Die Ladung der den Peaks zugrunde liegenden Moleküle wurde auf der Grundlage des Isotopenabstands von 1 m/z mit $z=1$ bestimmt.

Während der β -Schnitt klar zwischen Leucin 659 und Aspartat 660 der APLP2 Isoform 1 lokalisiert werden konnte, ist für den ADAM10-abhängigen α -Schnitt von APLP2 nicht klar, ob der Schnitt exklusiv C-terminal von Arginin 670 stattfindet und das zweite detektierte Peptid ein Abbauprodukt des initial durch ADAM10 generierten sAPLP2 ist oder ob ADAM10 sowohl nach Glutamat 669 wie auch Arginin 670 der APLP2 Isoform 1 schneiden kann. Letzteres ist eher nicht zu erwarten, da den meisten bisher be-

schriebenen ADAM10-Schnittstellen exakt eine Aminosäurebindung zugeordnet werden konnte (Caescu et al., 2009). Für APP ist zum Beispiel bekannt, dass ADAM10 nach dem Lysin 16 der A β -Sequenz schneidet, das produzierte α APP aber durch C-terminale Verkürzung weiter abgebaut wird (Kuhn et al., 2010).

Diese aus der Literatur bekannten Beispiele legen nahe, dass die erste der oben aufgeführten Erklärungen zutrifft, die besagt, dass ADAM10 nur die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Arginin 670 und Valin 671 katalysiert und das entstehende Produkt durch eine weitere enzymatische Aktivität C-terminal um eine Aminosäure trunziert wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Zellüberstand von mit APLP2-TEV-FLAG transfizierten HEK293-Zellen für drei Stunden beziehungsweise für 16 Stunden gesammelt und dann wie oben beschrieben prozessiert. Bei der dreistündigen Inkubation des Mediums wurde festgestellt, dass der auf das Peptid, das das Arginin 670 noch enthält, zurückgehende Peak (α) eine stärkere Intensität aufweist, als der auf das um eine Aminosäure verkürzte Peptid (α -1). Bei der 16-stündigen Inkubation war dieses Verhältnis umgekehrt zu beobachten (Abbildung 23). Während man für den Fall, dass beide Schnitte auf Ektodomänenspaltung von APLP2 durch ADAM10 zurückgehen erwarten würde, dass das Verhältnis der beiden Produkte unabhängig von der Sammelzeit des Überstandes ist, lässt sich das Modell eines initialen Schnitts mit einem nachfolgenden Schnitt durch eine weitere proteolytische Aktivität gut mit den erhaltenen Daten in Übereinstimmung bringen. So ist bei der kurzen Sammelzeit erst wenig von dem initialen, ADAM10-abhängig generierten APLP2-Produkt trunziert worden, während das trunzierte APLP2-Produkt bei längerer Inkubationszeit akkumuliert. Dieses Modell setzt voraus, dass die Stabilität des α -1-Peptids höher ist, als die Stabilität des α -Peptids beziehungsweise in anderen Worten, dass ein wie auch immer geariteter Abbau des α -1-Peptids eine geringere Geschwindigkeit aufweist, als die Transformation des α -Peptids zum α -1-Peptid.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die erhaltenen Daten klar für einen initialen α -Schnitt durch ADAM10 und eine anschließende Verkürzung des α APLP2 durch eine nicht bekannte Protease sprechen. Der abschließende Beweis dafür ließe sich aber erst durch eine Bestimmung der für den Abbau verantwortlichen Protease und deren Inhibition erbringen.

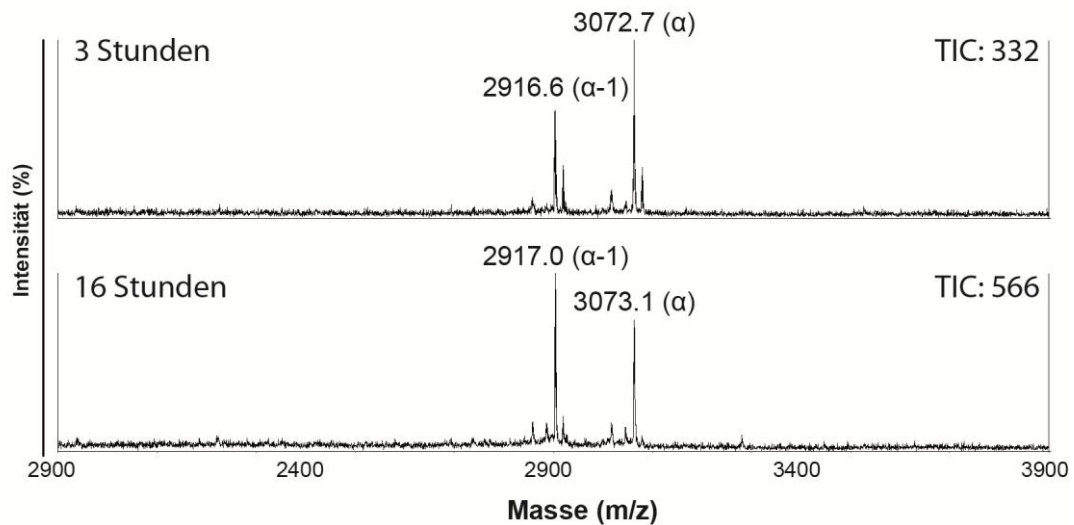


Abbildung 23: α APLP2 wird nach der Generierung durch ADAM10 C-terminal trunziert. HEK293-Zellen wurden mit APLP2-TEV-FLAG transfiziert. Medium wurde für dreimal 3 Stunden beziehungsweise für 16 Stunden auf den Zellen inkubiert und anschließend wie in Abbildung 19 beschrieben zur massenspektrometrischen Analyse vorbereitet. Die MALDI-TOF-Massenspektren zeigen die zwei erwarteten Peaks bei circa 2917 Da beziehungsweise circa 3073 Da. Der Peak bei circa 3073 Da (α) entspricht jeweils dem α APLP2, der bei circa 2917 Da (α -1) dem C-terminal um eine Aminosäure trunzierten α APLP2. Die totale Ionenzahl („total ion count“: TIC) ist für beide Spektren angegeben.

4.1.2.2 Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2

Bei der regulierten Intramembran-Proteolyse folgt auf die Ektodomänenspaltung die proteolytische Prozessierung des in der Membran verbleibenden CTF durch die Intramembran-Protease γ -Sekretase (Eggert et al., 2004; Gu et al., 2001). Während der ϵ -Schnitt, der den N-Terminus der entstehenden ICD definiert, von Gu et al. für APLP2 nach Leucin 712 gefunden wurde, konnten die das A β -ähnliche Peptid C-terminal definierenden Schnittstellen noch nicht näher bestimmt werden (Gu et al., 2001; Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

Um die Bestimmung der Schnittstelle zu erreichen, wurde zunächst ein Konstrukt kloniert, das N-terminal einen HA-Tag aufweist, der über ein fünf Glycine langes Verbindungsstück mit dem oben bestimmten α APLP2CTF verbunden ist. Außerdem wurde ein C-terminaler Flag-Tag an den α APLP2CTF fusioniert (Klonierung siehe 8.2.1.1). Dieses HA-APLP2CTF-Flag-Konstrukt wurde in HEK293-Zellen überexprimiert. Die durch γ -Sekretase in den Zellüberstand freigesetzten Peptide wurden nach dem in Abbildung 24 beschriebenen Verfahren für die massenspektrometrische Analyse aufgereinigt.

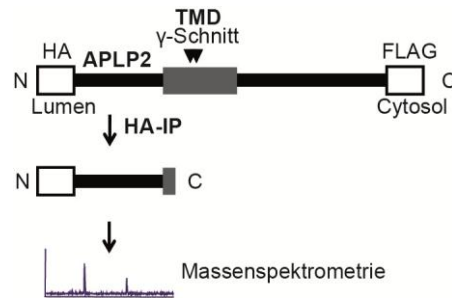


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2. Durch den γ -Sekretase abhängigen Schnitt des HA-APLP2CTF-FLAG Proteins in HEK293-Zellen kommt es zur Freisetzung von kurzen, β -ähnlichen Peptiden in den Zellüberstand. Diese können mittels Immunopräzipitation aufgereinigt und anschließend per MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden.

Die Analyse der Peptide per MALDI-TOF-Massenspektrometrie ergab Spektren mit einer niedrigen Auflösung, in denen Peaks zwischen 3600 und 5000 m/z detektierbar waren (Abbildung 25). Neben fünf Hauptpeaks bei ca. 4267, 4494, 4552, 4665 und 4777 m/z wurden „Nebenpeaks“ bei 4773, 4531 und 4644 m/z gefunden. Da das Isotopenmuster trotz der Aufnahme im Reflektormodus nicht aufgelöst werden konnte, ließ sich der Ladungszustand der den Peaks zu Grunde liegenden Moleküle nicht bestimmen. Nachdem bei dem verwendeten MALDI-TOF Massenspektrometer fast ausschließlich einfach geladene Moleküle detektiert werden, wurde für die detektierten Moleküle eine Ladung von $z=1$ angenommen (Fukumori et al., 2010; Kuhn et al., 2007; Kuhn et al., 2010; Page et al., 2008). Somit wurde angenommen, dass die für die Peaks gefundenen m/z-Werte den Massen der jeweils den Peaks zu Grunde liegenden protonierten Peptiden in Da entsprechen. Diese Massen wurden mit den sich bei einem *in silico* Verdau des HA- α APLP2CTF-Flag-Proteins ergebenden Massen verglichen (siehe 11.1.2). Dabei wurde festgestellt, dass die Massen der drei „Nebenpeaks“ HA- α APLP2-Peptiden mit einem Massenfehler von weniger als 2 Da zugeordnet werden konnten (Abbildung 25). Die drei korrespondierenden, um jeweils circa 21 Da verschobenen, „Hauptpeaks“ könnten Natriumaddukte der entsprechenden „Nebenpeaks“ sein. Für Na-Addukte würde man eine zusätzliche Masse von 22 Da erwarten, da Peptide dann statt als $[M+H]^+$ als $[M+Na]^+$ vorliegen (Sabareesh and Balaram, 2006). Dass ein Unterschied von 21 Da statt 22 Da detektiert wurde, liegt vermutlich an der niedrigen Auflösung der Spektren, die keine exakte Bestimmung der monoisotopischen Masse der Peptide erlaubt. Nimmt man für die zwei bisher nicht zugeordneten Hauptpeaks von 4267 Da und 4777 Da ebenfalls an, dass es sich um Natriumaddukte erwartbarer HA- α APLP2-Peptide handelt, so lassen sich auch diese zuordnen. Der Peak bei 4267 Da resultiert nach dieser Interpretation aus dem Natriumaddukt des HA- α APLP2-Peptids das C-terminal auf Alanin 694 der 763 Aminosäuren langen APLP2 Isoform 1 endet, während der Peak bei 4777 Da vermutlich auf das Natriumaddukt des HA- α APLP2-Peptids mit dem C-terminalen Leucin 699 zurückgeht. Damit wurden mögliche γ -Schnittstellen von APLP2 auf der Grundlage des α APLP2CTF bestimmt. Allerdings

sind die Auflösung der Spektren und die Sensitivität nicht hoch genug, um weitere aussagekräftige Experimente mit dem verwendeten Konstrukt durchzuführen.

Um die Sensitivität und die Auflösung zu erhöhen, wurde ein Konstrukt eines kürzeren APLP2CTF kloniert. In diesem HA-sAPLP2CTF-FLAG-Konstrukt beginnt der APLP2CTF mit dem Prolin 683 der APLP2 Isoform 1 (zur Klonierung siehe 8.2.1.1). Dieses Konstrukt führt infolge der Prozessierung durch γ -Sekretase zu zwölf Aminosäuren kürzeren Produkten (siehe 11.1.3), die in der massenspektrometrischen Analyse besser detektierbar sein sollten.

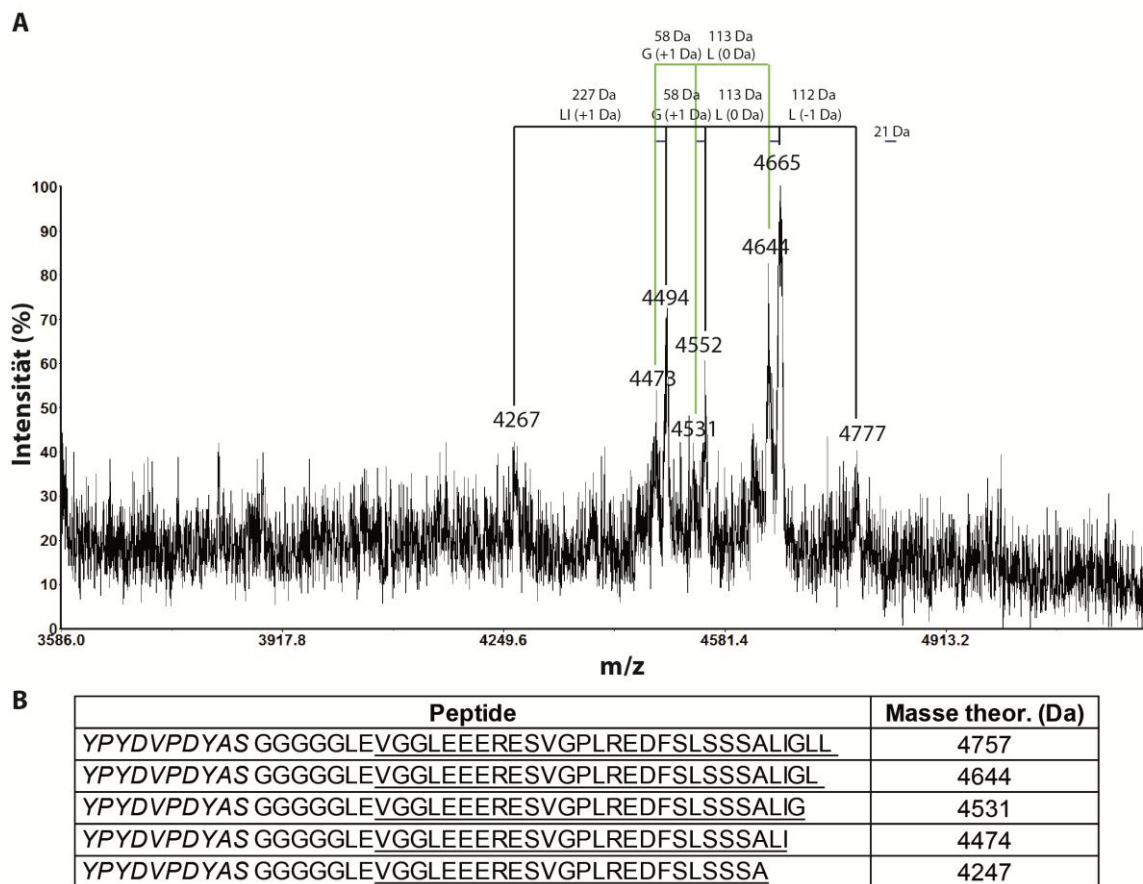


Abbildung 25: Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen auf Grundlage eines α APLP2CTF-Konstrukts. HEK293-Zellen wurden mit HA- α APLP2CTF-FLAG transfiziert und der Zellüberstand dieser Zellen nach dem in Abbildung 24 skizzierten Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse vorbereitet. (A) MALDI-TOF-Massenspektrum der von den Zellen produzierten und aufgereinigten Peptide im Reflektormodus aufgenommen. Alle markierten Peaks wiesen ein schlechteres Signal-zu-Rauschverhältnis als 5 auf. Es sind fünf als Hauptpeaks (bei 4267, 4494, 4552, 4665 und 4777 m/z) und drei als Nebenpeaks (bei 4473, 4531 und 4644 m/z) definierte Peaks zu erkennen. Abstände zwischen den Haupt- und Nebenpeaks sind jeweils angegeben. Ausgewählte Aminosäuren, deren jeweilige Masse diesen Abständen etwa entspricht, sind angegeben. Die Abweichung zwischen der jeweils experimentell bestimmten Massendifferenz und der Masse der jeweiligen Aminosäure ist in Klammern angegeben. Die drei Nebenpeaks weisen ein m/z-Verhältnis von circa 21 weniger auf als drei der Hauptpeaks. (B) Verschiedene HA- α APLP2-Peptide mit ihrer jeweiligen theoretischen Masse im protonierten Zustand $[M+H]^+$. In den Peptidsequenzen ist der HA-Tag kursiv und der α APLP2-Anteil unterstrichen markiert.

Zunächst wurde getestet, ob die Prozessierung von HA-sAPLP2CTF-FLAG in HEK293-Zellen γ -Sekretase-abhängig ist. Hierzu wurden stabile HEK293 HA-sAPLP2CTF-FLAG-Zellen mit dem γ -Sekretase-Inhibitor Merck A behandelt und die HA-sAPLP2CTF-FLAG-Menge im Zelllysate untersucht. Hierbei wurde bei Merck A-Behandlung eine starke Anreicherung von HA-sAPLP2CTF-FLAG im Zelllysate festgestellt, was zeigt, dass HA-sAPLP2CTF-FLAG von γ -Sekretase abgebaut wird (Abbildung 26A).

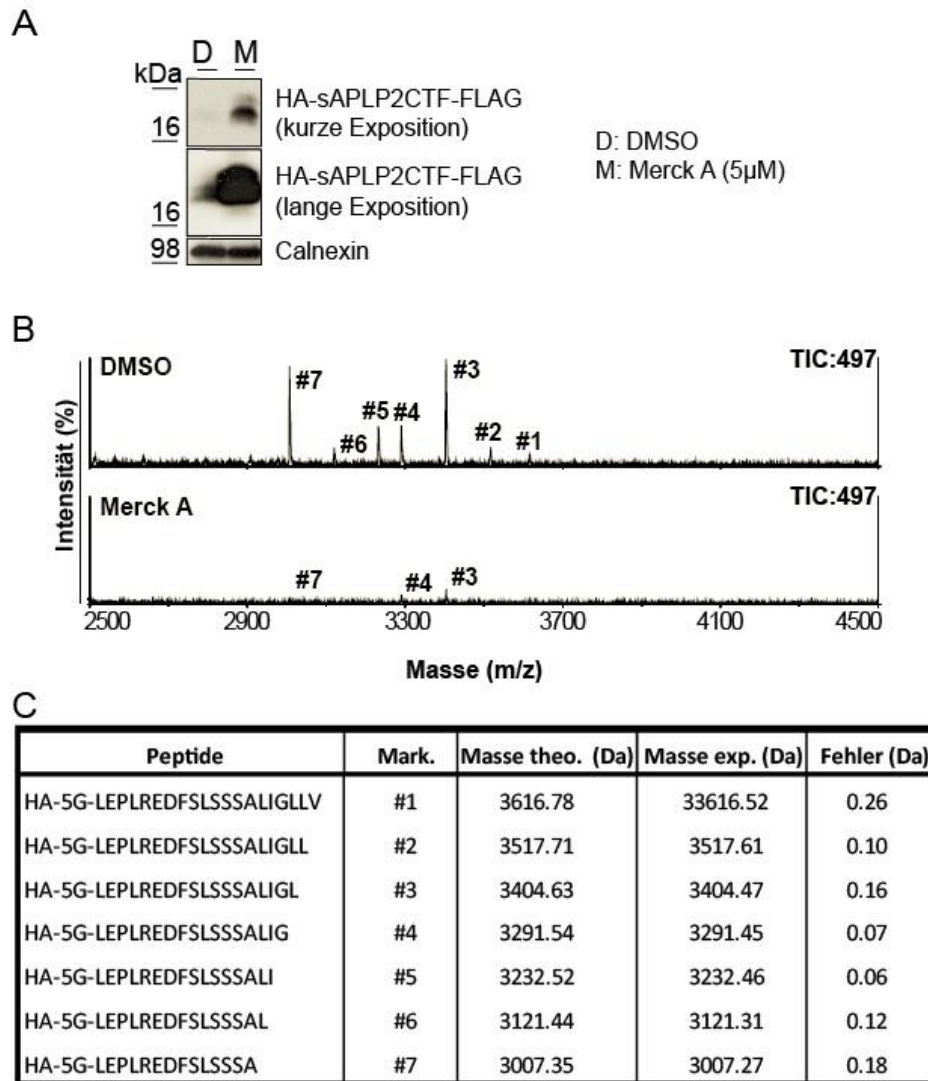
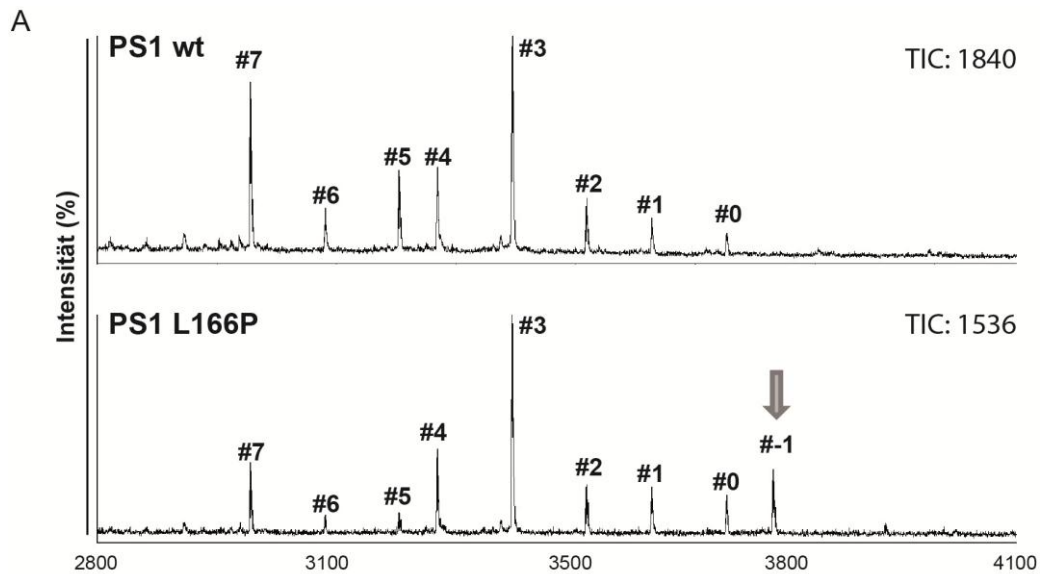


Abbildung 26: Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 mit einem verkürzten HA-sAPLP2CTF-FLAG-Konstrukt. (A) Stabile HEK293 HA-sAPLP2CTF-FLAG-Zellen wurden entweder mit 5 μ M Merck A (M) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle (D) behandelt. Im Zelllysate wurde mittels Western Blot (α -Flag) eine Anreicherung des HA-sAPLP2CTF-Flag-Proteins bei Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor Merck A beobachtet. Calnexin wurde als Ladekontrolle ebenfalls im Zelllysate analysiert. (B) MALDI-TOF-Analyse der Überstände der Zellen aus (A). Im Falle der mit DMSO behandelten Zellen ist ein Peakmuster mit sieben Peaks (#1 bis #7) zu erkennen. Bei einer gleichen Gesamtionenzahl („total ion count“: TIC) sind im Falle der mit Merck A behandelten Zellen nur noch drei der Peaks detektierbar (#3, #4 und #7). Die den Peaks zugrunde liegenden Moleküle sind einfach geladen. (C) HA-sAPLP2 Peptide, die auf Grundlage ihrer theoretischen Masse (Masse theo.) den Peaks (Masse exp.) zugeordnet werden können. Die Massenabweichung zwischen theoretisch berechneter und experimentell bestimmter Masse ist angegeben (Fehler).

Daraufhin wurden die von den HEK293 HA-sAPLP2CTF-FLAG-Zellen sekretierten Peptide nach dem in Abbildung 24 beschriebenen Verfahren aufgereinigt und per MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Dabei wurden im Massenbereich zwischen 2900 m/z und 3700 m/z sieben Peaks detektiert (Abbildung 26B). Die Isotopenmuster dieser Peaks waren im Reflektormodus des Massenspektrometers klar auflösbar und ergaben eine Ladung von $z=1$ für alle den Peaks zu Grund liegenden Moleküle. Damit entsprachen die Massen aller Peaks den entsprechenden m/z-Werten in Da. Die Zuordnung der Massen zu den jeweiligen Peptide wurde wiederum auf der Basis eines *in silico* Verdaus des HA-sAPLP2CTF-FLAG-Proteins durchgeführt und die hierbei theoretisch bestimmten Massen mit den detektierten m/z-Werten verglichen (für die Ergebnisse des *in silico* Verdaus siehe 11.1.3). Dabei ließen sich allen Peaks Peptidsequenzen mit einer Massenabweichung von weniger als 0,3 Da zuordnen (Abbildung 26C). Um zu überprüfen, ob die detektierten Peptide γ -Sekretase-abhängig gebildet werden, wurden auch HA-sAPLP2-Peptide aus dem Zellüberstand der mit Merck A behandelten HEK293 HA-sAPLP2CTF-FLAG-Zellen untersucht. Drei der sieben unter Kontrollbedingungen detektierten Peaks waren auch bei Merck A-Behandlung noch detektierbar, allerdings mit stark verringerter Intensität (Abbildung 26B). Zusammengefasst lässt sich hieraus schließen, dass die detektierten Peaks auf γ -Sekretase-abhängig gebildete Peptide zurückgehen.

4.1.2.3 Variabilität der γ -Sekretase Schnittstellen in Abhängigkeit einer familiären PS1-Mutation

Für die aggressive, familiäre Alzheimer Mutation Presenilin L166P ist bekannt, das γ -Schnittmuster von APP dahingehend zu verändern, dass mehr toxisches A β 42 und weniger A β 38 gebildet wird (Moehlmann et al., 2002). Um zu untersuchen, ob der γ -Schnitt von APLP2 ebenfalls durch diese Mutation moduliert wird, wurden die Experimente zur Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen in HEK293-Zellen mit einer stabilen Überexpression von Wildtyp-Presenilin (PS1 wt) beziehungsweise Presenilin L166P (PS1 L166P) durchgeführt. Bei den Zellen mit einer Überexpression von PS1 wt wurde im Prinzip das gleiche γ -Schnittmuster gefunden wie oben für Zellen ohne PS1-Überexpression beschrieben (Abbildung 27). Für die Zellen mit einer Überexpression von PS1 L166P wurde eine klare Veränderung des γ -Schnittmusters festgestellt. Ein Peak bei circa 3799 Da war im Falle der PS1 L166P überexprimierenden Zellen detektierbar, der weder bei den PS1 wt überexprimierenden noch bei den Zellen ohne PS1 Überexpression detektierbar war. Außerdem war die Intensität der Peaks im höheren Massenbereich im Fall der PS1 L166P-Zellen erhöht im Vergleich mit den PS1 wt-Zellen. Dieses Experiment zeigt eindeutig, dass der γ -Schnitt von APLP2 auch von Mutationen eines γ -Sekretase-Komplexbestandteils moduliert werden kann.



B

Mark.	Peptide	Masse exp. wt (Da)	Masse exp. L166P (Da)	Masse theo. (Da)	Fehler (Da)
#-1	HA-5G-LEPLREDFSLSSALIGLLVIA	-	3798,9	3798,9	0
#0	HA-5G-LEPLREDFSLSSALIGLLVI	3727,9	3727,9	3727,9	0
#1	HA-5G-LEPLREDFSLSSALIGLLV	3614,9	3614,8	3614,8	0,1/0
#2	HA-5G-LEPLREDFSLSSALIGLL	3515,8	3515,8	3515,7	0,1
#3	HA-5G-LEPLREDFSLSSALIGL	3402,8	3402,7	3402,6	0,2/0,1
#4	HA-5G-LEPLREDFSLSSALIG	3289,7	3289,7	3289,5	0,2
#5	HA-5G-LEPLREDFSLSSALI	3231,7	3231,7	3232,5	0,8
#6	HA-5G-LEPLREDFSLSSAL	3119,7	3119,7	3119,4	0,3
#7	HA-5G-LEPLREDFSLSSA	3006,5	3006,6	3006,4	0,1/0,2

Abbildung 27: Analyse der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 bei einer aggressiven Presenilin 1-Mutation. HEK293 mit einer stabilen Überexpression von Wildtyp-Presenilin 1 (PS1 wt) oder Presenilin mit der Mutation L166P wurden mit HA-sAPLP2CTF-FLAG transfiziert und der Zellüberstand wie in Abbildung 24 beschrieben für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Acht Peaks konnten im Fall der PS1 wt überexprimierenden Zellen, neun Peaks im Fall der PS1 L166P überexprimierenden Zellen detektiert werden. Insgesamt war die Intensität der Peaks im höheren Massenbereich im Fall der PS1 L166P Zellen im Vergleich zu den PS1 wt Zellen erhöht. (B) Auflistung der den Peaks aus (A) zu Grunde liegenden Peptide. Die experimentell bestimmte Masse (Masse exp.) ist für die PS1 wt und die PS1 L166P-Zellen angegeben. Außerdem ist die theoretisch für das jeweilige Peptid bestimmte Masse im einfach protonierten Zustand angegeben (Masse theo.). Außerdem ist die Massendifferenz zwischen theoretisch zu erwartender und experimentell bestimmter Masse angegeben (Fehler).

4.2 Proteomische Analyse von BACE1 $-/-$ Zebrafischen

Dieser Teil der Arbeit verfolgte das Ziel, Substrate der Protease BACE1 *in vivo* im Zebrafischmodell zu identifizieren. Dem gewählten Ansatz lag die Überlegung zugrunde, dass Substrate von BACE1 in Fischen ohne BACE1, im Gegensatz zu Fischen mit BACE1, akkumulieren sollten. Die hierfür benötigten BACE1 $-/-$ Zebrafische wurden im Rahmen einer Kollaboration mit Frauke van Bebber, Bettina Schmid und Christian Haass von diesen bereitgestellt. Die BACE1 $-/-$ Zebrafische wurden vom Kollaborationspartner als stabile Linie mittels Zinkfingertechnologie generiert (Meng et al., 2008). Die Kollaborationspartner konnten auf Western Blot-Ebene zeigen, dass die Fische dieser Linie stabil kein BACE1 mehr exprimieren. Eine Publikation, die die Generierung

der BACE1 -/- Linie beschreibt, ist durch den Kollaborationspartner in Vorbereitung. Es ist anzumerken, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Protein Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 grundsätzlich als BACE1 abgekürzt wird und nicht die im Zebrafisch übliche Nomenklatur (*Bace1*) verwendet wird. Dies dient der besseren Lesbarkeit der Arbeit.

4.2.1 Identifikation von BACE1-Substraten im Gesamtproteinlysat von sechs Tage alten Zebrafischlarven

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden sechs Tage alte Larven von BACE1 -/- Fischen vom Kollaborationspartner fixiert in Aliquots à 15 Larven zur Verfügung gestellt. Das Alter der Larven wurde bei sechs Tagen post Fertilisation gewählt, da der Kollaborationspartner zeigen konnte, dass die Expression von BACE1 in Wildtyp-Larven zu diesem Zeitpunkt hoch ist. In einem Vorversuch wurde zudem bestimmt, dass der Proteingehalt einer sechs Tage alten Zebrafischlarve circa 0,5 µg, der Proteingehalt von 15 Larven also 7,5 µg, beträgt.

Zur quantitativen proteomischen Analyse der Zebrafischlarven wurden verschiedene Methoden zur Probenvorbereitung kombiniert. So wurden die Pools von 15 Larven nach der FASP-Methode (filter-aided sample preparation, aus dem Englischen etwa „Filter-unterstützte Probenvorbereitung“) lysiert und tryptisch verdaut (Wisniewski et al., 2009b). Die gewonnenen Peptide wurden mit deuteriertem beziehungsweise nicht-deuteriertem Formaldehyd methyliert. Die von den BACE1 -/- stammenden Peptide wurden dabei mit deuterierten Methylgruppen versehen (also „schwer“ markiert) während die von den Kontrolllarven stammenden Peptide mit nicht-deuterierten Methylgruppen versehen (also „leicht“ markiert) wurden. Bei der von Natriumcyanoborhydrid katalysierten Reaktion der freien Aminogruppen der Peptide (jedes der tryptischen Peptide weist mindestens eine freie Aminogruppe am N-Terminus und gegebenenfalls eine weitere ε-Aminogruppe an einem Lysin auf) kommt es im Falle der Dimethylierung mit nicht-deuteriertem Formaldehyd zu einer Massenzunahme des entsprechenden Peptids um 28,0313 Da pro Aminogruppe, während eine Behandlung mit deuteriertem Formaldehyd zu einer Massenzunahme um 32,0564 Da pro Aminogruppe führt (Boersema et al., 2009; Hsu et al., 2003). Nach der Dimethylierung wurden die Peptide der beiden experimentellen Gruppen vermischt. Um die Komplexität der resultierenden Probe zu verringern, wurde ein StageTip-basiertes Anionenaustausch-Chromatographie-System verwendet. Dabei wurden die Peptide auf der Basis ihres isoelektrischen Punktes in drei Fraktionen aufgeteilt (Wisniewski et al., 2009a). Die einzelnen Fraktionen wurden dann jeweils in zwei technischen Replikaten per LC-MS/MS analysiert (für Details siehe 8.2.5). Die Methodik der proteomischen Analyse ist in Abbildung 28 zusammengefasst.

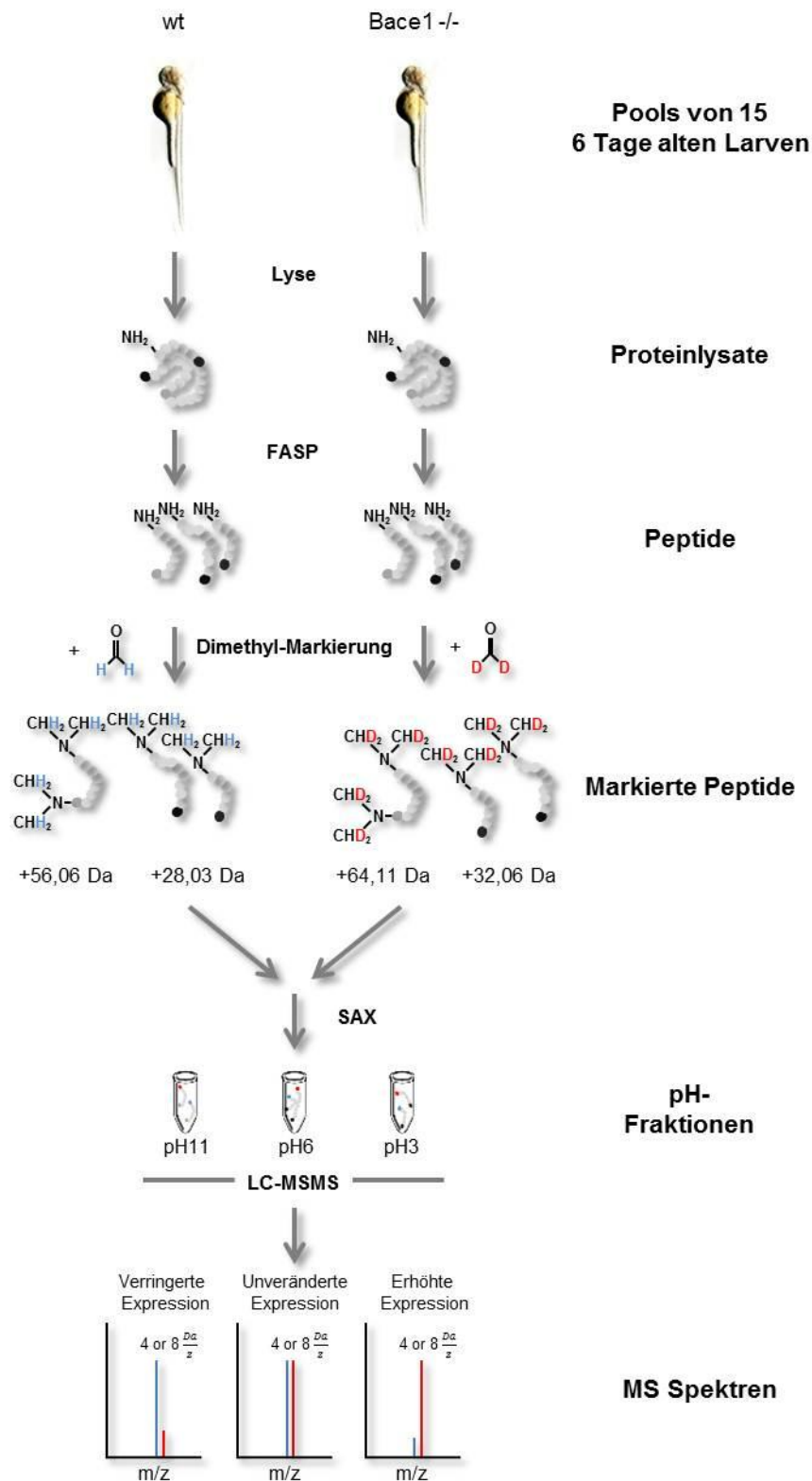


Abbildung 28: Experimenteller Ansatz zur *in vivo* Identifikation von BACE1-Substraten im Gesamtlarvenlysat. Pools von jeweils 15 Wildtyp- (wt) und 15 BACE1^{-/-} Zebrafischlarven wurden lysiert. Die Proteinlysate wurden mittels FASP-Technik verdaut. Die tryptischen Peptide wurden mittels Dimethylierung „leicht“ beziehungsweise „schwer“ markiert. Die Dimethylierung erfolgte in der Anwesenheit von entweder nicht-deuteriertem Formaldehyd (gekennzeichnet durch blaue Wasserstoffatome, für die „leichte“ Markierung) oder in Anwesenheit von deuteriertem Formaldehyd (gekennzeichnet durch rote Deuteriumatome, für die „schwere“ Markierung). Die Masse tryptischer Peptide, die kein Lysin enthielten, erhöhte sich bei der Dimethyl-Markierung um

28,03 Da im Fall der leichten Markierung beziehungsweise um 32,06 Da im Fall der schweren Markierung. Tryptische Peptide die ein Lysin enthielten wurden streng genommen nicht dimethyliert sondern tetramethyliert, da sowohl die Aminogruppe am N-Terminus als auch die ϵ -Aminogruppe am Lysin dimethyliert wurden. Dabei kam es zu einer Massenzunahme der entsprechenden Peptide um 56,06 Da beziehungsweise 64,11 Da. Nach dem Dimethyl-Markierungsschritt wurden die Peptide der beiden experimentellen Bedingungen vermischt. Zur Reduzierung der Einzelprobenkomplexität wurde die Peptidmischung daraufhin via einer StageTip-basierten Anionenaustausch-Chromatographie (SAX) in drei Fraktionen aufgeteilt. pH-Werte der Elutionspuffer für die jeweiligen Fraktionen sind angegeben. Die einzelnen Fraktionen wurden per LC-MSMS vermessen. Peptide, die von Proteinen stammen, die eine verringerte Abundanz in den BACE1 $-/-$ Larven aufwiesen, zeigen dabei MS1-Spektren, bei denen die Intensität des „schwer“ markierten Peptids (dargestellt in Form eines roten Peaks) geringer ist als die der „leicht“ markierten Form des entsprechenden Peptids (dargestellt in Form eines blauen Peaks). Entsprechendes ergibt sich für Peptide von einem in den BACE1 $-/-$ Larven unveränderten Protein (Intensität des „schweren“ und „leichten“ Peptids identisch) beziehungsweise einem Protein mit einer erhöhten Abundanz in den BACE1 $-/-$ Larven (Intensität des „schweren“ Peptids höher als die des „leichten“).

Insgesamt konnten bei der Analyse 3578 Proteine identifiziert werden. 2513 dieser Proteine wurden mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden identifiziert. Für 1905 Proteine war eine Bestimmung ihrer relativen Abundanz, das heißt ihrer Abundanz in den BACE1 $-/-$ Larven im Verhältnis zu den Wildtypylarven auf der Basis von mindestens zwei eindeutigen Peptiden möglich (Abbildung 29A). Ein Protein wurde als quantifizierbar definiert, wenn seine relative Abundanz in mindestens zwei der drei durchgeführten biologischen Replikate bestimmbar war. Von den identifizierten Proteinen wiesen 230 die Gene Ontology (GO) Annotation „intrinsisches Membranprotein“ auf. Auf Grund der mangelhaften Annotation des Zebrafischproteoms ist aber, wie unter 5.2.2 ausführlich diskutiert, davon auszugehen, dass der tatsächliche Anteil an intrinsischen Membranproteinen um einen Faktor zwei bis drei höher liegt.

Der Großteil der quantifizierbaren Proteine zeigte keine starke Veränderung der relativen Abundanz (Abbildung 29B). Von den quantifizierbaren, als intrinsische Membranproteine annotierten Proteinen zeigte lediglich eines eine Anreicherung um mindestens 40 % (Abbildung 29C). Dieses Protein, das Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), konnte mit vier eindeutigen Peptiden identifiziert werden und wurde um das 4,2-fache akkumuliert in den BACE1 $-/-$ Larven gefunden. Ein p-Wert von 0,006 wurde auf der Basis eines Student t-Tests ohne multiples Hypothesentesten bestimmt. Der korrigierte p-Wert nach Benjamini-Hochberg beträgt für EpCAM 0,14.

Ein großes Problem stellt bei diesen Ergebnissen die Tatsache dar, dass keines der bekannten BACE1-Substrate mit ausreichend vielen eindeutigen Peptiden identifiziert werden konnte, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Somit fehlt in diesem Screen jegliche Positivkontrolle. Die offensichtlichsten BACE1-Substrate, die APP-Orthologen Appa und Appb, konnten zum Beispiel nur in einem der drei biologischen Replikate identifiziert und quantifiziert werden. Dabei zeigte die Proteingruppe, die beide Ortho-

logen, also Appa und Appb, beinhaltetete, eine 2,2-fache Anreicherung in den BACE1 $-/-$ Fischen. Dies reichte aber auf Grund des gewählten Ausschlusskriteriums, dass ein Protein in mindestens zwei der drei biologischen Replikate quantifizierbar sein muss, nicht aus, um einen Hit und somit eine Positivkontrolle darzustellen. Es ist aber eine leichte Indikation dafür, dass der Versuchsaufbau prinzipiell Substrate identifizieren kann.

