

**Bildungsmechanismus und physiologische  
Relevanz supramolekularer Proteincluster des  
*Amyloid Precursor Protein APP* in der Zellmembran**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Arne Schreiber

aus

Köln

Bonn 2012

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-  
Universität Bonn

**1. Gutachter**

**Herr Prof. Dr. Thorsten Lang**

**2. Gutachter**

**Herr Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck**

**Tag der Promotion: 06.12.2012**

**Erscheinungsjahr: 2013**

## Erklärung

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

**Schreiber, A.**; Fischer, S.; Lang, T. (2012): The Amyloid Precursor Protein Forms Plasmalemmal Clusters via Its Pathogenic Amyloid- $\beta$  Domain. *Biophys. J* 102 (6), S. 1411–1417.

Weitere Publikationen, deren Daten nicht im Rahmen des Themas der hier vorliegenden Dissertation diskutiert wurden, sind:

Zilly, F. E.; Halemani, N. D.; Walrafen, D.; Spitta, L.; **Schreiber, A.**; Jahn, R.; Lang, T. (2011):  $\text{Ca}^{2+}$  induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions. *EMBO J* 30 (7), S. 1209–1220. Online verfügbar unter doi:10.1038/emboj.2011.53.

Bill, A.; Schmitz, A.; Albertoni, B.; Song, J.-N.; Heukamp, L. C.; Walrafen, D. et al. (2010): Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell* 143 (2), S. 201–211.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Kurzfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1	Demenz und Alzheimersche Erkrankung .....	4
2.2	Molekulare Grundlagen der Alzheimerschen Erkrankung .....	6
2.2.1	Das Protein Tau.....	6
2.2.2	Amyloide Plaques.....	7
2.2.3	A $\beta$ -Aggregation und die neuropathologische Rolle von A $\beta$ -Oligomeren .....	8
2.3	Die APP-Proteinfamilie .....	10
2.4	Das <i>Amyloid Precursor Protein</i> APP .....	10
2.5	Physiologische Funktionen von APP .....	12
2.6	Der zelluläre Transportweg von APP .....	14
2.7	Prozessierungswege von APP .....	16
2.7.1	Die $\alpha$ -Sekretase.....	18
2.7.2	Die $\beta$ -Sekretase.....	19
2.7.3	Der $\gamma$ -Sekretasekomplex .....	20
2.8	Allgemeine Zellmembranorganisation.....	22
2.8.1	Das <i>Picket-Fence</i> -Modell.....	24
2.8.2	Das <i>Membrane-Raft</i> -Modell.....	25
2.8.3	Proteincluster-Modell.....	27
2.8.4	Membrankompartimentierung durch elektrostatische Wechselwirkungen .....	28
2.8.5	Oligomerisierung und Clusterbildung von APP in der Zellmembran .....	29
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Material .....</b>	<b>33</b>
4.1	Materialien .....	33
4.1.1	Pufferlösungen .....	33
4.1.2	Zellkulturmedien .....	35
4.1.3	Zelllinien .....	36
4.1.4	Antikörper.....	36

---

4.1.5 Reagenzien und Kits .....	37
4.1.6 Bezogene DNS-Konstrukte.....	38
<b>5 Methoden.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Klonierung der APP-Konstrukte .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Präparation von Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Deckgläsern für die Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Zellkultur.....</b>	<b>41</b>
5.3.1 Auftauen von Zellen.....	41
5.3.2 Passagieren von Zellen .....	42
5.3.3 Passagieren von Zellen auf beschichtete Deckgläser .....	42
5.3.4 Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff .....	43
5.3.5 Transfektion von Zellen .....	43
5.3.6 Lyse von transfizierten PC12-Zellen und Proteinkonzentrationsbestimmung.....	44
<b>5.4 SDS-PAGE und Western Blot Analyse .....</b>	<b>44</b>
<b>5.5 Enzymatischer Glykokalyxverdau an lebenden Zellen.....</b>	<b>45</b>
<b>5.6 Präparation von <i>Membrane Sheets</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.7 Immunhistochemische Färbung .....</b>	<b>46</b>
5.7.1 Antikörperfärbung gegen endogenes APP.....	47
5.7.2 Zelloberflächenfärbung gegen verschiedene APP-Konstrukte .....	47
5.7.3 Antikörperfärbung gegen endogenes Clathrin.....	48
<b>5.8 Glykokalyxfärbung durch das Lektin WGA .....</b>	<b>48</b>
<b>5.9 Mikroskopie .....</b>	<b>49</b>
5.9.1 STED-Nanoskopie.....	49
5.9.2 <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP) Analyse .....	50
5.9.3 <i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i> (TIRFM).....	51
5.9.4 Epifluoreszenzmikroskopie .....	52
5.9.5 Analyse des Glykokalyxverdaus .....	53
5.9.6 Mikroskopie und Analyse der lateralen Verteilung der APP-Konstrukte .....	54
5.9.7 Mikroskopie und Analyse der Zelloberflächenimmunfärbung .....	55
5.9.8 Kolokalisationsanalyse der APP-Konstrukte mit Clathrin .....	55
<b>6 Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>

<b>6.1</b>	<b>Charaktisierung der lateralen Organisation von APP mittels STED-Nanoskopie .....</b>	<b>58</b>
<b>6.2</b>	<b>Mobilität und Verteilung von überexprimierten APP-Konstrukten – Die generelle Rolle der extra- und intrazellulären Domäne.....</b>	<b>61</b>
6.2.1	Western Blot Analyse der überexprimierten APP-Konstrukte Myc-App, $\Delta C$ und $\Delta N$ .....	61
6.2.2	Die Mobilität von überexprimierten APP in Abhängigkeit von der Zeitdauer nach der Transfektion .....	63
6.2.3	Mobilität von überexprimiertem APP und der Hauptdomänendeletionsmutanten in der Plasmamembran von PC12-Zellen.....	66
6.2.4	Mobilität von überexprimiertem APP und der Hauptdomänendeletionsmutanten in der Plasmamembran von HepG2-Zellen .....	68
6.2.5	Laterale Organisation von überexprimiertem APP und der Deletionsmutanten $\Delta N$ und $\Delta C$ .....	70
<b>6.3</b>	<b>Abhängigkeit der APP-Mobilität von der Glykokalyx und dem Glykosylierungsstatus der extrazellulären Domäne.....</b>	<b>72</b>
6.3.1	Enzymatischer Abbau der Glykokalyx.....	72
6.3.2	Mobilität von überexprimiertem APP in Abhängigkeit einer intakten Glykokalyx .....	74
6.3.3	Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und nicht-glykosylierten Mutanten .....	75
6.3.4	Mobilität von APP und nicht-glykosylierter Mutanten in PC12-Zellen .....	77
<b>6.4</b>	<b>Detaillierte Analyse des Einflusses der Ektodomäne von APP auf die Clusterdynamik.....</b>	<b>80</b>
6.4.1	Western Blot Analyse der Ektodomänendeletionskonstrukte .....	80
6.4.2	Die Mobilität der Ektodomänendeletionsmutanten wird von maximal fünf Aminosäuren bestimmt .....	82
6.4.3	Laterale Organisation der Ektodomänendeletionsmutanten in <i>Membrane Sheets</i> .....	86
6.4.4	Zellmembranständigkeit von überexprimiertem APP, $\Delta 22-596$ und $\Delta 22-601$ .....	91
<b>6.5</b>	<b>Einfluss einzelner Aminosäuren der A<math>\beta</math>-Peptidsequenz auf die plasmalemmale Organisation von APP .....</b>	<b>95</b>
6.5.1	Western Blot Analyse .....	95
6.5.2	Mobilität der Punktmutanten APP-R601G und APP-E618G.....	96

---

6.5.3 Laterale Organisation von APP-R601G und APP-E618G .....	98
<b>6.6 Kolokalisation von APP-Clustern mit Clathrinstrukturen in der Plasmamembran .....</b>	<b>101</b>
<b>7 Diskussion .....</b>	<b>106</b>
7.1 Laterale Organisation von APP in plasmalemmalen Proteinclustern.....	106
7.2 Plasmamembranlokalisation überexprimierter APP-Mutanten.....	107
7.3 Die Rolle der A $\beta$ -Region bei der Bildung von APP-Clustern.....	109
7.4 Mögliche Interaktionsmechanismen bei der plasmalemmalen Organisation von APP .....	110
7.5 Modell der lateralen Organisation von APP in plasmalemmalen Nanodomänen.....	113
7.6 APP-Membranproteincluster und ihre physiologische Bedeutung .....	116
7.7 Therapeutische Bedeutung des APP-Clusterbildungsmechanismus.....	117
7.8 Schlussfolgerung.....	119
7.9 Ausblick.....	119
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>138</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Anzahl von Menschen mit Demenz in entwickelten und sich entwickelnden Staaten.....	4
Abbildung 2	Neuropathologie der Alzheimerschen Erkrankung .....	5
Abbildung 3	Aggregation von A $\beta$ -Peptiden zu Oligomeren und Fibrillen .....	9
Abbildung 4	Die schematische Domänenstruktur von APP .....	11
Abbildung 5	Intrazellulärer Transport von APP .....	15
Abbildung 6	Die proteolytische Prozessierung von APP .....	17
Abbildung 7	Modell des $\gamma$ -Sekretase Proteolysemechanismus von dimeren $\beta$ -CTF.....	21
Abbildung 8	Der $\gamma$ -Sekretasekomplex.....	22
Abbildung 9	Das Flüssig-Mosaik-Modell und eine Klassifikation von Membrandomänen nach Größe .....	23
Abbildung 10	Das <i>Fence</i> - und das <i>Picket</i> -Modell.....	24
Abbildung 11	<i>Membrane-Rafts</i> in der Plasmamembran.....	26
Abbildung 12	Proteincluster-Modell von Syntaxin 1a .....	28
Abbildung 13	Der Einfluss von <i>Membrane-Rafts</i> auf die Produktion, Aggregation und Toxizität von A $\beta$ -Oligomeren .....	30
Abbildung 14	Präparation von <i>Membrane Sheets</i> .....	46
Abbildung 15	Laterale Organisation von APP in der basalen Plasmamembran von PC12-Zellen.....	59
Abbildung 16	Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und seiner Hauptdomänendeletionskonstrukte .....	62
Abbildung 17	Die Mobilität von überexprimiertem APP in der Zellmembran ist abhängig von dem Zeitpunkt der FRAP-Messung nach der Transfektion .....	64
Abbildung 18	Mobilität von überexprimiertem APP, APP- $\Delta$ N und APP- $\Delta$ C in der Zellmembran von PC12-Zellen.....	67
Abbildung 19	Mobilität von überexprimiertem APP und seiner Hauptdomänendeletionsmutanten in der Zellmembran von HepG2-Zellen .....	69
Abbildung 20	Laterale Organisation der Mutanten APP, $\Delta$ N und $\Delta$ C in der Zellmembran von PC12- und HepG2-Zellen .....	71
Abbildung 21	Lektin-Bindungsstudie nach enzymatischem Glykokalyxverdau..	73
Abbildung 22	Mobilität von überexprimiertem APP ohne und mit enzymatischer Degradation der Glykokalyx .....	74