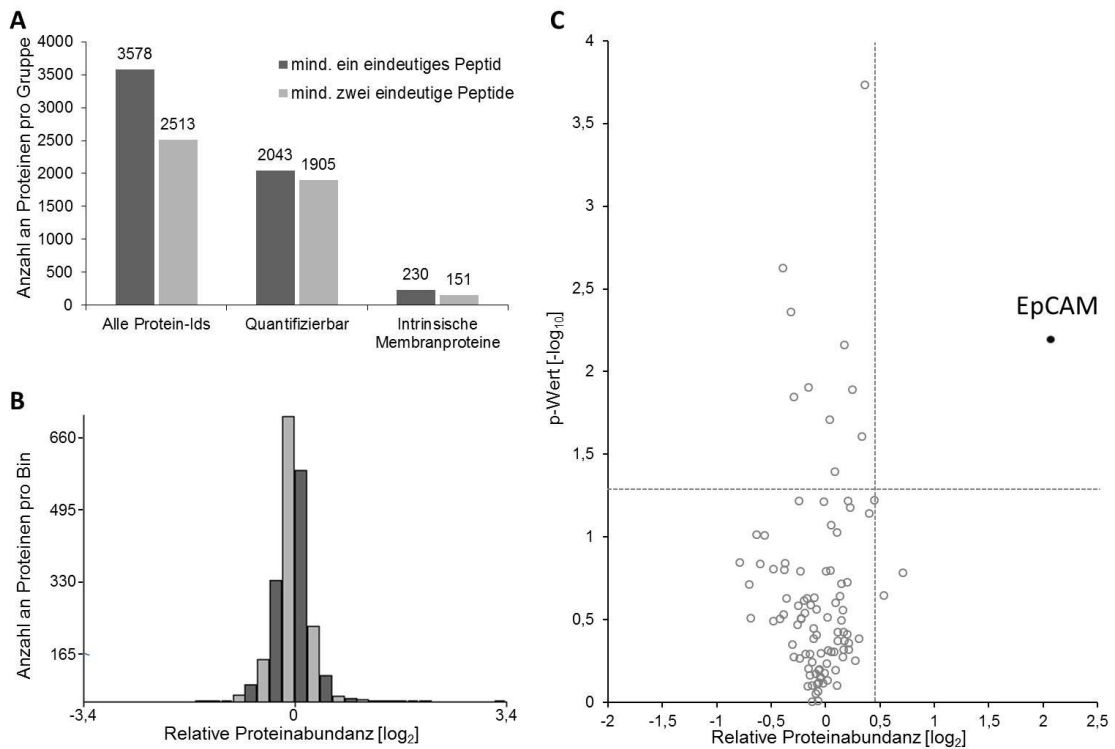


Abbildung 29: Quantitative proteomische Analyse der BACE1 $-/-$ Larven. Die Proteome von sechs Tage alten BACE1 $-/-$ und Wildtyp Zebrafischlarven wurden verglichen. (A) Insgesamt konnten 3587 Proteine identifiziert werden, 2513 davon mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden. Hiervon wiederum waren 1905 in mindestens zwei der drei biologischen Replikate quantifizierbar. Insgesamt 230 der identifizierten Proteine waren nach GOCC-Annotation intrinsische Membranproteine. (B) Histogramm der relativen Proteinabundanz. Die Anzahl an Proteinen pro Bin ist dargestellt, die Bingröße beträgt 0,2. (C) Vulkanplot zur Darstellung der Proteinabundanz von intrinsischen Membranproteinen und der Bewertung der Signifikanz ihrer Anreicherung beziehungsweise ihrer Reduktion. Jeder Punkt stellt ein Protein dar. Der negative dekadische Logarithmus des mittels eines t-Tests ohne Korrektur für multiples Hypothesentesten berechneten p-Werts ist gegen den Median der logarithmierten Proteinabundanz der drei biologischen Replikate (Relative Proteinabundanz) aufgetragen. Punkte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie stellen Proteine dar, deren p-Wert kleiner als 0,05 ist. Punkte rechts der vertikalen gestrichelten Linie codieren für Proteine, deren Abundanz in den BACE1 $-/-$ Larven um mindestens 40 % erhöht vorliegt. Das einzige Protein, das diese Kriterien erfüllt, ist das in der Abbildung hervorgehobene Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM).

Trotz der Bedenken bezüglich der fehlenden Positivkontrolle wurde das am stärksten akkumulierende Typ-1 Transmembranprotein, EpCAM, weiter daraufhin untersucht, ob es sich hierbei um ein BACE1-Substrat handelt und damit die Anreicherung in den BACE1 $-/-$ Larven möglicherweise auf die fehlende Prozessierung von EpCAM durch BACE1 zu erklären ist.

Eine Validierung der Anreicherung des volle-Länge EpCAM-Moleküls im Zebrafisch war nicht möglich, da keiner der getesteten humanen und murinen Antikörper eine Spezifität für das Zebrafisch-EpCAM (zfEpCAM) zeigte. Allerdings bestand die Möglichkeit, die mögliche Proteolyse von murinem EpCAM (mEpCAM) durch BACE1 zu testen, da ein Kollaborationspartner HEK293-Zellen zur Verfügung stellte, die stabil mEpCAM mit einem in die Ektodomäne inserierten Flag-Tag exprimierten (siehe Abbildung 30). In der Literatur ist ein BACE1-Schnitt von EpCAM nicht beschrieben, dagegen aber eine Prozessierung von EpCAM durch die Metalloprotease ADAM17 (Gires, 2009; Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009).

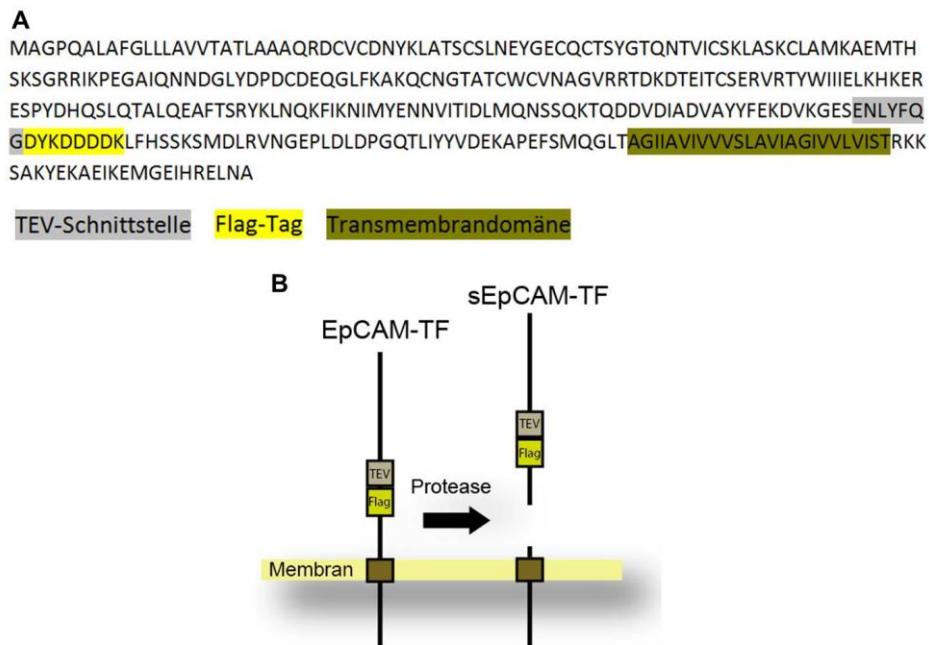


Abbildung 30: Schema der proteolytischen Prozessierung von EpCAM. (A) Die Aminosäuresequenz von murinem EpCAM mit der eingefügten TEV-Protease Schnittstelle und dem eingefügten Flag-Tag ist hier abgebildet. Außerdem ist die vorhergesagte Transmembrandomäne markiert. (B) Schema der proteolytischen Prozessierung des mEpCAM-TEV-Flag (EpCAM-TF). EpCAM-TF wird von einer Protease im Juxtamembranbereich zwischen der Transmembrandomäne und dem Flag-Tag geschnitten. Dabei entsteht lösliches EpCAM-TF (sEpCAM-TF), ein C-terminales Fragment verbleibt in der Membran.

Um die Hypothese zu testen, dass EpCAM ein BACE1-Substrat ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob für EpCAM spezifische Banden im Überstand von HEK293 mEpCAM-TF-Zellen detektierbar sind. Dies war der Fall, wie eine vergleichende Western Blot-Analyse von mEpCAM-TF transfizierten und nicht-transfizierten HEK293-Zellen zeigte (Abbildung 31A, B). Eine Überexpression von humanem BACE1 in den HEK293 mEpCAM-TF-Zellen führte zu einer dramatischen Zunahme der Ektodomänenspaltung von mEpCAM-TF (Abbildung 31C). Dies zeigt klar, dass BACE1 mEpCAM-TF schneiden kann. Es bleibt aber offen, ob die endogen vorkommende Menge an BACE1 ausreichend ist, um diesen Schnitt zu katalysieren und in welchem Verhältnis BACE1 und ADAM17 zur Spaltung von mEpCAM beitragen.

Um dies zu untersuchen, wurden die HEK293 mEpCAM-TF Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 und dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 behandelt. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlung mit C3 die Ektodomänenspaltung um circa 70 % hochsignifikant ($p < 0,01$) verringerte, während die Behandlung mit TAPI-1 zu keiner detektierbaren Abnahme der Ektodomänenspaltung von mEpCAM-TF führte (Abbildung 31A, B). Eine Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster PMA führte dazu, dass eine weitere Bande für das lösliche sEpCAM-TF detektierbar wurde. Diese stellt vermutlich das ADAM17-abhängig generierte sEpCAM-TF dar, während die andere detektierte Bande vermutlich zum größten Teil auf das Produkt des BACE1-vermittelten Schnitts von EpCAM zurückzuführen ist (Abbildung 31D).

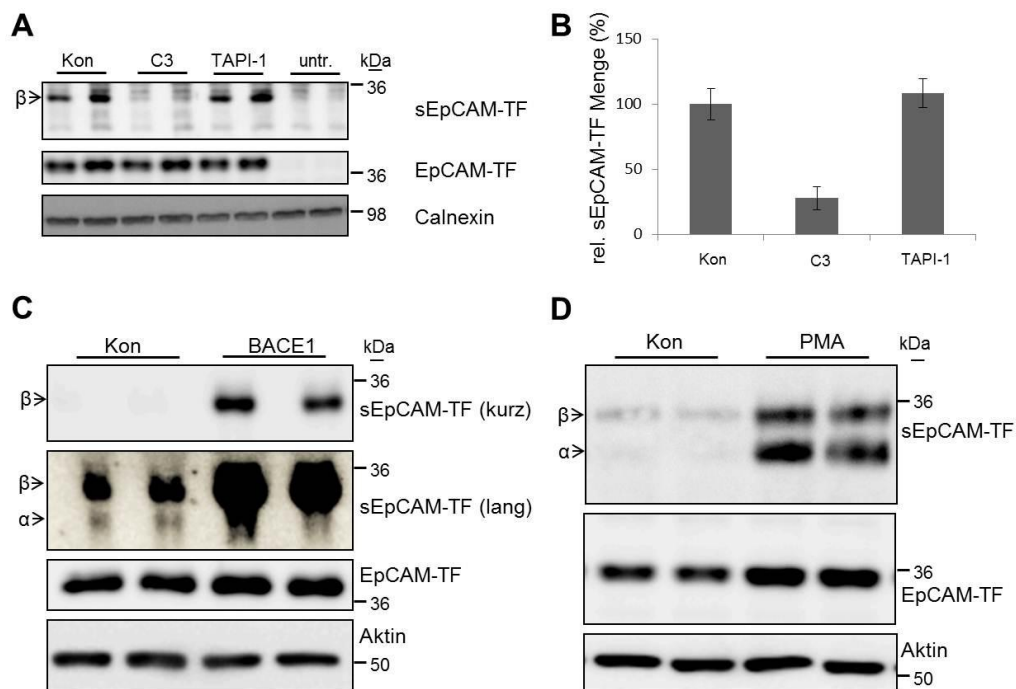


Abbildung 31: EpCAM ist ein BACE1-Substrat. Stabile HEK293 mEpCAM-TEV-Flag (EpCAM-TF) Zellen wurden auf die Spaltung von EpCAM-TF durch BACE1 untersucht. Lösliches EpCAM-TF (sEpCAM-TF) wurde im Zellüberstand, volle-Länge EpCAM-TF und Calnexin wurden im Zelllysat analysiert. (A) Die Zellen wurden mit dem BACE1-Inhibitor C3, dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-1 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kon) behandelt. Des Weiteren wurden untransfizierte HEK293wt-Zellen (untr.) parallel mit DMSO behandelt. In den DMSO-behandelten Zellen ist klar eine Bande zu erkennen, die in den untransfizierten Zellen nicht erkennbar ist (β). Diese Bande ist in den C3-behandelten Zellen klar reduziert, in den TAPI-1 behandelten Zellen ist keine Änderung sichtbar. (B) Quantifizierung von A. Die Reduktion der relativen sEpCAM-TF-Menge in den C3-behandelten Zellen beträgt 70 % und ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$, $n=4$). In den TAPI-1-behandelten Zellen ist keine signifikante Veränderung der sEpCAM-TF-Menge detektierbar. (C) Die Zellen wurden mit BACE1 oder Luciferase als Kontrolle (Kon) transfiziert. In den BACE1-transfizierten Zellen ist ein klarer Anstieg der bereits in A detektierten sEpCAM-TF-Bande (β), sowohl bei kurzer wie auch bei langer Exposition des Blots, erkennbar. Außerdem ist eine weitere Bande für sEpCAM-TF bei der längeren Exposition detektierbar (α), deren Intensität nicht in demselben Maße zunimmt, wie die der β-Bande. (D) Die Zellen wurden mit dem Phorbolster PMA oder Ethanol als Lademittelkontrolle (Kon) behandelt. Die Behandlung mit PMA führt zu einer starken Erhöhung der Intensität der sEpCAM-TF α-Bande und zu einer weniger starken Erhöhung der Intensität der sEpCAM-TF β-Bande. Außerdem führte die vierstündige Behandlung mit PMA zu einer Erhöhung der volle-Länge-EpCAM-TF-Menge.

Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass zumindest murines EpCAM ein BACE1-Substrat sein kann. Der *in vivo* Screen nach BACE1-Substraten im Gesamtlarvenlysat von BACE1 $-/-$ Larven war also zumindest teilweise erfolgreich.

4.2.2 Identifikation von BACE1-Substraten im Gehirnllysat sechs Monate alter Zebrafischlarven

Da bei der Analyse der Gesamtproteinlysate der sechs Tage alten Zebrafischlarven die Quantifizierung wichtiger, als Positivkontrollen verwendbarer, Proteine wie zum Beispiel Appa und Appb nicht möglich war, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer Ansatz zur *in vivo* Identifikation von BACE1-Substraten mittels quantitativer proteomischer Analyse der BACE1 $-/-$ Zebrafische durchgeführt. Hierzu wurden zwei Modifikationen des oben beschriebenen Ansatzes gewählt.

Erstens wurden Gehirnllysat von sechs Monate alten Zebrafischen anstelle der Gesamtlarvenlysat der sechs Tage alten Larven analysiert. Im Gehirn der Zebrafische ist BACE1 sehr stark exprimiert, wie der Kollaborationspartner mittels *in situ*-Hybridisierungsexperimenten zeigen konnte und wie es von anderen Organismen her bekannt ist (Dislich and Lichtenthaler, 2012). Daraus lässt sich schließen, dass physiologisch relevante BACE1-Substrate im Gehirn ebenfalls exprimiert sein sollten, insbesondere die wichtigen Positivkontrollen Appa und Appb (Liao et al., 2012; Musa et al., 2001). Es kann also hypothetisiert werden, dass der relative Anteil der putativen BACE1-Substrate im Gehirnllysat relativ zur Gesamtproteinmenge höher ist als deren relativer Anteil im Gesamtlarvenlysat. Damit sollte die Identifikation und Quantifizierung von diesen Proteinen mittels Massenspektrometrie im Gehirnllysat einfacher sein als im Gesamtproteinlysat.

Zweitens wurde die Quantifizierung „label-free“ durchgeführt, das heißt es wurde auf die Dimethylierung verzichtet. Zur „label-free“-Quantifizierung (LFQ) wurde die MaxQuant Software Suite mit aktivierter LFQ genutzt, wie von Lubner et al. (2010) erstmals beschrieben (Cox and Mann, 2008b; Lubner et al., 2010). Zur LFQ werden die Proben der einzelnen Versuchsbedingungen getrennt voneinander gemessen. In der folgenden Auswertung werden dann die Intensitäten der jeweiligen Peptide in den jeweiligen Proben, beziehungsweise formal korrekt die Volumen aller entsprechenden de-isotopierten 3-D Peaks aller MS1-Merkmalen der jeweiligen Proben, miteinander verglichen. Hierbei sind verschiedene Normalisierungs- beziehungsweise Skalierungsberechnungen nötig. Die Grundannahme, die diesen Normalisierungen bei MaxQuant zugrunde liegt ist, dass der Median aller Quantifizierungen von detektierten MS1-Merkmalen lokal und global 1 beträgt (Cox and Mann, 2008b). LFQ wurde für den zweiten Screen gewählt, da hierbei, wie in Vorversuchen gezeigt, signifikant höhere Proteinidentifikationsraten erzielt werden konnten und damit eine Identifikation und

Quantifizierung von Appa und Appb regelmäßig möglich war. Dies stellt einen klaren Vorteil von LFQ gegenüber der Quantifizierung mittels Dimethyl-Markierung für einen *in vivo* Screen nach BACE1-Substraten im Zebrafischgehirn dar.

Durchgeführt wurde der Screen wie folgt: Zunächst wurde der Proteingehalt von sechs Monate alten Zebrafischgehirnen bestimmt. Dieser lag bei circa 30 µg Protein pro Gehirn. Für das Hauptexperiment wurden vom Kollaborationspartner vier Gehirne von sechs Monate alten Wildtyp-Zebrafischen und fünf Gehirne von BACE1 ^{-/-} Zebrafischen präpariert, mit PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff fixiert. Aus diesen Gehirnen wurden für die massenspektrometrische Analyse Proteinlysate gewonnen. Die Proteinlysate wurden mittels FASP-Technik tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels StageTip-basierter Anionenaustausch-Chromatographie in drei Fraktionen aufgeteilt. Jede dieser Fraktionen wurde einzeln mittels LC-MSMS analysiert. Die erhaltenen Spektren wurden mittels LFQ analysiert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 32 dargestellt.

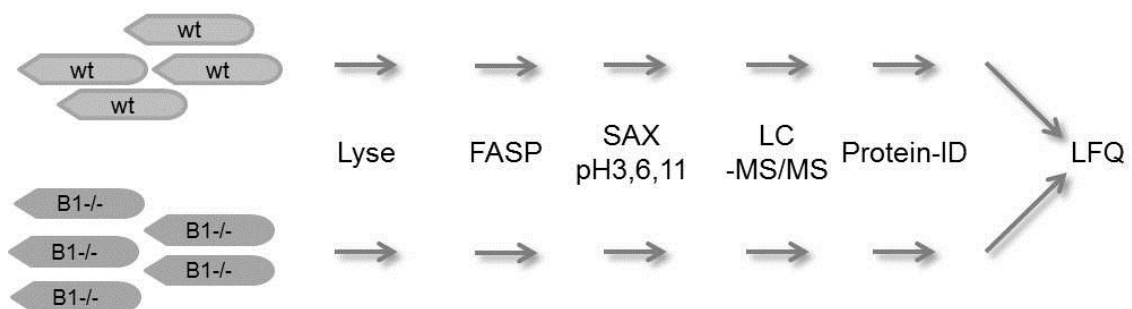


Abbildung 32: Schematischer Versuchsaufbau zur quantitativen proteomischen Analyse von BACE1 ^{-/-} Zebrafischgehirnen. Gehirne von sechs Monate alten Zebrafischen wurden präpariert. Für den Versuch wurden vier Gehirne von Wildtyp-Fischen (wt) und fünf Gehirne von BACE1 ^{-/-} Fischen (B1-/-) verwendet. Diese wurden jeweils einzeln lysiert und tryptisch mittels FASP-Technik verdaut. Die resultierenden Peptide wurden durch eine StageTip-basierte Anionenaustausch-Chromatographie (SAX) in drei Fraktionen aufgetrennt (pH3, 6, 11) und jede dieser Fraktionen einzeln per LC-MSMS analysiert. Insgesamt wurden dabei 27 Rohdatensätze gewonnen. In diesen wurde die Proteinidentifikation durchgeführt und anschließend eine „label-free“-Quantifizierung (LFQ) detektierter MS1-Merkmale zwischen den 12 Wildtyp-Datensätzen und den 15 BACE1 ^{-/-} Datensätzen durchgeführt. Die Quantifizierungen wurden anschließend mit den Proteinidentifikationen verknüpft.

Insgesamt konnten bei der Analyse der Zebrafischgehirne 7352 Proteine mit einer Falsch-Positiv-Rate von weniger als 1 % identifiziert werden. 5614 Proteine davon wurden mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden identifiziert. Auf der Basis von mindestens zwei eindeutigen Peptiden quantifizierbar war die Abundanz von 4770 Proteinen. 422 dieser Proteine hatten die Gene Ontology (GO) Annotation „intrinsic to membrane“ und sind damit intrinsische Membranproteine (siehe Abbildung 33A).

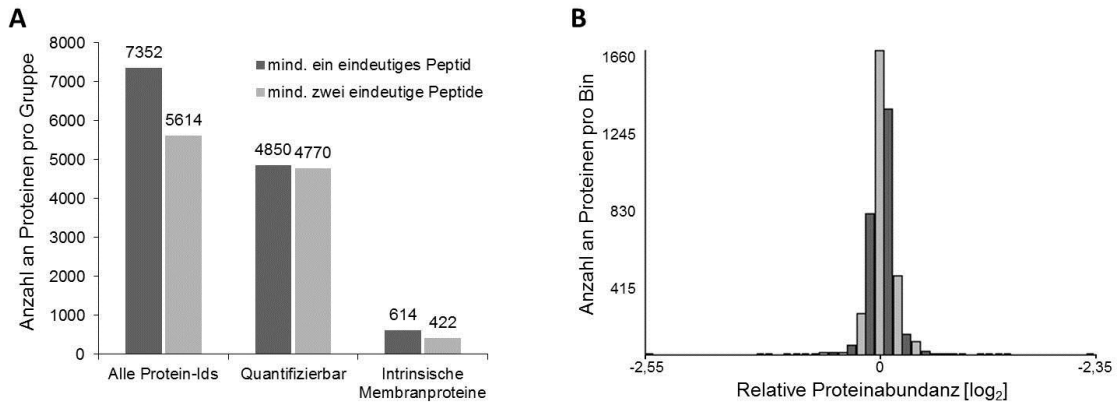


Abbildung 33: Proteinidentifikationen in den Zebrafischgehirnen. (A) Insgesamt konnten bei der quantitativen proteomischen Analyse der sechs Monate alten Zebrafischgehirne 7352 Proteine identifiziert werden. Quantifizierbar waren davon 4850 Proteine, als intrinsische Membranproteine annotiert waren 614. Mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden konnten insgesamt 5614 Proteine identifiziert werden, wovon 4770 quantifizierbar waren. Insgesamt waren 422 der mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden identifizierten Proteine als intrinsische Membranproteine annotiert. (B) Histogramm der relativen Proteinabundanz. Die Anzahl an Proteinen pro Bin ist angegeben, die Bingröße beträgt 0,2.

Die GO-Annotation „intrinsic to membrane“ in der Kategorie „Cellular Compartment“ (engl. für Zellkompartiment, für die GO-Kategorie auch kurz GOCC) bedeutet, dass ein Protein kovalent mit der Zellmembran verbunden ist, sei es durch eine oder mehrere Transmembrandomänen oder durch einen GPI-Anker. Während die positive Annotation ein sehr zuverlässiger Indikator dafür ist, dass ein Protein in der Tat ein intrinsisches Membranprotein ist, bedeutet eine fehlende Annotation als intrinsisches Membranprotein nicht zwingend, dass das entsprechende Protein kein Membranprotein ist. Insgesamt wiesen überhaupt nur 2691 der 7352 identifizierten Proteine, beziehungsweise circa 40 %, eine GO Annotation in der Kategorie „Cellular Compartment“ auf. Hieraus lässt sich unter den Annahmen, dass nicht-annotierte Proteine entsprechend den annotierten Proteinen auf die unterschiedlichen zellulären Kompartimente verteilt sind und dass der Anteil der mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden detektierbaren Proteinen in nicht-annotierten und annotierten Proteinen identisch ist, schließen, dass im Gesamtdatenset der Gehirnllysate vermutlich circa 1055 intrinsische Membranproteine mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden detektiert werden konnten. Bezieht man auch noch mit ein, dass einige Proteine intrinsische Membranproteine sind, obwohl sie eine GOCC-Annotation aufweisen, die „intrinsic to membrane“ nicht beinhaltet, wie zum Beispiel der Lamin B receptor (Transmembranprotein, identifiziert mit 7 eindeutigen Peptiden) oder Reticulon1-like (Transmembranprotein, 20 eindeutige Peptide), so muss man von einer noch höheren Anzahl an identifizierten intrinsischen Membranproteinen ausgehen. Weitere prominente Beispiele für intrinsische Membranproteine, die in den Gehirnllysaten identifiziert werden konnten, aber nach GOCC-Annotation entweder nicht als intrinsische Membranproteine oder gar nicht annotiert sind, sind Contactin 1b (GPI-verankertes Protein, 20 eindeutige Peptide), Contactin 2 (GPI-verankertes

Protein, 16 eindeutige Peptide) und Neural Cell Adhesion Molecule 2 und 3 (Transmembranproteine, 15 beziehungsweise 6 eindeutige Peptide). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur die nach GO-Annotation als intrinsische Membranproteine annotierten Proteine weiter untersucht, da eine manuelle Annotation aller nicht annotierten Proteine nicht darstellbar war. Dies zeigt klar, dass eine bessere Annotation des Zebrafischproteoms einen wichtigen Fortschritt in Bezug auf eine möglichst umfassende experimentelle Analyse des Zebrafischproteoms darstellen würde.

Betrachtet man die quantitativen Ergebnisse so stellt man fest, dass das Gros der Proteine in den BACE1 $-/-$ Gehirnen unverändert vorliegt (siehe Abbildung 33B). Besonders interessant sind natürlich die relativen Proteinabundanzen der intrinsischen Membranproteine in den BACE1 $-/-$ Gehirnen, da diese Proteine potentielle BACE1-Substrate darstellen. Betrachtet man exklusiv diese Proteine in einem Vulkanplot so stellt man fest, dass auch hier das Gros der intrinsischen Membranproteine in den BACE1 $-/-$ Hirnen in unveränderter Abundanz vorliegt (Abbildung 34). Allerdings zeigen einige intrinsische Membranproteine auch eine klare Anreicherung beziehungsweise eine klare Verringerung in den BACE1 $-/-$ Hirnen.

Zur Bestimmung eines „Hits“ wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die folgenden Kriterien verwendet. Ein Protein wurde als signifikant akkumulierend betrachtet, wenn es mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden identifiziert werden konnte, in mindestens zwei der vier Wildtyp-Gehirne und zwei der fünf BACE1 $-/-$ Gehirne eine Bestimmung eines LFQ-Wertes möglich war, eine Anreicherung des Proteins um mindestens 40 % gefunden wurde und der p-Wert nach einem t-Test ohne Korrektur bezüglich des multiplen Hypothesentestens kleiner 0,05 für den Vergleich der LFQ-Werte der Wildtyp- und der BACE1 $-/-$ Gehirne für das entsprechende Protein war. 24 Proteine erfüllten diese Definition (Abbildung 34 und Tabelle 1). Berechnet man die Falsch-Positiv-Rate für das Kriterium des t-Tests nach der von Benjamini und Hochberg beschriebenen Methode, so beträgt diese für das Datenset 0,30 (Benjamini and Hochberg, 1995).

Unter den nach der oben eingeführten Definition akkumulierenden intrinsischen Membranproteinen befinden sich die beiden Positivkontrollen Appa und Appb. Des Weiteren befinden sich Orthologe anderer bekannter BACE1-Substrate darunter: Microsomal prostaglandin E synthase 2, Novel protocadherin protein (das Orthologe von humanem und murinem Protocadherin7), Amyloid-like protein 2 und Neural cell adhesion molecule L1.2 (Dislich and Lichtenthaler, 2012; Hemming et al., 2009; Kihara et al., 2010; Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Außerdem sind drei Proteine darunter, für die zumindest schon für Proteinfamilienmitglieder des humanen oder murinen Orthologen vorgeschlagen wurde, dass diese BACE1-Substrate sind: Novel protein similar to Glypican 1 und Zgc:63947 sind Orthologe des humanen Glypican 1. Für humanes Glypican 3 wurde bereits vorgeschlagen, dass es ein BACE1 Substrat ist (Hemming et al., 2009). Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1 ist das

Zebrafisch-Orthologe des gleichnamigen Proteins in der Maus. Für murines Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 2 wurde bereits vorgeschlagen, dass es ein BACE1-Substrat ist (Kuhn et al., 2012).

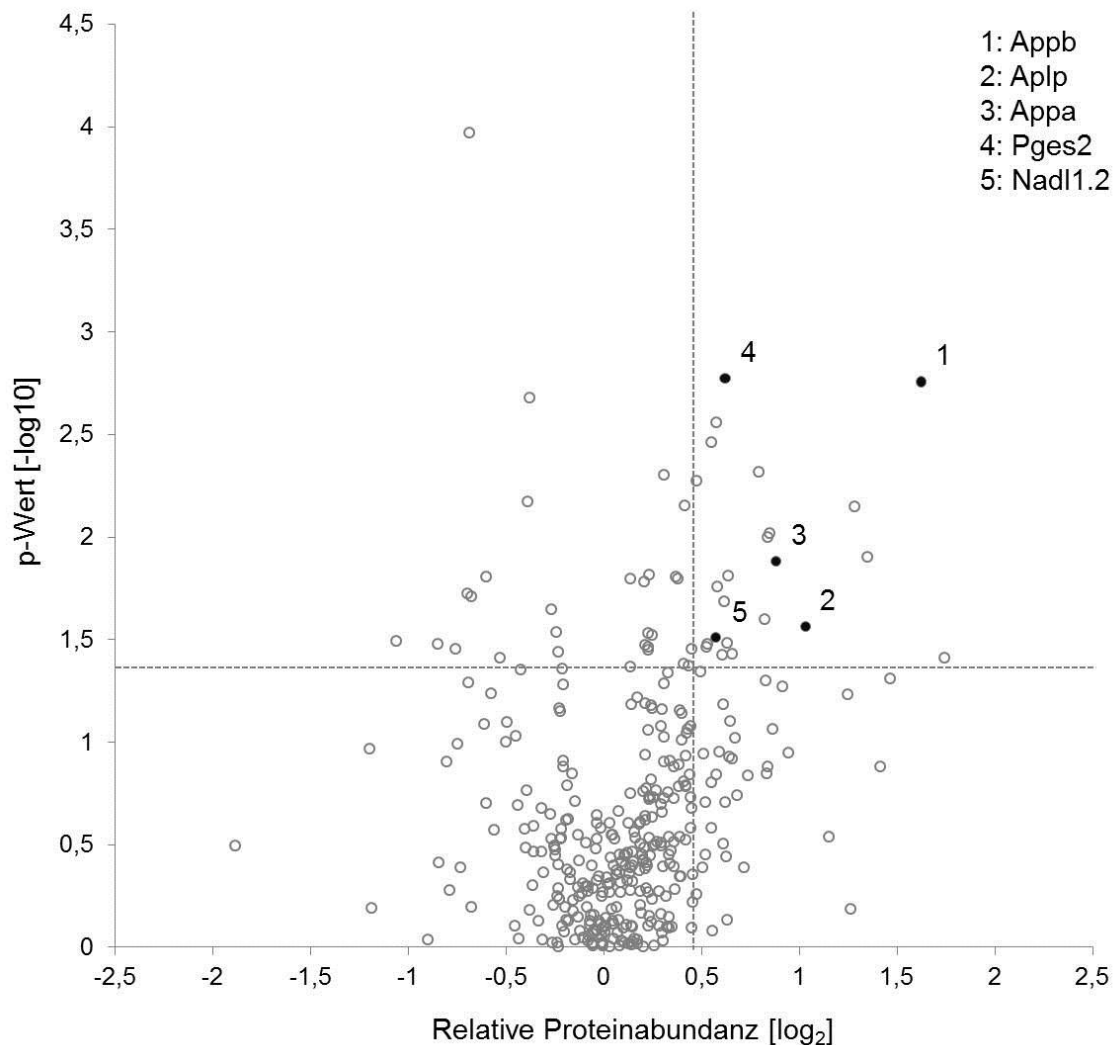


Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse der quantitativen proteomischen Analyse der BACE1^{-/-} Gehirne im Vulkanplot. Ergebnisse der quantitativen proteomischen Analyse der nach GO-Annotation intrinsischen Membranproteine von fünf BACE1^{-/-} und vier Wildtyp-Gehirnen dargestellt als Vulkanplot. Jedes Protein wird durch einen Kreis symbolisiert. Der negative dekadische Logarithmus des p-Werts nach einem t-Test ohne Berücksichtigung des multiplen Hypothesentestens ist gegen den Median der Abundanz des jeweiligen Proteins in den BACE1^{-/-} Gehirnen im Vergleich mit den Wildtyp-Gehirnen (Relative Proteinabundanz) aufgetragen. Die zwei gestrichelten Linien dienen zur vereinfachten Darstellung der Hits nach der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Definition: Proteine die um über 40 % in den BACE1^{-/-} Gehirnen akkumulieren können rechts der vertikalen gestrichelten Linie, Proteine die einen p-Wert von weniger als 0,05 aufweisen oberhalb der horizontalen Linie, gefunden werden. Unter den Hits befinden sich unter anderem die Orthologen der fünf bekannten BACE1-Substrate Appa, Appb, Aplp, Pges2 und Nadl1.2. Diese sind durch eine schwarze Füllung markiert und beschriftet. Alle Hits sind in Tabelle 1 detailliert aufgeführt.

Es lässt sich festhalten, dass der LFQ-basierte *in vivo* Screen nach BACE1-Substraten in den Gehirnen der BACE1^{-/-} Zebrafische erfolgreich war, da eine Reihe an bekannten BACE1-Substraten identifiziert werden konnte.

Tabelle 1: Akkumulierende intrinsische Membranproteine in den BACE1 -/- Gehirnen. Ergebnisse der quantitativen proteomischen Analyse der BACE1 -/- Gehirne. Um mindestens 40 % akkumulierende intrinsische Membranproteine sind angegeben, deren Akkumulation nach einem t-Test ohne Korrektur für multiples Testen signifikant ist ($p < 0,05$). Der Proteinname, die relative Abundanz des jeweiligen Proteins in den BACE1 -/- Gehirnen im Vergleich mit den Wildtypgehirnen (Akkumulation), die Anzahl eindeutiger Peptide, auf die die Identifizierung und die Quantifizierung der Akkumulation zurück geht, der Membranproteintyp (Typ) sowie der p-Wert sind angegeben. Neben Typ I und Typ II-Transmembranproteinen sind auch Multipass- (MP, Anzahl an Transmembrandomänen in Klammer) und GPI-verankerte Proteine darunter. Ein Stern hinter dem Membranproteintyp gibt an, dass diese Information nur auf einer Vorhersage beruht. Die Proteine sind nach der Effektstärke ihrer Akkumulation durchnummeriert. Proteine, deren humane oder murine Orthologe als BACE1-Substrate bereits etabliert sind, sind fett geschrieben und grau hinterlegt (Hemming et al., 2009; Kihara et al., 2010; Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Proteine, für die für Proteinfamilienmitglieder der humanen oder murinen Orthologen, eine Proteolyse durch BACE1 vorgeschlagen wurde, sind fett geschrieben, aber nicht grau hinterlegt dargestellt (Hemming et al., 2009; Kuhn et al., 2012).

#	Proteinname	Akkumulation	Eind. Peptide	Typ	p-Wert
1	Protein lunapark-B	3,35	6	MP(2)	0,039
2	Amyloid beta (A4) protein b	3,08	5	I	0,002
3	Novel protein similar to vertebrate TMEM24	2,77	2	II	0,049
4	Novel protein similar to vertebrate OATC1	2,55	2	MP(4)*	0,013
5	UPF0451 protein C17orf61 homolog	2,43	4	MP(2)	0,007
6	Amyloid-like protein 2	2,04	6	I	0,027
7	Amyloid beta (A4) protein a	1,84	2	I	0,013
8	Zgc:73292 (CD-82-like)	1,80	4	MP(4)*	0,010
9	Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1	1,79	2	I	0,025
10	Novel protein similar to vertebrate GABRB3	1,77	4	MP(2)*	0,010
11	Novel protein similar to vertebrate glypican 1	1,73	3	GPI	0,005
12	Novel protocadherin protein	1,58	9	I	0,037
13	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	1,55	4	I	0,016
14	Protein tweety homolog 3	1,55	4	MP(5)*	0,033
15	Microsomal prostaglandin E synthase 2	1,54	12	I	0,002
16	Plexin A3	1,53	29	I	0,021
17	Cleft lip and palate transmembrane protein 1 homolog	1,52	8	MP(5)	0,038
18	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	1,50	41	MP(10)	0,174
19	Phosphoglycerate mutase family member 5	1,49	6	I	0,003
20	Zgc:63947 (Glypican-1 like)	1,49	19	GPI	0,031
21	Immediate early response 3-interacting protein 1	1,47	2	MP(2)	0,003
22	Uncharacterized transmembrane protein C1orf95 homolog	1,45	2	MP(2)	0,033
23	Novel protein similar to vertebrate synaptic vesicle glycoprotein 2C (SV2C)	1,44	7	MP(12)	0,035
24	Neural cell adhesion molecule L1.2	1,41	33	I	0,045

5 Diskussion

Der Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, für die es bis heute keine kurative Therapie gibt (Finger, 2011; Huang and Mucke, 2012). Der molekulare Mechanismus der Pathologie von Morbus Alzheimer wird in der Bildung neurotoxischer A β -Oligomere gesehen (Selkoe, 2011). Diese entstehen durch Oligomerisierung der bei der regulierten Intramembran-Proteolyse von APP gebildeten A β -Monomeren (Hardy and Selkoe, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, zwei Aspekte der regulierten Intramembran-Proteolyse mit Bezug zur Pathologie von Morbus Alzheimer zu untersuchen. Zum einen wurde die regulierte Intramembran-Proteolyse von APLP2, einem Homologen des APP, untersucht. Dies sollte Aufschluss über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Prozessierung dieser zwei funktionell zumindest partiell redundanten Proteine bringen. Des Weiteren wurde versucht, neue Substrate der „Alzheimer Protease“ BACE1 in einem Zebrafischmodell *in vivo* unter Verwendung von proteomischen Techniken zu identifizieren.

5.1 Analyse der regulierten Intramembran-Proteolyse (RIP) von APLP2

Auf Grund der zentralen Rolle, die die regulierte Intramembran-Proteolyse des Amyloid Precursor Proteins (APP) für die Alzheimer-Erkrankung spielt, wurde diese, wie in der Einleitung ausführlich diskutiert, sehr detailliert untersucht. So konnte früh gezeigt werden, dass die Ektodomänenspaltung von APP von einer als α -Sekretase bezeichneten Metalloprotease-Aktivität (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990) und einer als β -Sekretase bezeichneten weiteren proteolytischen Aktivität (Haass et al., 1993; Seubert et al., 1993) katalysiert wird. Während bereits im Jahr 1999 die Identität der β -Sekretase dem β -site APP-cleaving enzyme (BACE1) zugeordnet werden konnte (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999), war die Identität der α -Sekretase-Aktivität lange Zeit nicht abschließend geklärt. So wurde in verschiedenen Arbeiten die Identität der α -Sekretase ADAM9, ADAM10 oder ADAM17 zugeordnet (Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999; Slack et al., 2001). Erst 2010 konnten Kuhn et al. abschließend zeigen, dass ADAM10 die konstitutive, physiologische α -Sekretase-Aktivität in verschiedenen Tumorzelllinien und in primären, kortikalen Neuronen darstellt (Kuhn et al., 2010). Die genauen Schnittstellen der verschiedenen proteolytischen Aktivitäten für APP sind schon seit längerem bekannt (Cao and Sudhof, 2001; Kang et al., 1987; Sastre et al., 2001; Weidemann et al., 2002; Yu et al., 2001).

Für das APP-Homolog APLP2 ist die Situation weniger eindeutig. Dass die APLP2-Ektodomäne im Überstand von Zellen nachweisbar ist, wurde erstmals durch Thinaka-

ran und Sisodia gezeigt (Thinakaran and Sisodia, 1994). Eine Ektodomänenspaltung von APLP2 durch BACE1, in Analogie zur Spaltung bei APP als β -Spaltung bezeichnet, konnte aufgezeigt werden (Eggert et al., 2004; Li and Sudhof, 2004; Pastorino et al., 2004), eine Ektodomänenspaltung von APLP2 durch eine Metalloprotease-Aktivität, als α -Spaltung bezeichnet, ebenfalls (Eggert et al., 2004; Endres et al., 2005). Allerdings blieb in den Arbeiten von Eggert et al. beziehungsweise Endres et al. unklar, ob ADAM10 oder ADAM17 die physiologische α -Sekretase in Tumorzelllinien darstellt, da sowohl eine Überexpression von ADAM10, als auch eine Überexpression von ADAM17 zu einer gesteigerten Ektodomänenspaltung von APLP2 in SKNMC-Zellen führte (Endres et al., 2005). Außerdem führte eine PMA-abhängige Aktivierung von ADAM17 in HEK293-, SH-SY5Y- und SKNMC-Zellen ebenfalls zu einer erhöhten Ektodomänenspaltung von APLP2 (Endres et al., 2005). Die Prozessierung von APLP2 in primären, kortikalen Neuronen wurde in keiner der vorliegenden Arbeiten analysiert. Lediglich die Arbeit von Pastorino et al. zeigt *in vivo*, dass die APLP2-Spaltung im Gehirn zum Teil BACE1-abhängig ist, adressiert aber in keiner Weise die Metalloprotease-abhängige Prozessierung von APLP2 (Pastorino et al., 2004). Neben dieser Unklarheit bei der Identität der APLP2- α -Sekretase sind auch die Ektodomänen- sowie die γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 unbekannt (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Aspekte der regulierten Intramembran-Proteolyse von APLP2 zu untersuchen. Zum einen sollte gezeigt werden, welche Metalloprotease für die konstitutive α -Spaltung von APLP2 in Tumorzelllinien und in primären Neuronen verantwortlich ist. Zum anderen sollten die exakten Schnittstellen der Ektodomänenspaltung von APLP2 bestimmt werden. Ein weiteres Ziel war die Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2.

5.1.1 sAPLP2 liegt als komplex glykosyliertes Protein vor

Vor einer ausführlichen Analyse der proteolytischen Prozessierung von APLP2 wurden zunächst Vorversuche zur Identität der detektierbaren APLP2-Spezies durchgeführt. Es ist beschrieben, dass APLP2 in Form von bis zu fünf verschiedenen Isoformen exprimiert wird, von denen alle O-glykosyliert und drei auch mit Chondroitinsulfat-glycosaminoglycan (CS GAG) modifiziert sein können (Lyckman et al., 1998; Slunt et al., 1994). Ein Alignment der beschriebenen APLP2 Isoformen ist mit Markierung der selektiven CS GAG-Modifikationsstelle in Abbildung 35 dargestellt. Eine N-Glykosylierung ist für APLP2 nicht beschrieben (Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

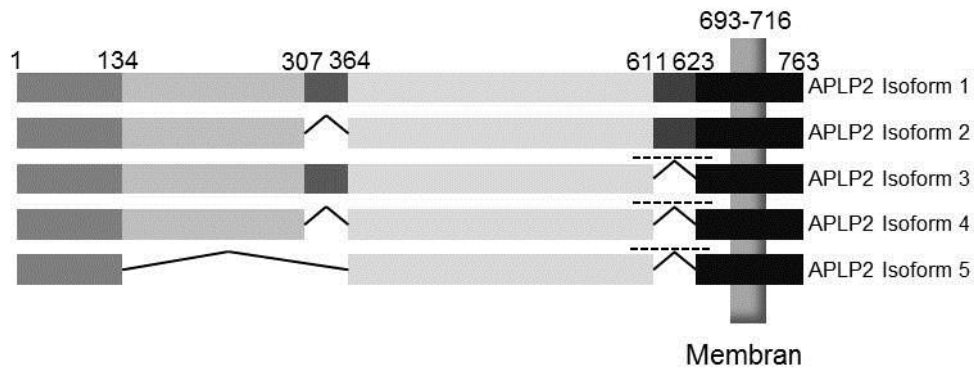


Abbildung 35: Alignment der annotierten fünf Isoformen von APLP2. Fünf Isoformen von APLP2 sind in der Proteindatenbank Uniprot annotiert. Die Nummerierung der Aminosäuren 1 bis 763 bezieht sich auf die längste Isoform 1. Alternative Splice-Stellen sind durch schwarze Striche eingezeichnet. Die gestrichelte Linie markiert eine Chondroitinsulfatglykosylierungsstelle, die durch Splicen von Exon 5 entsteht und somit nur in den APLP2 Isoformen 3-5 vorkommt. Die Lage der Transmembrandomäne ist angedeutet, ihre Annotierung entspricht der bei Uniprot angegebenen.

APLP2 wurde im Rahmen dieser Arbeit im Western Blot in Form von zwei distinkten und einer diffusen Bande detektiert. Alle drei sind APLP2-spezifisch (Abbildung 11). Dies entspricht einem Laufverhalten, das bereits im Rahmen einer anderen Arbeit für sAPLP2 beschrieben wurde (Endres et al., 2005). In der Arbeit von Endres et al. wurde auf Grundlage der Arbeiten von Thinakaran und Sisodia (1994) beziehungsweise Slunt et al. (1994) argumentiert, dass es sich bei der diffusen Bande um mit CS GAG modifiziertes sAPLP2 und bei den zwei scharfen Banden um sAPLP2 und eine „verkürzte Version“ von sAPLP2 handelt (Endres et al., 2005; Slunt et al., 1994; Thinakaran and Sisodia, 1994). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Deglykosylierungsexperimente haben dies bestätigt. So führte eine Behandlung des von SH-SY5Y-Zellen durch Ektodomänenspaltung gebildeten sAPLP2 mit Endoglykosidase-H nicht zu einer Änderung des Laufverhaltens der sAPLP2-Spezies, während eine Behandlung mit N-Glykosidase F zu einer Erhöhung der Elektromobilität aller drei Proteinspezies führte. Auch nach der N-Glykosidase F-Behandlung sind weiterhin drei sAPLP2-Spezies detektierbar (Abbildung 12). Hieraus kann geschlossen werden, dass alle drei sAPLP2-Spezies komplex glykosyliert sind, da sie alle Endoglykosidase H-resistent sind.

Die entsprechenden *in vitro* Deglykosylierungsexperimente für die Proteinlysate zeigen, dass alle drei detektierbaren Banden für volle-Länge APLP2 sowohl Endoglykosidase H- als auch N-glykosidase F-sensitiv sind. Das bedeutet, dass die im Zelllysate detektierten APLP2-Spezies nicht komplex glykosyliert sind, sondern immature APLP2-Spezies darstellen.

Die Tatsache, dass auch nach der Entfernung der N-Glykosylierung durch N-Glykosidase F noch drei Proteinspezies für volle-Länge-APLP2 und sAPLP2 detektierbar sind, zeigt, dass es sich bei den zwei scharfen Banden um unterschiedliche sAPLP2 Isoformen und nicht um unterschiedliche Glykosylierungszustände handelt. In

letzterem Fall würde man erwarten, dass nach der N-Glykosidase F-Behandlung der Proben nur noch eine scharfe Bande an Stelle der zwei scharfen Banden detektierbar wäre. Formal kann auf Grundlage dieser Ergebnisse noch nicht ausgeschlossen werden, dass eine der beiden, den zwei scharfen Banden zugrunde liegenden APLP2 Isoformen, partiell auch mit CS GAG modifiziert vorliegt und damit insgesamt nur zwei unterschiedliche sAPLP2 Isoformen im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden. Allerdings ist die plausiblere Interpretation der Daten, dass die drei detektierbaren APLP2-Spezies auf mindestens drei verschiedene APLP2 Isoformen zurückgehen, nämlich Isoform 1 (obere scharfe Bande), Isoform 2 (untere scharfe Bande) und Isoform 3, 4 und/oder 5 (diffuse Bande). Es wurde beschrieben, dass die CS GAG-positiven Isoformen vor allem in peripheren Zellen und im Bulbus olfactorius exprimiert werden, während die CS GAG-negativen Isoformen ubiquitär exprimiert werden (Thinakaran and Sisodia, 1994). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten bestätigen diese Beobachtung. Während in den Tumorzelllinien die CS GAG-positiven Isoformen klar mit hoher Intensität detektierbar sind (Abbildung 11 bis Abbildung 16), sind die CS GAG-positiven Isoformen in den primären Neuronen nur schwach detektierbar (Abbildung 17 und Abbildung 18). Diese differentielle, gewebeabhängige Expression der verschiedenen APLP2 Isoformen ähnelt der Situation bei APP, wo die verschiedenen Isoformen ebenfalls differentiel, gewebeabhängig exprimiert werden. So wird die 695 Aminosäuren lange APPIsoform prädominant neuronal exprimiert, während die 770 und die 751 Aminosäuren langen Isoformen peripher stark exprimiert werden (Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

5.1.2 ADAM10 ist die konstitutive APLP2- α -Sekretase in verschiedenen Zelllinien und primären Neuronen

Vier verschiedene Arbeiten haben die Ektodomänenspaltung von APLP2 bisher eingehender untersucht. Li und Südhof zeigen, dass in HEK293-Zellen eine Co-Überexpression von APLP2 und der Protease BACE1 zu einer starken Ektodomänenspaltung von APLP2 durch BACE1 führt (Li and Südhof, 2004). Pastorino et al. bestätigen dieses Ergebnis durch eine Co-Überexpression von APLP2 und BACE1 in COS-7-Zellen. Außerdem zeigen sie, dass lösliches APLP2 in Gehirnlysaten von BACE1 Knock-out Mäusen signifikant um circa 50 % verringert ist, während es in Gehirnlysaten von BACE1 überexprimierenden Mäusen um circa 100 % erhöht ist (Pastorino et al., 2004). Dies legt nahe, dass *in vivo* eine Prozessierung von APLP2 durch BACE1 stattfindet. Eine Metalloprotease-abhängige Ektodomänenspaltung von APLP2 wurde von Kaden et al. (2005) beschrieben. Sie konnten zeigen, dass die Behandlung von verschiedenen Zelllinien mit dem Phorbolster PMA zu einer gesteigerten Ektodomänenspaltung von APLP2 führt. Dies zeigt, dass die durch PMA über den PKC-Signalweg aktivierbare Metalloprotease ADAM17 die Ektodomänenspaltung von APLP2 katalysieren kann. Außerdem zeigen Kaden et al., dass die Ektodomänenspal-

tion von APLP2 mit verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren, sowohl in PMA-aktivierten, als auch in nicht-behandelten Zellen, verringert werden kann. Dies zeigt klar, dass es eine Metalloprotease-Aktivität gibt, die die proteolytische Prozessierung von APLP2 katalysiert. In Analogie zur Situation bei APP wird diese Aktivität auch als α -Sekretase-Aktivität bezeichnet. Kaden et al. (2005) beobachteten außerdem, dass sowohl eine Überexpression von ADAM10 als auch eine Überexpression von ADAM17 zu einer verstärkten Ektodomänenspaltung von endogenem APLP2 in HEK293-Zellen führen. Des Weiteren zeigten sie, dass die Überexpression einer dominant-negativen Form von ADAM10 zu einer Reduktion der Ektodomänenspaltung von APLP2 führt. Zusammengefasst zeigten Kaden et al., dass eine APLP2-Ektodomänenspaltung von einer konstitutiven Metalloprotease-Aktivität katalysiert wird. Kaden et al. schlagen ADAM10 und ADAM17 als Kandidaten für diese als α -Sekretase bezeichnete Aktivität vor. Eggert et al. (2004) haben die Ektodomänenspaltung von APLP2 ebenfalls untersucht. Sie haben den Ansatz gewählt, dass sie ein C-terminal stabilisiertes APLP2-Konstrukt in HEK293-Zellen überexprimiert und dann die Bildung der C-terminalen APLP2-Fragmente (APLP2-CTFs) untersucht haben. CTFs sind, neben der löslichen Ektodomäne, das zweite Produkt der Ektodomänenspaltung von APLP2. Eggert et al. konnten zeigen, dass sich die Bildung der APLP2-CTFs sowohl veränderte, wenn sie die Zellen mit einem BACE1-Inhibitor behandelten, wie auch, wenn sie die Zellen mit einem Metalloprotease-Inhibitor behandelten. Dies zeigt wiederum, dass die Ektodomänenspaltung von (zumindest überexprimiertem) APLP2 von BACE1 und einer Metalloprotease-Aktivität katalysiert werden kann. Außerdem haben Eggert et al. APLP2-CTF-Konstrukte kloniert, exprimiert und im Western Blot mit den durch proteolytische Spaltung von stabilisiertem volle-Länge-APLP2 gebildeten CTFs verglichen. Hieraus schlossen sie, dass der APLP2 α -Schnitt in der Nähe von Arginin 678 der APLP2 Isoform 1 und der β -Schnitt in der Nähe von Methionin 664 der APLP2 Isoform 1 stattfindet. Die Ektodomänenspaltung von APLP2 wurde bisher nicht in primären Neuronen untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, welchen Anteil α - und β -Schnitt an der konstitutiven Ektodomänenspaltung von APLP2 haben. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob ADAM10 oder ADAM17 oder gegebenenfalls eine andere Metalloprotease den konstitutiven α -Sekretase-Schnitt von APLP2 katalysiert. Dies sollte sowohl in Tumorzelllinien als auch in primären Neuronen untersucht werden.

Zunächst wurde in SH-SY5Y-Zellen pharmakologisch untersucht, zu welchem Anteil α - und β -Schnitt zur Prozessierung von APLP2 endogen beitragen. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 zu keiner signifikanten Reduktion der Ektodomänenspaltung von APLP2 führte, während eine Behandlung mit dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor TAPI zu einer signifikanten

Reduktion der Spaltung um über 75 % führte (Abbildung 13). Hieraus wurde geschlossen, dass die Ektodomänenspaltung von APLP2 in SH-SY5Y-Zellen größtenteils von der α -Sekretase Aktivität katalysiert wird. Das als Kontrollprotein ebenfalls untersuchte APP verhielt sich identisch (Abbildung 13).

Um zu untersuchen, ob ADAM10 oder ADAM17 konstitutiv den α -Sekretase-Schnitt von APLP2 katalysiert, wurden ADAM10 und ADAM17 jeweils in SH-SY5Y-Zellen mittels siRNA-Technologie ausgeschaltet. Dabei wurde festgestellt, dass nur das Ausschalten von ADAM10 zu einer signifikanten, Reduktion der Ektodomänenspaltung von APLP2 um circa 75 % führte (Abbildung 14). In den Zellen mit stark verringerten ADAM17-Mengen wurde dagegen keine Reduktion der Ektodomänenspaltung von APLP2 festgestellt (Abbildung 14). Da die Reduktion der Ektodomänenspaltung von APLP2 in den Zellen mit ADAM10 Knock-down in ihrer Effektstärke der Reduktion der Ektodomänenspaltung von APLP2 in den, mit dem Metalloprotease-Inhibitor behandelten Zellen entsprach, kann geschlossen werden, dass ADAM10 die Metalloprotease-abhängige Spaltung von APLP2 in SH-SY5Y-Zellen katalysiert und damit die konstitutive α -Sekretase darstellt.

In HEK293-Zellen wurde der Versuch ebenfalls durchgeführt, um zu untersuchen, ob die oben diskutierten Beobachtungen zelllinienspezifisch sind. Dies war nicht der Fall. In HEK293-Zellen führt auch nur das Ausschalten von ADAM10 und nicht das Ausschalten von ADAM17 zu einer signifikanten Reduktion der APLP2-Ektodomänenspaltung. Daraus wurde gefolgert, dass der oben gezogene Schluss, dass ADAM10 die konstitutive α -Sekretase in Tumorzelllinien darstellt, zutreffend ist.

Der Versuch wurde ebenfalls noch einmal mit stabiler, shRNA-vermittelter Verringerung der ADAM10-Menge durchgeführt. Dies diente zum einen der Überprüfung, ob in Zellen mit einer konstitutiven Verringerung der Menge von ADAM10 eine Kompensation in Bezüge auf die APLP2-Spaltung stattfindet, zum anderen sollte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auf einen „off-target-Effekt“ der siRNAs zurückzuführen ist. Hierzu wurden SH-SY5Y-Zellen mit einem stabilen Knock-down von ADAM10 auf die Ektodomänenspaltung von APLP2 hin untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Ektodomänenspaltung in den Zellen mit den stark verringerten ADAM10-Mengen wie erwartet signifikant reduziert war (Abbildung 15). Dies zeigt, dass die Zellen keinen Kompensationsmechanismus aufweisen, um ein dauerhaftes Fehlen der ADAM10-vermittelten APLP2-Spaltung zu auszugleichen.

Außerdem wurden auch die bei der Ektodomänenspaltung entstehenden APLP2-CTFs im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Hierzu wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt, um den Abbau der APLP2-CTFs durch die γ -Sekretase zu inhibieren. Des Weiteren wurden die Zellen entweder mit einem BACE1-Inhibitor behandelt oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Außerdem wurden sowohl für die BACE1-inhibierten als auch für die Kontrollzellen siRNA-vermittelte

Knock-downs von ADAM10 durchgeführt. Es wurden drei APLP2-CTFs detektiert (Abbildung 16). Zwei der drei Banden zeigten eine Elektromobilität, die einem Molekulargewicht von circa 10 kDa entspricht, wie dies bereits in verschiedenen Publikationen für APLP2-CTFs beschrieben ist (Endres et al., 2005; Li and Sudhof, 2004; Sala Frigerio et al., 2010). Die beiden APLP2-CTFs zeigten in ihrer Bildung eine klare BACE1- beziehungsweise ADAM10-Abhängigkeit. Das CTF mit der höheren Elektromobilität und damit dem vermutlich geringeren Molekulargewicht wies eine ADAM10-abhängige Produktion auf, das CTF mit der etwas geringeren Elektromobilität und dem damit vermutlich etwas höheren Molekulargewicht wurde BACE1-abhängig gebildet (Abbildung 16). Von der dritten detektierten CTF-Bande wird angenommen, dass es sich hierbei ebenfalls um eine Form von APLP2-CTF handelt, da diese Bande ebenfalls bei γ -Sekretase-Inhibition akkumuliert. Die Bildung dieser circa 8 kDa schweren APLP2-CTF-Spezies ist weder ADAM10- noch BACE1-abhängig und scheint damit auf den Schnitt von APLP2 durch eine weitere Protease zurückzugehen. Auch Eggert et al. haben bei einer Überexpression von stabilisiertem volle-Länge-APLP2 ein CTF entsprechender Länge detektiert und es als α' -like APLP2-CTF bezeichnet (Eggert et al., 2004). Auf Grund der geringen Länge des „8 kDa APLP2-CTFs“ wäre es vorstellbar, dass es durch einen Rhomboid-abhängigen Schnitt produziert wird, wobei das durch den Rhomboid-Schnitt hypothetisch generierte CTF dann Substrat für die γ -Sekretase seien müsste, da das „8 kDa APLP2-CTF“ DAPT-abhängig akkumuliert (Urban and Dickey, 2011). Diese Hypothese ließe sich durch eine Analyse der APLP2 CTF-Bildung analog der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analyse unter Verwendung von Rhomboid Knock-down Zelllinien überprüfen.

Die Ektodomänenspaltung von APLP2 wurde in primären Neuronen bisher nicht untersucht. Dabei ist diese vermutlich besonders relevant, wenn man den Phänotyp der APP/APLP1/APLP2-dreifach-Knock-out Maus in Betracht zieht. Diese zeigen eine fokale kortikale Dysplasie, die vermutlich auf eine fehlerhafte Migration von Neuronen zurückgeht, welche allerdings wahrscheinlich nicht zellautonom ist (Bergmans et al., 2010; Herms et al., 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Ektodomänenspaltung in primären Neuronen analog zu den Versuchen mit den Tumorzelllinien durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, zu welchem Anteil α - und β -Sekretase-Aktivität zur Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen beitragen. Primäre Neuronen wurden für diese Versuche aus dem Kortex von 16 Tage alten Mäuseembryonen gewonnen und für 7 Tage *ex vivo* in Kultur genommen. Anschließend wurden sie für jeweils 24 Stunden mit pharmakologischen Inhibitoren behandelt. Eine Behandlung mit dem Breitband-Metalloprotease Inhibitor TAPI führte dabei zu einer statistisch signifikanten Reduktion der sAPLP2-Produktion um circa 35 %, während eine Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 zu einer Verringerung der sAPLP2-Bildung um circa 60 % führte. Damit kann festgehalten werden, dass der Anteil der BACE1-abhängigen APLP2-Prozessierung in primären Neuronen höher ist als in den

untersuchten Tumorzelllinien. Dies entspricht der Prozessierung von APP in primären Neuronen und lässt sich mit den höheren BACE1-Mengen in den primären Neuronen erklären (Kuhn et al., 2010; Simons et al., 1996; Willem et al., 2006). Um zu untersuchen, ob auch in primären Neuronen analog zur Situation in den Tumorzelllinien ADAM10 die Metalloprotease-abhängige Spaltung von APLP2 konstitutiv katalysiert, wurde ADAM10 in den primären Neuronen mittels shRNA-Technologie ausgeschaltet. Dazu wurden die Neuronen mit Lentiviren transduziert, die für gegen ADAM10-mRNA gerichtete shRNAs codieren. Der erfolgreiche ADAM10 Knock-down führte dabei mit zwei unabhängigen shRNA-Sequenzen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der sAPLP2-Menge um circa 30 % (Abbildung 18). Dies entspricht nahezu vollständig der Reduktion, die mit dem Metalloprotease-Inhibitor erreicht werden konnte. Die um circa 5 % stärkere Reduktion der APLP2-Ektodomänenspaltung mittels des Metalloprotease-Inhibitors ist vermutlich mit den verbleibenden ADAM10-Mengen in den ADAM10 Knock-down Zellen zu erklären. Es kann damit geschlossen werden, dass ADAM10 auch in primären Neuronen die konstitutive α -Sekretase-Aktivität darstellt.

Es wurde damit in zwei verschiedenen Zelllinien (HEK293 und SH-SY5Y) und mit zwei verschiedenen Knock-down-Techniken (siRNA und shRNA) gezeigt, dass ADAM10 die konstitutive α -Sekretase in Tumorzelllinien darstellt. Außerdem wurde gezeigt, dass ADAM10 auch die konstitutive physiologische α -Sekretase in primären Neuronen ist.

5.1.3 Bestimmung der Ektodomänenspaltstellen von APLP2

Die Ektodomänenspaltstellen von APLP2 sind bisher nicht bestimmt worden (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). Wie unter 5.1.2 diskutiert, gibt es lediglich einige Vermutungen hinsichtlich der Schnittstellen, die auf Grundlage der Größe der als Produkt der proteolytischen Prozessierung von APLP2 beobachtbaren APLP2-CTFs aufgestellt wurden (Eggert et al., 2004). Wie oben ebenfalls diskutiert, schlossen Eggert et al. aus einem solchen Vergleich im Laufverhalten von künstlich generierten und durch natürliche Prozessierung von volle-Länge-APLP2 entstehenden CTFs, dass der α -Schnitt von APLP2 in der Nähe von Arginin 678 und der β -Schnitt in der Nähe von Methionin 664 der APLP2 Isoform 1 stattfindet. Bei dieser Art der Schnittstellenbestimmung ist aber natürlich anzumerken, dass diese sehr grob und eine aminosäuregenaue Bestimmung unmöglich ist. Eine weitere Limitierung der Studie von Eggert et al. (2004) ist, dass die Spezifität der jeweiligen APLP2-CTFs in Bezug auf die Protease, auf die ihre Bildung zurückgeht, nicht näher untersucht wurde. Die Differenzierung zwischen α -APLP2-CTF, β -APLP2-CTF und α' -APLP2-CTF ging lediglich darauf zurück, dass CTFs entsprechender Länge für das Homolog APP beschrieben wurden (Eggert et al., 2004). Dies stellt somit klar keine exakte Bestimmung der Ektodomänenschnittstellen dar.

Betrachtet man die Länge der proteolytisch produzierten APLP2-Fragmente, so wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit per Western Blot detektiert wurden, so kommt man

zu dem Schluss, dass der α -Schnitt näher an der Membran stattfindet als der β -Schnitt. Dies sieht man zum einen daran, dass die 115 kDa sAPLP2-Bande in Abbildung 17 bei C3-Behandlung eine geringfügig geringere Elektromobilität aufweist als bei TAPI-Behandlung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Bande unter Kontrollbedingungen vermutlich eine Doppelbande aus α - und β -geschnittenem sAPLP2 darstellt. Die Behandlung mit C3 führt nun zur Inhibierung der Produktion der geringfügig tiefer laufenden sAPLP2 β -Bande, während die TAPI-Behandlung zur Inhibierung der Produktion der geringfügig höher laufenden sAPLP2 α -Bande führt. Zum anderen weisen auch die Beobachtungen in Bezug auf die Produktion der APLP2-CTFs auf dieses Schnittmuster hin. So sieht man in Abbildung 16, dass die untere der beiden 10 kDa APLP2-CTF-Banden beim ADAM10 „Knock-down“ nur noch mit stark verminderter Intensität detektierbar ist, während die C3-Behandlung dazu führt, dass die obere 10 kDa APLP2-CTF-Bande gar nicht mehr detektierbar ist. Da die CTFs die Gegenprodukte zu den sAPLP2-Spezies darstellen, weist eine längere CTF-Länge für das β -CTF darauf hin, dass die entsprechende β -Schnittstelle distaler von der Membran liegt, als die α -Schnittstelle. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beobachtung für die Ektodomänen. Damit kann aus zwei unabhängigen Experimenten geschlossen werden, dass, wie bei APP, der α -Sekretase-Schnitt bei APLP2 näher an der Membran liegt als der β -Sekretase-Schnitt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es aber nicht nur, die Lage der beiden Schnitte relativ zueinander zu bestimmen, sondern auch, die genauen Schnittstellen zu identifizieren. Dazu wurde ein Ansatz gewählt, der eine massenspektrometrische Analyse der Schnittstellen zulässt. Da eine massenspektrometrische Analyse der gesamten Ektodomäne auf Grund der Heterogenität der Glykosylierung von sAPLP2 wenig aufschlussreich wäre und ein tryptischer Verdau in Abhängigkeit der Lage der Schnittstellen nicht zwingend zur Generierung eines aussagekräftigen und detektierbaren semi-tryptischen Peptids führen würde, wurde ein anderer Ansatz gewählt. Es wurde, wie in Abbildung 19 schematisch dargestellt, ein APLP2-Konstrukt kloniert, das, wie in 4.1.2.1 erklärt, die Generierung eines kurzen Peptids erlaubt, dessen N-Terminus konstant und bekannt ist und dessen C-Terminus durch die Ektodomänenspaltung des volle-Länge-APLP2-Konstrukts bestimmt wird. Dieses Konstrukt wird immer noch wie endogenes volle-Länge-APLP2 von α -Sekretase geschnitten (Abbildung 20). Das Konstrukt wurde auf der Grundlage der APLP2 Isoform 1 kloniert (siehe 8.2.1.1) und weist damit keine CS-GAG Modifizierung auf (Abbildung 20 und Abbildung 35).

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass bei endogenen Protease-Mengen zwei Peptide detektiert werden konnten, deren Sequenz auf der Grundlage ihrer Masse und der Kenntnis der Sequenz des APLP2-Konstrukts bestimmt werden konnte. Die Peptide waren indikativ für einen Schnitt des APLP2-Konstrukts nach Arginin 670 beziehungsweise Glutamat 669 der APLP2 Isoform 1 (Abbildung 21). Zwei grundsätzlich

unterschiedliche Interpretationen dieser Beobachtung sind möglich. Zum einen ist es denkbar, dass die zwei direkt benachbarten Peptidbindungen von APLP2 unabhängig voneinander Substrate für die Ektodomänenspaltung durch eine oder mehrere proteolytischen Aktivitäten sind. Zum anderen ist auch vorstellbar, dass die Ektodomänenspaltung die Peptidbindung von Arginin 670 und Valin 671 hydrolysiert und das entstehende sAPLP2 von einer weiteren proteolytischen Aktivität, zum Beispiel einer Carboxypeptidase, C-terminal um eine Aminosäure trunziert wird. Beide aufgeführten Szenarien sind in Abbildung 36 schematisch dargestellt.

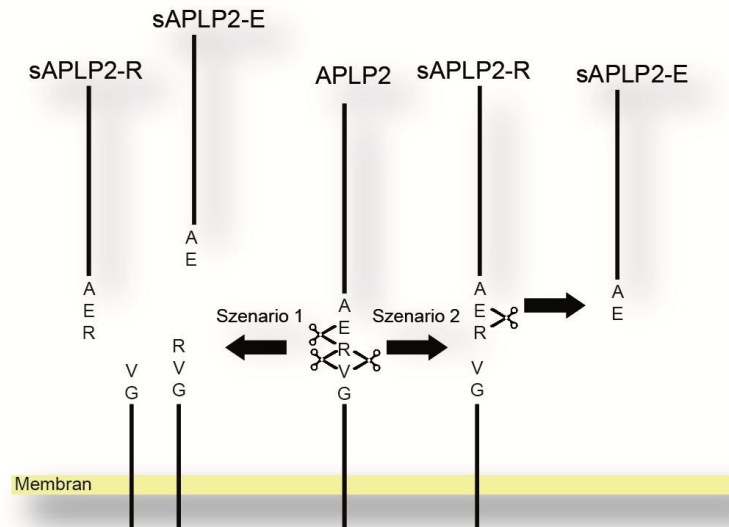


Abbildung 36: „Ein-Schnitt“ vs. „Doppel-Schnitt“ Szenario für die Ektodomänenspaltung von APLP2 C- und N-terminal von Arginin 670. Unter endogenen Protease-Bedingungen können massenspektrometrisch Peptide detektiert werden, welche auf sAPLP2-Spezies rückschließen lassen, die sich lediglich in einer Aminosäure an ihrem C-Terminus unterscheiden. Dies lässt sich durch zwei Szenarien erklären. In Szenario 1 wird das volle-Länge APLP2 jeweils an einer der zwei benachbarten Peptidbindungen (AE-RV bzw. ER-VG) durch die in der Abbildung schematisch als Scheren dargestellten Proteasen hydrolysiert. Die beiden unabhängigen Schnitte können in diesem Szenario von der gleichen oder auch von zwei unterschiedlichen Proteasen katalysiert werden. In Szenario 2 katalysiert eine Protease, oder möglicherweise auch verschiedene Proteasen, die Proteolyse der Peptidbindung ER-VG. Das entstehende sAPLP2-Molekül (sAPLP2-R) wird dann von einer weiteren proteolytischen Aktivität C-terminal um eine Aminosäure trunziert, das heißt die Peptidbindung zwischen Glutamat 669 und Arginin 670 wird durch diese zweite proteolytische Aktivität gespalten.

Zur Unterscheidung zwischen den beiden Szenarien wurde das Experiment zur Bestimmung der APLP2-Schnittstellen mit folgender Modifikation wiederholt. Das Experiment wurde zweimal parallel durchgeführt. In einem Fall wurde das Medium für 16 Stunden auf den Zellen belassen. Im anderen Fall wurde das Medium alle drei Stunden gewechselt (insgesamt dreimal) und das abgenommene Medium eingefroren. Danach wurden die vereinigten 3-Stunden-Proben und die 16-Stunden-Probe wie beschrieben massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass bei den 3-Stunden-Proben das sAPLP2-Fragment überwiegt, das auf Arginin 670 endet (im Folgenden als

„sAPLP2-R“ bezeichnet). Bei den 16-Stunden-Proben kann dagegen das sAPLP2-Fragment mit höherer Intensität detektiert werden kann, dass auf Glutamat 669 endet und im Folgenden als „sAPLP2-E“ bezeichnet wird (Abbildung 23). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass Szenario 2 (siehe Abbildung 36) zutreffend ist. Während man bei Szenario 1 erwartet hätte, dass das Verhältnis zwischen den beiden detektierbaren sAPLP2-Fragmenten unabhängig von der Dauer der Inkubation des Mediums auf den Zellen identisch ist, da die Produktion der beiden Proteinspezies voneinander unabhängig ist, ist im Szenario 2 die Generierung von sAPLP2-E klar von der Konzentration, und damit der Produktion, von sAPLP2-R abhängig. Damit würde man für Szenario 2 vorhersagen, dass die Konzentration von sAPLP2-E im Verhältnis zur Konzentration von sAPLP2-R in Abhängigkeit der Inkubationsdauer des Mediums auf den Zellen solange ansteigt, bis ein Gleichgewicht zwischen dem Abbau von sAPLP2-E und der Bildung von sAPLP2-E aus sAPLP2-R eingetreten ist. Da dies ja wie oben diskutiert der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Ektodomänenspaltung von APLP2 unter endogenen Bedingungen hauptsächlich an der Peptidbindung C-terminal von Arginin 670 stattfindet und das entstehende sAPLP2-R von einer proteolytischen Aktivität C-terminal trunziert wird. Dieser Verkürzung könnte eine wichtige physiologische Funktion zukommen. So ist zum Beispiel bekannt, dass bestimmte Prohormone durch das Abspalten eines C-terminalen Arginins oder Lysins in ihre aktive Form umgewandelt werden (Steiner, 1998).

Um festzustellen, ob die gefundene Schnittstelle der α -Sekretase-Schnittstelle entspricht, wurde eine massenspektrometrische Schnittstellenbestimmung unter Co-Überexpression von ADAM10 und BACE1 durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass eine Co-Überexpression von ADAM10 das detektierbare Spektrum qualitativ nicht verändert. Es wurde allerdings mittels Western Blot gezeigt, dass bei der ADAM10 Co-Überexpression mehr sAPLP2-TEV-FLAG gebildet wird (Abbildung 21A). Parallel dazu führte die Co-Überexpression von ADAM10 auch reproduzierbar zu erhöhten Intensitäten der detektierbaren sAPLP2-Peptid-Peaks in der Massenspektrometrie (Abbildung 21B). Daraus wurde geschlossen, dass die APLP2-Ektodomänenspaltstelle nach Arginin 670 der α -Sekretase-Schnittstelle entspricht.

Die Co-Überexpression von BACE1 führte wie erwartet und mittels Western Blot detektiert zu einem starken Anstieg der sAPLP2-TEV-FLAG-Menge (Abbildung 21A). Bei diesem Versuch änderte sich das detektierbare Spektrum qualitativ so, dass nur noch ein APLP2-Peptid detektierbar war, das auf Leucin 659 endet (Abbildung 21B). Damit stellt die Peptidbindung zwischen Leucin 659 und Asparaginsäure 660 die β -Schnittstelle von APLP2 dar. Dass sich im Fall der BACE1-Co-Überexpression kein durch α -Sekretase geschnittenes APLP2 mehr detektieren lässt, ist, wie im Ergebnisteil bereits diskutiert, am besten damit zu erklären, dass überexprimiertes BACE1 bereits im *trans*-Golgi-Apparat schneiden kann (Yan et al., 2001) und damit nur noch so gerin-

ge Mengen des sAPLP2 α gebildet werden, die für eine Detektion nicht mehr ausreichend sind. Dass das β -Sekretase-abhängig gebildete APLP2-Peptid unter Kontrollbedingungen massenspektrometrisch nicht detektiert werden kann, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Anteil des β -Schnitts an der APLP2-Prozessierung in Tumorzellen sehr gering ist (siehe C3-Experiment in Abbildung 13) und die resultierende Peptidkonzentration damit vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Außerdem ist es gut möglich, dass das β -Sekretase-abhängig gebildete APLP2-Peptid eine schlechtere Ionisierbarkeit aufweist als das α -Sekretase-abhängig gebildete APLP2-Peptid. Letzteres lässt sich auch damit belegen, dass die Gesamtionenzahl in der massenspektrometrischen Aufnahme der TEV-Protease-abhängig gebildeten APLP2-Peptide der BACE1 co-überexprimierenden Zellen reproduzierbar niedriger war, als die unter Kontrollbedingungen für die APLP2-Peptide detektierbare Gesamtionenzahl (Abbildung 21B), während der absolute Anteil an produziertem sAPLP2-TEV-Flag bei der Co-Überexpression von BACE1 im Vergleich mit der Kontrollbedingung sehr stark erhöht war, wie mittels Western Blot gezeigt werden konnte (Abbildung 21A). Dies weist ganz klar auf eine schlechtere Ionisierbarkeit des β -APLP2-Peptids hin.

Vergleicht man die Lage der Ektodomänenpaltstellen von APP und APLP2, so fällt als erste Gemeinsamkeit auf, dass bei beiden Substraten die α -Schnittstellen näher an der Transmembrandomäne liegen als die β -Schnittstellen (Abbildung 37). Dies ist nicht zwingend erforderlich, wie das Beispiel von P-selectin glycoprotein ligand-1 zeigt (Lichtenthaler et al., 2003). Auffällig ist, dass der Abstand der APLP2- α -Schnittstelle von der annotierten Transmembrandomäne mit 22 Aminosäuren größer ist als für die APP-Schnittstelle mit 12 Aminosäuren. Die APLP2- β -Schnittstelle liegt ebenfalls distaler von der Transmembrandomäne als die APP- β -Schnittstelle. Allerdings gilt es zu bedenken, dass die APP-Transmembrandomäne N-terminal durch ein positiv geladenes Lysin klar begrenzt ist, während die annotierte APLP2-Transmembrandomäne N-terminal nicht so klar definiert ist, da noch sechs Aminosäuren N-terminal der annotierten APLP2-Transmembrandomäne keine Ladung tragen (Abbildung 37A). Es könnte also sein, dass die reale APLP2-Transmembrandomäne etwas N-terminaler beginnt und damit der Unterschied in der Lage der α - und β -Schnittstelle relativ zur Membran nicht so groß ist. Zur experimentellen Bestimmung der APLP2-Transmembrandomäne ließe sich zum Beispiel ein Cystein-Mutagenese-Scan durchführen, wie dies bereits erfolgreich für APP durchgeführt wurde (Grziwa et al., 2003).

Betrachtet man die Sequenzmotive der α - und β -Schnittstelle von APLP2 so fallen Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Substraten auf. Die APLP2 α - und damit ADAM10-Schnittstelle weist in der P1 Position ein positiv geladenes Arginin auf. Ein positiver Rest an der P1-Stelle ist typisch für einen ADAM10-Schnitt. So schneidet ADAM10 zum Beispiel Epidermal growth factor (EGF), N-cadherin und Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor (CD23) ebenfalls nach einem Arginin, während es

zum Beispiel Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 (FasL) und APP nach einem ebenfalls positiv geladenen Lysin schneidet (siehe Abbildung 37B und Caescu et al., 2009). Ein typisches, wenn auch nicht zwingend erforderliches, Sequenzmotiv für einen β -Schnitt stellt eine negativ geladene Aminosäure an P1' dar. Diese Sequenzeigenschaft kann zum Beispiel bei APP, APLP1, Neural cell adhesion molecule L1-like protein (CHL1) oder Neural cell adhesion molecule L1 (L1) beobachtet werden (Abbildung 37C).

Vergleicht man die gefundenen Schnittstellen mit den von Eggert et al. vorhergesagten Schnittstellen, so ist festzuhalten, dass die von Eggert et al. vorhergesagten grob zutreffend, aber nicht exakt richtig sind (Abbildung 37A, Eggert et al., 2004).

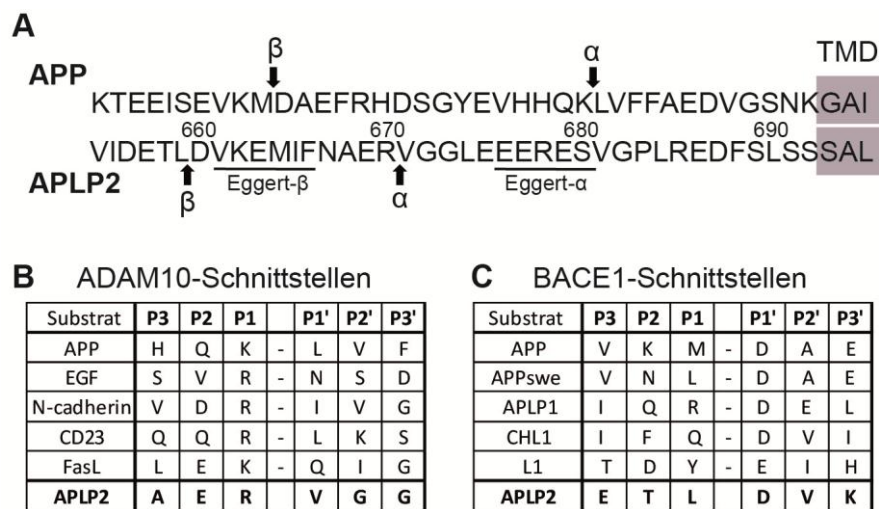


Abbildung 37: Übersicht zu den APLP2-Ektodomänenschnittstellen. (A) Alignment von humanem APP und humanem APLP2. Die bekannten α - und β -Schnittstellen für APP und die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Schnittstellen sind markiert. Des Weiteren ist die Transmembrandomäne von APP und APLP2 entsprechend der Uniprot-Annotierung markiert (TMD). Die Nummerierung bezieht sich auf die APLP2 Isoform 1. Die von Eggert et al. (2004) vorgeschlagenen Regionen für den α - und β -Schnitt von APLP2 sind markiert. (B+C) Übersicht über ausgewählte ADAM10- beziehungsweise BACE1-Schnittstellen (Caescu et al., 2009). Der Strich markiert jeweils die von der entsprechenden Protease hydrolysierte Peptidbindung.

5.1.4 Analyse des heterogenen γ -Sekretase-Schnitts von APLP2

Im Unterschied zur Ektodomänenspaltung von Membranproteinen ist die γ -Sekretase-abhängige Prozessierung der durch diese Ektodomänenspaltung entstehenden C-terminalen Fragmente in der Regel sehr heterogen. Mechanistisch beginnt die γ -Sekretase-abhängige Intramembranproteolyse mit einem sogenannten ϵ -Schnitt im C-terminalen Bereich der Substrat-Transmembrandomäne, der zur Freisetzung der intrazellulären Domäne führt (Sastre et al., 2001). Der in der Membran verbleibende „Stummel“ wird daraufhin schrittweise weiter geschnitten, bis ein kurzes Peptid entsteht, das aus der Membran in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (Haass et al.,

2012). Im Falle der proteolytischen Prozessierung von APP ist dieses Peptid, wie oben diskutiert, das neurotoxische A β -Peptid. Während für APP die exakten ϵ - und γ -Schnittstellen bekannt sind (Haass et al., 2012), wurde für APLP2 bisher ausschließlich die ϵ -Schnittstelle bestimmt (Gu et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun erfolgreich die γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 bestimmt (siehe 4.1.2.2). Deren Lage ist in Abbildung 38A dargestellt. Die Spezifität der Schnittereignisse durch γ -Sekretase wurde über die Inhibierbarkeit der Schnitte mittels des γ -Sekretase-Inhibitor Merck A gezeigt. Dass sie kein Artefakt des verwendeten APLP2-CTF-Konstrukts sind, wurde durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Konstrukten gezeigt. Betrachtet man das heterogene γ -Sekretase-Schnittmuster von APLP2, so verwundert zunächst die relativ große Heterogenität der Schnittstellen im Vergleich zum üblicherweise für den γ -Sekretase-Schnitt von APP dargestellten Muster von „nur“ A β -38, A β -40 und A β -42. Betrachtet man aber massenspektrometrische Aufnahmen von A β , das von HEK293-Zellen sekretiert wird, so ähneln die detektierbaren Spektren in ihrer Heterogenität denen der APLP2-Peptide (Murphy et al., 1999).

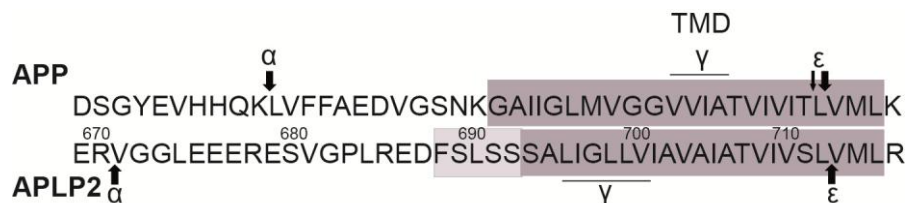


Abbildung 38: Lage der γ -Sekretase-Schnittstellen in APP und APLP2. (A) Alignment der Transmembrandomänen (TMD, dunkelgrau hinterlegt) und des Juxtamembranbereichs von APP und APLP2. Die bekannten und die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten α -, γ - und ϵ -Schnittstellen sind markiert. Die Nummerierung entspricht der APLP2 Isoform 1. Der hell-grau hinterlegte Bereich markiert den direkt an die TMD anschließenden Juxtamembranbereich von APLP2 in dem keine geladenen Aminosäuren vorkommen und der damit potentiell noch zur Transmembrandomäne gehören könnte.