Abbildung 23	Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und nicht-glykosylierten Mutanten in PC12-Zellen .....	76
Abbildung 24	Mobilitätsanalyse von APP und nicht-glykosylierter Mutanten in der Zellmembran von PC12-Zellen .....	78
Abbildung 25	Western Blot Analyse der Ektodomänendeletionsmutanten .....	81
Abbildung 26	Mobilität der Ektodomänendeletionsmutanten .....	83
Abbildung 27	Einfluss des Myc-Tags und der vier AS LEVP auf die Mobilität ...	85
Abbildung 28	Laterale Organisation der Ektodomänendeletionsmutanten in <i>Membrane Sheets</i> .....	88
Abbildung 29	Quantitative Analyse des Clustergrades von APP, $\Delta 22-596$ und $\Delta 22-601$ .....	89
Abbildung 30	Zelloberflächendetektion von überexprimiertem APP, $\Delta 22-596$ und $\Delta 22-601$ in PC12-Zellen .....	92
Abbildung 31	Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und der Punktmutanten APP-R601G und APP-E618G .....	96
Abbildung 32	FRAP-Analyse der Mobilität von überexprimiertem APP, APP-R601G und APP-E618G .....	97
Abbildung 33	Laterale Organisation von überexprimiertem APP, APP-R601G und APP-E618G .....	99
Abbildung 34	Abhängigkeit der Kolo-kalisation von APP mit Clathrinstrukturen erfordert eine intakte A $\beta$ -Sequenz und die C-terminale Domäne .....	103
Abbildung 35	Kolo-kalisation von überexprimiertem APP und Clathrin auf der Ebene einzelner Cluster .....	104
Abbildung 36	Modell zur Bildung von APP-Clustern in der Plasmamembran ..	114

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht und Informationen zu den verwendeten Konstrukten ...	40
-----------	--	----

## Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>Arbitrary Unit</i>
A $\beta$	Amyloid-beta
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADDL	<i>A<math>\beta</math>-derived diffusible ligand</i>
AICD	<i>APP Intracellular Domain</i>
AK	Antikörper
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APPs	<i>Soluble Amyloid Precursor Protein</i>
AS	Aminosäure
BACE	<i><math>\beta</math>-Site APP Cleaving Enzyme</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
CTF	C-terminales Fragment
DABCO	1, 4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIK	Differentieller Interferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRM	<i>Detergent Resistant Membrane</i>
EmGFP	Emerald grün fluoreszierendes Protein
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum,</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
KO	<i>Knock out</i>
KPI	Kunitz-Proteaseinhibitordomäne
Lsg.	Lösung
NA	Numerische Apertur
PALM	<i>Photoactivated Localization Microscopy</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PNGase F	Peptid-N-(N-acetyl- $\beta$ -glucosaminy)-Asparaginamidase
PS	Präsenilin
PSF	Punktspreizfunktion
ReC <sub>Max</sub>	<i>Maximum Recovery Value</i>
Rel.	Relativ
ROI	<i>Region Of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error Of The Mean</i>
SNARE	<i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor</i>
SP	Signalpeptid
Std.	Stunde
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit der Fluoreszenzrückkehr bei der FRAP-Mikroskopie
TIRFM	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i>
TMA-DPH	1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1;3;5;-Hexatrien-p-Toluolsulfonat
TMR	Transmembranregion
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

## Aminosäuren-Kürzel:

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

# 1 Kurzfassung

Proteine in biologischen Membranen sind in der Regel heterogen in Domänen organisiert. Die Mechanismen dieser Segregation in Membranproteincluster unterschiedlicher Zusammensetzung sind noch immer unverstanden.

Auch das *Amyloid Precursor Protein* APP bildet Proteincluster in der Plasmamembran, welche die Endozytose von APP in das frühe Endosomenkompartiment begünstigen können. Dies ist von besonderer Bedeutung, da APP nach seiner Internalisierung durch proteolytische Prozessierung u.a. in das A $\beta$ -Peptid gespalten wird. Dieses Peptid kann entweder in seiner aggregierten Form, den sogenannten amyloiden Plaques, oder als lösliches Oligomer der Auslöser neurodegenerativer Veränderungen bei der Alzheimerschen Demenz sein. Der eigentliche Bildungsmechanismus der plasmalemalen APP-Cluster ist ungeklärt.

In dieser Arbeit wurde daher der APP-Clustermechanismus systematisch unter Anwendung verschiedener Mikroskopiemethoden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass APP in der Plasmamembran hauptsächlich über seine extrazelluläre Domäne aggregiert. Dabei haben die Glykokalyx und der Glykosylierungsstatus von APP keinen Einfluss auf die Clusterbildung. Auch eine sterische Hinderung oder Friktion der großen Ektodomäne mit der umgebenden Zellmatrix konnte als Ursache für die Proteinaggregation ausgeschlossen werden. Vielmehr wurde in dieser Arbeit eine fundamentale Rolle der fünf ersten Aminosäuren DAEFR in der N-terminalen A $\beta$ -Region bei der lateralen Organisation von APP in Proteincluster entdeckt. Diese fünf Aminosäuren stellen eine notwendige Bedingung für die Bildung von Proteinclustern dar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass stabile APP-Cluster eine notwendige Voraussetzung für den Aufenthalt von APP in Clathrinmembrandomänen und somit auch für die Endozytose von APP sind.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten beschreiben eine bisher unbekanntة physiologische Funktion der N-terminalen A $\beta$ -Sequenz bei der Regulation der Clusterbildung und der Endozytose von APP. Da nach der Internalisierung in das frühe Endosomenkompartiment das A $\beta$ -Peptid durch proteolytische Spaltung entsteht, steuert die A $\beta$ -Region im intakten Protein folglich die Prozessierung zum neurotoxischen A $\beta$ -Peptid. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein vollkommen neuer Therapieansatz für die Alzheimersche Erkrankung diskutiert, der darauf

---

beruht, die Clusterbildung durch an die extrazelluläre A $\beta$ -Region bindende Moleküle zu stören.

## 2 Einleitung

Robert Hooke erkannte anhand mikroskopischer Untersuchungen von Korkschnitten, dass Pflanzen aus kleinen Kammern aufgebaut sind und benutzte für diese Bausteine zum ersten Mal im biologischen Kontext die Bezeichnung Zelle (lat. *cellula* = Kämmerchen oder Zelle, Hooke 1665). Aufbauend auf den Untersuchungen von Matthias Jacob Schleiden übertrug der Begründer der Zelltheorie Theodor Schwann dieses Bauprinzip auch auf Tiere und postulierte das Konzept der Zelle als ein allgemeines Struktur- und Entwicklungsprinzip von Lebewesen (Schleiden 1838; Schwann und Schleiden 1847; Wehner et al. 1995). Nachdem Louis Pasteur erkannt hatte, dass das Leben nicht „*de novo*“ entsteht, prägte Virchow, auch basierend auf eigenen Arbeiten, den Satz „*omnis cellula ex cellula*“ (Virchow 1858). Dies bedeutet, dass Zellen sich nicht neu bilden können, sondern immer durch Reproduktion aus Vorläuferzellen hervorgehen. Eine wichtige Erkenntnis der Zelltheorie ist, dass die Zelle die kleinste, selbstständig lebensfähige Einheit eines Organismus ist und somit als Grundbaustein des Lebens betrachtet werden kann.

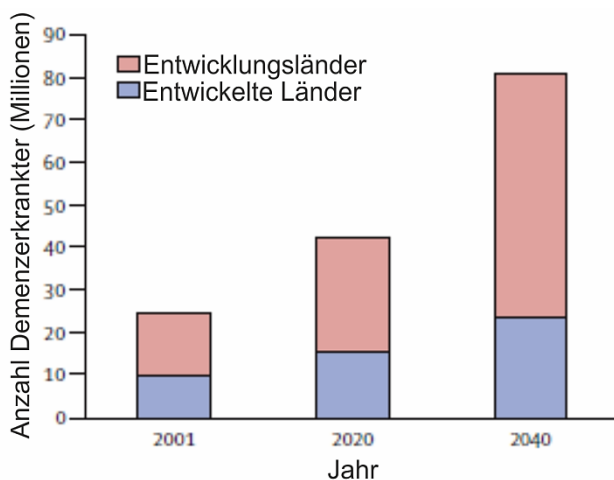
Zellen grenzen sich zu ihrer Umwelt durch eine Zellmembran ab, welche aus einer Lipiddoppelschicht mit integralen bzw. assoziierten Membranproteinen besteht. Diese sorgt nicht nur für die Kompartimentierung und Aufrechterhaltung eines geordneten chemischen Systems (Alberts 2011), sondern ist als eine selektive Barriere auch an einer Vielzahl lebenswichtiger biologischer Vorgängen beteiligt. Dazu zählen die Informationsweiterleitung bzw. -verarbeitung, der Energiehaushalt und der Austausch von Stoffen mit der Umgebung (Nelson et al. 2001; Alberts 2011). Zellmembranen sind nicht homogen sondern heterogen aufgebaut, da sie einen hohen Grad an lateraler Organisation von Membranlipiden und -proteinen in Nano- und Mikrodomänen zeigen (Jacobson et al. 2007; Lang und Rizzoli 2010).

Auch das *Amyloid Precursor Protein* (APP) ist als ein Transmembranprotein in der Plasmamembran in Nanodomänen, den sogenannten Proteinclustern, organisiert (Schneider et al. 2008). Die Bildung dieser APP-Cluster ist dabei nicht nur von phänomenologischem Interesse, sondern scheint durchaus auch von physiologischer Relevanz zu sein. So konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Clusterbildung mit einer verstärkten Endozytose von APP einhergeht und dies zu einer Zunahme proteolytischer Prozessierung samt Bildung des humanpathogenen APP-Spaltproduktes A $\beta$ -Peptid führt (Schneider et al. 2008).

Dieses Peptid gilt heutzutage als ein Hauptfaktor in der häufigsten Form der Demenz, der Alzheimerschen Erkrankung. Deshalb wird im Folgenden erst der Zusammenhang zwischen APP, seiner proteolytischer Spaltung und der Alzheimerschen Erkrankung erläutert, bevor auf die Mechanismen der Clusterbildung im Allgemeinen und der von APP im Besonderen eingegangen wird.

## 2.1 Demenz und Alzheimersche Erkrankung

Unsere Gesellschaft lebt in einer ihrer Geschichte einmaligen Phase des Wohlstandes und der Prosperität. Zu den Vorzügen dieser Entwicklung zählt eine stark gestiegene Lebenserwartung in den entwickelten Industrieländern, aber auch in Schwellen- und Entwicklungsländern ist diese zunehmend. Liegt der Anteil der über 65-Jährigen in Deutschland derzeit bei ca. 21 %, so wird dieser für das Jahr 2040 bereits auf ca. 32 % prognostiziert (Destatis, Variante 1-W1: <https://www.destatis.de/ bevoelkerungspyramide/>).

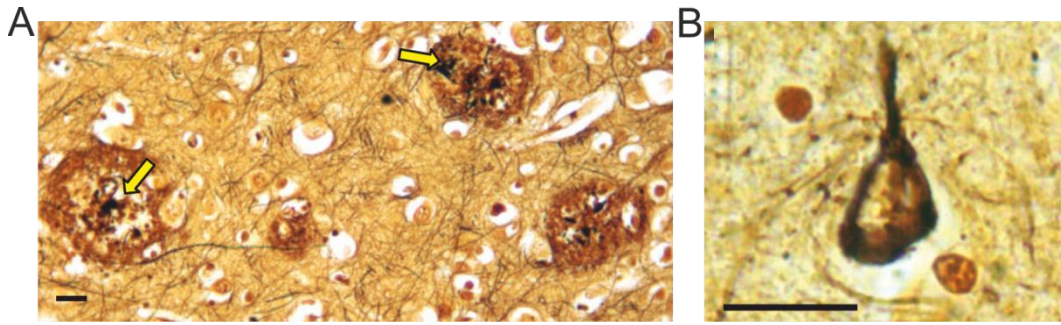


**Abbildung 1 Anzahl von Menschen mit Demenz in entwickelten und sich entwickelnden Staaten.**

Die weltweite Anzahl der Demenzerkrankungen wird in den nächsten Jahren rasant zunehmen. Auch wenn in den derzeitigen Industrieländern die Prävalenz für Demenzerkrankungen mit z.B. 5,4 % in Europa noch höher ist als in aufstrebenden Entwicklungsländern wie China mit 4,0 % oder Indien mit 1,9 %, werden

sich die Gewichte in den nächsten Jahrzehnten aufgrund steigender Lebenserwartungen immer stärker zu den Entwicklungsländern hin verschieben. Die Abbildung zeigt absolute Fallzahlen und wurde modifiziert aus Ferri et al. (2005) übernommen.