Der größte Unterschied zwischen der Lage der γ -Sekretase-Schnittstelle von APP und der von APLP2 liegt im Abstand zur vorhergesagten Transmembrandomäne der jeweiligen Proteine. Während der Haupt- γ -Sekretase-Schnitt von APP, der in der Produktion von A β -40 resultiert, 12 Aminosäuren vom N-terminalen Beginn der APP-Transmembrandomäne entfernt liegt, liegt der Haupt- γ -Sekretase-Schnitt von APLP2 zwischen Leucin 698 und Leucin 699 nur 6 Aminosäuren vom N-terminalen Beginn der Transmembrandomäne entfernt (Abbildung 38A). Allerdings gilt auch hier wiederum, wie für die relative Lage der Ektodomänenspaltstellen, dass die N-terminale Begrenzung der Transmembrandomäne von APLP2 unklar ist und es gut sein kann, dass diese um 6 Aminosäuren N-terminal des annotierten Beginns liegt (Abbildung 38A). In diesem Fall wären beide Haupt-Schnittstellen circa 12 Aminosäuren vom Beginn der Transmembrandomäne entfernt.

Es ist bekannt, dass verschiedene Presenilin-Mutationen die Prozessierung von APP-CTFs beeinflussen können (Steiner, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Zellen, die die Presenilin-1 Mutation L166P aufweisen, das γ -Sekretase-Schnittmuster des APLP2-CTF dahingehend verändert ist, dass analog zur Situation für APP längere A β -ähnliche Peptidspezies entstehen (Abbildung 27). Dies könnte, wie unten ausführlicher diskutiert, eine Verwendung von A β -ähnlichen APLP2 Peptiden als Biomarker für den Morbus Alzheimer interessant machen.

5.1.5 Relevanz der gefundenen Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ADAM10 die konstitutive physiologische α -Sekretase von APLP2 ist. Außerdem wurden die Ektodomänenschnittstellen von APLP2 durch ADAM10 und BACE1 bestimmt. Des Weiteren wurden die γ -Sekretase-Schnittstellen für APLP2 und damit indirekt die Sequenz des A β -ähnlichen APLP2-Peptids bestimmt. Diese Ergebnisse sind nach aktueller Einschätzung vor allem für zwei Fragestellungen relevant.

Zum einen sind die Ergebnisse für die Erforschung der physiologischen Funktion der APP-Familienmitglieder relevant. Erst die Bestimmung der APLP2 α - und β -Schnittstellen erlaubt zum Beispiel die Generierung eines Mausmodells, in dem sAPLP2 α oder sAPLP2 β in einem APP $^{-/-}$ APLP2 $^{-/-}$ Hintergrund exprimiert werden können. Der Vergleich der Phänotypen eines solchen Mausmodells mit den Ergebnissen entsprechender Versuche für sAPP α beziehungsweise sAPP β (die Expression von sAPP α im APP $^{-/-}$ APLP2 $^{-/-}$ Hintergrund führt, wie oben diskutiert, zu einer partiellen Rettung, die Expression von sAPP β zu gar keiner Rettung der perinatalen Lethalität der APP $^{-/-}$, APLP2 $^{-/-}$ Mäuse; Wayer et al. 2011, Li et al. 2010) könnte zum Beispiel beweisen, dass in der Tat exklusiv der α -Schnitt von APP und APLP2 zur Rettung der perinatalen Lethalität der Doppel-knock-out Mäusen führt und damit wichtige funktionelle Schlüsse erlauben. Außerdem können durch die Bestimmung der APLP2-Ektodomänenschnittstellen schnittstellenspezifische Antikörper generiert werden, die wiederum wertvolle Werkzeuge für verschiedene Versuche zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von APLP2 darstellen. Ein Beispiel für eine solche Untersuchung wäre die Analyse, ob eine Kompensation zwischen dem APP- und dem APLP2- α -Schnitt stattfindet.

Zum anderen könnten die erzielten Ergebnisse eine Relevanz für die Entwicklung neuer Biomarker zur frühen Detektion von Morbus Alzheimer haben. So ist zum Beispiel für das A β -ähnliche APLP1-Peptid gezeigt worden, dass dessen Menge im CSF in eingeschränktem Maße die Unterscheidung zwischen sporadischen Alzheimerfällen und nicht-dementen Kontrollsubjekten erlaubt (Yanagida et al., 2009). Der Vorteil einer Verwendung der Menge von A β -ähnlichen APLP1- beziehungsweise APLP2-Peptiden als Biomarker für die Detektion von Morbus Alzheimer gegenüber der Messung von

A β -Mengen ist, dass diese Peptide im Unterschied zu A β im Verlauf der Pathogenese von Morbus Alzheimer nicht aggregieren und ihre Menge im CSF damit einen guten Marker für die Produktion von A β im Gehirn darstellen. Dies setzt natürlich voraus, dass die Mechanismen der A β -Produktion und der Produktion des jeweils gemessenen Peptids möglichst ähnlich sind. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass APLP2 sehr ähnlich wie APP durch ADAM10, BACE1 und γ -Sekretase prozessiert wird, ist davon auszugehen, dass die Messung der Menge des A β -ähnlichen APLP2-Peptids eine Aussage über die Produktionsmenge von A β im Gehirn erlaubt. Der mögliche Vorteil einer Messung der Menge von A β -ähnlichen APLP2-Peptiden im CSF als Biomarker für Morbus Alzheimer gegenüber den A β -ähnlichen APLP1-Peptiden besteht darin, dass APLP1 vermutlich ein exklusives BACE1-Substrat ist und damit eine Konkurrenz zwischen ADAM10-abhängiger und BACE1-abhängiger Ektodomänsplaltung keinen Einfluss auf die detektierbaren A β -ähnlichen APLP1-Peptidmenge hat (Yanagida et al., 2009, unveröffentlichte eigene Daten). Da aber gezeigt wurde, dass eine moderate Erhöhung der ADAM10-Menge zumindest im Tiermodell die A β -Produktion soweit verringern kann, dass signifikant weniger A β -Plaques gebildet werden, ist es für einen Biomarker für Morbus Alzheimer vorteilhaft, wenn er auch der ADAM10-Aktivität Rechnung trägt (Postina et al., 2004).

Des Weiteren trägt die genaue Analyse der Schnittstellen von APLP2 auch zu einem besseren Verständnis der Sequenzspezifität der beteiligten Proteasen bei.

5.2 Proteomische Analyse von BACE1 -/- Zebrafischen

Die Inhibierung der β -Sekretase BACE1 ist, wie in der Einleitung diskutiert, ein potentiell-elles Verfahren für die Prävention und Therapie des Morbus Alzheimer (siehe 2.1.6). Es wird angenommen, dass diese Therapieform relativ nebenwirkungsarm ist (De Strooper et al., 2010; Kandalepas and Vassar, 2012). Diese Vermutung beruht vor allem auf der Tatsache, dass BACE1 -/- Mäuse keine offensichtlichen Phänotypen in Bezug auf Verhalten, neuromuskuläre Funktion, Gewebsmorphologie, Histologie, Blut oder Urinchemie zeigen (Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Bei genauerer Analyse der Mäuse wurde allerdings eine Hypomyelinisierung des peripheren Ischiasnervs und des zentralen optischen Nervs festgestellt (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). Des Weiteren wurde bei den BACE1 -/- Mäusen eine erhöhte Anzahl spontaner und mittels Kainsäure induzierbarer epileptischer Anfälle nachgewiesen (Hitt et al., 2010; Kobayashi et al., 2008). Die Substrate, deren BACE1-abhängige Proteolyse für die jeweiligen Phänotypen verantwortlich sind, sind mit Ausnahme von korrelativen Erkenntnissen über die Relevanz von Neuregulin-1 für den Hypomyelinisierungs-Phänotyp noch weitgehend unbekannt (Kandalepas and Vassar, 2012; Willem et al., 2006). Für eine bessere Abschätzung der Nebenwirkungen einer BACE1-Inhibition wäre es sehr

hilfreich, möglichst alle physiologisch im Gehirn prozessierten BACE1-Substrate und die durch sie mediierte Funktion zu kennen.

Verschiedene Arbeiten haben es sich in der Vergangenheit zum Ziel gemacht, BACE1-Substrate zu identifizieren. So konnten mittels Kandidatenansatz Golgi-localized membrane-bound α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) (Kitazume et al., 2005; Kitazume et al., 2001), Interleukin-1 type II receptor (IL1R2) (Kuhn et al., 2007), P-selectin-glycoprotein ligand-1 (Lichtenthaler et al., 2003), APLP1 und APLP2 (Eggert et al., 2004; Li and Sudhof, 2004; Pastorino et al., 2004), Low-density lipoprotein receptor-related protein (von Arnim et al., 2005), Prostaglandin E synthase-2 (Kihara et al., 2010) und Voltage-gated sodium channel β 1-4 subunits (Navb1-4) (Wong et al., 2005) als BACE1-Substrate identifiziert und validiert werden.

Drei sogenannte „unbiased approaches“ (aus dem Englischen etwa „unvoreingenommene Ansätze“) zur Ermittlung von BACE1-Substraten wurden bisher unternommen. Hemming et al. haben BACE1 in HEK293-Zellen überexprimiert und den Zellüberstand dieser Zellen mittels Massenspektrometrie mit dem Zellüberstand von Wildtyp-Zellen verglichen und dabei 68 potentielle BACE1-Substrate identifiziert (Hemming et al., 2009). Allerdings muss die Relevanz dieser Substrate als physiologische BACE1-Substrate im Gehirn in Frage gestellt werden, da das verwendete System (Verwendung von Tumorzelllinien, Überexpression von BACE1, serumfreie Inkubation) sehr artifiziell ist. Um zumindest zwei der besonders artifiziellen Faktoren zu ersetzen, wurde kürzlich eine Studie durchgeführt, bei der primäre Neuronen mit einem β -Sekretase-Inhibitor behandelt wurden und die Sekretion von Proteinen durch Ektodomänenspaltung in den serumfreien Zellüberstand massenspektrometrisch untersucht wurde (Zhou et al., 2012). Sogar alle drei artifiziellen Faktoren der Analyse von Hemming et al. (2009) wurden, in einer ebenfalls erst kürzlich publizierten Studie, durch die Entwicklung einer neuen Technik überwunden. Durch die metabolische Markierung von primären Neuronen konnten in dieser Studie durch proteolytische Spaltung generierte Ektodomänen aus dem serumhaltigen Zellüberstand aufgereinigt und damit massenspektrometrisch untersucht werden (Kuhn et al., 2012). Analog zur Analyse von Zhou et al., verwendeten auch Kuhn et al. eine Inhibition von BACE1 durch den Inhibitor C3 um BACE1-Substrate zu identifizieren. Insbesondere der von Kuhn et al. gewählte Ansatz lieferte auf Grund seines sehr physiologischen Aufbaus ein äußerst robustes Datenset von 34 putativen BACE1-Substraten (Kuhn et al., 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt, um unvoreingenommen BACE1-Substrate zu identifizieren. Im Gegensatz zu den oben aufgeführten *ex vivo* Studien war es dabei das Ziel, BACE1-Substrate *in vivo* zu identifizieren. Dies, so die Hypothese, sollte zu einer vermehrten Identifikation physiologisch relevanter Substrate von BACE1 führen, da die Mikro- und Makroumgebung der Neuronen im intakten Gehirn im Gegensatz zur Zellkultur physiologisch ist. Der Ansatz basierte auf

der Hypothese, dass BACE1-Substrate in BACE1 $-/-$ Gehirnen akkumulieren, wie dies zum Beispiel für Neuregulin-1 in BACE1 $-/-$ Mäusen bereits beschrieben wurde (Willem et al., 2006).

Als Organismus für die Identifikation von potentiellen BACE1-Substraten wurde der Zebrafisch gewählt. Der Zebrafisch ist ein in der Forschung von neurodegenerativen Erkrankungen immer wichtiger werdender Modellorganismus dessen proteomische Analyse bisher weitestgehend auf 2D Gelelektrophorese basierte Methoden beschränkt blieb (Bandmann and Burton, 2010; Forne et al., 2010; Paquet et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb sowohl neue Methoden für die Analyse des Zebrafisch-Proteoms etabliert werden als auch erstmals BACE1-Substrate *in vivo* identifiziert werden.

5.2.1 Identifikation von BACE1-Substraten im Gesamtproteinlysate von 6 Tage alten Zebrafischlarven

Zunächst war also das Ziel, eine gelfreie, möglichst quantitative Analyse von Proteinen des Zebrafischproteoms zu etablieren. Hierzu wurden zunächst sechs Tage alte BACE1 $-/-$ Larven analysiert, da diese hohe BACE1-Mengen aufweisen (unveröffentlichte Daten des Kollaborationspartners). Als Methode wurde die Filter-unterstützte Probenvorbereitung (FASP) in Kombination mit einer Stage-Tip-basierten Anionenaustauschchromatographie (SAX) gewählt, da sich dieses Verfahren in Mäusen als besonders erfolgreich für die Analyse von Membranproteinen erwiesen hat (Wisniewski et al., 2009a). Zur Quantifizierung wurde die Dimethyl-Markierung gewählt, da zum einen eine SILAC-basierte Markierung im Zebrafisch nicht mit ausreichender Effizienz möglich ist und zum anderen die Dimethyl-Markierung eine kostengünstige, universell einsetzbare Technik zur proteomischen Quantifizierung darstellt (Boersema et al., 2009; Westman-Brinkmalm et al., 2011).

Bei der Analyse von Pools à 15 Wildtyp- und 15 BACE1 $-/-$ Larven ($n=3$) konnten insgesamt 3578 Proteine mit einer Falsch-Positiv-Rate von weniger als 1% identifiziert werden, 2513 davon mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden. Diese Anzahl an Proteinidentifikationen war zum Zeitpunkt der Analyse die mit Abstand höchste Anzahl an Proteinen, die bislang aus Zebrafischembryonen identifiziert werden konnte. Allerdings wurde im Februar 2012 eine Analyse von 24-32 Stunden alten Zebrafischembryonen veröffentlicht, die ebenfalls durch eine Kombination der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FASP- und SAX-Technik eine Identifikation von 2267 Proteinen mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden erreichten (Lossner et al., 2012). Dies zeigt, dass die Kombination aus FASP und SAX in der Tat eine sehr gute Möglichkeit zur proteomischen Analyse von Zebrafischembryonen beziehungsweise -larven darstellt, die eine bisher unerreichte proteomische Tiefe der Analyse erlaubt. Es ist dabei anzumerken, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben mittels Dimethylier-

rung modifiziert und die Proben von „leicht“ markierten Wildtyp-Larven und „schwer“ markierten BACE1^{-/-} Larven vermischt wurden. Dadurch wurde die Komplexität der Proben mindestens um einen Faktor zwei (vollständige Markierung vorausgesetzt) oder sogar einen Faktor drei (bei partiell unvollständiger Dimethylierung) erhöht, was zwangsläufig zu einer reduzierten Anzahl an Proteinidentifikationen führt. In der Tat führte eine nicht in die vorliegende Arbeit eingebrachte, markierungsfreie Analyse von sechs Tage alten Zebrafischlarven mittels einer Kombination von FASP und SAX sogar zur Identifizierung von über 7000 Proteinen von denen 6599 Proteine mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden identifiziert werden konnten (unveröffentlichte Daten).

Betrachtet man die Quantifizierung der Proteine in den BACE1^{-/-} Zebrafischlarven relativ zu den Wildtyp-Larven ergaben sich kaum starke Änderungen der Proteinmenge der 1905 quantifizierbaren Proteine (Abbildung 29A, B). Bei der quantitativen Analyse der intrinsischen Membranproteine zeigt nur eines eine nach den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Kriterien, eine signifikante Anreicherung um mindestens 40 % (EpCAM).

Leider konnte in der proteomischen Analyse kein bekanntes BACE1-Substrat detektiert und quantifiziert werden, womit eine Positivkontrolle des Versuchsaufbaus fehlte. Trotzdem wurde das auffallend stark akkumulierende EpCAM in Bezug auf eine mögliche Proteolyse durch BACE1 hin untersucht, da die Relevanz einer solchen Proteolyse in der Onkologie sehr hoch sein könnte.

EpCAM ist ein homophiles, Ca²⁺-unabhängiges Adhäsionsmolekül, das in einer Vielzahl von Karzinomen verstärkt exprimiert ist (Balzar et al., 1999; Forne et al., 2010; Litvinov et al., 1994). Die regulierte Intramembran-Proteolyse von EpCAM durch ADAM17 und die γ -Sekretase führt zur Freisetzung einer löslichen Ektodomäne (sEpCAM oder EpEx) die über den β -Catenin Signalweg pro-proliferative Signale vermittelt (Maetzel et al., 2009). Die durch die regulierte Intramembran-Proteolyse ausgelöste Freisetzung der intrazellulären Domäne von EpCAM (EpCAM-ICD oder EpICD) führt ebenfalls zu einer pro-proliferativen Signalkaskade in deren direkter Konsequenz es zu einer Expressionssteigerung des Onkogens c-myc kommt (Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass eine Ektodomänenspaltung von EpCAM durch eine andere Protease als ADAM17 vermutlich ebenfalls zu pro-proliferativen Effekten führen würde. Dies sollte zumindest über den ICD-Signalweg der Fall sein, da die γ -Sekretase-abhängige ICD-Bildung in der Regel nicht von der exakten Lage der Ektodomänenschnittstelle des jeweiligen Moleküls abhängt (siehe als Beispiel 4.1.2.2). Eine mögliche BACE1-abhängige Proteolyse von EpCAM in Karzinomzellen könnte also hypothetisch einen wichtigen Beitrag zur Proliferation dieser Zellen liefern.

Als erstes wurde versucht die im BACE1^{-/-} Larvenlysat gefundene Anreicherung von zfEpCAM zu bestätigen. Dies gelang aber nicht, da keiner der untersuchten humanen

und murinen Antikörper ein spezifisches zfEpCAM-Signal im Western Blot zeigte, was vermutlich auf die relativ geringe Homologie der EpCAM-Sequenz zwischen Mensch beziehungsweise Maus und Zebrafisch zurückgeht (Abbildung 39). Die Homologie im Juxtamembranbereich ist dabei am höchsten, was vermuten lässt, dass die Ektodomänenschnittstellen konserviert sind. Um trotzdem einen möglichen durch BACE1 katalysierten Schnitt von EpCAM nachzuweisen, wurden Versuche bezüglich eines potentiellen Schnitts von EpCAM in Zellkulturassays, analog den im Rahmen dieser Arbeit für APLP2 beschriebenen Versuchen, durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass überexprimiertes EpCAM in HEK293 tatsächlich von BACE1 geschnitten werden kann (Abbildung 31C). Für die durch BACE1 katalysierte Ektodomänenspaltung von EpCAM reichen dabei endogene BACE1-Menge in der HEK-Zelle aus (Abbildung 31A, B). Neben der BACE1-abhängig gebildeten sEpCAM-Spezies wurde noch eine zweite Spezies mit einer höheren Elektromobilität gefunden (Abbildung 31A, C, D). Diese sEpCAM-Spezies wird nach Behandlung mit dem Phorbol ester PMA bevorzugt gebildet (Abbildung 31D). Da EpCAM bekanntlich ein ADAM17-Substrat ist und PMA die ADAM17-Aktivität erhöht, kann mit relativ hoher Sicherheit angenommen werden, dass diese zweite Bande die ADAM17-abhängig geschnittene sEpCAM-Spezies darstellt (Gires, 2009; Zhang et al., 2001). Eine abschließende Klärung der Identität dieser Bande wäre durch Versuche wie die Analyse der EpCAM-Ektodomänenspaltung in Zellen mit einem ADAM17 Knock-down möglich. Hier sollte die entsprechende Bande nicht mehr detektierbar sein.

1	MAPPQVLAFLGLLAAATATFAAAQEECVCENYKLVANCFVNNNRQCQCTS---VGAQNTV	57	human_EpCAM
1	-----MKVLVALFVVALVDVTSQCTCKTMKW-----ANCDDSCSCSLTLTESSKQTL	47	fish_EpCAM
	: :*: * :*: * . * : . * : *		
58	ICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRR-----AKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNG	112	human_EpCAM
48	DCSKLVFKCFLMKAEMYRARHNLGTRKTGKPDENAFVDNDGIYDEPCQSDGKFKAVQCNN	107	fish_EpCAM
	**** . ** :***** : : * * : * : * : * : * : * : * * * * *		
113	TSMCWCVNTAGVVRTDKDTEITCSERVRTYWIIEELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITT	172	human_EpCAM
108	TEVCWCVNSAGVRRSDKKDKNIKCEPAETYWVRAEMTHKSVDPIDVANLRMGIEINALQQ	167	fish_EpCAM
	* . :***** :***** :* . : * . . * : * : * : * : * * . * *		
173	RYQLDPKFITSILYENNVITIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSKK-M	231	human_EpCAM
168	RYFLDKNFVSEVQYDKDARLIV-VDVKKDKNDRTDLSLMTYYLEKDIKVKPLFSDEKPF	226	fish_EpCAM
	** * * : * : : . : * : : . * * : . . * : . . * : : : * : * : * * : * * . * : * :		
232	DLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRK	291	human_EpCAM
227	VLSVQGKN--VTMENVLIYYVDDKAPTFTMQKLTGGIIAVIVVVS LIVIGGFLVLFLLAR	284	fish_EpCAM
	* : * : * : : : . :***** : * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :		
292	KRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA	314	human_EpCAM
285	RQKAHYSKAQAREMETIS-----	302	fish_EpCAM
	: : * : * . * : : * * : :		

Abbildung 39: Alignment von humanem und Zebrafisch-EpCAM. Identische Aminosäuren sind in dunklerem Grau hinterlegt und durch einen Stern markiert. Ähnliche Aminosäuren sind durch einen Doppelpunkt (sehr ähnliche Eigenschaften) beziehungsweise einen Punkt (ähnliche Eigenschaften) markiert. Die höchste Konservierung besteht im Juxtamembranbereich (Aminosäuren 245 bis 265 der humanen EpCAM-Sequenz) und im Bereich der Transmembrandomäne (Aminosäuren 266 bis 288 der humanen EpCAM-Sequenz)

Damit wurde herausgefunden, dass EpCAM im Zellkulturassay ein BACE1-Substrat sein kann. Allerdings bleibt anzumerken, dass diese Aussage bisher exklusiv auf Zellkulturexperimenten mit dem murinen EpCAM-TEV-Flag-Konstrukt beruht. Im Rahmen einer Kollaboration führt die Gruppe von Olivier Gires derzeit Versuche durch, ob die gefundenen Ergebnisse auch für andere murine und humane EpCAM Konstrukte zutreffend sind.

Sollte dies der Fall sein, so wäre es von hohem Interesse EpCAM-positive Karzinome auf die Expression von BACE1 hin zu untersuchen. Sollte es EpCAM-positive Karzinome mit einer hohen Expression von BACE1 geben, so kann vermutet werden, dass die BACE1-abhängige Ektodomänenspaltung von EpCAM zum proliferativen Verhalten dieser Zellen beiträgt und eine Inhibierung von BACE1 diese Proliferation zumindest verringern sollte, analog der Inhibierung von ADAM17 in Karzinomen die ADAM17 und EpCAM-positiv sind (Munz et al., 2009). Die Inhibierung von BACE1 wäre in diesem Fall eine Option für die Therapie möglicher BACE1- und EpCAM-positiven Karzinome. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde eine Kollaboration mit Dr. Bartsch von der Universität Marburg begonnen, bei der verschiedene primäre Tumorzelllinien auf eine mögliche Expression von EpCAM und BACE1 hin untersucht werden.

Physiologisch ist die Expression von EpCAM und BACE1 relativ komplementär. Während BACE1 hauptsächlich in verschiedenen Regionen des Gehirns exprimiert wird, wird EpCAM im adulten Organismus nahezu ausschließlich in Epithelgeweben gefunden (Dislich and Lichtenthaler, 2012; Trzpis et al., 2007a). Allerdings ist die Expression von EpCAM während der Embryonalentwicklung breiter (Trzpis et al., 2007b). Insbesondere im Zebrafisch konnte mittels *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass zumindest die Expression der EpCAM-mRNA in der Anlage für den olfaktorischen Bulbus im Larvenstadium hoch ist (Slanchev et al., 2009). Wie unser Kollaborationspartner zeigen konnte, ist hier auch die Expression von BACE1 hoch, so dass die olfaktorische Anlage ein Kompartiment darstellen könnte, in dem die BACE1-abhängige Proteolyse von EpCAM eine physiologische Relevanz hat. In der Tat spielt BACE1 eine wichtige Rolle für die korrekte Entwicklung des olfaktorischen Bulbus in der Maus (Cao et al., 2012).

Es kann zusammengefasst werden, dass erfolgreich Techniken zur proteomischen Analyse von Zebrafischlarven etabliert wurden. Diese erlauben eine zuvor nicht erreichte Tiefe der proteomischen Analyse des Zebrafischlarvenproteoms. Eine unvoreingenommene, proteomische Suche nach BACE1-Substraten im Zebrafisch konnte EpCAM als ein neues potentielles BACE1-Substrat identifizieren. Dies konnte in mehreren Zellkulturversuchen validiert werden. Die Proteolyse von EpCAM durch BACE1 hat möglicherweise eine physiologische Relevanz für die Entwicklung des olfaktorischen Bulbus und möglicherweise eine pathologische Relevanz für die Proliferation von Karzinomzellen. Es bleibt aber festzuhalten, dass der gewählte Ansatz der markie-

rungsbasierten quantitativen proteomischen Analyse des Gesamtllysats von sechs Tage alten Larven zur *in vivo* Identifizierung neuer BACE1-Substrate nicht in dem erhofften Maße erfolgreich war, da bekannte BACE1-Substrate nicht identifiziert werden konnten und somit keine Positivkontrollen vorlagen. Gründe hierfür sind vermutlich zum einen die Dimethylierung, die die Probenkomplexität erhöht und somit die Anzahl identifizierbarer und quantifizierbarer Proteine entsprechend verringert, und die Verwendung von Gesamtlarvenlysaten. Letzteres wirkt sich doppelt negativ aus. Zum einen erhöht dies ebenfalls die Probenkomplexität im Vergleich zu einer selektiven Analyse BACE1 stark exprimierender Zellen. Zum anderen „verwässert“ die Verwendung von Gesamtllysaten die Quantifizierungsergebnisse. Tatsächlich führte die Veränderung dieser Parameter im Versuchsaufbau zu einer besseren Ausbeute bei der Identifizierung bekannter und potentiell neuer BACE1-Substrate (siehe nachfolgend 5.2.2).

5.2.2 Identifikation von BACE1-Substraten im Gehirnllysats sechs Monate alter Zebrafischlarven

Es wurde eine markierungsfreie, proteomische Analyse von Zebrafischgehirnen durchgeführt, um die sich bei der markierungsbasierten Analyse von Gesamtfischlysaten ergebenden Probleme für die *in vivo* Identifizierung neuer BACE1-Substrate zu überwinden. Diese Analyse war sehr erfolgreich. Insgesamt konnten 7352 Proteine mit einer Falsch-Positiv-Rate (FDR) von weniger als 1 % identifiziert werden. Dies ist die höchste Anzahl an Proteinen, die je in einer Analyse von Zebrafischgewebe oder auch Zebrafischgesamtllysaten identifiziert werden konnte (De Souza et al., 2009; Forne et al., 2010; Lossner et al., 2012). Die dafür benötigte Messzeit war mit insgesamt weniger als sechs Tagen (27 Datensets à fünf Stunden inklusive Equilibraions-, Lade- und Waschschrift sowie Leerläufen zwischen den Proben) relativ moderat. So nutzen de Souza et al. zum Beispiel konservativ geschätzt mindestens 18 Tage Messzeit zur Identifizierung von 5716 Proteinen (5 % FDR) aus einem Zebrafischflossenproteinlysats (De Souza et al., 2009). Dies zeigt nochmals, wie in 5.2.1 bereits diskutiert, dass die Kombination aus FASP-Verdau mit anschließender Stage-Tip-basierter SAX-Chromatographie und LC-MSMS Analyse eine wertvolle Pipeline für die proteomische Analyse von Zebrafischgewebe darstellt.

Im Gegensatz zur Analyse der Gesamtlarvenlysate war in der Analyse der Gehirne die Identifizierung und Quantifizierung von Appa und Appb möglich. Beide Proteine wurden in den BACE1 *-/-* Gehirnen signifikant akkumuliert gefunden (Abbildung 34, Tabelle 1). Dies stellt eine klare Positivkontrolle für den gewählten Ansatz dar, da die beiden Zebrafisch-Orthologen des humanen APP klar als BACE1-Substrate vermutet wurden.

Neben Appa und Appb wurden noch 22 weitere intrinsische Membranproteine nach dem im Rahmen dieser Arbeit gewählten Kriterien als signifikant um mindestens 40 % akkumulierend detektiert (Tabelle 1). Für vier dieser Proteine, das Amyloid-like protein

2 (Aplp), die microsomal Prostaglandin synthase E (mPGES), und das Neural cell adhesion molecule L1.2 (Nadl1.2) ist ebenfalls bereits bekannt, dass die humanen oder murinen Orthologen BACE1-Substrate sind (Kihara et al., 2010; Kuhn et al., 2012; Li and Sudhof, 2004; Pastorino et al., 2004; Zhou et al., 2012). Die Detektion von damit fünf Positivkontrollen innerhalb des Datensets zeigt, dass der gewählte Ansatz tatsächlich BACE1-Substrate identifizieren kann.

Betrachtet man die restlichen Hits, so wurde für zumindest drei davon bereits in einer der *ex vivo* proteomischen Studien vorgeschlagen, dass Proteinfamilienmitglieder des jeweiligen humanen oder murinen Orthologen BACE1-Substrate sind: das murine Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 2 ist nach Kuhn et al. (2012), das Glypican-3 nach Hemming et al. (2009) und das Protocadherin-7 ebenfalls nach Hemming et al. (2009) jeweils ein BACE1-Substrat.

Damit verbleiben fünfzehn potentielle neue BACE1-Substrate in der Hitliste, für die nach Wissen des Autors bisher keine Prozessierung durch BACE1 vorgeschlagen wurde. Es gilt aber festzuhalten, dass diese Proteine nicht zwingend BACE1-Substrate sind, sondern gegebenenfalls auch nur infolge des Fehlens von BACE1 akkumulieren. Dies wäre im vorliegenden Datenset zum Beispiel für Plexin A3 denkbar. So wurde von Hemming et al. (2009) vorgeschlagen, dass Semaphorine BACE1-Substrate sind. Eine fehlende BACE1-abhängige Prozessierung von Semaphorinen könnte durch die resultierende Anreicherung von Semaphorinen über die direkte Interaktion von Semaphorinen mit Plexin A3 zu einer Stabilisierung von Plexin A3 und damit indirekt zu einer Anreicherung von Plexin A3 führen (Schwarz et al., 2008). Dies stellt aber lediglich eine mögliche Erklärung für die Anreicherung von Plexin A3 dar. Die naheliegendere Erklärung wäre selbstverständlich, dass Plexin A3 ein direktes BACE1-Substrat ist. Dies ließe sich zum Beispiel durch Versuche analog den im Rahmen dieser Arbeit für EpCAM durchgeführten Zellkultur-Assays testen. Auch ein Peptid-Assay, bei dem ein Stück der Juxtamembrandomäne von Plexin A3 durch rekombinantes BACE1 geschnitten wird, würde analog zu den Versuchen von Kihara et al. (2010) für mPGES2 einen Beweis für einen direkten Schnitt darstellen.

Neben der Möglichkeit einer potentiell indirekten Anreicherung muss aber auch die mögliche falsch-positive Identifikation eines Hits in Betracht gezogen werden. So wurde für die quantitative Analyse das Ausschlusskriterium eines t-Test-basierten p-Werts von weniger als 0,05 verwendet. Dies würde aber lediglich im Fall einer einfachen Testung bedeuten, dass die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Identifikation für jedes Protein kleiner als 5 % ist. Führt man mehrere t-Tests durch, so muss man post-hoc, also nach der Analyse mittels t-Test, eine Abschätzung vornehmen, wie viel Prozent falsch-positive Hits vermutlich in der Hitpopulation vorkommen und dann gegebenenfalls das Ausschlusskriterium seiner Analyse dementsprechend modifizieren. Im Fall der vorliegenden Arbeit wurde die post-hoc Abschätzung nach der Methode von

Benjamini und Hochberg durchgeführt und ergab eine falsch-positiv Rate von 30 % (Benjamini and Hochberg, 1995). Dies bedeutet, dass vermutlich jeder dritte Hit in der Tabelle ein falsch-positiver Hit in Bezug auf seine Anreicherung ist. Dies ist nach Meinung des Autors eine im Rahmen eines Screens akzeptable falsch-positiv Rate, da es für die zukünftige Validierung anschaulich bedeuten würde, dass zwei von drei untersuchten Proteinen in der Tat die vorhergesagte Anreicherung zeigen.

In der Liste der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten potentiellen BACE1-Substrate befinden sich neben den oben diskutierten Typ-I Transmembranproteinen auch Proteine mit mehreren Transmembrandomänen, sogenannte Multipass-Proteine (MP) und ein Typ-II Transmembranprotein (Tabelle 1). Während die meisten bekannten BACE1-Substrate Typ-I Membranproteine sind, ist mit ST6Gal I zumindest ein Typ-II Membranprotein als BACE1-Substrat beschrieben (Kitazume et al., 2001). Auch Transmembranproteine mit mehreren Transmembrandomänen sind als BACE1-Substrate beschrieben. So weist zum Beispiel das bekannte BACE1-Substrat und Multitransmembrandomänenprotein Neuregulin-1 type III zwei Transmembrandomänen auf (Velanac et al., 2012; Willem et al., 2006). Auch die Analyse von Kuhn *et al.* (2012) fand mit Latrophilin-2 und -3 Multitransmembrandomänenproteine als potentielle BACE1-Substrate.

Die akkumuliert gefundenen GPI-verankerten Proteine Zgc:63947 und Novel protein similar to Glypican-1 sind beide Orthologe des humanen Glypican-1. Für humanes Glypican-1 ist bekannt, dass es ein Ektodomänenspaltungssubstrat ist, es wurde allerdings in der Literatur bisher nicht mit BACE1 in Verbindung gebracht (Filmus et al., 2008).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die markierungsfreie, quantitative proteomische Untersuchung der BACE1 ^{-/-} Hirne erfolgreich war. Neben den Zebrafisch-Orthologen von fünf bekannten BACE1-Substraten wurden 19 weitere intrinsische Membranproteine als signifikant akkumulierend gefunden. Diese stellen ein Reservoir möglicher neuer BACE1-Substrate dar. Möglicherweise sind einige von Ihnen keine BACE1-Substrate, sondern durch den BACE-1 Verlust nur indirekt akkumulierende Proteine. Durch eine weitere Analyse der Hits kann aber in beiden Fällen mehr über die Funktion der Protease BACE1 herausgefunden werden.

Damit wurde nach Wissen des Autors erstmals ein *in vivo* Screen nach BACE1-Substraten erfolgreich etabliert. Auf Grundlage der im Rahmen dieses Screens etablierten Methoden sollte die *in vivo* Suche nach Protease-Substraten anderer Proteasen ebenfalls möglich sein, so lange deren Inhibierung zu einer Anreicherung des Edukts der proteolytischen Prozessierung führt.

6 Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist mit über 26 Millionen Patienten weltweit die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Die regulierte Intramembran-Proteolyse des Amyloid Precursor Proteins (APP) durch β - und γ -Sekretase führt zur Bildung des neurotoxischen A β -Peptids und ist damit essentiell für die Entstehung von Morbus Alzheimer. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die regulierte Intramembran-Proteolyse des APP-Homologen Amyloid Precursor-Like Protein 2 (APLP2) detailliert untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Metalloproteinase ADAM10 die konstitutive, physiologische α -Sekretase-Aktivität in Bezug auf APLP2 darstellt. Dies konnte sowohl in Tumorzelllinien als auch in primären Neuronen gezeigt werden. Des Weiteren wurden die Ektodomänenschnittstellen von APLP2 durch ADAM10 und die Aspartylprotease BACE1 erfolgreich bestimmt. Ebenfalls bestimmt werden konnten die γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2. Dabei wurde festgestellt, dass die Prozessierung von APLP2 derjenigen von APP sehr ähnelt. Die Bestimmung der Schnittstellen und der für die Schnitte verantwortlichen Proteasen hat eine hohe Relevanz für die Erforschung der physiologischen Funktion der APP-Familie. So ermöglicht die Kenntnis der genauen Ektodomänenschnittstellen von APLP2 die Generierung neuer Tiermodelle, mit denen die funktionelle Redundanz von APP und APLP2 besser untersucht werden kann. Außerdem ermöglicht die Kenntnis der APLP2-Schnittstellen die Generierung schnittstellenspezifischer Antikörper, die ein wichtiges Werkzeug für die molekularbiologische Forschung an APLP2 darstellen. Möglicherweise hat das Wissen über die genauen APLP2-Schnittfragmente auch eine Relevanz für die Entwicklung von Biomarkern für Morbus Alzheimer. Da die Produktion des A β -artigen APLP2-Peptids, wie unter anderem im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, der Generierung des neurotoxischen A β -Peptids sehr ähnelt, könnte die Menge des A β -artigen APLP2-Peptids im humanen CSF einen möglichen Biomarker für die A β -Produktion darstellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden gelfreie proteomische Methoden für die Analyse des Zebrafischproteoms etabliert. Diese erlaubten eine bisher unerreicht hohe Anzahl an Proteinidentifikationen im Zebrafisch mit einem verhältnismäßig moderaten Messaufwand. Zur unvoreingenommenen Identifikation von BACE1-Substraten wurden zwei quantitative proteomische Analysen durchgeführt. In einer ersten Analyse wurde das Gesamtproteinlysate von sechs Tage alten BACE1^{-/-} Larven untersucht. Hierbei wurde ein potentiell neues BACE1-Substrat identifiziert, das Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). Für dieses Protein wurde in Zellkulturversuchen etabliert, dass zumindest das murine Ortholog in der Tat ein BACE1-Substrat darstellen kann. Die Relevanz einer möglicherweise auch im Menschen vorkommenden BACE1-abhängigen Prozessierung von EpCAM ist sehr hoch, da die regulierte Intramembran-

Proteolyse von EpCAM als pro-proliferativer Mechanismus eine wichtige Rolle beim Wachstum von Tumoren spielen kann (Maetzel et al., 2009).

In einer zweiten Analyse zur unvoreingenommenen Identifikation von BACE1-Substraten wurden die Gehirne von sechs Monate alten BACE1 $-/-$ Fischen mittels quantitativer proteomischer Methoden untersucht. Hierbei konnten insgesamt 24 intrinsische Membranproteine identifiziert werden, deren relative Menge in den Knock-out Fischen signifikant um mindestens 40 % akkumulierte. Unter diesen 24 intrinsischen Membranproteinen waren die Zebrafisch-Orthologen von fünf bekannten BACE1-Substraten, was die Validität des Ansatzes zur Identifizierung von BACE1-Substraten belegt. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein proteomischer *in vivo* Screen nach BACE1-Substraten erfolgreich durchgeführt. Die genauere Analyse der im Gehirn akkumulierenden, intrinsischen Membranproteine kann vermutlich zu einem besseren Verständnis der Funktion und einer besseren Bewertung des therapeutischen Potentials von BACE1 beitragen.

7 Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease with an estimated prevalence of over 26 million patients worldwide. The regulated intramembrane proteolysis of the Amyloid Precursor Protein (APP) by β - and γ -secretase leads to the production of the neurotoxic A β peptide initiating the amyloid cascade which eventually leads to the development of AD. In the first part of this work a detailed analysis of the regulated intramembrane proteolysis of the APP homolog Amyloid Precursor-Like Protein 2 (APLP2) was performed. It could be shown that the metalloproteinase ADAM10 is the constitutive physiological α -secretase activity for APLP2. This was shown in tumor cells as well as in primary neurons. Further, the ectodomain shedding sites of APLP2 and the γ -secretase intramembrane cleavage sites could be identified. It was found that the proteolytic processing of APLP2 resembles that of the Amyloid Precursor Protein (APP). Identification of the exact cleavage sites and the relevant proteases is of importance for the analysis of the APP family's physiological function. Knowledge of the exact cleavage sites allows for example for the generation of novel animal models for a better analysis of the redundant function of APP and APLP2. The identification of the APLP2 cleavage sites further allows generating cleavage-site-specific antibodies against APLP2 fragments which can be useful tools to study the molecular biology of APLP2 processing. Possibly, the knowledge of the exact APLP2 cleavage products could be helpful for the development of novel early biomarkers for Alzheimer's Disease as the analysis of the levels of the A β -like APLP2 peptide in human CSF might be a good indicator for the production of A β in the brain.

In a second part of the work, a gel-free proteomic workflow for the analysis of the zebrafish proteome was established. This workflow allowed for the identification of an unprecedentedly high number of proteins in the zebrafish proteome without requiring a disproportionate amount of measurement resources. For an unbiased identification of BACE1 substrates two quantitative proteomic analyses were performed. In a first analysis, the whole protein lysate of six days old zebrafish larvae was analyzed. This resulted in the identification of one potential novel BACE1 substrate, the Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). For this protein, it could be shown that at least the murine ortholog can indeed be a BACE1 substrate. This might be of high relevance, as the regulated intramembrane proteolysis of EpCAM can play an important role in tumor growth (Maetzel et al., 2009). Therefore, BACE1-dependent processing of human EpCAM might be a pro-proliferative stimulus for some tumors.

In a second quantitative proteomic analysis for the unbiased identification of BACE1 $-/-$ substrates, the brains of BACE1 $-/-$ fish were analyzed using the established methods for the proteomic analysis of zebrafish tissues. A total of 24 intrinsic membrane proteins accumulated significantly by at least 40 % in the BACE1 knock-out fish. These 24

intrinsic membrane proteins included the zebrafish orthologs of five known BACE1 substrates which shows the validity of the approach chosen. This was thus the first successful proteomic *in vivo* screen for BACE1 substrates ever performed. A more in-depth analysis of the intrinsic membrane proteins accumulating in the brain can probably contribute to gaining a better understanding of BACE1 functions and to better evaluating the therapeutic potential of BACE1.

8 Material und Methoden

8.1 Material

8.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

8.1.1.1 Für allgemeine und molekularbiologische Arbeiten

Gerät/Material	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems
Agarosegeldokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Agarosegeldokumentationskamera (CCD Video)	MS Laborgeräte
Agarosegelelektrophoresekammern	PeqLab
Analysenwaage (Analytical+ 200 g - 0,0001 g)	Ohaus
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systemec
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Fast Optical 96-well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems
Feinwaage (Standard 2000 g - 0,01 g)	Ohaus
Gefrierschrank -20°C (Arktis)	AEG
Gefrierschrank -80°C	Heraeus
Kolbenhubpipetten	Gilson
Kühlschrank 4°C	AEG
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Multifuge 3	Kendro
Magnetrührer MR Heitec	Heidolph
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Mikrotiterplatten (96-well, transparent)	Nunc
Mikrotiterplatten (96-well, transparent)	Thermo F Scientific
Mikrowelle	Sharp
Nanophotometer	Implen
PCR System 2700 Thermocycler	Applied Biosystems
pH-Elektrode	Schott
pH-Meter (Inolab pH Menge 1)	WTW
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Scanner	Hewlett Packard
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer kompakt	Eppendorf

Gerät/Material	Hersteller
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
UV-Schirm für Agarosegele	Intas
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
Wärmeschrank 37°C (Function line)	Heraeus
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore

8.1.1.2 Für proteinbiochemische Arbeiten

Gerät/Material	Hersteller
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Filterpapier für den Western Blot (Whatmanpapier)	Macherey-Nagel
Plattenspektrometer	BioTek
PVDF Membran (Immobilon-P)	Millipore
Röntgenfilme (SuperRX)	Fujifilm
Schüttelvorrichtung (3015)	GFL
SDS-PAGE Elektrophoresekammern	Bio-Rad
SDS-PAGE Glasplatten und zugehörige Kämmen	Bio-Rad
SDS-PAGE Transferkammern	Bio-Rad
Spannungsquelle für SDS-PAGE und Transfer	Bio-Rad
Transferkammer: Mini Trans-Blot Transfer Zell	Bio-Rad
Überkopfschüttler	Heidolph
Westernblot Dokumentationsgerät (LAS-4000)	Fujifilm

8.1.1.3 Für massenspektrometrische Arbeiten

Gerät/Material	Hersteller
96 Well Mikrotiterplatte (AB-800)	Thermo F Scientific
AM-96-PCR-RD Silikonmatten	Axymat
Anion Exchange-SR 47 mm Disk	3D/Varion
C18 Disk	Dr. Körner
Cell Disruptor B15	Branson
Easy nLCII Flüssigkeitschromatographie	Proxeon Biosystems
Filterröhrchen Vivacon 30000	Sartorius
LTQ Velos Orbitrap Massenspektrometer	Thermo F Scientific
MALDI Target plate hydrophob	Applied Biosystems
Nanokapillaremitter Pico Frit (15 cm, 30 cm)	New Objective
Nanokapillar-Packer Nanobaume	Western Analytics
Nanokapillar-Packer Proxeon	Proxeon Biosystems

Gerät/Material	Hersteller
Vakuumzentrifuge, ScanSpeed MaxiVac Alpha	ScanVac
Voyager-DE STR MALDI-TOF Massenspektrometer	Applied Biosystems

8.1.1.4 Für Zellkultur-Arbeiten

Gerät/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
Spritze (5 ml)	Thermo
Wasserbad	GFL
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zellkulturflaschen (T-75)	Nunc
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 14 cm, 6-well)	Nunc
Zellkultursterilwerkbank	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus

8.1.2 Chemikalien, Enzyme und Versuchskits

8.1.2.1 Allgemeine Anmerkung

Nicht näher spezifizierte Chemikalien wurden analysenrein (p.a.) von den Firmen Roth, Merck, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen. Für massenspektrometrische Analysen eingesetzte Lösungsmittel entsprachen dem Reinheitsgrad LC-MS Chromasolv. Restriktionsenzyme wurden, wenn nicht näher spezifiziert, von den Firmen Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

8.1.2.2 Für allgemeine und molekularbiologische Arbeiten

Gerät/Material	Hersteller
1 kb-DNA-Leiter Gibco	Invitrogen Corporation
Agarose NA	Amersham Biosc.
Ampizillin	Roth

Gerät/Material	Hersteller
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
NucleoBond AX500 Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Oligonukleotide	Thermo
Power SYBR-Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
QIAshredder	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen

8.1.2.3 Für massenspektrometrische Arbeiten

Gerät/Material	Hersteller
C18-AQ Partikel (2,4 µm)	Dr. Maisch
Sodiumcyanoborodeuteride	Aldrich
Sodiumcyanoborohydride	Fluka
Formaldehyde-d2 (20 %)	Aldrich
Formaldehyde ACS (37 %)	Aldrich
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega

8.1.2.4 Für Zellkulturarbeiten

Gerät/Material	Hersteller
DAPT	Callbiochem
DMEM Medium	Gibco
DMEM-F12 Medium	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Inhibitor IV (C3)	Callbiochem
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Optimem Medium	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
RNAimax	Invitrogen
SILAC-Lys6-Arg10-Kit	Silantes
TAPI-1	Callbiochem
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco
Phleomycin D1 (auch Zeocin)	Sigma-Aldrich
γ-secretase inhibitor X (MerckA)	Callbiochem

8.1.3 Puffer

Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, in ddH₂O angesetzt. Puffer für die Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie wurden, wenn immer möglich, mit Wasser beziehungsweise anderen Lösungsmitteln des Reinheitsgrades Chromasolv (LC-MS grade) angesetzt.

8.1.3.1 Für allgemeine und molekularbiologische Arbeiten

Puffer	Zusammensetzung
4x DNA-Probenpuffer	30 % Glycerin 10 mM EDTA 0,05 % Orange G
Ampizillin-Stammlösung (1000x)	100 mg/ml in 70 % Ethanol
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1 % SDS
Elektrophoresepuffer (Agarosegele) 50x Stammlösung	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
Gefriermedium	Zelltypspezifisches Me- dium 10 % DMSO
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl pH 7,0
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,75 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-EDTA	PBS 25 mM EDTA

8.1.3.2 Für proteinbiochemische Arbeiten

Puffer	Zusammensetzung
4x SDS-Probenpuffer (10 ml)	4 ml 20 % (w/v) Glycerin 4 ml 20 % (w/v) SDS 1 ml β -Mercaptoethanol 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8 10 μ l 10 % Bromphenolblau
ABC-Puffer	50 mM Ammoniumbicarbonat Wasser (Chromasolv)
Blockierlösung für Western Blot	5 % (w/v) Magermilchpulver PBS-T
Extraktionspuffer (1ml)	660 μ l Acetonitril 340 μ l 10 % (v/v) Ameisensäure
Coomassie-Färbepuffer	50 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 2 % (w/v) Coomassie Blue-R
Hypotonpuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM EDTA 1 mM EGTA PI-Mix
IAA-Puffer (Gel-Verdau)	55 mM Iodoacetamid ABC-Puffer
IAA-Puffer (FASP)	100 mM Iodoacetamid Ureapuffer
IP-Elutionspuffer	100 mM Glycin pH 2,5
IP-Waschpuffer	PBS 0,5 % DDM
Lysepuffer (SDS-PAGE)	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 % NP-40 2 mM EDTA PI-Mix
Lysepuffer (Proteomik)	4 % SDS 0,1 % DTT 100 mM Tris pH7,6
MALDI-Matrix	2,5 % TFA 50 % Acetonitril

Puffer	Zusammensetzung
Primärantikörper	Antikörper 0,25 % BSA 0.05 % (w/v) Natriumazid in PBS-T
Sammelgelpuffer für Tris-Glycin-Gele	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SAX-Puffer	0.02 M CH ₃ COOH 0.02 M H ₃ PO ₄ 0.02 M H ₃ BO ₃ pH 11, 8, 6, 4, 3 (1 M NaOH)
Sekundärantikörper	Antikörper 1:2000 - 1:10000 0,25 % BSA in PBS-T
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
Ureapuffer	8 M Harnstoff 100 mM Tris pH 8,5
ST-Elutionspuffer (1 ml)	660 µl Acetonitril (Chromasolv) 340 µl 10 % (v/v) Ameisensäure
StageTip-Waschpuffer	2 % Ameisensäure Wasser (Chromasolv)

8.1.4 Antikörper

8.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
ADAM10	A10 Ektodomäne	Hase, polyklonal	1:10000	Calbiochem
ADAM17	ADAM17 Ektod.	Hase, polyklonal	1:2000	Oncogene
Aktin	Aktin	Maus, monoklonal	1:10000	Sigma
APLP1	APLP1 Ektodomäne	Hase, polyklonal	1:2000	Proteintech

Antikörper	Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
APLP2-2DII	APLP2 Ektodomäne	Hase, polyklonal	1:5000	Calbiochem
APLP2-CT12	APLP2 ICD	Hase, polyklonal	1:5000	Calbiochem
APP 14D6	α APP	Ratte, monoklonal	1:10	Dr. Kremmer
APP 192	$s\beta$ APP	Ratte, monoklonal	1:1000	Dr. Schenck
APP 22C11	APP Ektodomäne	Maus, monoklonal	1:5000	Millipore
Calnexin	Calnexin	Hase, polyklonal	1:2000	Stressgene
	EpCAM			
EpEx C10	Ektodomäne	Maus, monoklonal	1:3000	Santa Cruz
FLAG M2	Flag-Tag	Maus, monoklonal	1:5000	Sigma
GFP	GFP	Maus, monoklonal	1:2000	Clontech
HA.11	HA-tag	Maus, monoklonal	1:1000	Covance
hEpICD	EpCAM ICD	Meerschw., monoklonal	1:5000	Dr. Gires

8.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
anti-Maus-HRP	Ziege	1:5000	Promega
anti-Hase-HRP	Ziege	1:5000	Promega
anti-Ratte-HRP	Ziege	1:5000	Santa Cruz
anti-Meerschweinchen-HRP	Ziege	1:5000	Dr. Gires

8.1.5 Primer

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen und von Thermo mittels HPLC analysiert. Die Chromatogramme für alle Primer liegen vor. Die Primer wurden lyophilisiert erhalten und dann in ddH₂O gelöst. 100 μ M Stocklösungen der Plasmide wurden bei -20°C gelagert, für die regelmäßige Arbeit wurden außerdem 10 μ M Arbeitslösungen hergestellt.

Nr.	Name	Sequenz
P0	aAPLP2_Nhe_fw	cggctctagagattggaggcctcgaggaaga
P1	sAPLP2_Nhe_fw	gcggctctagagattgatgtaaggaaatgatt
P2	APLP2_Nhe_rev	gtcctctagaatctgcatctgctccaggtatt

Nr.	Name	Sequenz
P3	APLP2-TF_fw	ttcaaggagactacaaggatgacgacgataaggctcatt- gacgagactctg
P4	APLP2-TF_rev	tcctttagtctccttgaaagtataggtttccatgtttcatccacttt
P5	APLP2_Xba_rev	acgctctagacctaataatctgcatctgctcc
P6	APLP2_NheI_fw	atggctagcgatggcggccaccgggac
P7	T7_fw	taatacgactcactataggg
P8	BGH_rev	tagaaggcacagtcgagg

8.1.6 Plasmide

Im Folgenden sind die Plasmide aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Die Klonierungsstrategien für die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Plasmide sind unter 8.2.1.1 angegeben.

Plasmid	Quelle
pcDNA3.1	Dr. Kuhn
pcDNA3.1-APLP2-TEV-Flag	im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pcDNA3.1-CD5-HA-IL1R1-Flag	Dr. Kuhn
pcDNA3.1-CD5-HA-aAPLP2CTF-Flag	im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pcDNA3.1-CD5-HA-sAPLP2CTF-Flag	im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pcDNA3.1-hEpCAM	Dr. Gires
pCEP4-APLP2	Dr. Lichtenthaler
peak12-ADAM10	Dr. Lichtenthaler
peak12-BACE1	Dr. Lichtenthaler
peak12-Luciferase	Dr. Lichtenthaler

8.2 Methoden

8.2.1 Klonierungen

Im Folgenden werden zunächst die Strategien für die einzelnen Klonierungen aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die jeweils verwendeten Techniken werden anschließend aufgeführt.

8.2.1.1 Klonierstrategie

Das Plasmid pcDNA3.1-CD5-HA-aAPLP2CTF-Flag wurde auf der Basis der Plasmide pcDNA3.1-CD5-HA-IL1R1-Flag (*Vektor*) und pCEP4-APLP2 (*Insert*) kloniert. Das mit den Primern P0 und P2 per PCR amplifizierte Insert wurde nach einem Restriktions-

verdau mit dem Enzym NheI in den XbaI-verdauten und dephosphorilierten *Vektor* ligiert.

Das Plasmid pcDNA3.1-CD5-HA-sAPLP2CTF-Flag wurde auf der Basis der Plasmide pcDNA3.1-CD5-HA-IL1R1-Flag (*Vektor*) und pCEP4-APLP2 (*Insert*) kloniert. Das mit den Primern P1 und P2 per PCR amplifizierte Insert wurde nach einem Restriktionsverdau mit dem Enzym NheI in den XbaI-verdauten und dephosphorilierten *Vektor* ligiert.

Das Plasmid pcDNA3.1-APLP2-TEV-Flag wurde auf der Basis der Plasmide pcDNA3.1 (*Vektor*) und pCEP4-APLP2 (*Insert*) mittels Fusions-PCR generiert. Zunächst wurden zwei getrennte PCRs mit den Primern P3 und P5 beziehungsweise P2 und P4 durchgeführt. Die resultierenden Produkte wurden in einer Fusions-PCR mit den Primern P5 und P6 verbunden und amplifiziert. Das wiederum daraus resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen NheI und XbaI verdaut und anschließend in den NheI- und XbaI-verdauten und dephosphorilierten *Vektor* ligiert.

8.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der für PCRs verwendete Reaktionsansatz setzte sich in der Regel wie folgt zusammen:

Menge	Stoff
1 µl	Plasmid (1µg/µl)
1 µl	Primer A (10 µM)
1 µl	Primer B (10 µM)
1 µl	dNTPs
2 µl	Pwo-Reaktionsmix (10x)
1 µl	Pwo-Polymerase
14 µl	ddH ₂ O

Das Protokoll für die PCR umfasste ein Schmelzen der DNA bei 95°C für zwei Minuten sowie 35 Reaktionszyklen: Schmelzen bei 95°C für 20 s, Primerhybridisierung bei 55°C für 20 s und DNA-Elongation bei 72°C für unterschiedliche Zeiten. Die Zeiten für die DNA-Elongation (t) wurden wie folgt berechnet:

$$t = 10 + \frac{n}{750}$$

wobei, n der Anzahl der Nukleotide der zu amplifizierenden DNA entspricht. An die 35 Zyklen anschließend wurde eine abschließende Elongation bei 72°C für 2 min durchgeführt. Die PCR wurde in der Regel im PCR System 2007 Thermocycler durchgeführt.

8.2.1.3 Restriktionsverdau

Zur folgenden Ligation beziehungsweise für analytische Zwecke wurden PCR-Produkte und Plasmide mit Hilfe von Restriktionsenzymen gespalten. Restriktionsverdau (20 µl Ansatz) von Plasmiden wurden mit 500 ng (zur Analyse) beziehungsweise 2 µg (zur folgenden Ligation) DNA für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Für den Restriktionsverdau von aufgereinigten PCR-Produkten wurden in der Regel 10 µl des aufgereinigten Produkts eingesetzt. Der jeweilige Reaktionspuffer wurde mit Hilfe des *Double Digest Finder* (<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>) von New England Biolabs ausgewählt. Von den Restriktionsenzymen wurden in der Regel 0,5 µl (zur Analyse) beziehungsweise 1 µl (zur anschließenden Ligation) eingesetzt. Für den Restriktionsverdau von Plasmiden zur anschließenden Ligation wurden außerdem 0,5 µl porcine Alkaline Phosphatase zur Dephosphorylierung der beim Verdau *de novo* entstandenen 3' Enden der DNA eingesetzt.

8.2.1.4 Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung

Zur elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten zum Zwecke der Analyse oder der Aufreinigung wurden 1-2 %ige Agarosegele in TAE-Puffer mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. DNA-Proben wurden mit entsprechenden Mengen des 4x DNA-Probenpuffers versetzt, in das Gel geladen und elektrophoretisch bei 120 V in TAE-Puffer in Agarose-Gelkammern für 10 min bis 20 min aufgetrennt. Die aufgetrennte DNA mit dem interkalierten Ethidiumbromid wurde auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und mittels Kamera dokumentiert. Zur weiteren Verarbeitung benötigte DNA-Fragmente wurden mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem Nucleospin Extract Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

8.2.1.5 Ligation

Zur Generierung der jeweiligen Plasmide wurden die aufgereinigten, linearisierten und dephosphorierten Plasmide (*Vektor*) mit den aufgereinigten und verdauten PCR-Produkten (*Inserts*) ligiert. Zur Ligation (20 µl Ansatz) wurden *Vektor* und *Insert* in einem Kopien-Verhältnis von 1 zu 3 gemischt (Abschätzung der DNA-Kopienzahl auf Basis der Stärke des UV-Signals der jeweiligen DNA in der Gelelektrophorese) und mit 1 µl T4-Ligase und 2 µl 10x Ligationspuffer versetzt. Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* Dh5α transformiert.

8.2.1.6 Transformation von *E. coli*

Im Labor erzeugte chemokompetente *E. coli* des Stamms Dh5α wurden zur Produktion von Plasmiden verwendet. Zur Transformation der Bakterien wurde der gesamte Reaktionsansatz einer Ligation mit 50 µl einer auf Eis aufgetauten Bakterienlösung versetzt

und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s wurden die Bakterien für 90 s auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die transformierten Bakterien bei 37 °C unter Schütteln für bis zu 45 min inkubiert und anschließend durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (1000 UpM, 1 min) vom Medium getrennt. Das gewonnene Zellpellet wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf einer LB-Agar-Platte mit einer finalen Ampizillinkonzentration von 100 µg/ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

8.2.1.7 Aufreinigung von Plasmiden aus der Flüssigkultur

Für die Gewinnung von Plasmiden aus *E. coli* Kulturen wurden 5 ml (*minis*) oder 200 ml (*midis*) LB-Ampizillin-Medium mit jeweils einer einzelnen Kolonie transformierter *E. coli* angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Bakterienzellen wurden mittels Zentrifugation (4600 UpM, 5 min, Megafuge) vom Flüssigmedium abgetrennt und die Plasmide mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (*minis*) beziehungsweise NucleoBond AX500 Kit (*midis*) aufgereinigt. Dies wurde nach den entsprechenden Herstellerangaben durchgeführt. Plasmide wurden nach der Elution wenn immer möglich auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

8.2.1.8 Sequenzierung von klonierten Plasmiden

Die Inserts aller im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide wurden vollständig sequenziert und auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden die Primer P11 und/oder P12 verwendet, die beide direkt an der Grenze des Inserts im pcDNA3.1 Vektor hybridisieren.

8.2.2 Zellkultur und Zellkulturassays

8.2.2.1 Verwendete Zelllinien

HEK293-Ebstein-Barr virus nuclear antigen-Zellen wurden in „Dulbecco's modified eagles medium“ (DMEM), versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert und werden als HEK293E-Zellen bezeichnet. Diese Zellen wurden für diese Arbeit von Dr. Lichtenthaler zur Verfügung gestellt und bereits für andere Arbeiten verwendet (Ullrich et al., 2010).

HEK293-SV40 large T-Antigen-Zellen wurden in DMEM, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert und werden als HEK293T-Zellen bezeichnet. Diese Zellen wurden für diese Arbeit von Dr. Lichtenthaler zur Verfügung gestellt und bereits für andere Arbeiten verwendet (Kuhn et al., 2010).

SH-SY5Y-Zellen wurden in DMEM F12, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Diese Zellen wurden für diese Arbeit von Dr. Lichtenthaler

zur Verfügung gestellt und bereits für andere Arbeiten verwendet (Schobel et al., 2006).

SH-SY5Y-Zellen mit einem stabilen Knock-down von ADAM10 wurden in DMEM F12, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Die zwei in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien tragen die Bezeichnung sh7 und sh9 und wurden von Dr. Kuhn generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Kuhn et al., 2010).

HCT8-Zellen wurden in DMEM, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Diese Zellen wurden für diese Arbeit von Dr. Gires zur Verfügung gestellt und bereits für andere Arbeiten verwendet (Maetzel et al., 2009).

HEK293E-Zellen mit einer Überexpression von pcDNA 3.1 EpCAM-TEV-Flag (siehe Abbildung 31) wurden in DMEM, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Die Zellen wurden von Dr. Gires zur Verfügung gestellt, eine Publikation der Zellen durch den Kollaborationspartner ist in Vorbereitung.

HEK293E-Zellen, die mit den im Rahmen dieser Arbeit klonierten Plasmiden stabil transfiziert wurden, wurden in DMEM, versetzt mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Phleomycin D1 (Alternativname Zeocin), kultiviert und werden als HEK293E-*Plasmidname* bezeichnet, zum Beispiel HEK293E-HA-sAPLP2-Flag.

8.2.2.2 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Dazu wurden die Zellen in T-75 Flasks in den entsprechenden Medien (siehe 8.2.1.1) ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Die Zellen wurden beim Erreichen von 70-80 % Konfluenz mit sterilem PBS gewaschen und mittels eines tryptischen Verdauers der Extrazellulär-Matrixproteinen mit 0,05 %iger Trypsin-EDTA-Lösung aus den Zellschalen gelöst und in ein 15ml Falkongefäß überführt. Der tryptische Verdau wurde durch Zugabe von 10 % FCS haltigem DMEM Medium gestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Lösung vereinzelt. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in der Regel in einem Verhältnis von 1 zu 20 geteilt. SH-SY5Y-Zellen wurden maximal in einem Verhältnis von 1 zu 10 geteilt.

8.2.2.3 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Für Transfektionen von HEK293-Zellen mit siRNA oder Plasmiden wurden die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet worden waren. Eine Ausnahme hiervon stellte die Herstellung von stabilen Zellen dar. Hierfür wurden nicht-beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Zur Beschichtung im erstgenannten Fall wurden die Zellkulturschalen vollständig mit steriler Poly-L-Lysin-Lösung (PLL-Lösung) bedeckt und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abnehmen

der PLL-Lösung wurden die Schalen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend die entsprechenden Zellen ausgesät.

8.2.2.4 Aussäen von Zellen

Die Zellen wurden wie unter 8.2.2.2 beschrieben abgelöst, mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und auf die jeweiligen Zellkulturgefäße verteilt.

8.2.2.5 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmiden für die Analyse der Ektodomänenspaltung mittels Western Blot

Zur Transfektion von Zellen mit den jeweiligen Plasmiden wurden $4,5 \cdot 10^5$ HEK293E-Zellen pro Well auf PLL-beschichtete 6-Well-Platten ausgesät (Tag 0). An Tag 1 wurden Plasmid-Lipofectamine-Partikel wie folgt hergestellt: in getrennten Reaktionsgefäßen wurden jeweils 250 µl aufgewärmtes (37°C) DMEM mit 5 µl Lipofectamin bzw. 2 µg Plasmid für 5 min inkubiert. Die Lipofectamin- und die Plasmidlösung wurden vermischt und die resultierende Lösung für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde diese Lösung auf die Zellen gegeben (ein Ansatz pro zu transfizierendem Well). An Tag 2 wurde das Medium vorsichtig von den Zellen abgesaugt und durch 1 ml DMEM 10 % FCS 1 % NEAA ersetzt. Das zugegebene Medium enthielt je nach Versuchsaufbau noch pharmakologische Inhibitoren. An Tag 3 wurde der Zellüberstand abgenommen, für 5 min bei 4°C mit 14000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der hieraus resultierende Überstand zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden aus den Wells mit einem Plastik-Schaber herausgeschabt, mit PBS gewaschen und Proteinlysate in 500 µl Lysepuffer hergestellt. Im Folgenden ist der prinzipielle Versuchsablauf in einer kurzen Übersicht skizziert:

Tag	Tätigkeit
0	Aussäen der Zellen
1	Herstellung und Zugabe von Plasmid-Lipofectamine-Partikeln
2	Wechsel des Mediums
3	Abnahme des Mediums, Lyse der Zellen

8.2.2.6 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmiden für die massenspektrometrische Analyse der Ektodomänenspaltung

Da für die massenspektrometrische Analyse der Ektodomänenspaltung größere Mengen an Protein benötigt werden als für die sehr sensitive Western-Blot-Methode, wurden transiente Transfektionen für die massenspektrometrische Analyse in 10 cm Schalen durchgeführt. Hierfür wurde eine in-solution Transfektion durchgeführt. An Tag 0 wurde der Plasmid-Lipofectamine-Mix wie oben beschrieben hergestellt, allerdings

wurden größere Mengen an Plasmid und Lipofectamine verwendet: 20 µg Plasmid und 25 µl Lipofectamine wurden in jeweils 1 ml vorgewärmtem DMEM angesetzt. Die Plasmid-Lipofectamine-Partikel wurden dann direkt im Falkongefäß mit $2 \cdot 10^6$ HEK293E-Zellen vermischt, die daraufhin auf PLL-beschichtete 10 cm Schalen ausgesät wurden. An Tag 1 wurde der Überstand der Zellen abgenommen und durch 8 ml DMEM 10 % FCS 1 % NEAA ersetzt. Das zugegebene Medium enthielt je nach Versuchsaufbau noch pharmakologische Inhibitoren. An Tag 2 wurde der Überstand der Zellen abgenommen, zentrifugiert und direkt zur weiteren Analyse verwendet. Das Einfrieren des Überstandes erwies sich als negativ für den Versuchserfolg. Die Zellen wurden in PBS gewaschen. Für ein Zehntel der Zellen wurde ein Proteinlysate in 1 ml Lysepuffer generiert. Im Folgenden ist der prinzipielle Versuchsablauf in einer kurzen Übersicht skizziert:

Tag	Tätigkeit
0	Aussäen der Zellen, Zugabe von Plasmid-Lipofectamine-Partikeln
1	Wechsel des Mediums
2	Abnahme des Mediums, Lyse der Zellen

8.2.2.7 Transfektion von Zellen mit siRNA für die Analyse der Ektodomänenspaltung

Die siRNAs wurden als Gemisch von vier Sequenzen (siGenome Pool) von der Firma Dharmacon bezogen. Die lyophilisiert vorliegenden siRNAs wurden zunächst in siRNA-Puffer aufgenommen und aliquotiert. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -20°C . Die siRNAs wurden per Lipid-basierter reverser Transfektion in die Zielzellen (SH-SY5Y oder HEK293E) eingeschleust. An Tag 0 wurde der Transfektionsansatz bestehend aus 0,25 ml OPTIMEM, 1 µl 10 µM siRNA Pool und 5 µl Lipofectamine RNAiMAX vorbereitet. Die Zielzellen wurden in einer Konzentration von $4,5 \cdot 10^5$ pro 6-Well in DMEM 10 % FCS 1 % NEAA ausplattiert. Ein Transfektionsansatz pro Well wurde hinzugegeben und per Schütteln verteilt. Für Experimente mit HEK293E-Zellen wurden PLL-beschichtete 6-Well-Platten verwendet. An Tag 1 wurden 1,5 ml frisches Medium hinzugegeben. An Tag 2 wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. An Tag 3 wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und durch Zentrifugation (14000 UpM, 10 min, 4°C) von unlöslichen Bestandteilen getrennt und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Aus den Zellen wurden Proteinlysate und/oder Membranpräparationen gewonnen. Im Folgenden ist der prinzipielle Versuchsablauf in einer kurzen Übersicht skizziert:

Tag	Tätigkeit
0	Aussäen der Zellen, Zugabe von siRNA-Lipofectamine-Partikeln
1	Zugabe von Medium
2	Wechsel des Mediums
3	Abnahme des Mediums, Verarbeitung der Zellen

8.2.2.8 Herstellung stabiler Zelllinien mittels Transfektion von Plasmiden

Die Herstellung stabiler Zellen erfolgte durch Transfektion von HEK293E-Zellen mit einem Plasmid und anschließender Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium. So können nur Zellen proliferiert werden, die das Plasmid als episomale DNA erhalten haben und in Folge dessen das darauf codierte Resistenzgen exprimieren. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie unter 8.2.2.5 beschrieben, mit dem Unterschied, dass nicht-beschichtete 6-Well-Platten verwendet wurden. An Tag 2 wurde das Medium dann durch DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 µg/ml Zeocin ersetzt. An Tag 4 wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin wie unter 8.2.2.2 beschrieben abgelöst und in eine 60 mm-Zellkulturschale überführt. Bei einer Konfluenz von circa 30 % wurden die Zellen erneut vereinzelt und in einem T75 Flask ausgesät. Die Expression des auf dem jeweiligen Plasmid codierten Proteins wurde mittels Western Blot überprüft.

8.2.2.9 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate wurden erzeugt indem PBS-gewaschene Zellen in Lysepuffer mit 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert wurden. Unlösliche Zellbestandteile wurden per Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (14000 UpM, 10 min, 4°C) von den gelösten Proteinen abgetrennt. Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde mittels BCA-Assay-Kit nach den Herstellerangaben bestimmt. In der Regel wurden für die Analyse mittels Western Blot 60 µl Proteinlysate mit 20 µl 4X SDS-Probenpuffer vermischt und dann für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

8.2.2.10 Präparation von Membranproteinen

Zur stärkeren Anreicherung von Membranproteinen wurden Membranpräparationen durchgeführt. Hierzu wurden die PBS-gewaschenen Zellen im Hypotonpuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden sie 15 Mal „genadelt“, das heißt die resuspendierten Zellen wurden 15 Mal durch eine spitze Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,6 mm auf- und niedergezogen. Die Zellkerne wurden daraufhin mit einer Tischzentrifuge von der Membranfraktion getrennt (3000 UpM, 15 min, 4°C). Der die Membranfraktion enthaltende Überstand wurde daraufhin bei 14000 UpM für 30 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um die Membranen zu pelletie-

ren. Die pelletierten Membranen wurden in der Regel in 60 µl 4X SDS-Probenpuffer aufgenommen und für die Analyse mittels Western Blot für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

8.2.3 Proteinbiochemische Methoden

8.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970). Zur Herstellung der Gele sowie zur Trennung der Proteine wurden Minigelsysteme (Bio-Rad) verwendet. Die Gele waren wie in Tabelle 2 aufgeführt zusammengesetzt.

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

Trenngel	8 % Gel	10 % Gel	12 % Gel	15 % Gel	Sammelgel
ddH ₂ O	8,8 ml	8 ml	7,5 ml	6 ml	6,8 ml
40 % Acrylamid-Bis Lsg.	3,2 ml	4 ml	4,5 ml	6 ml	1 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	2,5 ml
10 % APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl

SDS-PAGE erfolgte nach den Herstellerangaben der SDS-PAGE Elektrophoresekammern. 60 µl zu analysierende Probe wurden in der Regel mit 20 µl 4X SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und entsprechende Mengen aufgetragen. Die Menge an aufzutragender Probe wurde auf Grundlage der Proteinkonzentration bestimmt. In der Regel wurden für Zelllysate zwischen 1 µg und 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für circa 10 min mit 99 V Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode gestartet. Nachdem die Laufmittelfront klar in das Trenngel eingelaufen war, wurde die Elektrophorese mit einer Potentialdifferenz von 149 V fortgeführt, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Daraufhin wurde das Gel entnommen und kurz in Wasser gewaschen um dann für einen Western Blot (siehe 8.2.3.2) oder eine Coomassie-Färbung (siehe 8.2.3.3) verwendet zu werden.

8.2.3.2 Western Blot

Zum Transfer der bei der SDS-PAGE nach ihrer Elektromobilität aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde die Western Blot-Technik verwendet. Hierzu wurden *Criterion Blotter* Transferkammern nach den Herstellerangaben verwendet. Der Transfer wurde in der Regel für 65 min bei einer konstanten Stromstärke von 0,90 A durchgeführt. Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde zu-

nächst für 45 min bei Raumtemperatur in 20 ml der Blockierlösung unter horizontalem Schütteln inkubiert. Nach dem mehrmaligen Abwaschen der Blockierlösung mit PBS-T wurde die Membran in 10 ml primärer Antikörperlösung (Antikörperkonzentration siehe 8.1.4.1) entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter horizontalem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Abwaschen der primären Antikörperlösung mit PBS-T wurde die Membran in 10 ml der sekundären Antikörperlösung (speziesspezifisch für den primären Antikörper, siehe 8.1.4.2) für 45 min bei Raumtemperatur unter horizontalem Schütteln inkubiert. Nach dem dreimaligen Abwaschen der sekundären Antikörperlösung mit PBS-T wurde die Membran entweder mit 2 ml *Enhanced Chemoluminescence Reagenz* (ECL) für 1 min (bei starken Signalen) oder mit 2 ml ECLplus für 5 min (bei schwächeren Signalen) behandelt. Dabei wird eine Chemolumineszenz-Reaktion der in ECL beziehungsweise ECLplus enthaltenen Edukte, von der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase, katalysiert, in deren Verlauf Licht freigesetzt wird. Zur Detektion des Signals kamen zwei Techniken zur Anwendung. Zum einen wurde die Schwärzung von auf die Membranen aufgelegten Röntgenfilmen analysiert, zum anderen wurde das emittierte Lichtsignal mit dem Western-Blot-Dokumentationsgerät LAS-4000 detektiert. Zur Quantifizierung der Signale wurde die Software *Multi Gauge* (Version 3.0) verwendet.

8.2.3.3 Coomassie-Färbung von Gelen

Zur Coomassie-Färbung wurde das zu färbende Polyacrylamidgel zunächst zwei weitere Male mit ddH₂O abgewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln in 15 ml der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Coomassie-Färbelösung wurde daraufhin mit ddH₂O abgewaschen und das Gel für 2 Stunden in ddH₂O unter Schütteln inkubiert. Das Wasser wurde dabei wiederholt gewechselt. Nach der Dokumentation des Gels mit dem Scanner wurde das Gel in ddH₂O mit 5 % Essigsäure aufbewahrt.

8.2.4 MALDI-TOF Massenspektrometrie

8.2.4.1 Bestimmung der Schnittstellen der Ektodomänenspaltung von APLP2

Für die Bestimmung der Schnittstellen der Ektodomänenspaltung von APLP2 wurden transiente Transfektionen von HEK293E-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1-APLP2-TEV-Flag wie in 8.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die proteolytisch abgespalteten Ektodomänen des jeweils exprimierten Proteins (sAPLP-TEV-Flag) wurden bei 4°C mit 30 µl Flag-M2-Agarose für 3 Stunden präzipitiert. Die Agarose mit den gebundenen sAPLP2-TEV-Flag Molekülen wurde daraufhin zweimal mit IP-Waschpuffer und dann einmal mit PBS gewaschen. Die gebundenen sAPLP2-TEV-Flag Moleküle wurden da-

rauffin in 40 μ IP-Elutionspuffer auf Eis für 15 min eluiert. Zur Neutralisation wurden 200 μ l 100 mM Tris (pH8) zugegeben. Über Nacht wurden die sAPLP2-TEV-Flag-Moleküle bei 4°C durch Zugabe von 1 μ l TEV-Protease proteolytisch an der TEV-Protease-Schnittstelle gespalten. Die Flag-positiven Schnittprodukte wurden daraufhin in 14 ml PBS mittels Immunopräzipitation mit 10 μ l Flag-M2-Agarose bei 4°C für 2 h aufgereinigt. Die Agarose mit den gebundenen Schnittprodukten wurde einmal mit IP-Waschpuffer, einmal mit PBS und zweimal mit ddH₂O gewaschen. Daraufhin wurden die aufgereinigten Moleküle in 10 μ l MALDI-Matrix eluiert und zweimal 1 μ l der Matrix mit den gelösten Peptiden auf die MALDI-Target-Platte pipettiert. Der Peptid-Matrix-Gemisch-Tropfen auf der Target-Platte kristallisierte in der Regel innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur. Die Proben wurden daraufhin wie unter 8.2.4.3 beschrieben analysiert. Alle verwendeten Puffer wurden vor dem Versuch für eine Stunde auf Eis gekühlt.

8.2.4.2 Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstellen von APLP2

Für die Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstellen von APLP2 wurden stabil mit pcDNA3.1-CD5-HA-APLP2CTF-Flag transfizierte HEK293E-Zellen verwendet. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden an Tag 0 auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert, an Tag 1 wurde das Medium auf 8 ml Medium (ggf. mit dem jeweiligen Inhibitor) gewechselt. An Tag 2 wurde das Medium abgenommen und direkt zur Analyse verwendet. Die Zellen wurden in PBS gewaschen. Für ein Zehntel der Zellen wurde ein Proteinlysate in 1 ml Lysepuffer generiert. Um die A β -artigen APLP2-spezifischen Peptide aus dem Zellkulturüberstand zu präzipitieren wurden die 8 ml zentrifugierter Überstand (4600 UpM, 15 min, 4°C) jeweils mit 6 ml PBS verdünnt und nach Zugabe von 10 μ l anti-HA-Konjugat bei 4 °C für 2 h unter „Überkopf-Schütteln“ inkubiert. Das anti-HA-Konjugat mit den gebundenen Peptiden wurde zweimal mit IP-Waschpuffer, zweimal mit PBS und zweimal mit ddH₂O gewaschen. Daraufhin wurden die aufgereinigten Peptide in 10 μ l MALDI-Matrix eluiert und zweimal 1 μ l der Matrix auf die MALDI-Target-Platte pipettiert. Der Peptid-Matrix-Gemisch-Tropfen auf der Target-Platte kristallisierte in der Regel innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur. Die Proben wurden daraufhin wie unter 8.2.4.3 beschrieben analysiert. Alle verwendeten Puffer wurden vor dem Versuch für eine Stunde auf Eis gekühlt.

8.2.4.3 Aufnahme von Spektren mit dem MALDI-TOF

Massenspektrometer

MALDI-TOF Spektren wurden auf einem Voyager DE STR Massenspektrometer aufgenommen. Zur Instrumentensteuerung wurde die Software *Voyager Instrument Control Panel* (Version 5.10.2) verwendet. Das Instrument wurde im manuellen Kontrollmodus verwendet. Es wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 20000 V im po-

sitiven Ionen-Modus gearbeitet. Für alle Proben wurden grundsätzlich mindestens zwei Spektren im linearen Modus aufgenommen, wenn möglich wurden zusätzlich zwei weitere Spektren im Reflektormodus aufgenommen. Der lineare Modus wurde in der Regel mit 90 % Grid-Spannung und einer Verzögerungszeit von 250 ns betrieben, der Reflektormodus mit 66 % Grid-Spannung und einer Verzögerungszeit von 150 ns. Die Laserintensität wurde in Abhängigkeit der Signalstärke und des Signal-Rausch-Verhältnisses für jede Probe individuell eingestellt.

8.2.4.4 Auswertung von MALDI-TOF Spektren

Zur Auswertung der mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer aufgenommenen Spektren wurde die Software *Data Explorer* (Version 4.0) verwendet. Um das Hintergrundrauschen der Spektren zu subtrahieren, wurde die Operation *Baseline Correction* durchgeführt.

8.2.5 LC-MS/MS Massenspektrometrie

8.2.5.1 Filter assistierte Proben Vorbereitung (*filter aided sample preparation, FASP*)

Für die proteomische Analyse der Zebrafischlarven und der Zebrafischgehirne wurde die FASP-Technik verwendet (Wisniewski et al., 2009b). Bei der FASP-Technik werden die Proben in einem Lysepuffer mit hohem SDS Gehalt lysiert. Zur Lyse von Fischlarven wurden die Larven nach Zugabe des Lysepuffers direkt für 30 s mit einem Stab-Sonifier sonifiziert und das Lysat bei 95°C aufgeköcht. Fischgehirne wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren im Lysepuffer lysiert und ebenfalls bei 95°C aufgeköcht. Je 100 µl Lysat wurden mit 900 µl Urea-Puffer versetzt. In mehreren Schritten wurde das Urea-versetzte Lysat daraufhin auf das Filterröhrchen gegeben und die Proteine durch Zentrifugation aufkonzentriert (je Schritt 5-10 min, 14000 UpM). Bei diesem und allen weiteren Schritten vor dem tryptischen Verdau wurde jeweils der Durchfluss verworfen. Nach zwei Waschsritten mit je 200 µl Urea-Puffer wurden 100 µl IAA-Puffer zum Alkylieren der reduzierten Cysteine der auf dem Filter zurückgehaltenen Proteinen gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit je 200 µl Urea-Puffer gewaschen. Nach zwei weiteren Waschsritten mit jeweils 200 µl ABC-Puffer wurde das Auffanggefäß durch ein frisches ersetzt. Anschließend wurden 100 µl ABC-Puffer, enthaltend einer Trypsinmenge von 1:20 im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge (w/w), zu den aufkonzentrierten, reduzierten und alkylierten Proteinen zugegeben. Für den tryptischen Verdau wurden die Filterröhrchen über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Eine Feuchtkammer wurde in Form einer 96-Well Gefrierbox realisiert, in der nicht mit Filter-

röhrchen gefüllte Wells mit Wasser aufgefüllt wurden. Nach der Inkubation über Nacht wurden die verdauten Peptide durch Zentrifugation (10 min, 14000 UpM) in das Auffanggefäß transferiert. Die so gewonnenen Peptide wurden daraufhin entweder mittels StageTip (8.2.5.3) entsalzt oder per Vakuumzentrifugation getrocknet (circa 30 min, 2000 UpM, 27°).

8.2.5.2 Dimethyl-Markierung (DMT-Labeling)

Zur markierungs-basierten quantitativen Proteomik wurde die DMT-Labeling Technik verwendet (Boersema et al., 2009; Hsu et al., 2003). Aminogruppen der Peptide aus dem tryptischen Verdau der BACE1 -/- Proteinlysate wurden dabei mit „schwerem“, das heißt deuteriertem Formaldehyd dimethyliert, während die Aminogruppen der Peptide aus dem tryptischen Verdau der Wildtyp-Proteinlysate mit „leichtem“, das heißt nicht-deuteriertem Formaldehyd dimethyliert wurden. Hierzu wurden bis zu 25 µg der eingetrockneten Peptide (es wurde eine Effizienz von 50 % für die Peptidgewinnung bei der FASP-Technik in Bezug auf die eingesetzten Proteinmenge angenommen (Wisniewski et al., 2009b) in 100 mM TEAB gelöst. Nach Zugabe von 4 µl der jeweiligen 4 %-igen Formaldehyd-Lösung (v/v) wurde die Probe kurz gevortext. Anschließend wurden 4 µl einer 0,6 M Cyanoborohydrid-Lösung zugegeben, die Probe erneut kurz gevortext und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 16 µl einer 1 %-igen Ammoniumlösung gestoppt. Um die Reaktion weiter abzustoppen, wurden 8 µl einer 5 %-igen Ameisensäurelösung hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um eine exotherme Reaktion bei der Wasserstoff und Blausäure entstehen. Deshalb wurde die Reaktion grundsätzlich unter dem Abzug durchgeführt. Nach dem die Reaktion abgeklungen war (keine weitere Bildung von Luftbläschen) wurden die „schwer“ und die „leicht“ markierten Proben vermischt und per Vakuumzentrifugation eingetrocknet (circa 30 min, 2000 UpM, 27°).