Dadurch werden altersbedingte Erkrankungen wie z.B. Krebs und Demenz ein immer drängenderes Problem werden. Gab es im Jahr 2001 weltweit 24,3 Millionen Demenzerkrankte, so wird deren Anzahl für das Jahr 2020 auf 42,3 Millionen und für das Jahr 2040 auf 81,1 Millionen geschätzt (Ferri et al. 2005). Dies entspricht einer relativen Zunahme von 2001 bis 2040 von 334 %. Dabei verschieben sich die Gewichte weiter zu den sich derzeit noch entwickelnden



### Abbildung 2 Neuropathologie der Alzheimerschen Erkrankung

(A) Histologisches Präparat aus einem Gehirn eines Alzheimerpatienten mit A $\beta$ -positiven Plaques (gelbe Pfeile). (C) Histologisches Neuropilpräparat mit neurofibrillären Taubündeln und dystrophen Neuriten bei Alzheimer. Abbildung ist verändert aus O'Brien und Wong (2011) übernommen.

Länder mit einer niedrigen Prävalenz für Demenz, wie z.B. China und Indien (siehe Abb. 1).

Der Begriff Demenz ist ein übergeordneter Begriff und subsumiert neurodegenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, welche zu messbaren Defiziten in dem Erinnerungsvermögen und anderer kognitiver Fähigkeiten der Patienten führt (American Psychiatric Association 1994; 2012 Alzheimer's disease facts and figures 2012). Die mit Abstand häufigste Ursache für Demenz ist die Alzheimersche Erkrankung, die für 60 bis 80 % der Demenzerkrankungen verantwortlich ist. Der Erkrankung liegt ein zunehmender Verlust an Gehirnmasse zugrunde, ausgelöst durch neuronalen Zelltod (Terry et al. 1991; DeKosky et al. 1996; Chan et al. 2003).

Im Fall der sogenannten familiären Alzheimerschen Erkrankung kann dieser Zelltod genetisch durch Mutationen im APP-, Präsenilin1- und Präsenilin2-Gen hervorgerufen werden. Allerdings wird der Anteil des familiären Typus an der Gesamtheit aller Alzheimerschen Erkrankungen auf lediglich < 1 bis 15 % taxiert (Crews und Masliah 2010; O'Brien und Wong 2011; 2012 Alzheimer's disease facts and figures 2012).

Die Hauptmasse der Alzheimerschen Demenz gehört der sogenannten „sporadischen“ Form an. Bei dieser Art von Alzheimer kennt man die Ursache der Erkrankung nicht. Neuropathologisch gehen aber alle Fälle von Alzheimer mit A $\beta$ -Ablagerungen, den Plaques, und neurofibrillären, hyperphosphorylierten Taubündeln im Gehirn einher, welche aber nur postmortal als sicheres Diagnosekriterium dienen können (Abb. 2 A und B). Während die familiäre Alzheimersche Erkrankung auch junge Menschen < 30 Jahren betreffen kann, findet man die sporadische Form hauptsächlich bei Menschen > 65 Jahren.



Bei der sporadischen Alzheimerform ist das größte Erkrankungsrisiko das Alter. Daneben wurden aber auch andere Faktoren gefunden, welche mit einer Entwicklung von Alzheimer positiv korrelieren. So ist die familiäre Vorbelastung ein wichtiger Faktor, auch wenn genetische Ursachen nicht immer klar sind (Fratiglioni et al. 1993; Lautenschlager et al. 1996; Green et al. 2002). Auch Kopf- und traumatische Gehirnverletzungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken (Lye und Shores 2000). Daneben gibt es eine enge Verbindung zwischen Alzheimer und Herz-Kreislaufkrankungen. Faktoren wie mangelnde Bewegung, Rauchen, Alkohol, Fettleibigkeit, ein erhöhter Cholesterinspiegel oder auch Diabetes erhöhen das Krankheitsrisiko deutlich (Ballard et al. 2011; 2012 Alzheimer's disease facts and figures 2012).

Trotz jahrzehntelanger, intensiver Suche nach Wirkstoffen, ist die Alzheimersche Erkrankung medikamentös bis heute weder heilbar noch deren Verlauf signifikant zu verlangsamen. Daher beschränken sich Therapien bisher auf die medikamentöse Behandlung der klinischen und psychischen Symptomatik, kognitives Training und auf die Unterstützung und eine allgemeine Verbesserung der Lebensumstände von Hilfebedürftigen und ihrer Angehörigen (Ballard et al. 2011; 2012 Alzheimer's disease facts and figures 2012).

## **2.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimerschen Erkrankung**

Die molekularen Ursachen von Alzheimer sind noch immer Gegenstand einer kontrovers geführten Debatte (Benilova et al. 2012). Sicher scheint nur, dass sowohl extrazelluläre A $\beta$ -Ablagerungen (Plaques) als auch intrazelluläre, hyperphosphorylierte, neurofibrilläre Taubündel im Gehirn von Alzheimerpatienten charakteristische Kennzeichen der Alzheimerschen Erkrankung sind (Alzheimer 1906; Glenner und Wong 1984; Delacourte und Defossez 1986; Grundke-Iqbal et al. 1986).

### **2.2.1 Das Protein Tau**

Das Protein Tau ist in seiner physiologischen Form mit Mikrotubuli assoziiert (Goedert et al. 1988) und scheint diese zu stabilisieren (Lee und Rook 1992). Zudem unterstützt Tau die Polymerisation von Tubulin (Weingarten et al. 1975; Medeiros et al. 2011). Neben der für die physiologische Funktion wichtigen Phosphorylierung von Tau, kann es auch zur einer Hyperphosphorylierung kommen. So kann man im Falle von Alzheimer im Gehirn von Patienten einen bis zu 9,5-mal höheren Phosphorylierungsgrad von Tau feststellen, der mit einer

proteolytischen Spaltung von Tau einhergeht. Dabei ändert sich die Konformation von Tau, was zu einer verminderten Mikrotubulibindung und, über eine Tau-Oligomerisierung, zu einer Aggregation in neurofibrillären Bündeln führt (Kayed 2010; Obulesu et al. 2011). Neben der dadurch bedingten Störung des axonalen Transports und des Neuritenwachstums, führt dies in letzter Konsequenz zum Tod der betroffenen Nervenzellen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Hyperphosphorylierung und proteolytische Spaltung durch A $\beta$ -Peptidoligomere ausgelöst werden können (Gotz et al. 2001; de Strooper 2010; Selkoe 2011), und die Taupathologie zur Neurotoxizität der Alzheimerschen Demenz beitragen kann. Dabei reicht die Taupathologie alleine zur Ausbildung des Alzheimerphänotyps zwar nicht aus, kann aber, einmal ausgelöst, unabhängig von der A $\beta$ -Peptidaggregation voranschreiten.

### 2.2.2 Amyloide Plaques

Das andere Kennzeichen von Alzheimer sind die sogenannten amyloiden Plaques in der grauen Substanz von Alzheimerpatientengehirnen. Als Hauptbestandteil dieser Ablagerungen wurde im Jahr 1984 das Amyloid- $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) identifiziert (Glennner und Wong 1984). Das A $\beta$ -Peptid entsteht durch proteolytische Prozessierung aus dem Vorläuferprotein APP (siehe auch Abschnitt 2.4 und 2.7).

Man unterscheidet zwischen neuritischen Plaques, welche zuerst als Merkmal der Erkrankung durch Alois Alzheimer (Alzheimer) entdeckt worden sind, und sogenannten diffusen Plaques, welche erst wesentlich später durch A $\beta$ -sensitive, immunhistochemische Methoden entdeckt werden konnten (Yamaguchi et al. 1988).

Dabei sind die diffusen Plaques wesentlich häufiger anzutreffen als die neuritischen Plaques und kommen auch in Gehirnarealen vor, welche normalerweise keine Läsionen während der Alzheimerschen Erkrankung aufweisen. Sie zeigen einen wenig dichtgepackten Phänotyp und kommen auch in der Gehirnmasse von klinisch gesunden Menschen vor, stellen also kein eindeutiges Merkmal der Alzheimerschen Erkrankung dar. Es wird allerdings vermutet, dass die diffusen Plaques Vorstufen der neuritischen sein könnten (Selkoe 2001; Irvine et al. 2008).

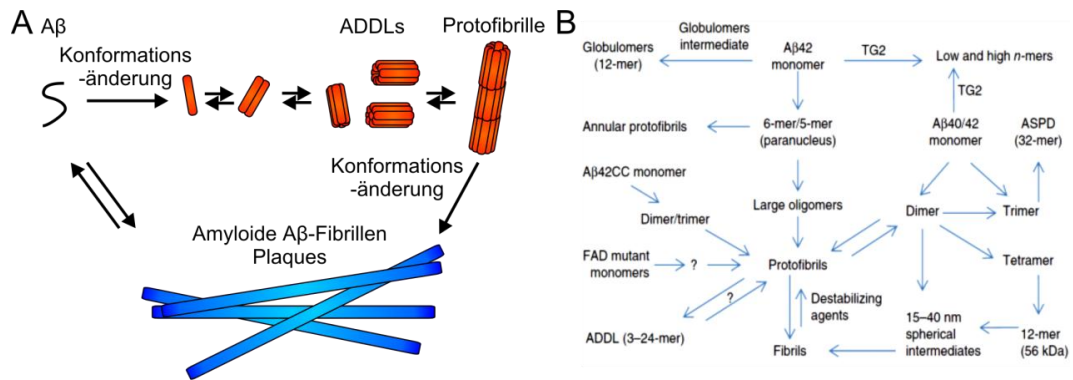
Neuritische Plaques haben eine dichtgepackte, fibrilläre Morphologie und können mit Kongorot und Thioflavin gut angefärbt werden (Bennhold 1922; LeVine 1993). Sie bestehen zum überwiegenden Teil aus einer 42 Aminosäuren langen A $\beta$ -

Peptidvariante ( $A\beta_{42}$ ) und zu einem geringeren Teil aus einer Variante mit einer Länge von 40 Aminosäuren ( $A\beta_{40}$ ), obwohl  $A\beta_{42}$  gerade einmal 10 % der Gesamtpeptidmenge an  $A\beta$  ausmacht (Selkoe 2001; Thinakaran und Koo 2008). Die neuritischen Plaques sind von einem Vorhof aus dystrophen Neuronen und Mikrogliazellen umgeben und ein spezifisches Kennzeichen der Alzheimerschen Erkrankung. Daher werden sie auch senile Plaques genannt. Als möglicher neurotoxischer Wirkmechanismus der neuritischen Ablagerungen kommt eine Störung der  $Ca^{2+}$ -Homöostase von Neuronen in Betracht, welche zu einer strukturellen und funktionellen Störung neuronaler Netzwerke führt (Kuchibhotla et al. 2008). Neben den senilen Plaques in der grauen Substanz kommen auch vaskuläre Plaques im Endothel von zerebralen Blutgefäßen vor, welche ebenfalls aus einer  $A\beta_{42/40}$ -Komposition bestehen. Diese können durch Verstopfung von Kapillaren ebenfalls neuronale Atrophien bei Alzheimer unterstützen (Roher et al. 1993).

### 2.2.3 $A\beta$ -Aggregation und die neuropathologische Rolle von $A\beta$ -Oligomeren

Trotz solcher Befunde ist es immer noch unklar, ob amyloide Plaques überhaupt entscheidend an der neurodegenerativen Wirkung von der Alzheimer beteiligt sind. So korreliert z.B. die Schwere der Alzheimerschen Demenz eher mit der Menge an löslichem  $A\beta$ -Peptid in der Zerebrospinalflüssigkeit als mit der Anzahl seniler Plaques (Lue et al. 1999; McLean et al. 1999; Naslund et al. 2000). Während lösliche  $A\beta$ -Peptide in monomerer Form keinerlei neurotoxische Wirkung zeigen, sind es vor allem oligomere  $A\beta$ -Peptidaggregate, welche eine Reihe von zytotoxischen Eigenschaften besitzen (Crews und Masliah 2010).