8.2.5.3 StageTip

Zur Aufreinigung von Peptiden wurden im Labor selbst hergestellte StageTips verwendet (Rappsilber et al., 2003). StageTips wurden hergestellt in dem gewöhnliche Pipettenspitzen (200 µl) mit zwei Lagen C18 Material aus C18 Disks gefüllt wurden. Die Lagen wurden mittels einer begradigten Kanülenspitze ausgestanzt und mit einer zweiten Pipettenspitze in der ersten „fingerfest“ eingedrückt. Um die Benutzung der StageTips in einer gewöhnlichen Tischzentrifuge zu ermöglichen, wurden die StageTips in ein Eppendorf-Vial gesteckt (Abbildung 40). Jeder der folgenden Schritte wurde durchgeführt, indem die entsprechende Menge an Probe beziehungsweise Puffer in die StageTip pipettiert und per Zentrifugation (1 min, 4500 UpM, Raumtemperatur) durch das C18-Material gedrückt wurde. Wenn nicht anders beschrieben wurde der Durchfluss verworfen.

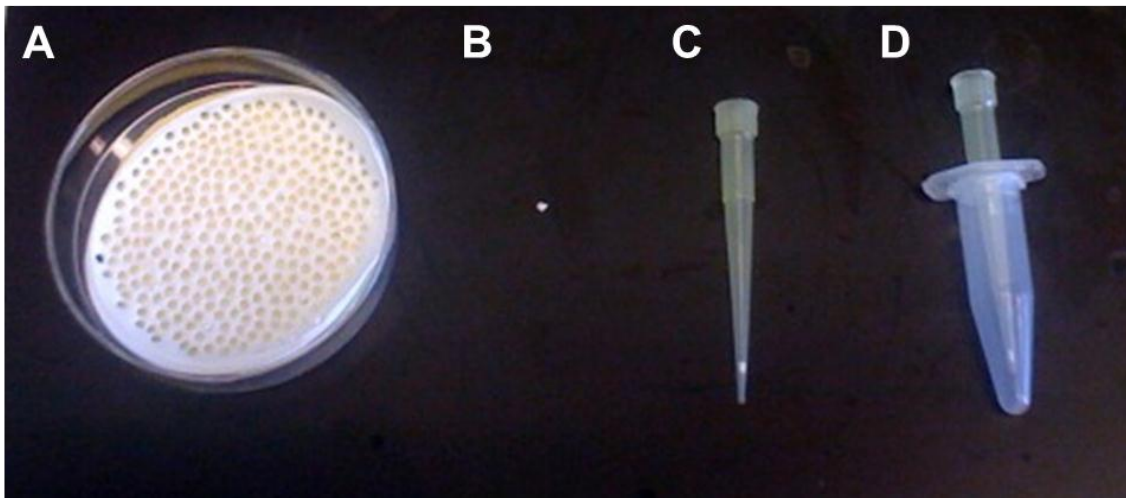


Abbildung 40: StageTips. StageTips wurden durch das Ausstanzen von Materiallagen aus zwei übereinanderliegenden C18-Disks gewonnen (A). Die ausgestanzten Materiallagen (B) wurden in eine gewöhnliche 200 μ l Pipettenspitze gefüllt und mit einer zweiten Pipettenspitze „fingerfest“ eingedrückt. Die fertige StageTip (C) wurde zur Benutzung in ein gewöhnliches Eppendorf-Gefäß gesteckt (D).

Vor dem Laden einer Probe auf eine StageTip wurde diese zunächst mit 100 μ l Methanol gewaschen und anschließend mit 100 μ l des jeweiligen Peptidlösungsmittels (in der Regel 2 % Ameisensäure, im Falle einer direkt vorausgegangen FASP auch ABC-Puffer beziehungsweise bei der SAX-Fraktionierung auch der jeweilige SAX-Puffer) equilibriert. Daraufhin wurden die gelösten Peptide auf die StageTip geladen und die StageTip anschließend mit 100 μ l ST-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Peptide in 50 μ l ST-Elutionspuffer gelöst und per Vakuumzentrifugation eingetrocknet (circa 30 min, 2000 UpM, 27°).

8.2.5.4 SAX-Fraktionierung

Eine StageTip-basierte Anionenaustausch-Fraktionierung wurde verwendet, um die Komplexität der Peptidproben zu verringern (Wisniewski et al., 2009a). Hierzu wurden selbst hergestellte SAX-Tips verwendet. SAX-Tips wurden analog zu den StageTips hergestellt, allerdings wurden drei Lagen des Anion Exchange-SR-Materials anstelle der zwei Lagen C18-Material verwendet. Vor der Verwendung wurden SAX-Tips zunächst mit 100 μ l Methanol gewaschen, mit 100 μ l einer 1 M NaOH-Lösung aktiviert und anschließend mit 100 μ l des SAX-Puffers pH 11 equilibriert (jeweils durch Zentrifugation: 2 min, 6000 UpM, Raumtemperatur). Daraufhin wurde die aktivierte SAX-Tip auf eine gewaschene und equilibrierte StageTip gesetzt (StageTip pH11) und die zu fraktionierende Probe durch Zentrifugation geladen und die nicht die SAX-Tip bindenden Peptide von der StageTip pH11 gebunden (5 min, 4500 UpM, Raumtemperatur). Nach dem Laden wurde die noch immer in die StageTip pH11 eingesetzte, SAX-Tip mit 100 μ l SAX-Puffer pH11 gewaschen und die nicht-gebundenen Peptide wiederum von

der StageTip pH11 gebunden. Hiernach wurde die SAX-Tip auf eine neue gewaschene und equilibrierte StageTip gesetzt (StageTip pH6). Daraufhin wurden weitere Peptide durch Zugabe von 100 µl SAX-Puffer pH 6 eluiert und von der StageTip pH6 gebunden. Anschließend wurde die SAX-Tip auf eine neue, gewaschene und equilibrierte, StageTip gesetzt (StageTip pH3) und weitere Peptide wurden von der SAX-Tip durch Zugabe von 100 µl SAX-Puffer pH3 gelöst. Nach der finalen Elution mit 100 µl SAX-Puffer pH3 wurde die SAX-Tip verworfen und die StageTips mit ST-Waschpuffer, wie unter 8.2.5.3 beschrieben, gewaschen. Anschließend wurden die Peptide wie unter 8.2.5.3 beschrieben eluiert und per Vakuumzentrifugation eingetrocknet (circa 30 min, 2000 UpM, 27°).

8.2.5.5 LC-MS/MS

Alle LC-MS/MS-Experimente wurden in einem Set-up bestehend aus einer Nano-Flüssigkeitschromatographie (Easy nLC II, Proxeon) und einem Orbitrap-Massenspektrometer (LTQ Velos Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Das Set-up wurde im „Einsäulenmodus“ verwendet. Zur Probenauftrennung und Probeninjektion wurden selbstgepackte, 15 cm lange Nanokapillaremittersäulen (New Objective, FS360-75-8-N-S-C15) verwendet. Die Säulen wurden mit C18-Partikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,4 µm gepackt (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, Dr. Maisch GmbH). Das Protokoll für die Peptidauftrennung bestand aus einem Säulen-Equilibrationsschritt (0,1 % Ameisensäure, für 10 min, max. 800 nl/min, max. 279 bar), dem Probenladeschritt (Probe in 0,1 % Ameisensäure, 1,5-faches Probenvolumen, max. 800 nl/min, max. 279 bar), dem bilinearen Gradienten zur Probenauftrennung und einem Säulenwaschschritt (95 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, für 2 min, 350 nl/min). Im ersten Abschnitt des bilinearen Gradienten wurde die Acetonitril Konzentration über 167 min von 7 % auf 25 % Acetonitril linear erhöht. Im zweiten Abschnitt wurde die Acetonitrilkonzentration anschließend über 33 min von 25 % auf 42 % Acetonitril linear erhöht. Die Auftrennung erfolgte konstant mit einem Fluss von 350 nl/min bei einem maximalen Druck von 290 bar. Der Druck lag in der Regel zwischen circa 150 bar und circa 250 bar. Abschließend wurde die Säule für 10 min bei 95 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure gewaschen. Ein Chromatographieschema ist in Abbildung 41 abgebildet.

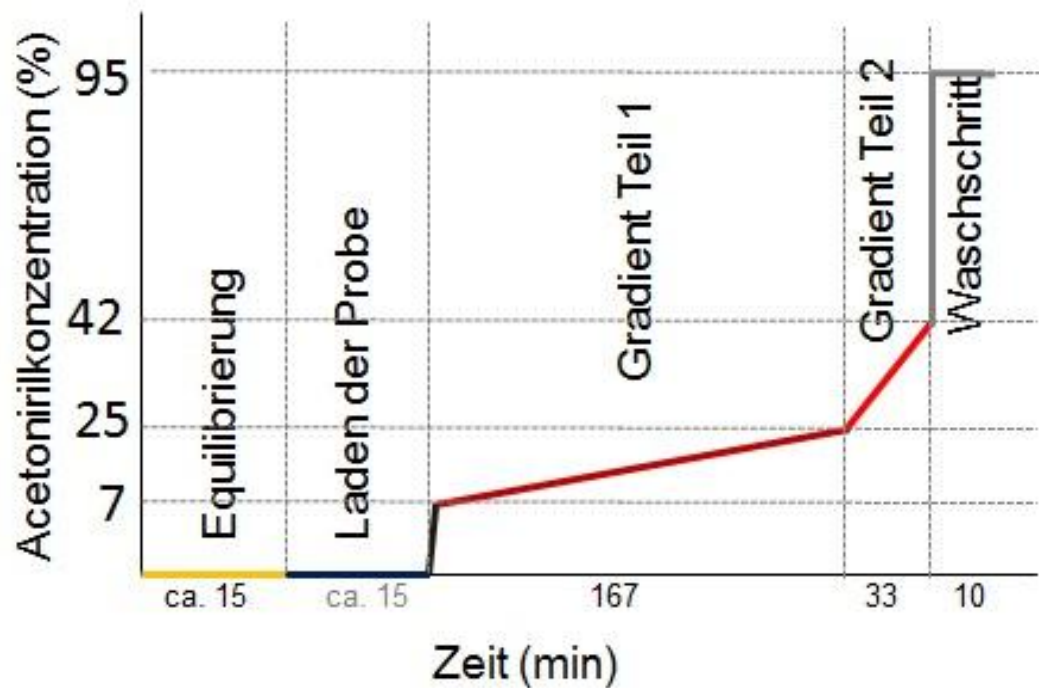


Abbildung 41: Methodendiagramm der Nanoflüssigkeitschromatographie. Die Acetonitrilkonzentration im jeweiligen Schritt der Chromatographie ist gegen die Dauer des jeweiligen Schritts aufgetragen.

Das Orbitrap Massenspektrometer wurde mit einer TOP14-Methode betrieben, das heißt auf einen vollen FTMS-Scan mit einer Auflösung von 60.000 und einem FTMS AGC-Zielwert von 1.000.000, folgten bis zu 14 MS/MS Aufnahmen der abundantesten Peptide in der linearen Ionenfalle. Die bis zu 14 abundantesten Vorläuferionen jedes vollen FTMS-Scans wurden mit einer Isolationsbreite von 2 Da isoliert und via CID-Fragmentierung (CID: collision-induced dissociation fragmentation) fragmentiert. Die Auswahl der 14 abundantesten Vorläuferionen wurde durch eine dynamische Ausschlussliste eingeschränkt, die eine Refragmentierung von Vorläuferionen verhinderte. Die Einstellungen der Ausschlussliste sahen vor, dass ein Massenfenster von -0,5 Da bis +1,5 Da um die jeweilige fragmentierte Vorläuferionenmasse herum für 50 s nicht für die Auswahl eines neuen Vorläuferions verwendet wird. MS-Spektren wurden im Profilmodus, MSMS-Spektren im Centroidmodus aufgenommen. Der AGC-Zielwert für die MSMS-Spektren betrug 10.000. Das Instrument wurde so eingestellt, dass nur solche Moleküle zur Fragmentation ausgewählt wurden, deren Ladungszustand auf Grund des Isotopenmusters bestimmt werden konnten und deren Isotopenmuster dem Isotopenmuster eines Peptids entsprach („monoisotopic precursor selection enabled“). Einfach geladene Vorläuferionen wurden grundsätzlich von der Fragmentierung ausgeschlossen. Die grundlegenden Informationen zu der massenspektrometrischen Methode sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Massenspektrometrie-Einstellungen

Methode	Datenabhängige Fragmentierung TOP14
Fragmentierungsart	CID
Fragmentierungsintensität	35 %
MS	Orbitrap
MS2	Lineare Ionenfalle
AGC-Zielwert MS	1.000.000
AGC-Zielwert MS2	10.000
Wideband-Aktivierung	zutreffend
Monoisotopische Vorläuferionenauswahl	zutreffend
Ladungsabhängiger Vorläuferionenausschluss	Ladung: +1
Mindestintensität für Fragmentierungsauswahl	1000
Dynamische Ausschlussliste	50 s, 500 Einträge möglich

8.2.5.6 Bioinformatische Auswertung Proteomik

Die Auswertung der proteomischen Daten erfolgte mit der MaxQuant Software Suite (Version 1.2.0.18) und dem integrierten Andromeda-Algorithmus für die Proteinidentifikation (Cox and Mann, 2008a; Cox et al., 2011). Die Software wurde mit den Standardeinstellungen genutzt. Eine Falsch-Identifizierungsrate (*false discovery rate*, FDR) von maximal 1 % wurde für die Identifikation auf Protein- und Peptidebene verwendet. Als fixe Modifikation wurde grundsätzlich die Carbamidomethylierung der Cysteine gewählt, als variable Modifikationen wurden die Oxidierung des Methionin und für die Experimente mit Dimethylierung die entsprechenden Methylierungen des N-Terminus und der Lysine gewählt. Eine Zweitpeptidsuche (*second peptide search*), das heißt eine Suche der erfolgreich identifizierten Spektren nach Subtraktion der auf Grund der initialen Identifikation zu erwartenden Fragmente, wurde durchgeführt. Als Datenbank für die Proteinidentifikation wurde die IPI Zebrafisch in der Version 3.86 verwendet (IPI: International Protein Index, eine Proteindatenbank die vom European Bioinformatics Institute gepflegt wird, <http://www.ebi.ac.uk/IPI>).

8.2.5.7 Statistische Auswertung Proteomik

Die relativen Proteinabundanzen für jedes Protein wurden wie folgt bestimmt: Bei der DMT-Labeling-basierten Analyse wurde zunächst für jedes Protein die relative Proteinabundanz in den einzelnen biologischen Replikaten bestimmt. Dazu wurde der Mittelwert der normalisierten H/L-Werte der zwei technischen Replikate für jedes der drei biologischen Replikate für jedes Protein gebildet. Der Median der relativen Proteinabundanzen der drei biologischen Replikate ergab dann die finale relative Proteina-

bundanz für das jeweilige Protein. Für die Angabe der Variabilität dieser Größe wurde der Standardfehler aus den relativen Proteinabundanz der drei biologischen Replikate gebildet. Ein p-Wert wurde mittels eines t-Tests für jedes intrinsische Membranprotein, wie in Abbildung 42 dargestellt, berechnet. Zur *post hoc* Abschätzung der Falsch-Positiv-Rate wurde ein Test nach Benjamini-Hochberg durchgeführt (Benjamini and Hochberg, 1995).

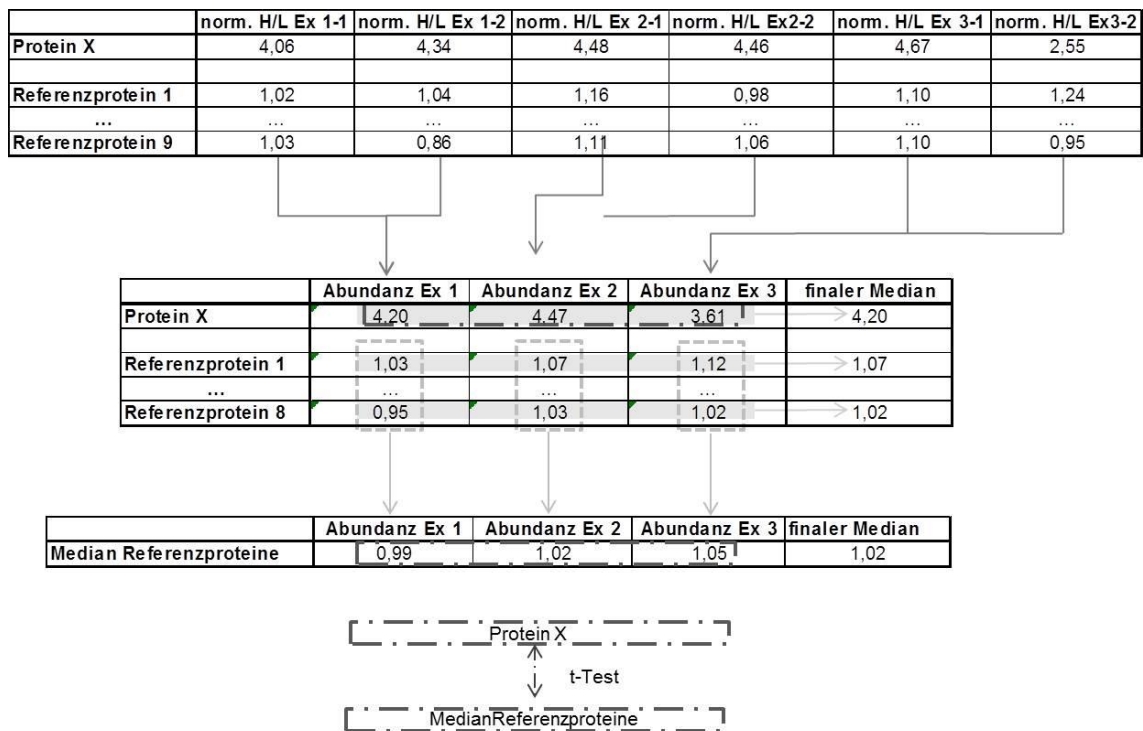


Abbildung 42: Schema der statistischen Auswertung zur Proteomik der BACE1 *-/-* Zebrafischlarven. Beispielrechnung zur Auswertung der proteomischen Daten der BACE1 *-/-* Zebrafischlarven. Drei biologische Replikate wurden betrachtet (Ex 1, Ex 2 und Ex 3). Für jedes biologische Replikat wurden zwei technische Replikate gemessen (-1,-2). Das normalisierte H/L Verhältnis (norm. H/L) für jedes technische Replikat wurde von MaxQuant berechnet. Der Mittelwert der normalisierten H/L Verhältnisse beider technischer Replikate eines biologischen Replikats ergibt die relative Abundanz des Proteins in dem jeweiligen biologischen Replikat (Abundanz Ex 1-3). Die relative Abundanz des Proteins bezieht sich auf die Abundanz des jeweiligen Proteins in BACE1 *-/-* Larven im Verhältnis zu Wildtyp-Larven. Der Median der relativen Abundanz von 8 Referenzproteinen (PPIA-1, Gapdh, Pgc1, Rplp0, Hp1t1, Ywhaz, Rpl13a, Sdha) wurde für jedes biologische Replikat berechnet. In einem t-Test wurde dann untersucht, ob der Median dieser drei relativen Abundanz (Median Referenzproteine) signifikant verschieden von dem Median der relativen Abundanz des Protein X ist.

Bei der markierungsfreien quantitativen Analyse der Zebrafischgehirne wurde die Quantifizierung auf der Grundlage der LFQ-Werte aus den einzelnen Proben durchgeführt. Hierzu wurden zunächst für jedes Protein die LFQ-Werte der einzelnen Proben durch den Mittelwert aller LFQ-Werte der Wildtyp-Larven geteilt. Dabei wurden relative LFQ-Werte für jedes Protein für jede Probe erhalten. Als nächstes wurde der Median der relativen LFQ-Werte der Wildtypgehirne und der BACE1 *-/-* Gehirne gebildet. Der Standardfehler wurde für beide Mediane berechnet. Zur Bestimmung der relativen Pro-

teinabundanz wurde dann das Verhältnis des Medians der relativen LFQ-Werte der BACE1 -/- Gehirne zum Median der relativen LFQ-Werte der Wildtypgehirne gebildet. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. Zur *post hoc* Abschätzung der Falsch-Positiv-Rate wurde ein Test nach Benjamini-Hochberg durchgeführt (Benjamini and Hochberg, 1995).

8.2.6 Allgemeine Bioinformatik

Als Datenbank wurde, falls nicht anders angegeben, die Proteindatenbank des Uniprot-Konsortiums (kurz für „Universal „Protein Resource“, aus dem Englischen etwa „universelle Proteindatenbank“) verwendet. Diese ist über die Webseite www.uniprot.org öffentlich zugänglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Alignments wurden mit dem „Align-Tool“ des UniProt-Konsortiums durchgeführt. Dieses verwendet eine Implementation des Clustal Omega Algorithmus, um global optimale multiple Sequenzalignments zu berechnen (Sievers et al., 2011). Im Sonderfall eines paarweisen Alignments, wie hier in der Regel durchgeführt, stellt der Clustal Omega eine klassische Implementation des Needleman-Wunsch Algorithmus dar (Needleman and Wunsch, 1970). Für Transmembranproteine, für die die Anzahl an Transmembrandomänen nicht annotiert war, wurde eine Vorhersage der Anzahl an Transmembrandomänen mittels eines Hidden Markov-Models nach dem Algorithmus von Kall et al. durchgeführt (Byströff and Krogh, 2008; Kall et al., 2004). Eine Implementation des Algorithmus ist unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> verfügbar.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Akkumulierende intrinsische Membranproteine in den BACE1 -/- Gehirnen	63
Tabelle 2: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE	108
Tabelle 3: Zusammenfassung der Massenspektrometrie-Einstellungen	116
Tabelle 4: Übersicht über die Peptidmassen der Flag-positiven Peptide, die sich aus einem <i>in silico</i> Verdau von APLP2-TEV-FLAG ergeben können	122
Tabelle 5: Übersicht über die Peptidmassen der HA-positiven Peptide, die sich aus einem <i>in silico</i> Verdau von HA- α APLP2CTF-FLAG ergeben können	123
Tabelle 6: Übersicht über die Peptidmassen der HA-positiven Peptide, die sich aus einem <i>in silico</i> Verdau von HA-sAPLP2CTF-FLAG ergeben können	124

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Amyloid-Kaskaden-Hypothese	10
Abbildung 2: Proteolytische Prozessierung des APP	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der APP Familie.....	14
Abbildung 4: Bestimmung der Ladungszahl aus dem Isotopenmuster.....	16
Abbildung 5: Aufbau eines Massenspektrometers	18
Abbildung 6: Elektronenspray-Ionisation.....	19
Abbildung 7: Schematische Skizze der verwendeten Massenspektrometer.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Orbitrap-Ionenfalle	24
Abbildung 9: Anzahl an Publikationen in der Proteomik seit 1997	25
Abbildung 10: Experimenteller Ablauf der bottom-up Proteomik.....	26
Abbildung 11: Analyse des Laufverhaltens von APLP2 und der Spezifität des APLP2- Antikörpers 2DII	33
Abbildung 12: Deglykosylierungsstudien für APLP2.....	34
Abbildung 13: Untersuchung der Ektodomänenspaltung von APLP2 mittels pharmakologischer Inhibitoren.	35
Abbildung 14: Bestimmung der Relevanz von ADAM10 und ADAM17 für die Ektodomänenspaltung von APLP2 in HEK293 und SH-SY5Y-Zellen.....	36
Abbildung 15: Analyse der Ektodomänenspaltung von APLP2 in SH-SY5Y-Zellen mit einem stabilen shRNA-vermittelten Knock-down von ADAM10	37
Abbildung 16: Analyse der APLP2-C-terminalen Fragmente	38
Abbildung 17: Analyse der Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen mittels pharmakologischer Inhibitoren.....	39
Abbildung 18: Analyse der ADAM10-abhängigen Ektodomänenspaltung von APLP2 in primären Neuronen	40
Abbildung 19: Schema des Verfahrens zur Bestimmung der Ektodomänenspaltungs- Schnittstellen von APLP2	41
Abbildung 20: Analyse der proteolytischen Prozessierung von APLP2-TEV-FLAG in HEK293- Zellen.....	42
Abbildung 21: Massenspektrometrische Bestimmung der APLP2-Ektodomänen- Schnittstellen.....	43
Abbildung 22: Detaillierte Ansicht der MALDI-TOF Spektren zur Bestimmung der APLP2 Ektodomänen-Schnittstellen	44
Abbildung 23: α APLP2 wird nach der Generierung durch ADAM10 C-terminal trunziert	46

Abbildung 24: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2	47
Abbildung 25: Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen auf Grundlage eines α APLP2CTF-Konstrukts	48
Abbildung 26: Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 mit einem verkürzten HA-sAPLP2CTF-FLAG-Konstrukt	49
Abbildung 27: Analyse der γ -Sekretase-Schnittstellen von APLP2 bei einer aggressiven Presenilin 1-Mutation.....	51
Abbildung 28: Experimenteller Ansatz zur <i>in vivo</i> Identifikation von BACE1-Substraten im Gesamtlarvenlysat.....	53
Abbildung 29: Quantitative proteomische Analyse der BACE1 -/- Larven.....	55
Abbildung 30: Schema der proteolytischen Prozessierung von EpCAM	56
Abbildung 31: EpCAM ist ein BACE1-Substrat	57
Abbildung 32: Schematischer Versuchsaufbau zur quantitativen proteomischen Analyse von BACE1 -/- Zebrafischgehirnen.....	59
Abbildung 33: Proteinidentifikationen in den Zebrafischgehirnen	60
Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse der quantitativen proteomischen Analyse der BACE1 -/- Gehirne im Vulkanplot.....	62
Abbildung 35: Alignment der annotierten fünf Isoformen von APLP2.....	66
Abbildung 36: „Ein-Schnitt“ vs. „Doppel-Schnitt“ Szenario für die Ektodomänenspaltung von APLP2 C- und N-terminal von Arginin 670	73
Abbildung 37: Übersicht zu den APLP2-Ektodomänenschnittstellen	76
Abbildung 38: Lage der γ -Sekretase-Schnittstellen in APP und APLP2.....	77
Abbildung 39: Alignment von humanem und Zebrafisch-EpCAM	83
Abbildung 40: StageTips	113
Abbildung 41: Methodendiagramm der Nanoflüssigkeitschromatographie.....	115
Abbildung 42: Schema der statistischen Auswertung zur Proteomik der BACE1 -/- Zebrafischlarven.....	117

11 Anhang

11.1 Peptidmassenübersichten

Die Schnittstellenbestimmung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ist ein relativ manueller Prozess. Nach dem die Spektren aufgenommen werden, müssen die Massen der den Peaks zugrunde liegenden Peptide mit den Massen der theoretisch möglichen Peptide verglichen werden. Um eine Liste der auf Grundlage des verwendeten Konstrukts theoretisch möglichen Peptide zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein kleines Programm programmiert, das als Anwendung auf Windows-Desktop Computern ausführbar ist. Das Programm errechnet auf der Basis einer Input-Peptidsequenz im Einbuchstaben-Code die Massen aller wahlweise durch C- oder N-terminale Verkürzung aus dieser Inputsequenz entstehenden Peptide. Das Programm ist sowohl in der Lage die monoisotopische Masse, wie auch die durchschnittlich zu erwartende Masse, für die jeweiligen Peptide zu berechnen. Eine weitere Option erlaubt die Berechnung der jeweiligen Massen unter Berücksichtigung einer Inkorporation von „schwerem“ Lysin ($^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$) und „schwerem“ Arginin ($^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$) wie dies zum Beispiel für die SILAC-Markierung verwendet wird (Ong et al., 2002).

11.1.1 Peptidmassentabelle für APLP2-TEV-FLAG

Tabelle 4: Übersicht über die Peptidmassen der Flag-positiven Peptide, die sich aus einem *in silico* Verdau von APLP2-TEV-FLAG ergeben. Massen sind für die einfach protonierten Peptide $[\text{M}+\text{H}^+]$ angegeben

Peptide	Masse (Da)
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLEEEERESV	4258,0
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLEEEERES	4158,9
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLEEEERE	4071,9
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLEEEER	3942,8
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLEEEE	3786,7
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLEE	3657,7
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGGLE	3528,7
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGG	3399,6
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVGG	3286,5
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERVG	3229,5
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAERV	3172,5
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAER	3073,4
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNAE	2917,3
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFNA	2788,3
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIFN	2717,2
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMIF	2603,2

Peptide	Masse (Da)
GDYKDDDDKVIDETLDVKEMI	2456,1
GDYKDDDDKVIDETLDVKEM	2343,0
GDYKDDDDKVIDETLDVKE	2212,0
GDYKDDDDKVIDETLDVK	2083,0
GDYKDDDDKVIDETLDV	1954,9
GDYKDDDDKVIDETLD	1855,8
GDYKDDDDKVIDETL	1740,8
GDYKDDDDKVIDET	1627,7
GDYKDDDDKVIDE	1526,6
GDYKDDDDKVID	1397,6
GDYKDDDDKVI	1282,6
GDYKDDDDKV	1169,5
GDYKDDDDK	1070,4

11.1.2 Peptidmassentabelle für HA- α APLP2CTF-FLAG

Tabelle 5: Übersicht über die Peptidmassen der HA-positiven Peptide, die sich aus einem *in silico* Verdau von HA- α APLP2CTF-FLAG ergeben können. Massen sind für die einfach protonierten Peptide $[M+H^+]$ angegeben

Peptide	Masse (Da)
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIAVA	5390,7
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIAV	5319,7
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIA	5220,6
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLLVI	5149,5
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLLV	5036,5
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLL	4937,4
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGL	4824,3
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIG	4711,2
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSALI	4654,2
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSAL	4541,1
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSSA	4428,0
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSSS	4357,0
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLSS	4270,0
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSLS	4182,9
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFSL	4095,9
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDFS	3982,8
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLREDF	3895,8
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLRED	3748,7
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLRE	3633,7
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPLR	3504,7
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGPL	3348,6
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVGP	3235,5

Peptide	Masse (Da)
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESVG	3138,4
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERESV	3081,4
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERES	2982,3
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEERE	2895,3
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEEER	2766,2
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEEE	2610,1
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLEE	2481,1
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFLE	2352,1
YPYDVPDYASGGGGGLEVFFL	2223,0
YPYDVPDYASGGGGGLEVFF	2109,9
YPYDVPDYASGGGGGLEVF	1962,9
YPYDVPDYASGGGGGLEV	1815,8
YPYDVPDYASGGGGGLE	1716,7
YPYDVPDYASGGGGGL	1587,7
YPYDVPDYASGGGGG	1474,6
YPYDVPDYASGGGG	1417,6
YPYDVPDYASGGG	1360,6
YPYDVPDYASGG	1303,5
YPYDVPDYASG	1246,5

11.1.3 Peptidmassentabelle für HA-sAPLP2CTF-FLAG

Tabelle 6: Übersicht über die Peptidmassen der HA-positiven Peptide, die sich aus einem *in silico* Verdau von HA-sAPLP2CTF-FLAG ergeben können. Massen sind für die einfach protonierten Peptide $[M+H^+]$ angegeben

Peptide	Masse (Da)
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGLLVIIVA	3969,0
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGLLVIIV	3898,0
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGLLVIA	3798,9
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGLLVI	3727,9
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGLLV	3614,8
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGLL	3515,7
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIGL	3402,6
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALIG	3289,5
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSALI	3232,5
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSAL	3119,4
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSSA	3006,4
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSSS	2935,3
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLSS	2848,3
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSLS	2761,3
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFSL	2674,2
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDFS	2561,1

Peptide	Masse (Da)
YPYDVPDYASGGGGGLEPLREDF	2474,1
YPYDVPDYASGGGGGLEPLRED	2327,0
YPYDVPDYASGGGGGLEPLRE	2212,0
YPYDVPDYASGGGGGLEPLR	2083,0
YPYDVPDYASGGGGGLEPL	1926,9
YPYDVPDYASGGGGGLEP	1813,8
YPYDVPDYASGGGGGLE	1716,7
YPYDVPDYASGGGGGL	1587,7
YPYDVPDYASGGGGG	1474,6
YPYDVPDYASGGGG	1417,6
YPYDVPDYASGGG	1360,6
YPYDVPDYASGG	1303,5
YPYDVPDYASG	1246,5

12 Literaturverzeichnis

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zschr Psychiat* 64, 146-148.

Alzheimer's-Association (2010). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 6, 158–194.

Bakkers, J. (2011). Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 91, 279-288.

Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., and Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med-Jmm* 77, 699-712.

Bandmann, O., and Burton, E.A. (2010). Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of disease* 40, 58-65.

Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M., and Kuster, B. (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and bioAnalytical Chemistry*. in press

Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., and Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 1613-1620.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met* 57, 289-300.

Bergmans, B.A., Shariati, S.A., Habets, R.L., Verstreken, P., Schoonjans, L., Muller, U., Dotti, C.G., and De Strooper, B. (2010). Neurons generated from APP/APLP1/APLP2 triple knockout embryonic Stem Cells behave normally in vitro and in vivo: lack of evidence for a cell autonomous role of the amyloid precursor protein in neuronal differentiation. *Stem Cells* 28, 399-406.

Blennow, K., Zetterberg, H., Rinne, J.O., Salloway, S., Wei, J., Black, R., Grundman, M., Liu, E., and for the, A.A.B.I. (2012). Effect of Immunotherapy With Bapineuzumab on Cerebrospinal Fluid Biomarker Levels in Patients With Mild to Moderate Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*.

Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A.J. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature Protocols* 4, 484-494.

Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., and Arrighi, H.M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 3, 186-191.

Bystroff, C., and Krogh, A. (2008). Hidden Markov Models for prediction of protein features. *Methods in Molecular Biology* 413, 173-198.

Caescu, C.I., Jeschke, G.R., and Turk, B.E. (2009). Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *The Biochemical Journal* 424, 79-88.

Cao, L., Rickenbacher, G.T., Rodriguez, S., Moulija, T.W., and Albers, M.W. (2012). The precision of axon targeting of mouse olfactory sensory neurons requires the BACE1 protease. *Scientific Reports* 2, 231.

- Cao, X., and Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Chaib, F., Saxena, S., and Smith, S. (2012). Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored. WHO Media Release *April 12*, 1-3.
- Cottrell, J.S., and Greathead, R.J. (1986). Extending the Mass Range of a Sector Mass-Spectrometer. *Mass Spectrom Rev* 5, 215-247.
- Cox, J., and Mann, M. (2008a). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372.
- Cox, J., and Mann, M. (2008b). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* 26, 1367-1372.
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., and Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of Proteome Research* 10, 1794-1805.
- Damon, P.E., Donahue, D.J., Gore, B.H., Hatheway, A.L., Jull, A.J.T., Linick, T.W., Sercel, P.J., Toolin, L.J., Bronk, C.R., Hall, E.T., *et al.* (1989). Radiocarbon Dating of the Shroud of Turin. *Nature* 337, 611-615.
- De Souza, A.G., MacCormack, T.J., Wang, N., Li, L., and Goss, G.G. (2009). Large-scale proteome profile of the zebrafish (*Danio rerio*) gill for physiological and biomarker discovery studies. *Zebrafish* 6, 229-238.
- De Strooper, B., Vassar, R., and Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 6, 99-107.
- Delabar, J.M., Goldgaber, D., Lamour, Y., Nicole, A., Huret, J.L., de Grouchy, J., Brown, P., Gajdusek, D.C., and Sinet, P.M. (1987). Beta amyloid gene duplication in Alzheimer's disease and karyotypically normal Down syndrome. *Science* 235, 1390-1392.
- Dislich, B., and Lichtenthaler, S.F. (2012). The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Frontiers in Physiology* 3, 8.
- Eckers, C., Skrabalak, D.S., and Henion, J. (1982). On-line direct liquid introduction interface for micro-liquid chromatography/mass spectrometry: application to drug analysis. *Clinical Chemistry* 28, 1882-1886.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nature cell biology* 5, 486-488.
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C.L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 18146-18156.
- Eimon, P.M., and Ashkenazi, A. (2010). The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis* 15, 331-349.
- Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., and Fahrenholz, F. (2005). Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *The FEBS Journal* 272, 5808-5820.

- Eng, J.K., McCormack, A.L., and Yates, J.R. (1994). An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5, 976-989.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Evans, C., Noirel, J., Ow, S.Y., Salim, M., Pereira-Medrano, A.G., Couto, N., Pandhal, J., Smith, D., Pham, T.K., Karunakaran, E., *et al.* (2012). An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Analytical and bioAnalytical Chemistry*.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Ferrer, C., Gomez, M.J., Garcia-Reyes, J.F., Ferrer, I., Thurman, E.M., and Fernandez-Alba, A.R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1069, 183-194.
- Filmus, J., Capurro, M., and Rast, J. (2008). Glypicans. *Genome Biology* 9, 224.
- Finger, E.C. (2011). New potential therapeutic approaches in frontotemporal dementia: oxytocin, vasopressin, and social cognition. *Journal of Molecular Neuroscience* 45, 696-701.
- Forne, I., Abian, J., and Cerda, J. (2010). Fish proteome analysis: model organisms and non-sequenced species. *Proteomics* 10, 858-872.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Developmental Cell* 3, 85-97.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochimica et biophysica acta* 1502, 122-132.
- Fukumori, A., Fluhrer, R., Steiner, H., and Haass, C. (2010). Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *The Journal of neuroscience* 30, 7853-7862.
- Gires, O. (2009). [EpCAM a proteolytically cleaved oncogene and an excellent therapeutic target in cancer]. *Medecine sciences : M/S* 25, 449-450.
- Glennner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V., and Eanes, E.D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Applied Pathology* 2, 357-369.
- Glish, G.L., and Goeringer, D.E. (1984). Tandem Quadrupole-Time-of-Flight Instrument for Mass-Spectrometry Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 56, 2291-2295.
- Glish, G.L., and Vachet, R.W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2, 140-150.
- Goate, A., and Hardy, J. (2012). Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. *Journal of Neurochemistry* 120 Suppl 1, 3-8.
- Golde, T.E., Schneider, L.S., and Koo, E.H. (2011). Anti-A beta Therapeutics in Alzheimer's Disease: The Need for a Paradigm Shift. *Neuron* 69, 203-213.

- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4913-4917.
- Grziwa, B., Grimm, M.O., Masters, C.L., Beyreuther, K., Hartmann, T., and Lichtenthaler, S.F. (2003). The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 6803-6808.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 35235-35238.
- Gundel, U., Kalkhof, S., Zitzkat, D., von Bergen, M., Altenburger, R., and Kuster, E. (2012). Concentration-response concept in ecotoxicoproteomics: effects of different phenanthrene concentrations to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo proteome. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76, 11-22.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 3021-3024.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006270.
- Han, X.M., Aslanian, A., and Yates, J.R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 483-490.
- Hardman, M., and Makarov, A.A. (2003). Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Analytical Chemistry* 75, 1699-1705.
- Hardy, J. (2006). Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Current Alzheimer Research* 3, 71-73.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., *et al.* (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *The Journal of Neuroscience* 20, 7951-7963.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2009). Identification of beta-secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PloS one* 4, e8477.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO Journal* 23, 4106-4115.
- Hitt, B.D., Jaramillo, T.C., Chetkovich, D.M., and Vassar, R. (2010). BACE1^{-/-} mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Molecular Neurodegeneration* 5, 31.

- Hoffman, J.H., Chaney, R.C., and Hammack, H. (2008). Phoenix Mars Mission--the thermal evolved gas analyzer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 1377-1383.
- Hsu, J.L., Huang, S.Y., Chow, N.H., and Chen, S.H. (2003). Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Analytical Chemistry* 75, 6843-6852.
- Hu, X.Y., Hicks, C.W., He, W.X., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., and Yan, R.Q. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-1525.
- Hu, Y., and Mechref, Y. (2012). Comparing MALDI-MS, RP-LC-MALDI-MS and RP-LC-ESI-MS glycomic profiles of permethylated N-glycans derived from model glycoproteins and human blood serum. *Electrophoresis* 33, 1768-1777.
- Huang, Y., and Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 148, 1204-1222.
- Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., and Hauer, C.R. (1986). Protein Sequencing by Tandem Mass-Spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 6233-6237.
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M.Y., and Doms, R.W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme - The Alzheimer's disease beta-secretase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33729-33737.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., *et al.* (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and Cellular Neurosciences* 14, 419-427.
- Jacobsen, K.T., and Iverfeldt, K. (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS 66, 2299-2318.
- Ji, W., and Ha, I. (2010). Drug development for Alzheimer's disease: recent progress. *Experimental Neurobiology* 19, 120-131.
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., *et al.* (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, *in press*.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., *et al.* (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *The Journal of Neuroscience* 30, 4833-4844.
- Kabashi, E., Brustein, E., Champagne, N., and Drapeau, P. (2011). Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Bba-Mol Basis Dis* 1812, 335-345.
- Kaiser, N.K., Quinn, J.P., Blakney, G.T., Hendrickson, C.L., and Marshall, A.G. (2011). A novel 9.4 tesla FTICR mass spectrometer with improved sensitivity, mass resolution, and mass range. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22, 1343-1351.
- Kall, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology* 338, 1027-1036.

- Kandalepas, P.C., and Vassar, R. (2012). Identification and biology of β -secretase. *Journal of Neurochemistry* 120, 55-61.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987). Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. *Int J Mass Spectrom* 78, 53-68.
- Karas, M., Gluckmann, M., and Schafer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* 35, 1-12.
- Kihara, T., Shimmyo, Y., Akaike, A., Niidome, T., and Sugimoto, H. (2010). Abeta-induced BACE-1 cleaves N-terminal sequence of mPGES-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 728-733.
- Kitazume, S., Nakagawa, K., Oka, R., Tachida, Y., Ogawa, K., Luo, Y., Citron, M., Shitara, H., Taya, C., Yonekawa, H., *et al.* (2005). In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 8589-8595.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13554-13559.
- Kobayashi, D., Zeller, M., Cole, T., Buttini, M., McConlogue, L., Sinha, S., Freedman, S., Morris, R.G.M., and Chen, K.S. (2008). BACE1 gene deletion: Impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 29, 861-873.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *The Biochemical Journal* 343 Pt 2, 371-375.
- Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievessen, I., Lubber, C.A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fassler, R., and Mann, M. (2008). SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 134, 353-364.
- Kuhn, P.H., Koroniak, K., Hognl, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., *et al.* (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *The EMBO Journal* 31, 3157-3168.
- Kuhn, P.H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S.F. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 11982-11995.
- Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal* 29, 3020-3032.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of

Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3922-3927.

Lemeer, S., Jopling, C., Gouw, J., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Slijper, M., and den Hertog, J. (2008). Comparative Phosphoproteomics of Zebrafish Fyn/Yes Morpholino Knockdown Embryos. *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 2176-2187.

Li, H., Wang, B., Wang, Z., Guo, Q., Tabuchi, K., Hammer, R.E., Sudhof, T.C., and Zheng, H. (2010). Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17362-17367.

Li, Q., and Sudhof, T.C. (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 10542-10550.

Liao, H.K., Wang, Y., Watt, K.E.N., Wen, Q., Breitbach, J., Kemmet, C.K., Clark, K.J., Ekker, S.C., Essner, J.J., and McGrail, M. (2012). Tol2 gene trap integrations in the zebrafish amyloid precursor protein genes *appa* and *aplp2* reveal accumulation of secreted APP at the embryonic veins. *Dev Dynam* 241, 415-425.

Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 48713-48719.

Lichtenthaler, S.F., Haass, C., and Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis-lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of Neurochemistry* 117, 779-796.

Lichtenthaler, S.F. (2011). Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *Journal of Neurochemistry* 116, 10-21.

Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A.M., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1994). Ep-Cam - a Human Epithelial Antigen Is a Homophilic Cell-Cell Adhesion Molecule. *Journal of Cell Biology* 125, 437-446.

Liuni, P., and Wilson, D.J. (2011). Understanding and optimizing electrospray ionization techniques for proteomic analysis. *Expert Rev Proteomic* 8, 197-209.

Lossner, C., Wee, S., Ler, S.G., Li, R.H., Carney, T., Blackstock, W., and Gunaratne, J. (2012). Expanding the zebrafish embryo proteome using multiple fractionation approaches and tandem mass spectrometry. *Proteomics* 12, 1879-1882.

Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., *et al.* (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* 32, 279-289.

Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J.H., Gong, Y.H., *et al.* (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4, 231-232.

Lyckman, A.W., Confaloni, A.M., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., and Moya, K.L. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 11100-11106.

Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., *et al.* (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology* 11, 162-171.

- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* 72, 1156-1162.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., and Plummer, T.H. (1989). Characterization of Glycoproteins and Their Associated Oligosaccharides through the Use of Endoglycosidases. *Anal Biochem* 180, 195-204.
- Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology* 8, 425-427.
- Mann, M. (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Bio* 7, 952-958.
- Marshall, A.G., Hall, L.D., Hatton, M., and Sallos, J. (1974). Multinuclear Continuous-Wave or Fourier-Transform Nuclear Magnetic-Resonance. *J Magn Reson* 13, 392-394.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4245-4249.
- Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D., and Wolfe, S.A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 26, 695-701.
- Michalski, A., Damoc, E., Lange, O., Denisov, E., Nolting, D., Muller, M., Viner, R., Schwartz, J., Remes, P., Belford, M., *et al.* (2012). Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11, O111 013698.
- Millan Sanchez, M., Heyn, S.N., Das, D., Moghadam, S., Martin, K.J., and Salehi, A. (2012). Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: exploring the role of APP. *Biological Psychiatry* 71, 403-409.
- Minden, J.S. (2012). DIGE: past and future. *Methods in Molecular Biology* 854, 3-8.
- Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., *et al.* (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8025-8030.
- Morris, H.R., Khan, M.N., Janssen, J.C., Brown, J.M., Perez-Tur, J., Baker, M., Ozansoy, M., Hardy, J., Hutton, M., Wood, N.W., *et al.* (2001). The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Archives of neurology* 58, 1813-1816.
- Muller, U., Cristina, N., Li, Z.W., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* 79, 755-765.
- Multhaup, G. (1994). Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* 76, 304-311.
- Munz, M., Baeuerle, P.A., and Gires, O. (2009). The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer research* 69, 5627-5629.
- Musa, A., Lehrach, H., and Russo, V.A. (2001). Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Development Genes and Evolution* 211, 563-567.

- Needleman, S.B., and Wunsch, C.D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48, 443-453.
- Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S.C., and Haynes, P.A. (2011). Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11, 535-553.
- Okello, A., Koivunen, J., Edison, P., Archer, H.A., Turkheimer, F.E., Nagren, K., Bullock, R., Walker, Z., Kennedy, A., Fox, N.C., *et al.* (2009). Conversion of amyloid positive and negative MCI to AD over 3 years: an 11C-PIB PET study. *Neurology* 73, 754-760.
- Olsen, J.V., Schwartz, J.C., Griep-Raming, J., Nielsen, M.L., Damoc, E., Denisov, E., Lange, O., Remes, P., Taylor, D., Splendore, M., *et al.* (2009). A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed. *Molecular & Cellular Proteomics* 8, 2759-2769.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1, 376-386.
- Page, R.M., Baumann, K., Tomioka, M., Perez-Revuelta, B.I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., *et al.* (2008). Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 677-683.
- Paquet, D., Bhat, R., Sydow, A., Mandelkow, E.M., Berg, S., Hellberg, S., Falting, J., Distel, M., Koster, R.W., Schmid, B., *et al.* (2009). A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 1382-1395.
- Pastorino, L., Ikin, A.F., Lamprinou, S., Vacaresse, N., Revelli, J.P., Platt, K., Paganetti, P., Mathews, P.M., Harroch, S., and Buxbaum, J.D. (2004). BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Molecular and Cellular Neurosciences* 25, 642-649.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Ponnudurai, R.P., Basak, T., Ahmad, S., Bhardwaj, G., Chauhan, R.K., Singh, R.A., Lalwani, M.K., Sivasubbu, S., and Sengupta, S. (2012). Proteomic analysis of zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to cyclosporine A. *J Proteomics* 75, 1004-1017.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., *et al.* (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation* 113, 1456-1464.
- Prvulovic, D., and Hampel, H. (2011). Amyloid beta (Abeta) and phospho-tau (p-tau) as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease. *Clinical Chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 49, 367-374.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry* 75, 663-670.
- Rinne, J.O., Brooks, D.J., Rossor, M.N., Fox, N.C., Bullock, R., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Blennow, K., Barakos, J., Okello, A.A., *et al.* (2010). 11C-PiB PET assessment of

change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurology* 9, 363-372.

Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., *et al.* (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10, 1317-1324.

Sabareesh, V., and Balam, P. (2006). Tandem electrospray mass spectrometric studies of proton and sodium ion adducts of neutral peptides with modified N- and C-termini: synthetic model peptides and microheterogeneous peptaibol antibiotics. *Rapid communications in mass spectrometry* 20, 618-628.

Sala Frigerio, C., Fadeeva, J.V., Minogue, A.M., Citron, M., Van Leuven, F., Staufenbiel, M., Paganetti, P., Selkoe, D.J., and Walsh, D.M. (2010). beta-Secretase cleavage is not required for generation of the intracellular C-terminal domain of the amyloid precursor family of proteins. *The FEBS Journal* 277, 1503-1518.

Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO reports* 2, 835-841.

Schobel, S., Neumann, S., Seed, B., and Lichtenthaler, S.F. (2006). Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 24, 141-148.

Schwarz, Q., Waimey, K.E., Golding, M., Takamatsu, H., Kumanogoh, A., Fujisawa, H., Cheng, H.J., and Ruhrberg, C. (2008). Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development. *Developmental Biology* 324, 1-9.

Seeley, E.H., and Caprioli, R.M. (2011). MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends in biotechnology* 29, 136-143.

Selkoe, D., and Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual review of neuroscience* 26, 565-597.

Selkoe, D.J. (2011). Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nature Medicine* 17, 1060-1065.

Selkoe, D.J., Abraham, C.R., Podlisny, M.B., and Duffy, L.K. (1986). Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 46, 1820-1834.

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, 260-263.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.

Simons, M., de Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P.J., Dotti, C.G., and Beyreuther, K. (1996). Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 16, 899-908.

- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., *et al.* (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., and Price, D.L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.
- Slack, B.E., Ma, L.K., and Seah, C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *The Biochemical Journal* 357, 787-794.
- Slanchev, K., Carney, T.J., Stemmler, M.P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., and Hammerschmidt, M. (2009). The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS Genetics* 5, e1000563.
- Slunt, H.H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A.C., Tanzi, R.E., and Sisodia, S.S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *The Journal of Biological Chemistry* 269, 2637-2644.
- Snowdon, D.A. (1997). Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study. *The Gerontologist* 37, 150-156.
- Soderblom, E.J., Philipp, M., Thompson, J.W., Caron, M.G., and Moseley, M.A. (2011). Quantitative label-free phosphoproteomics strategy for multifaceted experimental designs. *Analytical Chemistry* 83, 3758-3764.
- St George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., Myers, R.H., Feldman, R.G., Pollen, D., Drachman, D., *et al.* (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235, 885-890.
- Stafford, G.C., Kelley, P.E., Syka, J.E.P., Reynolds, W.E., and Todd, J.F.J. (1984). Recent Improvements in and Analytical Applications of Advanced Ion Trap Technology. *Int J Mass Spectrom* 60, 85-98.
- Steiner, D.F. (1998). The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 31-39.
- Steiner, H. (2008). The catalytic core of gamma-secretase: presenilin revisited. *Current Alzheimer Research* 5, 147-157.
- Strassnig, M., and Ganguli, M. (2005). About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry* 2, 30-33.
- Szajli, E., Feher, T., and Medzihradzsky, K.F. (2008). Investigating the Quantitative Nature of MALDI-TOF MS. *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 2410-2418.
- Tabira, T. (2010). Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies. *The Tohoku journal of experimental medicine* 220, 95-106.
- Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., and Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Terry, R.D., Gonatas, N.K., and Weiss, M. (1964). Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *The American Journal of Pathology* 44, 269-297.
- Thelen, J.J., and Miernyk, J.A. (2012). The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. *Biochemical Journal* 444, 169-181.

- Thinakaran, G., and Sisodia, S.S. (1994). Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) is modified by the addition of chondroitin sulfate glycosaminoglycan at a single site. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 22099-22104.
- Tholey, A., and Heinzele, E. (2006). Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives. *Analytical and bioAnalytical Chemistry* 386, 24-37.
- Trimble, R.B., and Tarentino, A.L. (1991). Identification of Distinct Endoglycosidase (Endo) Activities in *Flavobacterium-Meningosepticum* - Endo-F1, Endo-F2, and Endo-F3 - Endo-F1 and Endo-H Hydrolyze Only High Mannose and Hybrid Glycans. *Journal of Biological Chemistry* 266, 1646-1651.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., de Leij, L.M., and Harmsen, M.C. (2007a). Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *The American Journal of Pathology* 171, 386-395.
- Trzpis, M., Popa, E.R., McLaughlin, P.M., van Goor, H., Timmer, A., Bosman, G.W., de Leij, L.M., and Harmsen, M.C. (2007b). Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/EGP-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Experimental nephrology* 107, e119-131.
- Ullrich, S., Munch, A., Neumann, S., Kremmer, E., Tatzelt, J., and Lichtenthaler, S.F. (2010). The novel membrane protein TMEM59 modulates complex glycosylation, cell surface expression, and secretion of the amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 20664-20674.
- Urban, S., and Dickey, S.W. (2011). The rhomboid protease family: a decade of progress on function and mechanism. *Genome biology* 12.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Velanac, V., Unterbarnscheidt, T., Hinrichs, W., Gummert, M.N., Fischer, T.M., Rossner, M.J., Trimarco, A., Brivio, V., Taveggia, C., Willem, M., *et al.* (2012). Bace1 processing of NRG1 type III produces a myelin-inducing signal but is not essential for the stimulation of myelination. *Glia* 60, 203-217.
- von Arnim, C.A., Kinoshita, A., Peltan, I.D., Tangredi, M.M., Herl, L., Lee, B.M., Spoelgen, R., Hshieh, T.T., Ranganathan, S., Battey, F.D., *et al.* (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 17777-17785.
- von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiology of aging* 18, 661-669.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825-2835.
- Weiner, M.F., Cullum, C.M., Rosenberg, R.N., and Honig, L.S. (1998). Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study. *The Gerontologist* 38, 5-6.
- Westman-Brinkmalm, A., Abramsson, A., Pannee, J., Gang, C., Gustavsson, M.K., von Otter, M., Blennow, K., Brinkmalm, G., Heumann, H., and Zetterberg, H. (2011). SILAC zebrafish for quantitative analysis of protein turnover and tissue regeneration. *J Proteomics* 75, 425-434.

- Weyer, S.W., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost, N., Schaller, K.L., Saar, M., *et al.* (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *The EMBO Journal* **30**, 2266-2280.
- WHO (2012). Dementia - A public health priority. http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/index.html
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664-666.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., and Mann, M. (2009a). Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *Journal of Proteome Research* **8**, 5674-5678.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009b). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* **6**, 359-362.
- Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 23009-23017.
- Wu, W.W., Wang, G., Baek, S.J., and Shen, R.F. (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteome Research* **5**, 651-658.
- Yamashita, M., and Fenn, J.B. (1984). Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *J Phys Chem-U S* **88**, 4451-4459.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., *et al.* (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533-537.
- Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P., and Xu, H. (2001). The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 36788-36796.
- Yanagida, K., Okochi, M., Tagami, S., Nakayama, T., Kodama, T.S., Nishitomi, K., Jiang, J., Mori, K., Tatsumi, S., Arai, T., *et al.* (2009). The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Molecular Medicine* **1**, 223-235.
- Yost, R.A., and Enke, C.G. (1978). Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass-Spectrometer. *J Am Chem Soc* **100**, 2274-2275.
- Yu, C., Kim, S.H., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., and Sisodia, S.S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 43756-43760.
- Zabel, C., and Klose, J. (2009). High-resolution large-gel 2DE. *Methods in Molecular Biology* **519**, 311-338.
- Zhang, W., Liu, Y., Zhang, H., and Dai, J. (2012). Proteomic analysis of male zebrafish livers chronically exposed to perfluorononanoic acid. *Environment International* **42**, 20-30.

Zhang, Z., Oliver, P., Lancaster, J.R., Jr., Schwarzenberger, P.O., Joshi, M.S., Cork, J., and Kolls, J.K. (2001). Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 303-305.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., *et al.* (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.

Zhou, L., Barao, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijzen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaert, K., *et al.* (2012). The Neural Cell Adhesion Molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*.

13 Publikationen

Hog1, S., Kuhn, P.H., Colombo, A., and Lichtenthaler, S.F. (2011). Determination of the proteolytic cleavage sites of the amyloid precursor-like protein 2 by the proteases ADAM10, BACE1 and gamma-secretase. *PloS one* 6, e21337.

Kuhn, P.H., Koroniak, K., **Hog1, S.**, Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., *et al.* (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *The EMBO Journal* 31, 3157-3168.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit am Adolf-Butenandt-Institut unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler für eine hervorragende Betreuung, viele interessante und wertvolle Diskussionen sowie seine Unterstützung beim Schreiben von Anträgen und Manuskripten;

Prof. Dr. Christian Haass und Dr. Roman Körner für die Diskussionen im Rahmen der Thesis Advisory Committee Meetings und darüber hinaus;

Dr. Peer-Hendrik Kuhn für viele technische Anregungen und wissenschaftliche Diskussionen;

Alessio Colombo für die Herstellung primärer Neuronen;

Katrin Moschke für experimentelle Hilfe;

Prof. Dr. Axel Imhof und seiner Gruppe für die Möglichkeit, das MALDI-TOF Massenspektrometer zu nutzen;

der Fisch-Gruppe für spannende Kollaborationen ;

der International Max Planck Research School for Life Sciences für persönliche und finanzielle Unterstützung;

dem Boehringer Ingelheim Fonds ebenfalls für persönliche und finanzielle Unterstützung sowie ein perfekt organisiertes Seminar in Hirschegg;

allen Kollegen, die diese Arbeit mit Reagenzien oder Ideen unterstützt haben;

allen Kollegen am Institut für die produktive Arbeitsatmosphäre und den Spaß darüber hinaus.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere bei meiner Frau Sonja für ihre ständige Unterstützung und das Verständnis für die Arbeitszeiten eines Doktoranden bedanken.

Determination of the Proteolytic Cleavage Sites of the Amyloid Precursor-Like Protein 2 by the Proteases ADAM10, BACE1 and γ -Secretase

Sebastian Hognl^{1,2}, Peer-Hendrik Kuhn^{1,2}, Alessio Colombo^{1,2}, Stefan F. Lichtenthaler^{1,2*}

1 German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany, **2** Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

Abstract

Regulated intramembrane proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) by the protease activities α -, β - and γ -secretase controls the generation of the neurotoxic amyloid β peptide. APLP2, the amyloid precursor-like protein 2, is a homolog of APP, which shows functional overlap with APP, but lacks an amyloid β domain. Compared to APP, less is known about the proteolytic processing of APLP2, in particular in neurons, and the cleavage sites have not yet been determined. APLP2 is cleaved by the β -secretase BACE1 and additionally by an α -secretase activity. The two metalloproteases ADAM10 and ADAM17 have been suggested as candidate APLP2 α -secretases in cell lines. Here, we used RNA interference and found that ADAM10, but not ADAM17, is required for the constitutive α -secretase cleavage of APLP2 in HEK293 and SH-SY5Y cells. Likewise, in primary murine neurons knock-down of ADAM10 suppressed APLP2 α -secretase cleavage. Using mass spectrometry we determined the proteolytic cleavage sites in the APLP2 sequence. ADAM10 was found to cleave APLP2 after arginine 670, whereas BACE1 cleaves after leucine 659. Both cleavage sites are located in close proximity to the membrane. γ -secretase cleavage was found to occur at different peptide bonds between alanine 694 and valine 700, which is close to the N-terminus of the predicted APLP2 transmembrane domain. Determination of the APLP2 cleavage sites enables functional studies of the different APLP2 ectodomain fragments and the production of cleavage-site specific antibodies for APLP2, which may be used for biomarker development.

Citation: Hognl S, Kuhn P-H, Colombo A, Lichtenthaler SF (2011) Determination of the Proteolytic Cleavage Sites of the Amyloid Precursor-Like Protein 2 by the Proteases ADAM10, BACE1 and γ -Secretase. PLoS ONE 6(6): e21337. doi:10.1371/journal.pone.0021337

Editor: Koichi M. Iijima, Thomas Jefferson University, United States of America

Received: March 25, 2011; **Accepted:** May 25, 2011; **Published:** June 17, 2011

Copyright: © 2011 Hognl et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: We thank the following institutions for financial support: the Deutsche Forschungsgemeinschaft for SFB596 project B12, the competence network degenerative dementias (BMBF) and the PPP program (DAAD) (all to SFL) and the Boehringer Ingelheim Foundation to SH. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: stefan.lichtenthaler@med.uni-muenchen.de

Introduction

Regulated intramembrane proteolysis (RIP) occurs for an increasing number of membrane proteins, and is a molecular mechanism controlling the communication between cells [1,2]. In the RIP process a membrane protein typically undergoes two consecutive proteolytic cleavages. The first one happens outside of the membrane and results in shedding of the ectodomain. The second cleavage, called intramembrane proteolysis, occurs within the transmembrane domain and leads to the secretion of a small peptide and the release of the intracellular domain into the cytosol. The proteolytic cleavage fragments act as versatile signaling molecules or are further degraded [3,4]. RIP also occurs for the amyloid precursor protein (APP) family. This family comprises APP itself as well as its two homologs amyloid precursor-like proteins 1 and 2 (APLP1, APLP2) [5]. APP and APLP2 are ubiquitously expressed, whereas expression of APLP1 is restricted to the nervous system. The biological function of the APP protein family members is not yet fully understood. The three proteins are required for embryonic development, because in mice the triple knock-out of APP, APLP1 and APLP2 results in perinatal lethality, cranial abnormalities and cortical dysplasias [6]. In contrast, mice singly deficient in either APP, APLP1 or APLP2 alone as well as the double knock-out of APP and APLP1 do not show a phenotype

or only a mild one [7,8,9,10], suggesting functional overlap between the three family members. However, the double knock-out of APLP2 with either APP or APLP1 results in postnatal lethality [9,10]. Together, these studies demonstrate that APLP2 is particularly required for normal embryonic development and can compensate for the lack of APP or APLP1.

APP, APLP1 and APLP2 undergo shedding in their ectodomain by proteases referred to as α - and β -secretases, followed by γ -secretase-mediated intramembrane proteolysis. The cleavage of APP is intensively studied, as APP is the precursor for the amyloid β peptide (A β), which has a key role in Alzheimer's disease (AD) pathogenesis [11]. APP cleavage by β - and γ -secretase generates A β , whereas cleavage by α -secretase prevents A β generation [12,13]. APLP1 and APLP2 do not contain an A β domain and are not assumed to contribute to AD.

Despite the crucial function of APLP2 as described above, much less is known about the proteolytic cleavage of APLP2 compared to APP. Similar to APP, the type I membrane protein APLP2 undergoes shedding by the β -secretase BACE1 (β -site APP cleaving enzyme), which results in secretion of the N-terminal APLP2 ectodomain and in generation of the corresponding membrane-bound C-terminal fragments (CTFs) [14,15,16,17,18]. APLP2 also undergoes shedding by α -secretase. Although the name α -secretase was initially coined for the metalloprotease

cleaving APP, α -secretase is now used more widely to indicate the shedding of membrane proteins by a metalloprotease, typically of the ADAM (A disintegrin and metalloprotease) family. As expected for a cleavage by ADAM proteases, α -secretase cleavage of APLP2 occurs constitutively and is reduced by the metalloprotease inhibitors TAPI-2 or GM6001 [14,15]. Moreover, APLP2 α -secretase cleavage can be stimulated above its constitutive level by the phorbol ester PMA [14]. The constitutive α -secretase cleavage of APLP2 seems to be mediated by ADAM10 and ADAM17 (also known as TACE - TNF α converting enzyme). Overexpression of ADAM10 or ADAM17 in kidney cells and of ADAM10 in mouse brain increases APLP2 shedding [14,19]. Conversely, the metalloprotease inhibitor GI254023X reduces APLP2 shedding down to 30%. Because this inhibitor is 100-fold more potent in inhibiting recombinant ADAM10 than ADAM17, it was concluded that ADAM10 may be the primary α -secretase for APLP2 [14]. However, overexpression of a dominant-negative ADAM10 reduced APLP2 shedding only by 40% [14], raising the possibility that ADAM17 is also involved in constitutive APLP2 shedding. In fact, ADAM17, but not ADAM10, is required for APLP2 shedding in SH-SY5Y cells stimulated with insulin-like growth factor-1 [20]. So far, the constitutive APLP2 shedding has not yet been analyzed in primary neurons. Taken together, it remains unclear whether only ADAM10 or also ADAM17 contributes to the constitutive α -secretase cleavage of APLP2. A similar situation was observed for APP, where ADAM10 and 17 as well as other metalloproteases were discussed as the constitutive APP α -secretases. Recently, we demonstrated that only ADAM10, but not ADAM17, mediates the constitutive APP α -secretase cleavage in different cell lines and in primary murine neurons [21].

Ectodomain shedding can produce soluble protein fragments with biological activity, for example growth factors and cytokines [3,4]. Likewise, it is clear that the soluble APP ectodomain can be biologically active. For example, the APP ectodomain released through β -secretase cleavage (APPs β) binds and activates the death receptor DR6, acting in a proapoptotic manner [22]. Additionally, it is able to induce expression of transthyretin and Klotho [23]. In contrast, the α -secretase-cleaved APP (APPs α) has neurotrophic and neuroprotective properties [24,25,26] and is able to rescue the mild phenotype of APP single knock-out mice [27]. Together, this demonstrates that APPs α and APPs β have different biological functions, although APPs α is only 16 amino acids longer than APPs β [28]. Thus, it is essential to know the cleavage sites and the identity of the contributing protease activities in order to study the physiological functions of the APP cleavage products in depth. Compared to APP much less is known about the proteolytic cleavage of APLP2 and its functional consequence. The α -, β - and γ -cleavage sites for APLP2 have not yet been determined [5]. Thus, it remains unknown whether – similar to APP – α - and β -secretase produce APLP2 ectodomains of different length and diverse functions.

Here we demonstrate that the constitutive α -secretase cleavage of APLP2 in HEK293 and in neuroblastoma SH-SY5Y cells is mediated by ADAM10, but not by ADAM17. Furthermore, knock-down of ADAM10 completely abolished α -secretase cleavage of APLP2 in primary murine neurons, demonstrating that ADAM10 is the constitutive α -secretase for APLP2. Moreover, we determined the cleavage sites of α -, β - and γ -secretase in the APLP2 sequence.

Results

APLP2 is processed by an α -secretase

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells shed three different soluble species (sAPLP2) of the endogenous APLP2 (Fig. 1A). As

reported previously [14,29,30], the broad band between 120 and 160 kDa (***) corresponds to sAPLP2 carrying chondroitin sulfate glycosamino glycans (CS-GAG) at serine 614 of the 751 amino acids long APLP2 isoform 2. Due to heterogeneity in the amount of glycosylation, this form is detected as a broad band. The two sharp bands at apparent molecular weights of 115 and 100 kDa are assumed to be non-CS-GAG modified, mature sAPLP2 (**) and a truncated form of non-CS-GAG modified, mature sAPLP2 (***), respectively. sAPLP2 species are complex glycosylated as shown by their resistance to endoglycosidase H treatment. In the cell lysate full-length APLP2 was detected as two immature bands (marked ** and ***, Fig. 1A), which were endoglycosidase H sensitive (Fig. 1B), and as the CS-GAG modified APLP2 (*; Fig. 1A). All protein bands are specific for APLP2, because they were absent upon RNAi-mediated knock-down of APLP2 (Fig. 1A). As a positive control for the deglycosylation assay, deglycosylation was performed for the β -secretase BACE1. In agreement with previous studies [31,32,33], the mature form (#) was sensitive to N-glycosidase F, but not to endoglycosidase H, whereas the immature form (##) was sensitive to both glycosidases.

Next, we determined to which extent APLP2 shedding occurs by α - and β -secretase in SH-SY5Y cells. Treatment with the broad spectrum metalloprotease inhibitor TAPI-1, which also inhibits ADAM proteases, reduced APLP2 shedding down to less than 20% in SH-SY5Y cells (Fig. 1C and quantification in Fig. 1D), demonstrating that APLP2 shedding is mediated to a large extent by α -secretase, in agreement with previous publications [14,15]. As a control, TAPI-1 also inhibited the shedding of APP (Fig. 1C). The inhibitor C3, which is specific for the β -secretase BACE1 [34], did not lead to a significant reduction of total APLP2 shedding, revealing that β -secretase cleavage only contributes to a minor extent to total APLP2 shedding. This was further confirmed by the combined use of TAPI-1 and C3, which did not decrease total APLP2 shedding further than the use of TAPI-1 alone (Fig. 1C and D). The remaining small amount of APLP2 shedding may result from an as yet unknown protease different from α - and β -secretase. Alternatively, TAPI-1 may not be able to completely block α -secretase cleavage of APLP2.

Constitutive α -secretase cleavage of APLP2 is mediated by ADAM10 in HEK293 and SH-SY5Y cells

To determine whether constitutive α -secretase cleavage of APLP2 is mediated by ADAM10 or ADAM17 or both, a transient knock-down of both proteases was performed in SH-SY5Y cells (Fig. 2A and quantification in Fig. 2B). The siRNA pools efficiently reduced the protein levels of ADAM10 and ADAM17 (Fig. 2A). Knock-down of ADAM17 did not affect APLP2 shedding, ruling out the possibility that ADAM17 is the constitutive APLP2 α -secretase. In contrast knock-down of ADAM10 inhibited APLP2 shedding by ~70%, which is similar to the reduction of APLP2 shedding obtained with the metalloprotease inhibitor TAPI-1 (Fig. 1D). The inhibitor was slightly more potent than the siRNA in reducing APLP2 shedding, most likely due to the fact that the siRNA-mediated knock-down is not able to completely suppress ADAM10 protein levels. In a previous study we found 10–15% of ADAM10 protein remaining in the siRNA treated cells [21]. The shedding of all three sAPLP2 species was reduced to a similar extent (Fig. 2A and quantification in 2B). To rule out the possibility that the results obtained are cell line-specific, the same experiment was carried out in human embryonic kidney 293 cells (HEK293). Very similar to the SH-SY5Y cells, ADAM10, but not ADAM17, was essential for α -secretase cleavage of APLP2 (Fig. 2C and quantification in 2D).

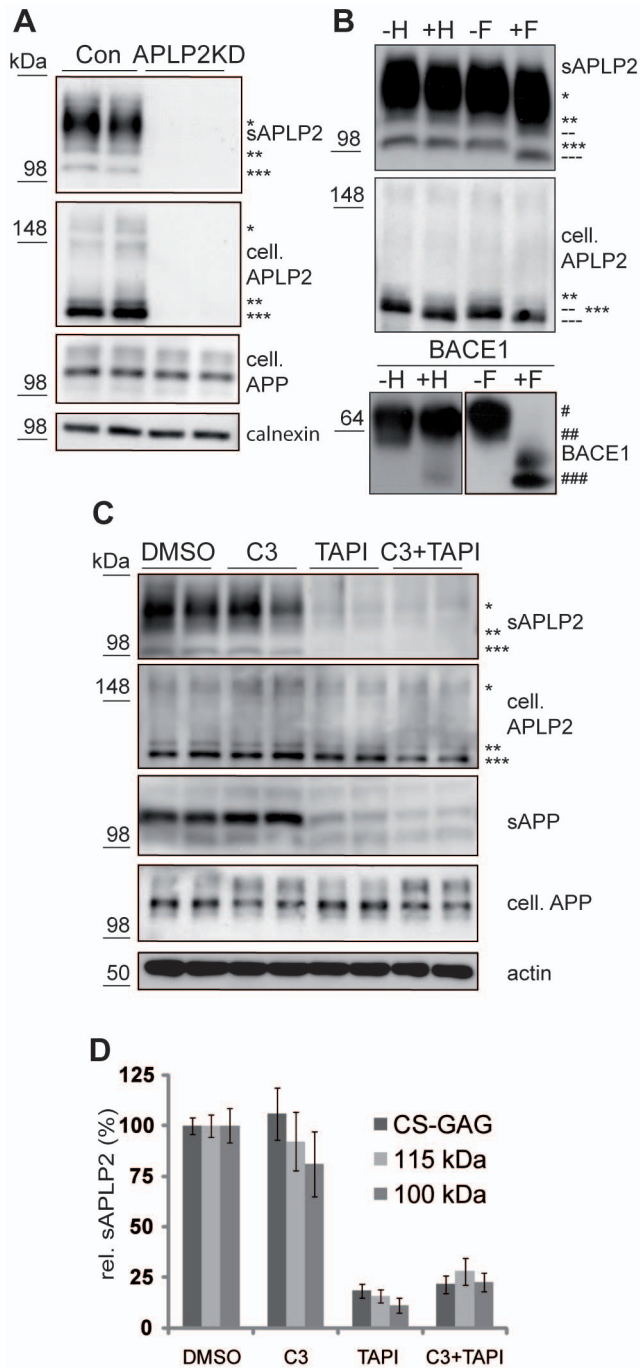


Figure 1. Analysis of APLP2 shedding using protease inhibitors. (A) Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were transiently transfected with an siRNA pool against APLP2 or with a control pool. Endogenous APLP2 was detected with the N-terminally binding 2D11 antibody. Bands were absent upon knock-down of APLP2 (APLP2KD), demonstrating the specificity of the antibody. Soluble APLP2 (sAPLP2) was detected in the conditioned medium, cellular full-length APLP2 (cell. APLP2), cellular full-length APP (cell. APP) and calnexin as a loading control in the cell lysate. Three forms of APLP2 were detected: CS-GAG modified (*) and two non-CS-GAG modified species (** and ***) with molecular weights of around 115 and 100 kDa respectively. (B) Deglycosylation of APLP2 in conditioned medium and cell lysate of SH-SY5Y cells using endoglycosidase H (H) and N-glycosidase F (F). Deglycosylated forms of APLP2 are indicated (-- and ---). As a control, deglycosylation was performed for BACE1 in the cell lysate of BACE1 overexpressing HEK293 cells. Mature (#), immature (##) and

deglycosylated (###) BACE1 is detectable. (C) Representative blots of treatment of SH-SY5Y cells with C3 (1 μM), TAPI-1 (50 μM) or C3+TAPI-1. Upon C3 treatment no significant reduction of sAPLP2 levels was observed. Upon TAPI-1 and C3+TAPI-1 treatment sAPLP2 levels were strongly reduced while no changes in APLP2 levels in the cell lysate were observed. As a control, soluble APP (sAPP) levels were clearly reduced upon TAPI-1 and C3+TAPI-1 treatment. (D) Quantification of experiments in C (mean ± SEM). C3 treatment did not lead to a significant reduction in sAPLP2 levels while TAPI-1 as well as C3+TAPI-1 treatment led to a significant reduction in sAPLP2 levels (p<0.001 for all three species, n=6). doi:10.1371/journal.pone.0021337.g001

To further validate this finding, SH-SY5Y cells with a stable knock-down of ADAM10 were used [21]. Similar to the transient ADAM10 knock-down, both shRNA sequences, which efficiently reduce ADAM10 protein levels [21], inhibited APLP2 shedding by 60–80% (Fig. 2E and quantification in 2F).

The α-secretase ADAM10 generates the soluble APLP2 ectodomain and additionally the membrane-bound C-terminal fragments (CTFs) of APLP2, which should be reduced in ADAM10 knock-down cells. As the CTFs are rapidly further cleaved by γ-secretase, we stabilized them with the γ-secretase inhibitor DAPT [35] in wild-type SH-SY5Y cells or cells with a knock-down of ADAM10. DAPT treatment led to an accumulation of the CTFs (Fig. 2G), which were not visible in the absence of DAPT or upon knock-down of APLP2 (not shown). Three CTF bands were detected. Two have an apparent molecular weight of approximately 10 kDa (-, -), in agreement with previous publications [14,17,18]. One additional study detected six different CTFs, which may be specific for the overexpression of a C-terminally tagged APLP2 construct used in that study [15]. The third band that we observed is at approx. 8 kDa (#, Fig. 2G). The lower of the two bands at 10 kDa was absent in the ADAM10 knock-down cells, demonstrating that it is the ADAM10-generated CTF. The upper band was absent upon treatment with the β-secretase inhibitor C3 (Fig. 2G), showing that it is produced by the β-secretase BACE1, which is in agreement with previous studies analyzing the CTFs generated upon BACE1 overexpression or knock-out [17,18]. The intensity of the CTFs may suggest a relatively large contribution of BACE1 to total APLP2 cleavage, whereas the shedding analysis (Fig. 1B) revealed only a minor contribution of BACE1 to APLP2 shedding. This difference is likely due to the fact, that a γ-secretase inhibitor was used for detecting the endogenous APLP2 CTFs, such that also the β-secretase generated CTF accumulates, even if it is only generated at much lower levels compared to the α-secretase generated CTF. Levels of the 8 kDa CTF were not significantly affected by ADAM10 knock-down or C3 treatment (t-test significance value p>0.1; n=6), suggesting that it is generated by an additional protease unrelated to ADAM10 and BACE1. Because this fragment was not described in previous studies, it may only be seen upon γ-secretase inhibition.

From the above experiments we conclude that ADAM10, but not ADAM17, is required for the constitutive APLP2 α-secretase cleavage in SH-SY5Y and HEK293 cells.

APLP2 shedding in primary neurons

Next, we analyzed whether ADAM10 is also required for APLP2 α-secretase shedding in primary neurons. Embryonic neurons were prepared at E16. First, we used pharmacological inhibitors of α- and β-secretase to evaluate their contribution to the total amount of APLP2 shedding in neurons. The specific β-secretase inhibitor C3 [34] reduced endogenous sAPLP2 levels by about 50%, whereas the metalloprotease inhibitor TAPI-1

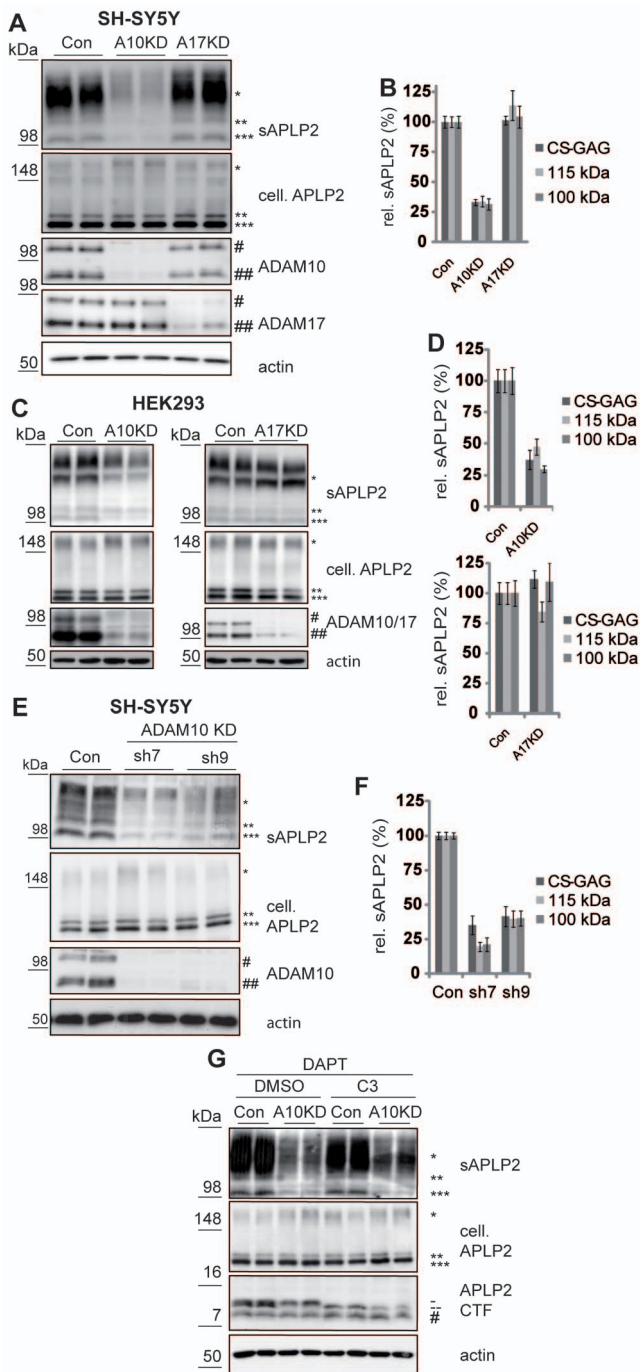


Figure 2. Transient and stable knock-down of ADAM10 suppresses APLP2 shedding. (A) SH-SY5Y cells were transfected with siRNA pools against the proteases ADAM10 (A10KD) or ADAM17 (A17KD) or with control siRNA (Con). Both proteases were detected in membrane preparations. The mature active form is indicated with ##, the immature form with #. Actin and full-length APLP2 levels (cell. APLP2) were detected in the cell lysate. Conditioned media were analyzed for total secreted APLP2 (sAPLP2). All three species of sAPLP2 (* CS-GAG modified, ** 115 kDa, *** 100 kDa) were strongly decreased upon knock-down of ADAM10, but not of ADAM17. (B) Quantification of experiments in A (mean \pm SEM). ADAM10 knock-down significantly reduced sAPLP2 ($p < 0.001$ for all three species, $n = 6$), while ADAM17 knock-down did not lead to any significant changes in sAPLP2 levels. (C) Knock-down of ADAM10 and ADAM17 in HEK293 cells, carried out as in A. (D) Quantification of experiments in C (mean \pm SEM). ADAM10 knock-down significantly reduced sAPLP2 ($p < 0.001$ for

CS-GAG modified and 100 kDa APLP2, $p = 0.001$ for 115 kDa APLP2, $n = 6$). (E) SH-SY5Y cells with stable shRNA-mediated knock-down of ADAM10 were used. shRNAs sh7 and sh9 are targeting two different regions of ADAM10. As control, a stable SH-SY5Y cell line expressing a non-targeting shRNA was used (Con). sAPLP2 levels were clearly reduced upon ADAM10 knock-down. (F) Quantification of experiments in E (mean \pm SEM). Both shRNAs significantly reduced sAPLP2 ($p < 0.001$ for all three species, $n = 6$). (G) SH-SY5Y cells were transiently transfected with a siRNA pool against ADAM10 (A10KD) or control siRNA (Con). Cells were treated with DAPT (1 μ M). Additionally C3 (1 μ M) or DMSO (as a solvent control) was applied. sAPLP2 levels were clearly reduced upon ADAM10 knock-down while cellular APLP2 levels (cell. APLP2) remained unchanged. Two forms of APLP2 C-terminal fragments (CTFs) were detected at around 10 kDa in the cell lysate (-,-). ADAM10 knock-down led to the elimination of the lower molecular weight APLP2 CTF (-) while C3-treatment abolished the higher molecular weight species (-). doi:10.1371/journal.pone.0021337.g002

reduced it by about 35% (Fig. 3A and quantification in 3B). Thus, compared to HEK293 cells, APLP2 shedding in neurons is mediated to a larger extent by the β -secretase BACE1. This is similar to APP and is in agreement with the finding that BACE1 is expressed at higher levels in neurons than in cell lines [21,36,37]. Due to alternative splicing of APLP2, which destroys the CS-GAG attachment site, neurons have less of the CS-GAG-modified APLP2 compared to HEK293 or SH-SY5Y cells (Fig. 2A, B) [38,39]. Next, ADAM10 was efficiently knocked-down in the primary neurons (Fig. 3C) using lentiviruses expressing two distinct and validated shRNAs against ADAM10 [21,40]. sAPLP2 levels were reduced by about 30% (Fig. 3C and quantification in 3D). This is similar to the metalloprotease inhibitor TAPI-1 (Fig. 3A) and demonstrates that the constitutive α -secretase cleavage of APLP2 in neurons is mediated by ADAM10.

APLP2 α -secretase cleavage occurs at the Arg670-Val671 peptide bond

The cleavage sites of APLP2 by either ADAM10 or BACE1 have not yet been identified. To determine them, mass spectrometry was used. The intensive glycosylation of APLP2 would lead to a broadening of the peaks in the mass spectrometric analysis, making identification of specific cleavage sites difficult. Thus, similar to a previous study analyzing APP cleavage [21], two short peptide tags were included into the APLP2 ectodomain C-terminally of the glycosylation sites at a distance of 39 amino acids from the suggested transmembrane domain (Fig. 4A). One of the two peptide sequences encodes a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site, the other one encodes a FLAG tag. This mutant APLP2-TEV-FLAG construct (APLP2TF) was transiently expressed in HEK293 cells. The metalloprotease inhibitor TAPI-1 strongly inhibited shedding of APLP2TF (Fig. 4B), demonstrating that APLP2TF was processed like the wild-type, endogenous APLP2 (Fig. 1B).