$A\beta$ -Oligomere entstehen durch konformationelle Änderungen von 4 kDa großen  $A\beta$ -Monomeren. Dabei ändert sich die  $\alpha$ -helikale Konformation der Monomere in eine hydrophobere  $\beta$ -Sheet-Konformation, z.B. durch Mediation von *Membran-Raft*-assoziiertem Gangliosid GM1 (siehe Abschnitt 2.8.2, Ikeda et al. 2011) oder durch Clusterin (Oda et al. 1995). Dadurch neigen die nun hydrophoberen Monomere in einer hydrophilen Umgebung zu oligomerisieren. Die Größe der Oligomere reicht von Di- zu 24meren. Oligomere von  $A\beta$ -Peptiden mit einer Molekülmasse  $> 12$  kDa werden dabei häufig als " *$A\beta$ -derived diffusible ligands*" (ADDL) bezeichnet. Diese ADDLs scheinen dabei eine besondere Rolle in der Neuropathologie von Alzheimer zu haben, da ihnen eine starke Verbindung zu



**Abbildung 3 Aggregation von Aβ-Peptiden zu Oligomeren und Fibrillen**

(A) Modell zur Polymerisation von Monomeren zu Aβ-Fibrillen. Aβ-Monomere unterlaufen eine konformationelle Änderung und aggregieren zu Oligomeren. Diese polymerisieren weiter zu Protofibrillen, welche durch eine erneute konformationelle Änderung zu amyloiden Aβ-Fibrillen auswachsen. Alternativ können Monomere auch direkt mit den Fibrillen assoziieren. Die Abbildung wurde nach (Glabbe 2008) und de Strooper (2010) erstellt. (B) Die genauen Aggregationsmechanismen sind noch nicht genau geklärt. So scheint es ein komplexes Netz aus Oligomerisierungspfaden zu geben, welche nicht zwangsläufig in einer Fibrillenbildung enden müssen. Die Abbildung wurde aus Benilova et al. (2012) übernommen.

kognitiven Defiziten in Alzheimermodellmäusen und –ratten zugesprochen wird (Glabbe 2008). In einem simplifizierten Modell aggregieren diese ADDLs weiter zu unlöslichen Protofibrillen, welche schließlich zu Fibrillen auswachsen (Abb. 3 A). Alternativ zu der fortgesetzten Bildung aus Protofibrillen können amyloide Fibrillen direkt mit Monomeren assoziieren (Glabbe 2008). Dabei ist die exakte Biophysik hinter der Aβ-Polymerisation noch nicht genau verstanden und es scheint, dass eine Vielzahl von verschiedenen Aβ-Oligomertypen existiert, welche nicht zwangsläufig in einen fibrillären Zustand übergehen müssen (Benilova et al. 2012, Abb. 3 B).

Gemein ist all diesen Oligomeren lediglich Ihre Neurotoxizität, auch wenn der zugrundeliegende Toxizitätsmechanismus unterschiedlich sein kann. Aβ-Oligomere werden neuropathologisch mit veränderter Ionen-Homöostase, oxidativen Stress, Verlust von Synapsen, Aktivitätsbeeinträchtigungen verschiedener Kinasen, Reduzierung der Konzentration an Zellmembranrezeptoren wie des Insulinrezeptors oder des NMDA-Rezeptors, Veränderung der Membranlokalisierung des Glutamaterezeptors mGluR5, Induzierung der Tau-Hyperphosphorylierung und der Aktivierung von Apoptose in Verbindung gebracht (Renner et al. 2010; Sakono und Zako 2010; O'Brien und Wong 2011).

Auf funktioneller Ebene besonders interessant für die Entwicklung der Demenzsymptomatik von Alzheimer ist die durch Aβ-Oligomere induzierte

Inhibition der Langzeitpotenzierung und Verstärkung von Langzeitdepressionen, sowie eine pathologische Veränderung der synaptischen Plastizität (z.B. Hsieh et al. 2006; Townsend et al. 2006; Shankar et al. 2008).

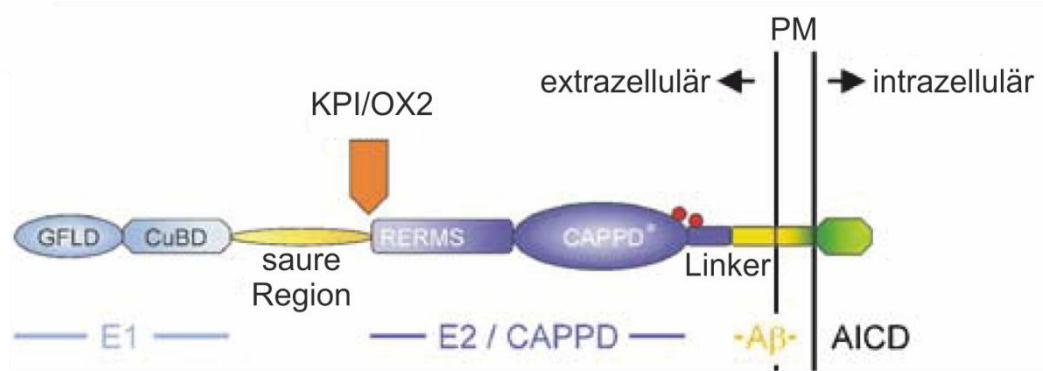
### 2.3 Die APP-Proteinfamilie

APP ist ein Mitglied einer evolutionär hochgradig konservierten Proteinfamilie, deren Mitglieder in vielen Organismen vorkommen. Beispielhaft für Invertebraten ist z.B. das APP-Ortholog APL-1 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Daigle und Li 1993) oder das *APP-like* Protein (APPL) der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Rosen et al. 1989; Luo et al. 1990). Auch Vertebraten weisen eine Reihe von APP-Orthologen auf. Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Okado und Okamoto 1992; van den Hurk et al. 2001) oder der Zebrafisch *Danio rerio* (Musa et al. 2001) exprimieren z.B. das Protein APP-A bzw. APPa und b. Säugetiere wie z.B. Maus oder Ratte produzieren eine dem menschlichen APP eng verwandte APP-Variante (Reinhard et al. 2005).

Im Menschen, aber z.B. auch in der Maus, kommen neben dem APP noch zwei Homologe vor: das *Amyloid Precursor Like Protein* (APLP) 1 und 2 (Zheng und Koo 2011).

### 2.4 Das Amyloid Precursor Protein APP

APP ist ein integrales Typ-I-Transmembranprotein. Es besitzt eine große extrazelluläre Domäne, welche auch Ektodomäne oder N-terminale Domäne genannt wird. Daneben hat es eine Transmembranregion (TMR) mit einem einfachen,  $\alpha$ -helikalen Membrandurchgang. Die intrazelluläre Domäne ist im Vergleich zur Ektodomäne eher kurz und wird auch Endodomäne oder C-terminale Domäne genannt. APP ist beim Menschen auf dem Chromosom 21 lokalisiert und besitzt mindestens 18 Exons, welche für 3,3 bis 3,5 kb RNA-Transkripte kodieren (siehe z.B. Goldgaber et al. 1987; Kang et al. 1987; Robakis et al. 1987; Yoshikai et al. 1991). Obwohl APP ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird, kann der Expressionsgrad gewebespezifisch unterschiedlich sein. Der höchste Expressionsgrad von APP im Menschen ist z.B. in Niere, Herz und Gehirn gefunden worden (Tanzi et al. 1987). Daneben werden auch verschiedene Spleißisoformen mit unterschiedlicher Länge exprimiert, von denen die Varianten mit 770 Aminosäuren (APP<sub>770</sub>), 751 Aminosäuren (APP<sub>751</sub>)



**Abbildung 4 Die schematische Domänenstruktur von APP**

APP<sub>695</sub> besitzt mit 624 AS eine relativ große extrazelluläre Domäne, die Transmembranregion (TMR) durchspannt die Plasmamembran (PM)  $\alpha$ -helikal mit 24 AS und die intrazelluläre Domäne besteht aus 47 AS. Nicht eingezeichnet ist das Signalpeptid SP (AS 1-17). Direkt auf das SP folgt die E1-Subdomäne (AS 18-189), welche sich aus der „Growth Factor Like“- (GFLD)-Domäne, die auch als heparinbindenden Domäne (HBD1) bezeichnet wird, sowie der kupferbindenden (CuBD) und der zinkbindenden Domäne (ZnBD, nicht eingezeichnet) zusammensetzt. Die saure Region (AS 190-264) besitzt einen Anteil von 56 % an den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat. An der AS-Position 290 befinden sich bei APP<sub>770</sub> die Kunitz-Proteaseinhibitor-domäne (KPI) und die OX2-Region. Auf die wenig strukturierte saure Region folgt die E2-Subdomäne (AS 290-495), oder auch „Central APP Domain“ (CAPPD) genannt, welche das RERMS-Motiv enthält. Die Linker-Region (AS 507-588), welche keine Standardsekundärstruktur einnimmt, verbindet die E2-Domäne mit der A $\beta$ -Region (AS 597~636). Die intrazelluläre Domäne (AS 649-695) beinhaltet z.B. das YENPTY-Motiv, welches z.B. die Internalisierung reguliert. AICD: APP Intracellular Domain (AS 637~695), Spaltprodukt der  $\gamma$ -Sekretase. Die Abbildung wurde aus Reinhard et al. (2005) übernommen und verändert.

und 695 Aminosäuren (APP<sub>695</sub>) die am häufigsten vorkommenden Isoformen sind. Die Expression der verschiedenen Spleißprodukte kann zelltypabhängig variieren. APP<sub>695</sub> ist z.B. die dominante Isoform in menschlichen Neuronen des zentralen Nervensystems (Wertkin et al. 1993).

APP<sub>770</sub> besitzt, im Gegensatz zu APP<sub>695</sub>, N-Terminal die 56 AS große sogenannte KPI-Domäne und eine 19 AS große OX2-Sequenz (Gralle et al. 2002), dahingegen fehlt APP<sub>751</sub> die OX2-Sequenz (Abb. 4).

Die Ektodomäne von APP wird zudem in weitere Unterdomänen unterteilt (siehe Abb. 4). Die ersten 17 Aminosäuren gehören zu dem Signalpeptid, welches APP zur Plasmamembran dirigiert. Des Weiteren wurden mit der E1- und E2-Domäne zwei weitere große N-terminale Domänen identifiziert, welche durch einen glutamat- und aspartatreichen Abschnitt getrennt werden, der auch als saure („acidic“) Region bezeichnet wird und keine bekannten Sekundärstrukturelemente aufweist (Gralle et al. 2002).

Auf die E2-Domäne folgend, findet sich ein weiterer Abschnitt der keine geordnete Sekundärstruktur besitzt und als „*Random Coil*“- (RC)-, Juxtamembran- oder Linkerregion bezeichnet wird (Gralle et al. 2002; Reinhard et al. 2005). Die E1-Domäne folgt direkt auf das Signalpeptid und setzt sich ihrerseits aus einer heparinbindenden Domäne (HBD1), welche auch als „*Growth Factor Like*“- (GFLD)-Domäne bezeichnet wird, einer kupferbindenden (CuBD) und einer zinkbindenden (ZnBD) Domäne zusammen (Rossjohn et al. 1999; Gralle et al. 2002; Kaden et al. 2012). Die Subdomäne E2, auch „*Central APP Domain*“ (CAPPD) genannt, beinhaltet die Peptidsequenz RERMS sowie eine weitere heparinbindende Domäne (HBD2) und eine mit Kollagen interagierende Domäne (CBD) (Storey und Cappai 1999; Reinhard et al. 2005; Gralle und Ferreira 2007; Kaden et al. 2012). Abwärts der Juxtamembranregion folgt die Amyloid- $\beta$ - (A $\beta$ )- Sequenz, der Ursprung des A $\beta$ -Peptids nach proteolytischer Spaltung von APP (siehe Abschnitt 2.7). Die A $\beta$ -Sequenz reicht in die Transmembranregion hinein und weist eine Sekundärstruktur auf, die durch zwei  $\alpha$ -Helices, verbunden über eine *Loop*-Region, charakterisiert ist. Auf die 24 Aminosäuren der Transmembranregion folgt die intrazelluläre Endodomäne. Deren auffälligste Region ist die YENPTY-Sequenz, die als Variation des grundlegenden NPXY-Internalisierungsmotives die clathrinabhängige Endozytose reguliert. Zudem kann APP über dieses Motiv mit einer Reihe von Adaptorproteinen und Kinasen interagieren (Muller und Zheng 2012). VT<sup>668</sup>PEER ist weiteres AS-Motiv in der intrazellulären Domäne, dessen Threonin von Kinasen phosphoryliert werden kann und dadurch bei zellulären Transportprozessen und der Generierung von A $\beta$  eine wichtige Rolle spielt (Zheng und Koo 2011).

Im Laufe des konstitutiven APP-Transportes zur Plasmamembran wird APP zudem O- und N-glykosyliert. Dabei konnte eine N-Glykosylierungsstelle an der Aminosäureposition N467 des APP<sub>695</sub> nachgewiesen werden und drei O-Glykosylierungsstellen an den Positionen T291, T292 und T576 (Pahlsson et al. 1992; Perdivara et al. 2009)

Zudem wird APP noch durch Tyrosinsulfatierungen (Weidemann et al. 1989), Phosphorylierungen (Caporaso et al. 1992) und intramolekulare Disulfidbrücken (Rossjohn et al. 1999; Kaden et al. 2008) modifiziert.

## 2.5 Physiologische Funktionen von APP

Wie es die vielfältige Domänenstruktur von APP schon nahelegt, kann APP mit einer großen Anzahl an physiologischen Aufgaben in Verbindung gebracht

werden. So wurde gezeigt, dass APP als Adhäsionsmolekül fungieren kann, indem es mit seiner extrazellulären Domäne mit anderen APP-Molekülen in cis- oder trans-Ausrichtung interagiert (Scheuermann et al. 2001; Wang und Ha 2004; Soba et al. 2005; Gralle und Ferreira 2007). Trans-Dimere können bei der Zell-Zell-Interaktion bedeutsam sein, z.B. bei der APP-vermittelten Adhäsion von Neuronen und Gliazellen während der Gehirnentwicklung (Trapp und Hauer 1994). Auch die Adhäsion von Zellen mit dem umgebenden Substrat aus Kollagen, Laminin u.ä. kann durch APP vermittelt werden (Small et al. 1999; Turner et al. 2003; Reinhard et al. 2005), und so z.B. für Neuritenwachstum verantwortlich sein.

Schon nach der Identifizierung von APP wurde eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor in Betracht gezogen (Kang et al. 1987), z.B. als Rezeptor für das A $\beta$ -Peptid (Lorenzo et al. 2000; Shaked et al. 2006). Besonders der dem Notch-Rezeptor ähnliche Prozessierungsweg begründete diesen Verdacht (Selkoe und Kopan 2003). Mittlerweile wurde eine Vielzahl an möglichen Liganden identifiziert, darunter das neuronale Glykoprotein F-Spondin, Heparin oder Netrin-1, ein lösliches Protein, das beim Wachstum von Axonen eine Rolle spielt (Ho und Südhof 2004; Lourenço et al. 2009; Zheng und Koo 2011). Ein endgültiger Nachweis einer Rezeptorfunktion steht allerdings noch aus.

In neuronalen Prozessen kann APP auch regulatorisch wirken. So wird APP insgesamt mit Neuritenwachstum, dendritischer Verzweigung, Synaptogenese, neuronaler Erregbarkeit und synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht. Zudem ist APP als Frachtrezeptor beim axonalen Vesikeltransport involviert (Kamal et al. 2000; Kamal et al. 2001; Matsuda et al. 2003; Lazarov et al. 2005). Über seine Metallbindungsdomänen kann APP einen Einfluss auf die Metallionenhomöostase von Zellen und Geweben ausüben (Maynard et al. 2005). So bindet APP Cu<sup>2+</sup>-Ionen über seine Kupferbindungsdomänen und reduziert diese zu Cu<sup>+</sup>-Ionen (Hesse et al. 1994; Valensin et al. 2004). Mit dem Zink- und Eisenionenhaushalt wird besonders das A $\beta$ -Peptid in Verbindung gebracht, da eine Änderung der Ionenhomöostase mit der Pathologie von Alzheimer in Zusammenhang stehen kann (Maynard et al. 2005; Roberts et al. 2012).

Neben dem intakten APP sind es besonders seine Prozessierungsspaltprodukte (siehe Abschnitt 2.7), wie z.B. die lösliche Ektodomäne APPs, aber auch die aus der Membran herausgelöste intrazelluläre Domäne AICD, die durch Interaktion mit den Proteinen JIP, Dab oder auch Shc/GRP2 G-Protein assoziierte Signalwege auslösen können (Reinhard et al. 2005). Zudem konnte das



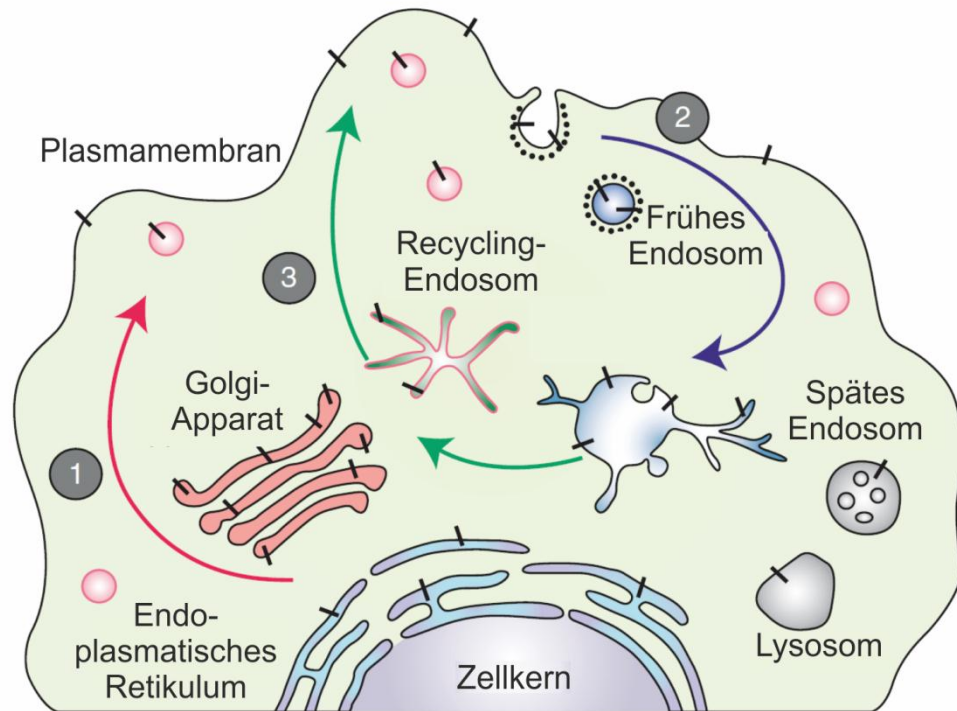
Prozessierungsfragment AICD unter anderem im Zellkern lokalisiert werden. Dort kann es die Transkription verschiedener Proteine regulieren, z.B. die des EGF-Rezeptors, von LRP1, p53 oder auch von BACE und APP (Pardossi-Piquard und Checler 2012).

Interessanterweise wirkt APP zumindest in vitro sowohl neuroprotektiv als auch neurotoxisch. Insbesondere das APP<sub>sα</sub>-Fragment wirkt sich dabei positiv auf die Überlebensfähigkeit von Neuronen in Kultur aus (Mattson 1997). Demgegenüber kann die Überexpression von APP und seiner Prozessierungsprodukte auch Apoptose initiieren. Besonders das AICD-Fragment zeigt in Zellkulturen im Zusammenspiel mit Fe65 apoptotische Aktivität, z.B. durch Aktivierung von GSK-3β (Ghosal et al. 2009; Zheng und Koo 2011). Durch Caspasen geschnittene Spaltprodukte von AICD können Apoptose in vitro und in vivo Experimenten auslösen (Bertrand et al. 2001; Galvan et al. 2006; Park et al. 2009). APP-Interaktionen mit den Apoptosefaktoren p53 und den Tumornekrosefaktor TNF $\alpha$  deuten ebenfalls auf eine Beteiligung von APP am programmierten Zelltod hin (Bamberger et al. 2003; Pardossi-Piquard und Checler 2012).

Neben seiner Rolle in der Pathologie von Alzheimer wird besonders, aber nicht nur, dem monomeren A $\beta$ -Peptid physiologische Bedeutung zugesprochen. So könnte das A $\beta$ -Peptid eine Schutzfunktion gegen oxidativen Stress ausüben (Zou et al. 2002; Baruch-Suchodolsky und Fischer 2009). In Mastrozyten hingegen scheint das A $\beta$ -Peptid den Transport von Cholesterin und Caveolin von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat stimulieren zu können (Igbavboa et al. 2009). Daneben wurde berichtet, dass die A $\beta$ -Region im intakten APP einen Einfluss auf die axonale Verteilung von APP in hippocampalen Neuronen hat (Tienari et al. 1996).

## 2.6 Der zelluläre Transportweg von APP

Als integrales Membranprotein mit einem Signalpeptid zur Plasmamembranlokalisierung durchläuft APP den gesamten konstitutiven Transportweg über das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und schließlich die Plasmamembran (siehe Abb. 5). Auf seinem Weg zur Zellmembran wird APP glykosyliert, phosphoryliert, und sulfatiert, zudem werden intramolekulare Disulfidbrücken geknüpft. Obwohl APP wegen seines Signalpeptides zur Plasmamembran transportiert wird, befindet sich maximal 10 % des zellulären APPs in dieser (Thinakaran und Koo 2008). Passend dazu



#### Abbildung 5 Intrazellulärer Transport von APP

Gerade translatiertes APP (schwarze Balken) gelangt über den konstitutiven sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran und wird auf seinem Weg glykosyliert, phosphoryliert, und sulfatiert (1). Nach nur kurzem Aufenthalt in der Zellmembran wird APP durch einen Clathrinendozytoseweg internalisiert und in das frühe Endosomenkompartiment geschleust (2). Über Recycling-Organellen können APP und seine Spaltprodukte dann entweder zum Trans-Golgi-Netzwerk oder zur Zellmembran zurücktransportiert werden (3). Zum Teil gelangen sie aus dem Endosom auch in das Lysosom, wo sie dann degradiert werden können. Die Abbildung wurde modifiziert aus Haass et al. (2012) genommen.

weist APP durch seine schnelle Endozytose bzw. proteolytische Spaltung (siehe Abschnitt 2.7) eine sehr geringe Halbwertszeit von zehn Minuten in der Plasmamembran auf (Gralle und Ferreira 2007), wobei die Lebensspanne von APP mit einer Halbwertszeit von 30 bis 180 Minuten insgesamt sehr gering ist (Selkoe 2001; Reinhard et al. 2005; de Strooper 2010).

Neben der proteolytischen Prozessierung von APP in der Plasmamembran durch die sogenannte  $\alpha$ -Sekretase und anschließend durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex kann APP auch über einen clathrinabhängigen Endozytoseweg in das frühe Endosomenkompartiment internalisiert werden (Nordstedt et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Clathrinendozytosemechanismus ein spezialisierter Internalisierungsweg ist, der unabhängig von Epsin1 funktioniert (Schneider et al. 2008), dafür aber abhängig von Cholesterol ist, welches eigentlich einen Marker für den Caveolinendozytoseweg darstellt.