For this study the longest APLP2 isoform (763 amino acids) was used, which lacks the CS-GAG modification. The secreted form of APLP2-TF was immunoprecipitated from the conditioned medium with an anti-FLAG antibody and then digested in vitro with TEV protease. This leads to the removal of the glycosylated part of the APLP2 ectodomain, resulting in ~ 3 kDa peptides having the FLAG tag at their new N-terminus and C-terminally ending at the peptide bond, where APLP2 is shed by the secretases (Fig. 4A). Mass spectrometric measurements yielded two peptide peaks at 2917.34 Da and at 3073.37 Da, which correspond to the peptides having glutamate 669 and arginine 670 respectively as their C-terminal amino acid (Fig. 4C and D). Overexpression of ADAM10 strongly increased APLP2TF shedding (Fig. 4E). The same two

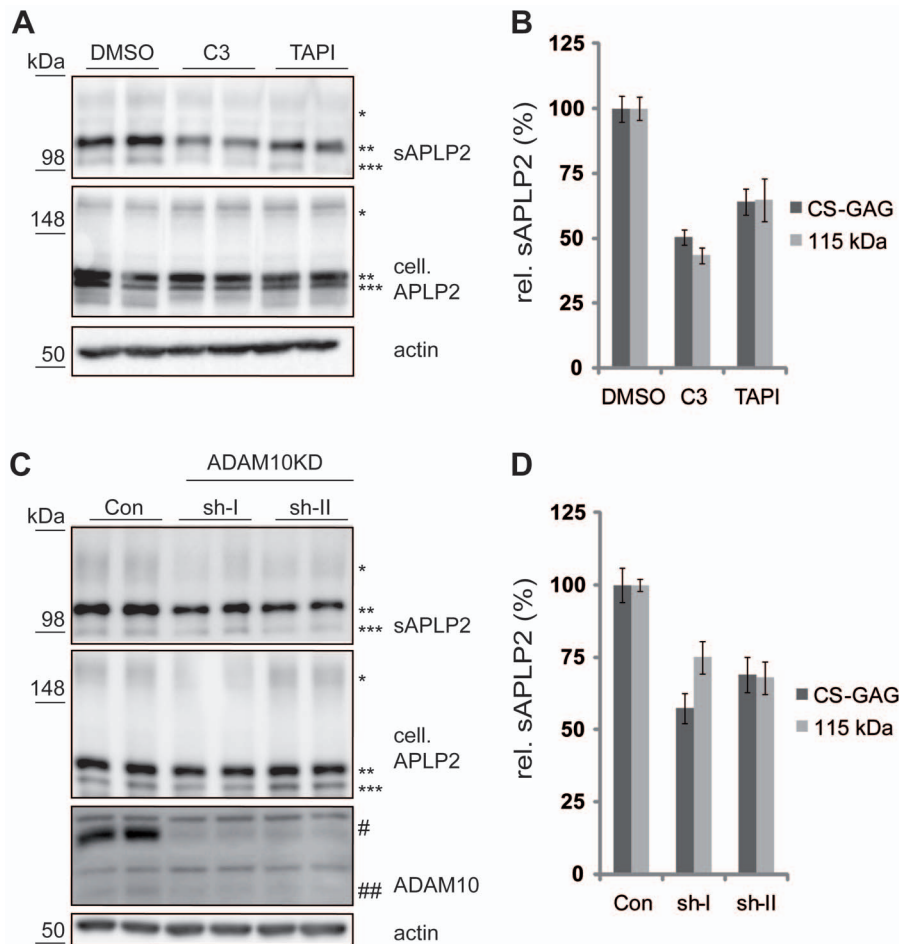


Figure 3. APLP2 processing in primary cortical neurons. (A) E16 primary cortical neurons were treated with C3 (1 μ M), TAPI-1 (50 μ M) or DMSO as a solvent control. sAPLP2 (* CS-GAG-modified, ** 115 kDa, *** 100 kDa) was detected in the conditioned medium of these cells. Full-length cellular APLP2 (cell. APLP2) and actin were detected in the cell lysate. A clear reduction of sAPLP2 levels was observable upon C3 as well as TAPI-1 treatment. (B) Quantification of experiments in A (mean \pm SEM). C3 and TAPI-1 significantly reduced sAPLP2 (C3: $p < 0.001$ for both detected species, TAPI-1: $p < 0.001$ for CS-GAG modified APLP2, $p = 0.004$ for mature APLP2; $n = 6$). (C) E16 primary cortical neurons with lentiviral knock-down of ADAM10 were analyzed. shRNAs (sh-I and sh-II) targeting different regions of ADAM10 and a non-targeting shRNA control (Con) were used. A clear reduction of ADAM10 (# immature, ## mature) levels was observed in the cell lysate and of sAPLP2 in the conditioned medium. (D) Quantification of experiments in C (mean \pm SEM). Both shRNAs significantly reduced sAPLP2 ($p < 0.01$ for both detected species for both shRNAs, $n = 6$). doi:10.1371/journal.pone.0021337.g003

peptide peaks were observed under control conditions, but with a much higher intensity (TIC, total ion count, Fig. 4C), indicating that both peptides directly derive from ADAM10-mediated cleavage. Given that ADAM10 preferentially cleaves after arginine or lysine [41], we assume that the primary ADAM10 cleavage site in APLP2 is after arginine 670 and then followed by an as yet unidentified carboxypeptidase cleavage, similar to what is known for APP [21,42]. This is in agreement with our observation that the ratio of the two peptides depends on the duration of the incubation of the supernatant on the cells, with longer incubations leading to a shift towards the shorter product (data not shown).

Overexpression of BACE1 increased APLP2TF shedding (Fig. 4E) and suppressed the ADAM10-generated peptide peaks and yielded a shorter peptide with 1740.72 Da (Fig. 4C), corresponding to leucine 659 as the C-terminal amino acid (Fig. 4D). The leucine is in good agreement with the substrate specificity of BACE1 known from *in vitro* experiments [43] and is also found in other BACE1 substrates, such as the Swedish variant APP and P-selectin glycoprotein ligand-1 [44] (Fig. 4G). The BACE1-generated peptide was not detected under control

conditions. As the BACE1 cleavage makes up a very small proportion of total APLP2 shedding (see C3-inhibitor treatment in Fig. 1B), it is likely that this peptide was below the detection limit in our analysis.

Heterogeneous γ -secretase cleavage occurs between alanine 694 and valine 700

After ectodomain shedding APLP2 undergoes intramembrane proteolysis by γ -secretase [15]. While the so-called ϵ -cleavage site at the C-terminal end of APLP2 has been mapped to occur after leucine 712 [45], the γ -cleavage sites remain unknown. For identification of the γ -secretase cleavage sites the APLP2 CTF was stably expressed in HEK293 cells. The CTF construct was composed of the N-terminal HA-tag, a short linker region, followed by the APLP2-CTF starting on proline 683. The construct further harbored a C-terminal FLAG-tag fused to the end of the CTF (Fig. 5A, HA-APLP2CTF-FLAG). As a control, the γ -secretase inhibitor Merck A [46] blocked γ -secretase cleavage of the CTF, as evidenced by increased CTF levels (Fig. 5B).

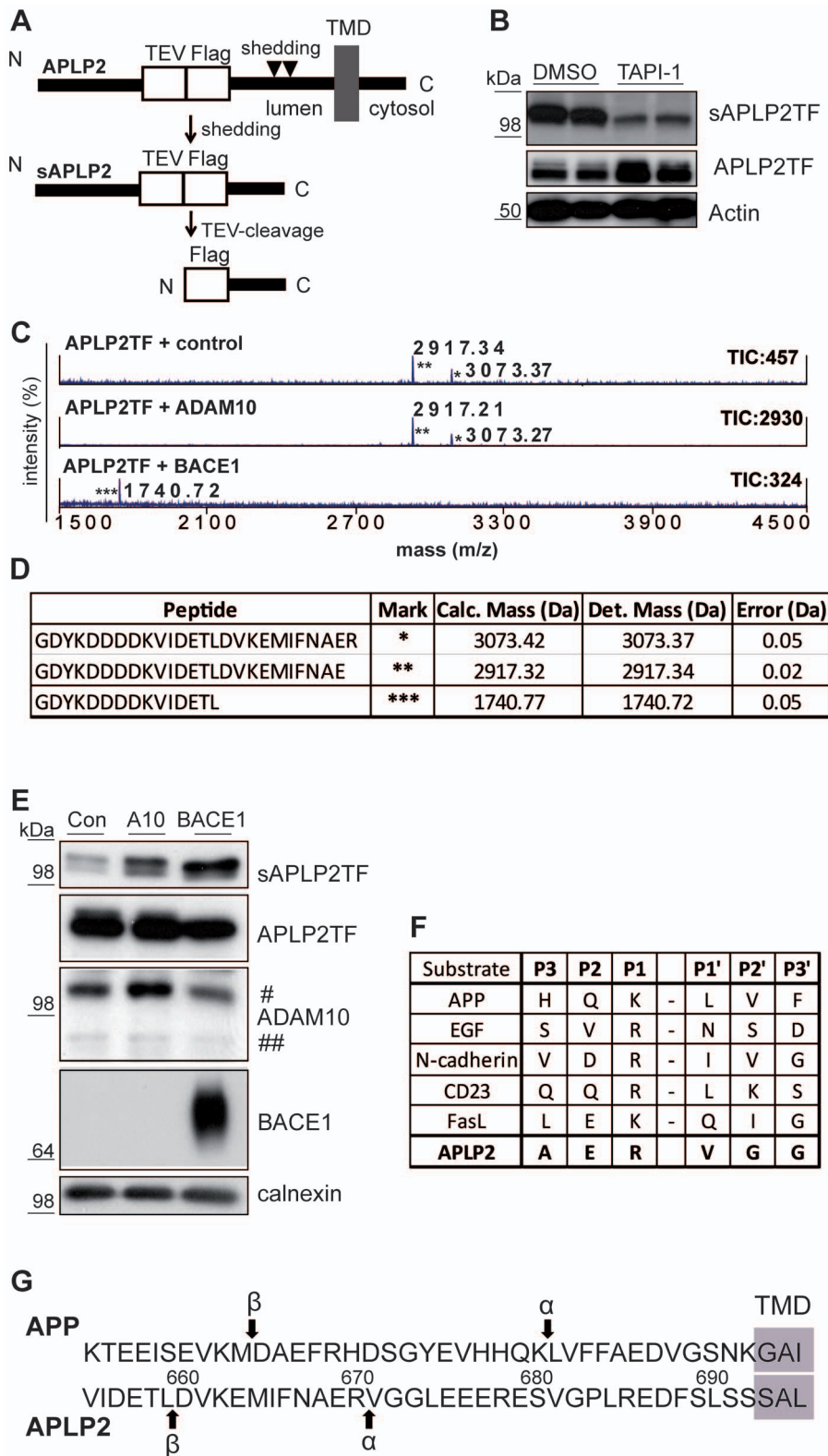


Figure 4. Mass spectrometry-based determination of APLP2 α - and β -shedding sites. (A) Scheme of experimental procedure. A TEV-protease cleavage site followed by a FLAG-tag was introduced into APLP2 isoform 763 starting after amino acid M653 (APLP2TF). The TEV-FLAG site is positioned 39 amino acids N-terminally of the assumed start of the transmembrane domain (TMD). Shedding yields sAPLP2TF, which was immunoprecipitated and digested with TEV-protease, leading to a small peptide harboring the N-terminal FLAG-tag as well as the C-terminal cleavage site resulting from the shedding. This peptide was analyzed in a mass spectrometer. (B) HEK293 cells were transiently transfected with the APLP2TF construct and either treated with TAPI-1 (50 μ M) or DMSO as a solvent control. Upon TAPI-1 treatment secreted sAPLP2TF levels were clearly decreased in the conditioned medium of the cells. An accumulation of APLP2TF levels was observed upon TAPI-1 treatment in the cell lysate. Actin

was analyzed in the cell lysate as a loading control. **(C)** Peptides produced according to the scheme in A were obtained from HEK293 cells transiently overexpressing APLP2TF and either luciferase as a control, ADAM10 or BACE1. Mass spectrometric analysis of the peptides revealed two peaks for control and ADAM10 overexpression (*,**) while upon BACE1 overexpression only one peak with a lower m/z ratio was observed. Total Ion Counts (TIC) and centroid peak masses of the first isotopic peak are given for each isotopic peak cluster. All peaks are revealed from singly-charged peptides. **(D)** Determined (Det.) masses of the peaks in C (*,**,****) were compared to calculated (calc.) masses. For each mass, a corresponding peptide could be computed with less than 0.5 Da error. **(E)** Western Blot analysis of the samples used in C. sAPLP2TF was detected in the conditioned media, full-length APLP2 (APLP2TF), ADAM10 (A10, # immature and ## mature), BACE1 and calnexin as a loading control were detected in the cell lysates. A clear increase in sAPLP2TF levels was observed upon ADAM10 and BACE1 overexpression. sAPLP2TF has a slightly reduced apparent molecular weight upon BACE1 overexpression if compared to control (Con). **(F)** Summary of known ADAM10 cleavage sites in different substrates aligned with the newly detected ADAM10 cleavage site for APLP2 [41]. **(G)** Schematic comparison of the ectodomain shedding sites of APP and APLP2. The APP α -cleavage occurs 12 amino acids N-terminally of the transmembrane domain (TMD), for APLP2 it occurs 22 amino acids N-terminally of the TMD. For both proteins β -cleavage occurs N-terminally of an aspartate.
doi:10.1371/journal.pone.0021337.g004

The secreted peptides resulting from γ -secretase cleavage were immunoprecipitated from the supernatant and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Seven peaks were identified in the range of 3000 to 3700 Da with the main peak showing a mass of 3404.47 Da (Fig. 5C). This implies that the main γ -secretase cleavage site is the peptide bond between leucine 698 and leucine 699 (Fig. 5D). Multiple γ -secretase cleavage sites are typically detected for γ -secretase substrates, including APP [47].

As a control, we verified that the identified peptides were generated in a γ -secretase-dependent manner. In fact, the γ -secretase inhibitor Merck A strongly reduced the seven mass peaks (Fig. 5C). Because mass spectrometry is only semi-quantitative, we further verified this finding by using a truly quantitative mass spectrometry technique, called SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) [48]. In this approach cells from two different experimental conditions, such as with and without Merck A, are grown in the presence of isotopically light (with Merck A) or heavy (without Merck A) amino acids arginine and lysine. The combined supernatants are then analyzed by mass spectrometry. To demonstrate the method, the stably HA-APLP2CTF-FLAG expressing HEK293 cells were first grown without Merck A (control) in either light or heavy medium. Labeling efficiency was above 90% as determined by mass spectrometry based analysis of the cell lysate of the heavy labeled cells (Fig. 5E). Upon growth in the 'heavy' medium, the cells incorporated the heavy labeled amino acids into their proteins thereby increasing the molecular weight of the APLP2 CTF-derived peptides by +10 Da due to the single arginine found in every of the seven peptides (Fig. 5F, upper panel). Addition of Merck A to the 'light' labeled cells strongly reduced the 'light' peaks relative to the 'heavy' peaks from the solvent control (DMSO)-treated cells (Fig. 5F, lower panel), demonstrating that all seven peaks result from γ -secretase cleavage.

Discussion

Ectodomain shedding regulates the activity of membrane proteins and is frequently the regulatory step for subsequent intramembrane proteolysis [2,49]. Shedding is often mediated by ADAM-proteases, in particular by ADAM10 and ADAM17. Both proteases have overlapping specificities in vitro [41] and overexpression of either one can increase the shedding of some substrates, whereas under physiological conditions frequently only of the two proteases cleaves a given substrate. Here, we demonstrate that this is also the case for APLP2. We found that the constitutive α -secretase cleavage of the APP homolog APLP2 is mediated by ADAM10, but not by ADAM17. Also in neurons, where we investigated APLP2 shedding for the first time, ADAM10 was essential for constitutive APLP2 α -secretase cleavage. A similar situation was previously found for APP. Although ADAM10 and ADAM17 and even ADAM9 can cleave APP and stimulate its shedding under overexpression conditions

[50,51,52], only ADAM10, but not ADAM9 or ADAM17, was recently shown to mediate the constitutive APP α -secretase shedding [21].

Our study reveals further similarities, but also differences between the constitutive shedding of the two homologs APP and APLP2. First, in cell lines, both proteins are predominantly cleaved by α -secretase and only to a low extent by β -secretase, whereas in primary neurons, which express higher levels of the β -secretase BACE1, APP and APLP2 are cleaved to at least 50% by β -secretase. Second, for both proteins the initial α -secretase cleavage appears to be followed by a carboxypeptidase cleavage removing the C-terminal, positively charged amino acid (Lys in APP, Arg in APLP2). While the functional relevance of this C-terminal truncation is not yet clear, it is interesting to note that the maturation of several prohormones also requires the removal of a C-terminal Lys or Arg by a carboxypeptidase [53]. Third, the α - and β -cleavage sites occur at similar peptide bonds, which are in agreement with the specificities of BACE1 and ADAM10 in vitro [41,43]. Fourth, APP and APLP2 are cleaved at slightly different distances from the membrane. For APP, the α -cleavage occurs at a distance of 12 amino acids from the membrane. The β -cleavage is a further 16 amino acids away. For APLP2 the α -cleavage is at a distance of 22 amino acids from the membrane and the β -cleavage is a further 11 amino acids away (Fig. 4G). In contrast to APP, where a Lys is assumed to be the membrane-anchor and determines the beginning of the transmembrane domain, the boundaries of the transmembrane domain of APLP2 are less clear. The N-terminal boundary is assumed to start at serine 693 (Fig. 4G), but is preceded by several non-charged amino acids, which may also be part of the transmembrane domain. If that were the case, the distance of the α - and β -secretase cleavage sites in APLP2 would be even closer to the transmembrane domain and thus, even more similar to APP (Figs. 4G and 5G). The exact determination of the length of the APLP2 transmembrane domain would require biochemical approaches, as previously carried out for APP [54]. Although for APLP2 and APP the β -cleavage site is further away from the membrane than the α -secretase cleavage site, this is not the case for all membrane proteins undergoing shedding by an α - and a β -secretase. For example, for the cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1, the cleavage site by β -secretase is closer to the membrane than the cleavage site by α -secretase [44].

Our finding that the constitutive α -secretase cleavage of APLP2 is mediated by ADAM10 is in agreement with previous reports showing that APLP2 shedding is reduced by a dominant-negative ADAM10 as well as by the metalloprotease inhibitor GI254023X [14,19], which is more potent on ADAM10 than on ADAM17 [55]. However, another study reported that the knock-down of ADAM17, but not of ADAM10, reduced APLP2 shedding [20]. In that study, APLP2 shedding was not analyzed under constitutive conditions, but after stimulation with IGF-1. This demonstrates

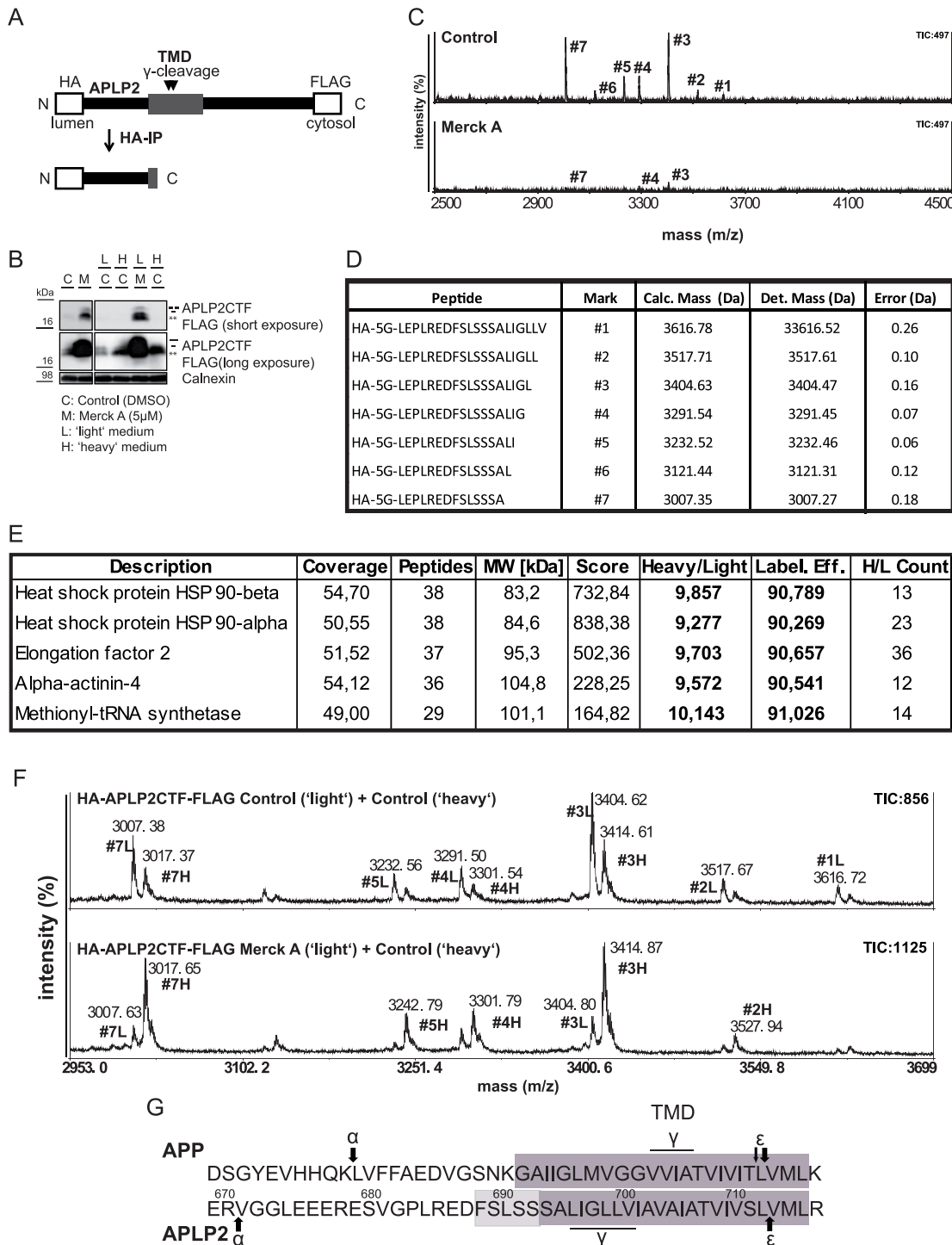


Figure 5. Mass spectrometry-based determination of APLP2 γ -cleavage site. (A) Scheme of experimental procedure: the HA-APLP2CTF-FLAG construct was stably expressed in HEK293 cells. The construct consists of an N-terminal HA-tag (HA), a linker region consisting of five glycines (5G), the APLP2CTF sequence (APLP2) and a C-terminal FLAG-tag (FLAG). Upon γ -secretase cleavage, peptides harboring the γ -secretase cleavage site at their C-terminus were liberated. Peptides were immunoprecipitated using HA-affinity agarose and subsequently analyzed in a MALDI-TOF mass spectrometer. (B) Western Blot to confirm the γ -secretase sensitivity of the construct. Cells stably expressing HA-APLP2CTF-FLAG were treated with (M) or without (C, control) the γ -secretase inhibitor Merck A. In the presence of Merck A the CTFs accumulated in the lysate. The same was observed for cells grown in 'light' (L) or 'heavy' (H) medium. CTFs were detected with anti-FLAG antibody. Calnexin levels were analyzed as a loading control. (C+D) Mass spectrometry-based identification of the γ -secretase cleavage sites. Under control conditions, seven peaks were detected with a maximal total ion count of 497. Upon Merck A treatment, the intensity (ion count) for the peaks was reduced significantly. Peaks are labeled with identifiers #1–#7 linking them to the respective peptides sequences in the table (D). All peptides were detected with a mass error of less than 0.3 Da. (E) Determination of the labeling efficiency for the SILAC experiment. To determine the labeling efficiency, proteins from the cell lysates of the 'heavy' labeled cells from (F) were separated on an SDS-PAGE gel. One band was cut out and tryptic in gel digestion was performed. Peptides resulting from this digestion were analyzed in an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer. Proteins were identified by database search, and the labeling efficiency

(Label. Eff.) was determined from the 'heavy' to 'light' ratios (Heavy/Light) of the quantifiable peptides. Further, coverage of the proteins in % (Coverage), number of unique peptides identified (Peptides), molecular weight of respective protein (MW), SEQUEST score (Score) and number of unique peptides used for quantification (H/L Count) are given. (F) Analysis of γ -secretase-dependent CTF cleavage by quantitative mass spectrometry. Upper panel: Cells without Merck A (Control) grown either in 'light' or in 'heavy' medium. Supernatants were combined, peptides immunoprecipitated and analyzed in the MALDI-TOF mass spectrometer. Peaks resulting from the 'light' and the 'heavy' labeled peptides are clearly separated (+10 Da as expected for one heavy labeled arginine). Intensities of corresponding 'heavy' and 'light' peak clusters are not identical, as the 'heavy' clusters are either shifted (+10 Da) or supershifted (+16 Da) due to additional incorporation of a 'heavy' proline resulting from arginine-to-proline conversion. Lower panel: upon treatment of the 'light' labeled cells with Merck A and the 'heavy' labeled cells with DMSO as a solvent control, the ratio between the intensity of the 'light' labeled peptides and the 'heavy' labeled peptides is significantly reduced if compared to the control experiment. This demonstrates that the identified peptide peaks are generated by γ -secretase. (G) Comparison of the position of the ϵ - and γ -secretase cleavage sites of APP and APLP2 in an alignment of the juxtamembrane and the transmembrane region of these two proteins. The dark boxes mark the predicted transmembrane domains (TMD), while the light box indicates amino acids which could potentially still be part of the transmembrane domain, as they do not harbor charges.

doi:10.1371/journal.pone.0021337.g005

that the regulated APLP2 shedding – i.e. the increase above the constitutive shedding level – can be mediated by proteases other than the constitutively cleaving ADAM10. This is similar to APP, where the constitutive α -secretase cleavage is mediated by ADAM10, whereas the regulated α -secretase cleavage can be mediated by ADAM17, at least upon stimulation with the phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Interestingly, the IGF-1-stimulated shedding, which requires ADAM17 for APLP2, requires ADAM10 for the APP cleavage [20]. This shows that α -secretase shedding of APP and APLP2 can be regulated in a different manner, despite the many similarities described above for the constitutive α -secretase cleavage. It will be interesting to see whether these differences also occur for other stimuli known to activate APP and APLP2 shedding.

In contrast to α - and β -secretase, we found that γ -secretase has multiple cleavage sites in the transmembrane domain of APLP2. This is also observed for other γ -secretase substrates, such as APP and Notch [47]. However, in contrast to APP the cleavage sites are not located in the middle of the predicted transmembrane domain, but are close to the N-terminal membrane boundary of APLP2 [15,56]. In APP the main γ -cleavage site after amino acid 40 of the A β sequence is 12 amino acids away from both ends of the transmembrane domain. In contrast, the main cleavage site in APLP2 is only around six residues away from the N-terminal membrane boundary. A similar situation is found for the γ -secretase substrate Notch-1, where the S4 cleavage site is also only seven amino acids away from the N-terminal membrane boundary [57]. Nevertheless, it may well be possible that the transmembrane domain of APLP2 is in fact around five amino acids longer than predicted at the N-terminal side, as discussed above for the α - and β -secretase cleavage (Fig. 5G). In this case, the main γ -cleavage site in APLP2 would be 11 residues away from the N-terminal end of the transmembrane domain and thus – similar to APP – roughly be located in the middle of the transmembrane domain.

The determination of the α -, β - and γ -secretase cleavage sites is the basis for further developments in APLP2 research. It will allow the generation of cleavage site-specific antibodies, which distinguish between the sAPLP2 forms generated by α - or β -secretase. Such antibodies will not only be valuable tools for studying APLP2 cleavage by both proteases, but may also be useful for biomarker studies in AD. In this disease, an increase in protein levels of BACE1 and a reduction of α -secretase cleavage is observed [reviewed in 28,58]. Potentially, the corresponding APLP2 cleavage fragments are changed in a similar way, which may be an additional approach to discriminate between AD patients and controls. This may be advantageous, as APLP2-derived peptides should not aggregate and not form deposits due to the lack of the A β domain. Thus, their levels should not be influenced by depositing peptides, similar to what was recently found for APLP1-derived A β -like peptides [59]. A second use of the cleavage sites of

APLP2 may be the dissection of the function(s) of APLP2. Potentially, sAPLP2 generated by α - or β -secretase has different functions, similar to what is known for APP. α -secretase-cleaved APP acts in a neurotrophic and neuroprotective manner [24,25,26], whereas β -secretase cleaved APP may be proapoptotic [22].

Given that APP α rescues the phenotype of APP single knock-out mice [27], it will be interesting to see whether expression of the α - or β -secretase-cleaved ectodomains of APP and APLP2 together are able to rescue the postnatal lethality in the APP/APLP2 double knock-out mice [9,10]. Such studies will provide further insights not only into the function of APLP2, but also of APP and into the functional overlap or functional divergence between both homologs.

Materials and Methods

Reagents

The following antibodies were used: FLAG M2 (Sigma), HA.11 (Covance), ADAM10 (Calbiochem-422751), ADAM17 (Oncogene), APLP2 (Calbiochem-171617 and 171616) HRP-coupled anti-rabbit and anti-mouse (DAKO), HRP-coupled anti-rat (Santa Cruz), Calnexin (Stressgen), β -actin (Sigma), monoclonal antibody (mAb) 22C11 (anti-APP ectodomain) from Konrad Beyreuther. The following reagents were used: α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, anti-FLAG M2 and anti-HA affinity gel from Sigma-Aldrich, metalloprotease inhibitor TAPI-1, BACE inhibitor C3, γ -secretase inhibitor X (referred to as Merck A) [46] and Dodecyl maltoside (DDM) from Calbiochem; siRNA pools siGenome against ADAM10 and 17, APLP2 and corresponding controls from Dharmacon. Lipofectamine 2000, RNaimax and TEV protease from Invitrogen; endoglycosidase H and N-glycosidase F from Roche; Acetonitrile (ACN) and trifluoroacetic acid (TFA) from Fluka. SILAC media were from Silantes.

Cloning

The APLP2-TEV-FLAG (APLP2TF) construct was cloned by the introduction of a TEV-cleavage site (ENLYFQG) followed by a FLAG-tag (DYKDDDDK) into the juxtamembrane region of APLP2-763 subcloned into the pcDNA3.1 zeo (+) vector (Invitrogen). The short peptide motifs were introduced between the respective nucleotides corresponding to amino acids M653 and V654 of the APLP2-763 sequence. Plasmids peak12-ADAM10, peak12-BACE1 and peak12-luciferase have been described [44]. HA-APLP2CTF-FLAG construct was produced through subcloning of the APLP2CTF into the backbone of a pcDNA 3.1 zeo (+) vector containing the N-terminal HA-tag, the linker region consisting of five glycines and the C-terminal FLAG-tag, which was described before [60].

Cell Culture, transfections, RNAi

HEK293-EBNA cells [21] were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco) containing 10% fetal calf serum (FCS/Gibco) as described [61,62]. SH-SY5Y cells were cultured in F12/DMEM (Lonza) supplemented with 15% FCS. SH-SY5Y cells with a lentivirus-induced stable knock-down of ADAM10 (shRNAs 7 and 9) were previously described [21]. Transient knockdown of ADAM10 and ADAM17 in HEK293E and SHSY5Y cells was performed as described [21]. In brief: Cells were transfected with either 10 nM (HEK293E) or 2 nM (SHSY5Y) of siGenome pool siRNA targeting ADAM10 or ADAM17 or the same amount of control siRNA (C2-pool) using RNAimax. After two days, transfection medium was replaced. After overnight incubation, conditioned medium and cell lysate (in 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% Nonidet P-40) were collected. For detection of ADAM 10 and ADAM17, cell membranes were prepared as described previously [63]. Transient APLP2 knock-down was performed using the siGenome pool siRNA in SH-SY5Y cells (2 nM).

Deglycosylation analysis

For deglycosylation analysis of APLP2, supernatants and cell lysates of SH-SY5Y cells were incubated either with or without 5 milliunits endoglycosidase H for 3 hours at 37°C or with or without 2.5 units of N-glycosidase F for 17 hours at 37°C. As a positive control, cell lysates from BACE1 overexpressing HEK293 cells were analyzed accordingly.

Generation of lentiviruses and transduction of primary neurons

Primary neuronal cultures were obtained from the cerebral cortex of embryonic day (E16) C57/BL6 mouse embryos, incubated with 200 U of papain (Sigma Aldrich) (30 min at 34°C) and subsequently mechanically dissociated and transduced using lentiviral shRNA knock-down constructs as described [21,64]. Breeding, maintenance and all experimental procedures on animals were approved and licensed by the Regierung von Oberbayern, Munich and were performed in accordance with German legislation and with the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Inhibitor treatment

Inhibition of α -, β - and γ -secretase was performed using TAPI-1 (50 μ M), C3 (1 μ M) and DAPT (1 μ M) respectively. Merck A (5 μ M) was used as a further γ -secretase inhibitor. For SH-SY5Y or HEK293 cells, 1 or 2 days after plating, the supernatant was exchanged with supernatant containing the respective inhibitors and conditioned supernatants and cell lysates were collected 24 hours later. Inhibitor treatment of the primary neurons started at 7DIV and was performed for 24 hours.

Determination of shedding sites

Determination of the shedding sites of APLP2 was performed as described for APP [21]. From the supernatant of HEK293 cells overexpressing pcDNA3.1/APLP2TF the shed ectodomain of APLP2TF was purified using anti-FLAG M2 agarose. The purified ectodomain was cleaved using TEV protease. The short peptide produced was again purified via anti-FLAG M2 agarose and subsequently analyzed in a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems).

Determination of γ -secretase cleavage sites

Peptides were purified from the supernatant from HEK293 cells stably overexpressing HA-APLP2CTF-FLAG applying anti-HA agarose and analyzed in a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems). For γ -secretase inhibition supernatant from cells was removed and cells were treated with Merck A (5 μ M) for 24 h prior to supernatant collection and subsequent analysis.

SILAC experiment

HEK293 cells stably overexpressing HA-APLP2CTF-FLAG were grown either in 'light' (12C6, 14N2 Lys; 12C6 14N4 Arg) or in 'heavy' medium (13C6, 15N2 Lys; 13C6 15N4 Arg) for at least six cell doublings before the actual experiment. For this, identical numbers of cells were plated in 'heavy' or 'light' medium. After overnight incubation the enriched medium was collected and equal quantities from both 'heavy' and 'light' cell supernatant was combined prior to immunoprecipitation with the anti-HA agarose. Cell lysates were produced for subsequent determination of the labeling efficiency.

Determination of labeling efficiency

For determination of the labeling efficiency, proteins from the cell lysates of the cells grown in the 'heavy' medium were separated on an SDS-Page gel. A band of the Coomassie stained gel at an apparent mass of around 90 kDa was cut out and tryptic in gel digestion of the proteins was performed [65]. Subsequently, peptides were analyzed by liquid chromatography (EASY nLC II, Proxeon) coupled to tandem mass spectrometry (LTQ Orbitrap Velos, Thermo) using a TOP10 method. Data analysis was performed using the Proteome Discoverer 1.2 (Thermo) with the embedded SEQUEST algorithm for protein identification. The International Protein Index database for human (version 3.78) was used for the database search with carbamidomethylation of cysteine as a static and oxidation of methionine as a dynamic modification. Quantification was performed using the 'precursor ions quantifier' node of the Proteome Discoverer 1.2.

Labeling efficiency was further validated in a control experiment. Equal amounts of supernatant from untreated 'light' and untreated 'heavy' labeled HA-APLP2CTF-FLAG HEK293 cells were combined and subsequent immunoprecipitation was performed as described above. The area under the isotopic peak cluster of every 'light' peptide was compared to the area under the isotopic peak cluster of the corresponding 'heavy' peptide. For the 'heavy' peptide, the +10 Da shifted (one 13C6 15N4 Arg per peptide) and the +16 Da supershifted (one 13C6 15N4 Arg and one 13C5 15N1 Pro per peptide) isotopic peak clusters were combined, as arginine-to-proline conversion played a significant role in our experiment [66]. Labeling efficiency was also found to be above 90% when determined by this method.

Acknowledgments

We thank Katrin Moschke for excellent technical help and Axel Imhof for providing the Voyager-DE STR mass spectrometer within the SFB596. We are grateful to Richard Page and Bastian Dislich for helpful comments on the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SH P-HK SFL. Performed the experiments: SH P-HK AC. Analyzed the data: SH P-HK AC SFL. Wrote the paper: SH SFL.

References

- Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H (2011) Regulated Intramembrane Proteolysis - Lessons from Amyloid Precursor Protein Processing. *J Neurochem* 117: 779–796.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100: 391–398.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29: 258–289.
- Reiss K, Saftig P (2009) The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 20: 126–137.
- Jacobsen KT, Iverfeldt K (2009) Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* 66: 2299–2318.
- Herns J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, et al. (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23: 4106–4115.
- Muller U, Cristina N, Li ZW, Wolfer DP, Lipp HP, et al. (1994) Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* 79: 755–765.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, et al. (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81: 525–531.
- Heber S, Herns J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, et al. (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20: 7951–7963.
- von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, et al. (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18: 661–669.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–356.
- Haass C (2004) Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* 23: 483–488.
- Lichtenthaler SF (2011) Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* 116: 10–21.
- Endres K, Postina R, Schroeder A, Mueller U, Fahrenholz F (2005) Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J* 272: 5808–5820.
- Eggert S, Paliga K, Soba P, Evin G, Masters CL, et al. (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279: 18146–18156.
- Li Q, Sudhof TC (2004) Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem* 279: 10542–10550.
- Pastorino L, Ikin AF, Lamprianou S, Vacaresse N, Revelli JP, et al. (2004) BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol Cell Neurosci* 25: 642–649.
- Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Minogue AM, Citron M, Van Leuven F, et al. (2010) beta-Secretase cleavage is not required for generation of the intracellular C-terminal domain of the amyloid precursor family of proteins. *FEBS J* 277: 1503–1518.
- Cong R, Biemesderfer D, Li Y (2011) ADAM 10 activity sheds the ectodomain of the amyloid precursor like protein-2 and regulates protein expression in proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C1366–C1374.
- Jacobsen KT, Adlerz L, Multhaup G, Iverfeldt K (2010) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-beta precursor protein (APP) and APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases. *J Biol Chem* 285: 10223–10231.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, et al. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29: 3020–3032.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457: 981–989.
- Li H, Wang B, Wang Z, Guo Q, Tabuchi K, et al. (2010) Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17362–17367.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, et al. (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12683–12688.
- Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, et al. (2004) Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24: 7707–7717.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, et al. (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67: 1882–1896.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, et al. (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27: 7817–7826.
- Lichtenthaler SF (2011) alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* 116: 10–21.
- Thinakaran G, Sisodia SS (1994) Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) is modified by the addition of chondroitin sulfate glycosaminoglycan at a single site. *J Biol Chem* 269: 22099–22104.
- Shunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo AC, Tanzi RE, et al. (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269: 2637–2644.
- Capell A, Steiner H, Willem M, Kaiser H, Meyer C, et al. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* 275: 30849–30854.
- Huse JT, Pjajk DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275: 33729–33737.
- Ulrich S, Münch A, Neumann S, Kremmer E, Tatzelt J, et al. (2010) The Novel Membrane Protein TMEM59 Modulates Complex Glycosylation, Cell Surface Expression and Secretion of the Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 285: 20664–20674.
- Stachel SJ, Coburn CA, Steele TG, Jones KG, Loutzenhiser EF, et al. (2004) Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem* 47: 6447–6450.
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, et al. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76: 173–181.
- Simons M, Destrooper B, Multhaup G, Tienari PJ, Dotti CG, et al. (1996) Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16: 899–908.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, et al. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314: 664–666.
- Thinakaran G, Slunt HH, Sisodia SS (1995) Novel regulation of chondroitin sulfate glycosaminoglycan modification of amyloid precursor protein and its homologue, APLP2. *J Biol Chem* 270: 16522–16525.
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1994) Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem* 269: 14227–14234.
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, et al. (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24: 742–752.
- Caescu CI, Jeschke GR, Turk BE (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J* 424: 79–88.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, et al. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248: 1122–1124.
- 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: 4687–4693.
- Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, et al. (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278: 48713–48719.
- Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K, et al. (2001) Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem* 276: 35235–35238.
- Lichtenthaler SF, Behr D, Grimm HS, Wang R, Shearman MS, et al. (2002) The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1365–1370.
- Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS (1996) The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. *J Biol Chem* 271: 31894–31902.
- Mann M (2006) Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 952–958.
- Lichtenthaler SF, Steiner H (2007) Sheddases and intramembrane-cleaving proteases: RIPPers of the membrane. Symposium on regulated intramembrane proteolysis. *EMBO Rep* 8: 537–541.
- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, et al. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2: 371–375.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, et al. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3922–3927.
- Slack BE, Ma LK, Seah CC (2001) Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J* 357: 787–794.
- Steiner DF (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 31–39.
- Grziba B, Grimm MO, Masters CL, Beyreuther K, Hartmann T, et al. (2003) The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *J Biol Chem* 278: 6803–6808.

55. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, et al. (2005) Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8: 161–171.
56. Nyborg AC, Ladd TB, Zwizinski CW, Lah JJ, Golde TE (2006) Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol Neurodegener* 1: 3.
57. Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, et al. (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J* 21: 5408–5416.
58. Rossner S, Sastre M, Bourne K, Lichtenthaler SF (2006) Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression—implications for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 79: 95–111.
59. Yanagida K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Kodama TS, et al. (2009) The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med* 1: 223–235.
60. Kuhn PH, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C, et al. (2007) Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem* 282: 11982–11995.
61. Schobel S, Neumann S, Hertweck M, Dislich B, Kuhn PH, et al. (2008) A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 283: 14257–14268.
62. Neumann S, Schobel S, Jager S, Trautwein A, Haass C, et al. (2006) Amyloid Precursor-like Protein 1 Influences Endocytosis and Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 281: 7583–7594.
63. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, et al. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2: 835–841.
64. Mitterreiter S, Page RM, Kamp F, Hopson J, Winkler E, et al. (2010) Bepiridil and amiodarone simultaneously target the Alzheimer's disease beta- and gamma-secretase via distinct mechanisms. *J Neurosci* 30: 8974–8983.
65. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856–2860.
66. Ong SE, Mann M (2006) A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* 1: 2650–2660.