Im frühen Endosomenkompartiment wird APP durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 und nachfolgend durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex gespalten (siehe Abschnitt 2.7). Dabei wird APP entweder zusammen mit BACE1 von der Plasmamembran in dieses Kompartiment endozytiert (Ehehalt et al. 2003), oder aber die  $\beta$ -Sekretase gelangt über einen von APP-unabhängigen ARF6-Endozytoseweg dorthin (Sannerud et al. 2011). Daneben kann APP auch ohne den Umweg über die Zellmembran direkt durch clathrinassoziierte Vesikel vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in das frühe Endosom gelangen (O'Brien und Wong 2011). Auch BACE1 kann über Interaktionen von seinem intrazellulären DISLL-Motiv mit den GGA- (*Golgi-localized  $\gamma$ -ear containing ADP ribosylation factor-binding*)-Proteinen direkt vom TGN zum endosomalen Kompartiment transportiert werden (Bonifacino 2004; Wahle et al. 2005).

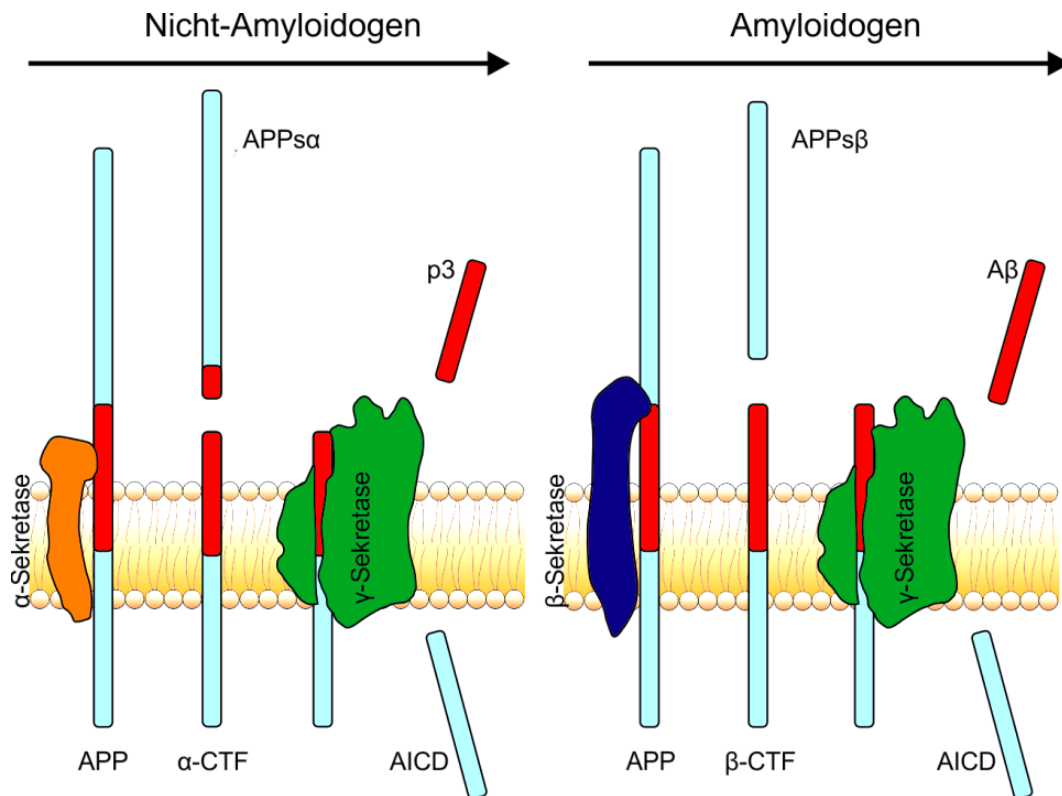
Neben der amyloidogenen Prozessierung wird APP von hier aus auch wieder zur Plasmamembran oder zum TGN zurücktransportiert. Alternativ kann APP auch vom frühen über das späte Endosomenkompartiment in das Lysosom weitergeleitet werden (Haass et al. 2012), wo es selber oder seine Spaltprodukte degradiert werden.

Der Abbau von APP und seinen Prozessierungsprodukten erfolgt über mehrere Mechanismen. Unter anderem sind z.B. im Lysosom die beiden Metalloproteasen Nephilysin und das Insulin-degradierende Enzym bzw. die Serinprotease Plasmin beteiligt (Iwata et al. 2001; Farris et al. 2003; Jacobsen et al. 2008). Diese sind in der Lage ca. 8 % der A $\beta$ -Menge pro Stunde abzubauen (Bateman et al. 2006). Alternativ kann das A $\beta$ -Peptid auch von glatten Muskelzellen oder Endothelzellen aufgenommen werden (Bell et al. 2009; Dotti und de Strooper 2009) und in den Blutstrom zum Abtransport abgegeben werden (Mackic et al. 1998).

## 2.7 Prozessierungswege von APP

Das A $\beta$ -Peptid entsteht bei der proteolytischen Spaltung durch Sekretasen aus APP. Dabei stehen APP zwei grundsätzliche Prozessierungswege offen (de Strooper 2010, siehe Abb. 6).

Der erste Prozessierungsweg ist der sogenannte „nicht-amyloidogene“ Weg, da bei diesem keine A $\beta$ -Spaltprodukte entstehen, welche die Hauptkomponenten der amyloiden Plaques darstellen. Er vollzieht sich hauptsächlich in der Plasmamembran und ist der dominante Prozessierungsweg. Zuerst wird APP durch eine membranständige  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der A $\beta$ -Region geschnitten.



**Abbildung 6 Die proteolytische Prozessierung von APP**

Die schematische Abbildung zeigt die beiden sekretasenabhängigen Spaltungswege von APP. Die Abbildung wurde aus Thinakaran und Koo (2008) entnommen und verändert.

Dabei wird das lösliche APP $\alpha$ - (APPs $\alpha$ )-Fragment in die extrazelluläre Umgebung entlassen und in der Membran verbleibt ein C-terminales Fragment (α-CTF), welches anschließend durch die γ-Sekretase in ein kurzes Peptidfragment (p3) und in das APP-intrazelluläre-Domäne-(AICD)-Fragment gespalten wird. Das p3 diffundiert dabei in den extrazellulären Raum, wohingegen das AICD intrazellulär verbleibt. Auch wenn das p3-Fragment in diffusen Plaques gefunden wurde (Gowing et al. 1994), gilt der „nicht-amyloidogene“ Weg allgemein als nicht-pathogen bzw. sogar als neuroprotektiv (Ninomiya et al. 1994; Stein et al. 2004; Gralle et al. 2009).

Den zweiten Prozessierungsweg nennt man „amyloidogen“, da bei diesem das A $\beta$ -Peptid entsteht. Hier schneidet anstelle einer α-Sekretase die β-Sekretase am N-terminalen Ende der A $\beta$ -Region. Im Gegensatz zum ersten Weg wird hierfür APP endozytiert, da die β-Sekretase den niedrigeren pH-Wert des frühen Endosomenkompartiments zur optimalen enzymatischen Aktivität benötigt (Kinoshita et al. 2003; He et al. 2007; Rajendran et al. 2008). Das extrazelluläre Spaltprodukt wird als lösliches APP $\beta$  (APPs $\beta$ ) bezeichnet und das in der Membran verbleibende als β-CTF. Dieses wird anschließend analog zum „nicht-

amyloidogenen“ Weg durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten, wobei das A $\beta$ -Peptid in das extrazelluläre Lumen sezerniert wird und das AICD in das Zytosol diffundiert. Anschließend kann das A $\beta$ -Peptid exozytiert werden, oder durch einen noch nicht genau verstandenen Transportprozess in das Zytosol gelangen (LaFerla et al. 2007). Da bei diesem Weg das A $\beta$ -Peptid entsteht, wird der „amyloidogene“ Prozessierungsweg als der eigentlich pathogene angesehen (siehe oben). Die genauen Mechanismen des Eintritts von APP in den einen oder anderen Prozessierungsweg sind weiterhin unklar.

### 2.7.1 Die $\alpha$ -Sekretase

$\alpha$ -Sekretasen sind membranständige Metalloproteasen, deren proteolytische Aktivität hauptsächlich an der Plasmamembran stattfindet und durch ein komplexes Netzwerk von Kinasen und/oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reguliert wird (Bandyopadhyay et al. 2007). Die proteolytische Spaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase ist mit Ausnahme von Neuronen der dominante Prozessierungsweg in menschlichen Zellen (Haass et al. 2012). Über 90 % der proteolytischen Spaltung passiert durch  $\alpha$ -Sekretasen zwischen den Aminosäuren Lys16 und Leu17 der A $\beta$ -Sequenz und lässt ein 83 AS großes  $\alpha$ -CTF in der Plasmamembran zurück (Thinakaran und Koo 2008). Die Mehrzahl dieser Proteasen gehören der „Disintegrin und Metalloproteasen“- (**A Disintegrin And Metalloprotease**, ADAM)-Familie an. Mitglieder dieser Familie, welchen eine APP-spaltende Funktion in vitro nachgewiesen werden konnte, sind ADAM9, ADAM10, ADAM17 und ADAM19 (de Strooper 2010). Alle diese Proteasen sind aber auch stark unspezifisch bezüglich ihres Substrates. So sind sie in die proteolytische Spaltung vieler Proteine involviert, z.B. von N-Cadherin, E-Cadherin, Notch, TGF- $\alpha$ , L-Selectin und vielen mehr. Die minimale Spezifitätsanforderung von ADAM-Mitgliedern scheint eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur und der Abstand der Schnittstelle von 12 bis 13 AS von der Plasmamembran zu sein (Sisodia 1992). Es konnten aber Hinweise gefunden werden, welche die Rolle von ADAM17 in Neuronen oder von ADAM 10 in diversen Zelllinien als dominante  $\alpha$ -Sekretasen belegen (de Strooper 2010). So reduziert z.B. die spezifische Inhibition von ADAM10 oder 17 die Menge an nachweisbaren APP $\alpha$  deutlich. Neuere Studien deuten sogar auf ADAM10 als physiologische  $\alpha$ -Hauptsekretase hin (Kuhn et al. 2010).

Neben den ADAM-Sekretasen wurde interessanterweise bei einem Mitglied der  $\beta$ -Sekretasefamilie BACE2 (siehe Abschnitt 2.7.2) ebenfalls eine  $\alpha$ -

Sekretaseaktivität nachgewiesen (Farzan et al. 2000; Fluhner et al. 2002). Anders als die ADAM-Sekretasen schneidet BACE2 jedoch leicht versetzt zwischen der AS-Position Phe19 und Phe20.

Da die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität die Bildung von A $\beta$ -Peptiden ausschließt, wird spekuliert, dass eine verstärkte Aktivität vor Alzheimer schützend wirken kann (Bandyopadhyay et al. 2007). Eine Bestätigung dieser Vermutung steht allerdings noch aus.

### 2.7.2 Die $\beta$ -Sekretase

Das „ *$\beta$ -Site APP Cleaving Enzyme*“ BACE1 wurde 1999 parallel von fünf verschiedenen Gruppen als  $\beta$ -Sekretase identifiziert (Hussain et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999; Yan et al. 1999; Lin et al. 2000). BACE1 ist ein 501 AS großes integrales Typ-I Membranprotein und zählt zu den Aspartatproteasen.

Es ist hauptsächlich im Golgi-Apparat oder in Endosomen lokalisiert, aber auch zu einem kleinen Prozentsatz in der Plasmamembran vorhanden (de Strooper 2010). BACE1 wird in vielen Geweben exprimiert, der höchste Expressionsgrad wurde jedoch in Neuronen des Gehirns gefunden (Vassar et al. 2009).

Die Standardschnittstelle der  $\beta$ -Sekretase in APP<sub>695</sub> befindet sich zwischen Met596 und Asp597, der ersten AS-Position der A $\beta$ -Region. Daneben schneidet BACE1 APP auch noch zu einem geringeren Anteil zwischen den Positionen Tyr10 und Glu11 der A $\beta$ -Sequenz (Vassar et al. 2009).

Zur optimalen Aktivität benötigt BACE1 eine Umgebung mit niedrigem pH-Wert, weshalb ein Großteil der  $\beta$ -proteolytischen Spaltung von APP in dem leicht sauren Milieu des frühen Endosomenkompartiments abläuft (Kinoshita et al. 2003; He et al. 2007; Rajendran et al. 2008).

Neben APP besitzt BACE1 auch andere Substrate wie z.B. Neuregulin-1 und Neuregulin-3, das P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 und noch einige andere (Vassar et al. 2009). Daher wird angenommen, dass BACE1 in vielfältigen physiologischen Prozessen involviert ist (Prox et al. 2011). Dennoch zeigen BACE1-KO-Mäuse nur einen leichten Phänotyp (Harrison et al. 2003; Dominguez et al. 2005; Willem et al. 2006). Dafür ist aber die Gesamtmenge an A $\beta$ -Peptiden in BACE1-KO-Mäusen stark reduziert (Luo et al. 2001; Roberds et al. 2001; McConlogue et al. 2007). Dies und der milde Phänotyp der KO-Mäuse führte zu der Vermutung, dass Inhibition von BACE1 ein vielversprechender Weg sein könnte, um die Alzheimersche Erkrankung zu behandeln oder zumindest

vorzubeugen (Rajendran et al. 2008; de Strooper 2010). Potentielle Inhibitoren, die sowohl die Blut-Hirn-Schranke passieren als auch in das Endosomenkompartiment gelangen können, werden zwar immer zahlreicher (Silvestri 2009), sind aber erst seit Kurzem in der Erprobung bei Primaten (Sankaranarayanan et al. 2009; de Strooper 2010). Daher konnte die Gültigkeit dieser Vermutung beim Menschen noch nicht bestätigt werden.

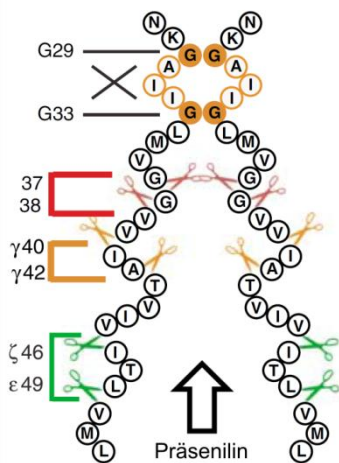
Neben BACE1 zeigt auch BACE2 in vitro eine leichte  $\beta$ -Sekretaseaktivität (Farzan et al. 2000).

### 2.7.3 Der $\gamma$ -Sekretasekomplex

Im Jahre 1998 wurde Präsenilin 1 (PS1) als katalytischer Bestandteil der 1993 vorgeschlagenen  $\gamma$ -Sekretaseaktivität erkannt (Haass und Selkoe 1993; de Strooper et al. 1998). Präsenilin ist eine membranständige Aspartatprotease mit neun Membrandurchgängen (Wolfe et al. 1999, siehe Abb. 8), die APP-CTF innerhalb der Transmembranregion spaltet („*Regulated Intramembrane Proteolysis*“, RIP). Dabei ist die Position an welcher PS1 das CTF spaltet eher flexibel (Qi-Takahara et al. 2005; Zhao et al. 2005). So existieren mehrere Positionen, an denen die Peptidbindungen des CTF hydrolysiert werden können, welche Epsilon-, Zeta- oder Gamma-Schnittstellen genannt werden (siehe Abb. 7). Im Falle des  $\beta$ -CTFs entstehen so A $\beta$ -Peptide verschiedener Länge.

Als Proteolyse-Mechanismus wurde eine sequentielle Schnittfolge vorgeschlagen, bei der zuerst längere Fragmente entstehen (Zhao et al. 2005). Diese werden dann sukzessiv verkürzt, bis die Peptide eine Länge von ca. 38 bis 42 AS besitzen, wobei auch kürzere bzw. längere Fragmente möglich sind (Qi-Takahara et al. 2005; Zhao et al. 2005; Munter et al. 2007; de Strooper 2010). Wie die Peptidlänge von A $\beta$  schließlich durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex reguliert wird ist nicht genau bekannt. Als Modell wurde aber z.B. vorgeschlagen, dass  $\beta$ -CTF als Dimer prozessiert wird (Abb. 7). Je stabiler die Dimerisierung über ein sich wiederholendes GxxxG-Motiv in der TMR des  $\beta$ -CTF ist, desto stärker wird Präsenilin sterisch am Voranschreiten gehindert und es entstehen längere Fragmente (Munter et al. 2007).

Anstelle von PS1 kann an dem  $\gamma$ -Sekretasekomplex auch alternativ das dem PS1 nahe verwandte Präsenilin 2 (PS2) als katalytisch wirksame Untereinheit beteiligt sein (Kimberly et al. 2000). Das Präsenilin wird seinerseits endoproteolytisch gespalten und liegt im Komplex als Heterodimer der beiden N- und C-terminalen



**Abbildung 7 Modell des  $\gamma$ -Sekretase Proteolysemechanismus von dimeren  $\beta$ -CTF**

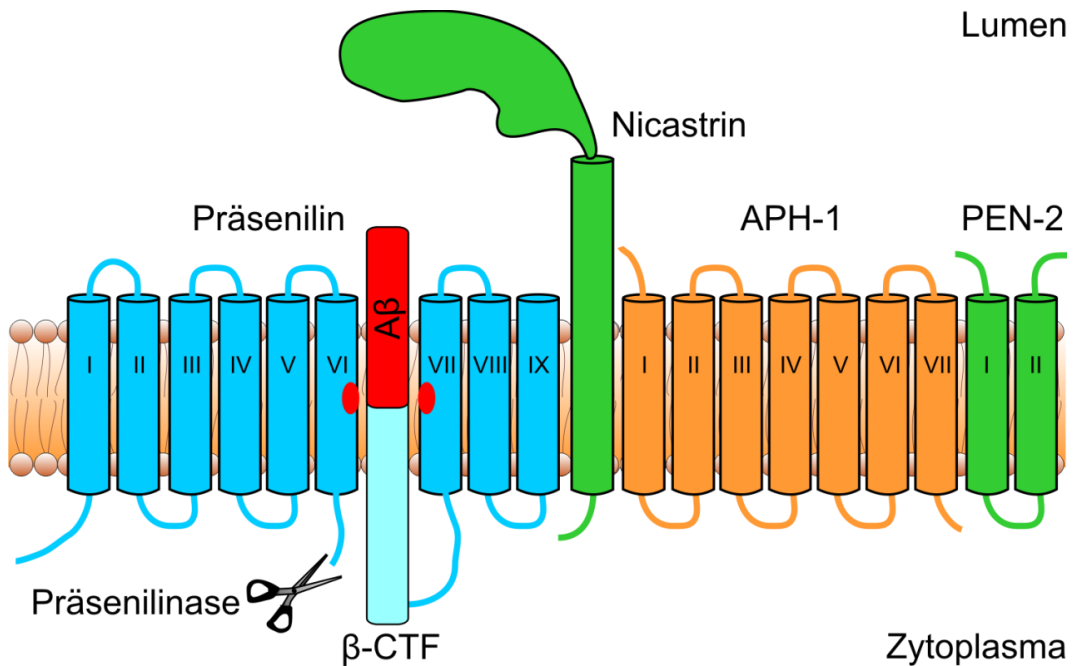
Die Abbildung zeigt die mögliche sterische Hinderung der  $\gamma$ -Sekretase durch eine räumlich enge Dimerisierung von APP- $\beta$ -CTF. Als Dimerisierungsmotiv kommt die sich wiederholende GxxxG-Sequenz in der TMR von APP in Betracht (siehe auch Abschnitt 2.9). Durch die räumliche Blockierung der mehr N-terminalen Schnittpositionen werden längere A $\beta$ -Fragmente erzeugt. Die Abbildung wurde aus Munter et al. (2007) übernommen und verändert.

PS-Fragmente vor (Thinakaran et al. 1996; Fraering et al. 2004; Brunkan et al. 2005, siehe Abb. 8). Das katalytische Zentrum wird dann durch zwei gegenüberliegende Aspartatreste gebildet (Wolfe et al. 1999). Neben der katalytisch aktiven Untereinheit Präsenilin bilden noch drei weitere Untereinheiten den physiologisch funktionellen  $\gamma$ -Sekretasekomplex (siehe Abb. 8). Zu den weiteren integralen Bestandteilen des Komplexes zählen Nicastrin, „Anterior Pharynx-Defective“- (APH)-1 und „Presenilin Enhancer“- (PEN)-2. Diese zusätzlichen Bestandteile sind für die Funktionalität der  $\gamma$ -Sekretase unerlässlich (Edbauer et al. 2003; Kimberly et al. 2003; Fraering et al. 2004), und liegen vermutlich in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie im Komplex vor (Sato et al. 2007). Daneben können noch andere Proteine mit dem  $\gamma$ -Sekretasekomplex assoziiert sein (Wakabayashi et al. 2009), sind für die Funktionalität aber nicht zwingend erforderlich.

Es konnte gezeigt werden, dass der  $\gamma$ -Sekretasekomplex sowohl in der Plasmamembran als auch im frühen Endosomenkompartiment aktiv ist (Vetrivel et al. 2004; Chyung et al. 2005; Frykman et al. 2010).

Um die Produktion von A $\beta$ -Peptiden zu reduzieren, ist es denkbar die Funktion der  $\gamma$ -Sekretase zu inhibieren. Dies sollte eigentlich problematisch sein, da aufgrund der vielfältigen physiologischen Substrate der  $\gamma$ -Sekretase, z.B. N-Cadherin, SorLA, Neuregulin-1 und Notch1-4 (McCarthy et al. 2009), Nebenwirkungen zu erwarten sind. Interessanterweise scheinen aber diese Substrate nicht immer auf gleiche Weise von der  $\gamma$ -Sekretase prozessiert zu werden. So konkurrieren z.B. Notch und APP-CTF nicht um Bindungsstellen in der  $\gamma$ -Sekretase (Schroeter et al. 2003). Dazu passt, dass bereits Inhibitoren bzw. Modulatoren gefunden worden sind, welche hauptsächlich Einfluss auf die Prozessierung von  $\beta$ -CTFs haben (McCarthy et al. 2009; de Strooper 2010). Dazu zählen auch nicht-steroidale Entzündungshemmer wie Ibuprofen oder R-Flurbiprofen, welche die Produktion von längeren A $\beta$ -Peptiden, wie z.B. A $\beta$ <sub>42</sub>, hin





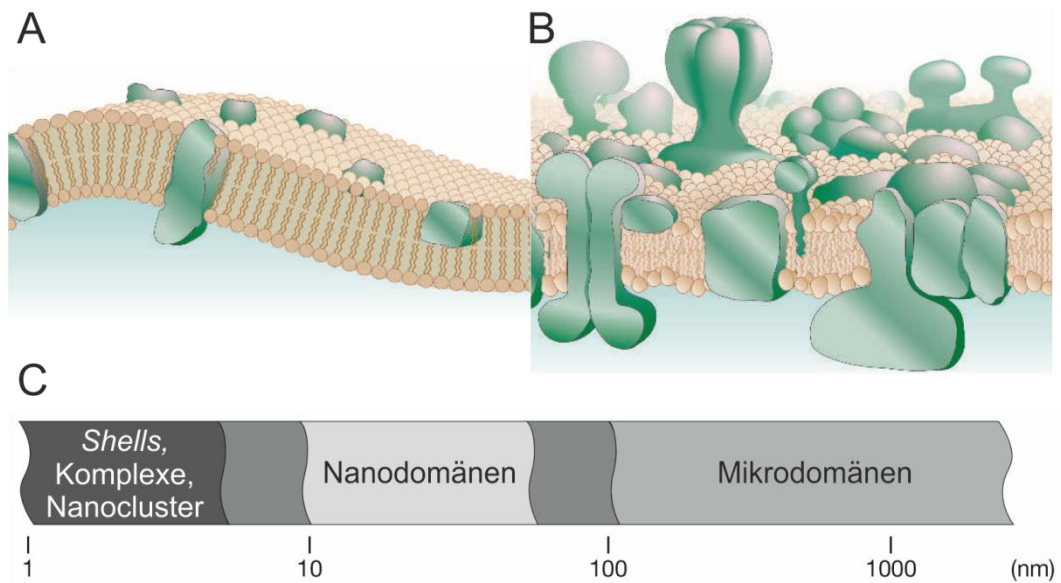
**Abbildung 8 Der  $\gamma$ -Sekretasekomplex**

Dargestellt ist der  $\gamma$ -Sekretasekomplex mit seinen vier Untereinheiten, von denen Präsenilin entweder PS1 oder PS2 sein kann. Die einzelnen Transmembrandurchgänge der Untereinheiten sind mit römischen Zahlen bezeichnet. Zwischen der TMR VI und VII wird Präsenilin endoproteolytisch gespalten. Die roten Ovale deuten die beiden katalytisch aktiven Aspartatreste an. Zur Veranschaulichung der proteolytischen Funktion der  $\gamma$ -Sekretase ist ein APP- $\beta$ -CTF in das Katalysezentrum eingezeichnet. Die Abbildung wurde modifiziert aus de Strooper (2010) übernommen.

zu kürzeren und weniger pathogenen Varianten verschieben können (Kukar und Golde 2008; McKee et al. 2008). Ein Nutzen solcher  $\gamma$ -Sekretasemodulatoren und –inhibitoren für Alzheimerpatienten konnte aber bisher in klinischen Studien noch nicht belegt werden (Ballard et al. 2011).

## 2.8 Allgemeine Zellmembranorganisation

Seit zum Ende des 19. Jahrhunderts die Idee formuliert wurde, dass die Zellhülle durch Lipide gebildet wird (Overton 1895), hat diese Vorstellung eine breite experimentelle Basis erhalten und sich nach anfänglichem Zögern besonders in den letzten vier Dekaden immer rasanter weiterentwickelt. Ging man zuerst von einer die Zelle umgebenden Einzelschicht von Lipiden aus, erkannte später den Doppelschichtcharakter der Zellmembran (Gorter und Grendel 1925). Zehn Jahre später fing man an, auch Proteine in der Zellmembran zu verorten (Danielli und Davson 1935). 1972 stellten Singer und Nicolson (Singer und Nicolson 1972) schließlich ihre revolutionäre und integrative Idee vom Flüssig-Mosaik-Modell der



**Abbildung 9 Das Flüssig-Mosaik-Modell und eine Klassifikation von Membrandomänen nach Größe**

(A) Klassisches Flüssig-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson. (B) Ein angepasstes Flüssig-Mosaik-Modell, welches der Proteindichte in Biomembranen Rechnung trägt. Die Abbildung A und B wurden verändert Engelmann (2005) entnommen. (C) Größe der Membrandomänen kann Klassifikationsmerkmal verwendet werden (verändert aus Jacobson et al. (2007)).

Zellmembran vor. Dieses Modell war jedoch nicht der End- sondern der Ausgangspunkt, welcher eine bis heute andauernden Exploration der Membranorganisation Struktur verliehen hat. Im Laufe der Jahrzehnte wurde das ursprüngliche Modell einem ständigen Wandel unterzogen und gilt heute daher als weitestgehend überholt (Engelmann 2005). Singer und Nicolson entwickelten die Vorstellung von Proteinen die wie Eisberge in einem Meer, bestehend aus einer Doppellipidschicht, treiben. Diese Eisberge sollten frei in ihrer lateralen Diffusion und dementsprechend homogen in der Membran verteilt sein (Abb. 9 A). In der Realität aber liegen Membranproteine aufgrund ihrer hohen Anzahl dicht gedrängt vor (Takamori et al. 2006), so dass das Bild von einzelnen, frei in der Membran diffundierenden Proteinen keinen Bestand mehr hat und die laterale Diffusion schon aus Gründen der Stöchiometrie nicht ungehindert sein kann (Abb. 9 B).

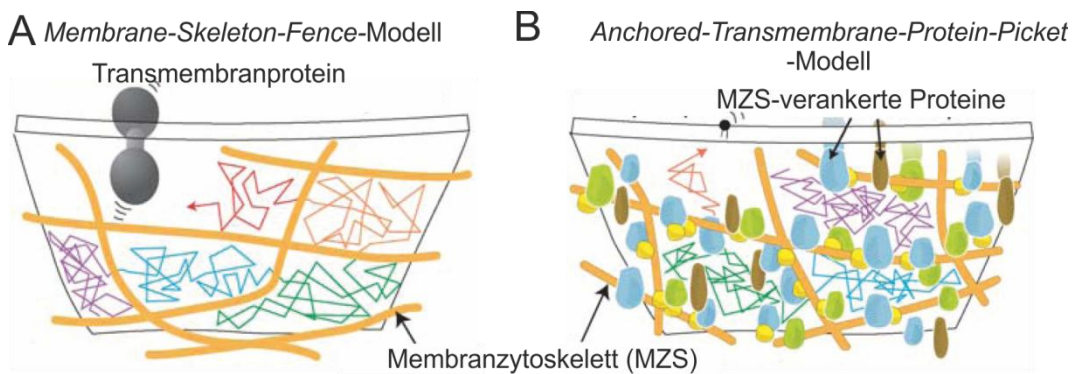
So ist eine heterogene Verteilung von Membranproteinen in Nano- und Mikrodomänen in der Lipiddoppelschicht eher die Regel als die Ausnahme (Jacobson et al. 1995; Jacobson et al. 2007; Lang und Rizzoli 2010, Abb. 9 C). Deshalb wurde das Modell immer weiter angepasst und erweitert, und damit

neuen Erkenntnissen über die Organisation von Lipiden und Proteinen in biologischen Membranen Rechnung getragen.

Daher werden im Folgenden aktuelle Konzepte zur lateralen Organisation der Zellmembran kurz vorgestellt.

### 2.8.1 Das *Picket-Fence*-Modell

Aus Diffusionsuntersuchungen an Proteinen erkannte man, dass eine freie Diffusion dieser Moleküle in Biomembranen nur in kleinen, abgegrenzten Zellmembranarealen stattfindet (Sheetz et al. 1980; Tsuji und Ohnishi 1986; Tsuji et al. 1988). Die Größe dieser Areale konnte auf ca.  $0,3 \mu\text{m}^2$  bestimmt werden (Sako und Kusumi 1995). Aus den Ergebnissen solcher Experimente wurde der



**Abbildung 10 Das *Fence*- und das *Picket*-Modell**

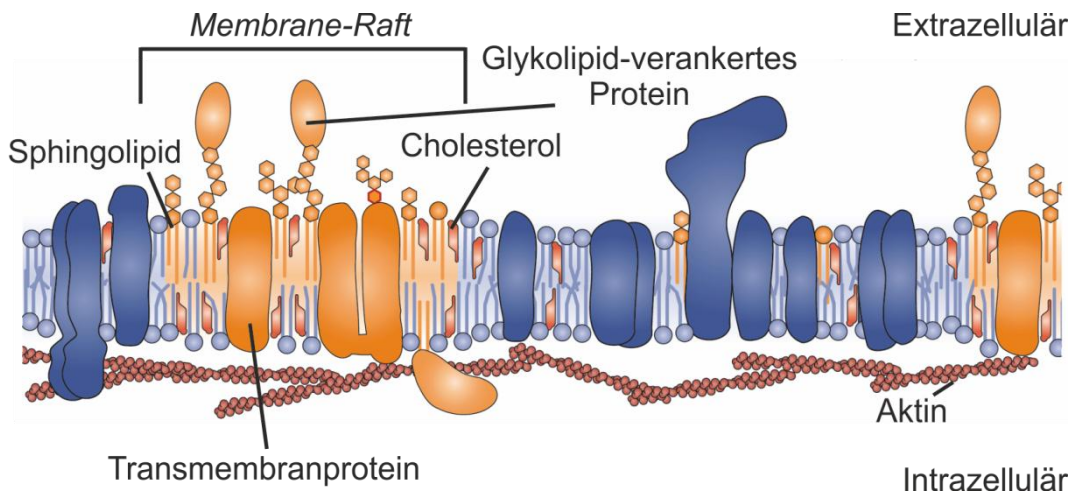
(A) Gezeigt ist das *Membrane-Skeleton-Fence-Modell*, in welchem das Membranzytoskelett (MZS) einen intrazellulären Zaun (*Fence*) bildet, der Membranproteine durch sterische Hinderung oder Friktion am Übertreten in angrenzende Membrankompartimente hindert. (B) Im *Anchored-Transmembrane-Protein-Picket-Modell* können mit dem MZS verbundene Ankertransmembranproteine, zusätzlich zu der Mobilitätsrestriktion durch das Zytoskelett, die Bewegung von Membranbestandteilen wie Lipiden einschränken. Die Abbildung wurde modifiziert aus Kusumi et al. (2005) übernommen.

Vorschlag entwickelt, dass die Diffusion der Moleküle durch sterische Hinderung oder Friktion von einem intrazellulärem Geflecht des Zytoskeletts wie durch einen Zaun (*Fence*) behindert wird (Kusumi et al. 1993). In diesem Zytoskelettkäfig (*Membrane-Skeleton-Fence-Modell*, Abb. 10 A) können Proteine zwar diffundieren, der Übergang zwischen den Arealen ist aber erschwert. Dennoch könne Proteine durch die sogenannte *Hop*-Diffusion die Zytoskelettbarriere überwinden und zwar umso einfacher, je kleiner ihr zytoplasmatischer Anteil ist (Iino et al. 2001).

Aber nicht nur Proteine zeigen eine in Membrankompartimente eingegrenzte Diffusion. Auch für Lipide konnte dieser Käfigeffekt zusammen mit *Hop*-Diffusionsereignissen beobachtet werden (Fujiwara et al. 2002). Durch einen reinen Zytoskelettzaun ist die Diffusionsrestriktion von Lipiden nicht zu erklären, da diese keine Möglichkeit zur Interaktion mit den Zytoskelettfasern haben sollten. Deshalb wurde das Modell durch sogenannte Pfähle oder Latten (*Pickets*), welche den Zaun in der Membran verankern, erweitert. Eine solche modifizierte Hypothese stellt das *Anchored-Transmembrane-Protein-Picket*-Modell dar (Kusumi et al. 2005, Abb. 10 B). In diesem Modell bilden die mit dem Zaun aus Zytoskelettfibrillen in Verbindung stehende Transmembranproteine die Latten (*Pickets*), welche die Diffusion direkt in der Membran behindern können. Diese *Pickets* bieten einen Erklärungsansatz für die Mobilitätsrestriktion sowohl von Proteinen als auch von Lipiden (Fujiwara et al. 2002; Ritchie et al. 2003). Zusammen mit dem intrazellulären Zytoskelettfibrillen bilden diese Ankerproteine einen Lattenzaun, weshalb ein solches Modell auf Englisch auch als *Picket-Fence*-Modell (Sheetz 1983) bezeichnet wird.

### 2.8.2 Das *Membrane-Raft*-Modell

1997 beschrieben Simons und Ikonen ein Modell zur Membranorganisation, in welchem Cholesterol und Sphingolipide in der extrazellulären Lipiddoppelschicht durch Lipid-Lipid-Interaktionen eine ca. 50 nm große geordnete Lipidphase in einer ungeordneten Lipidumgebung bilden (Simons und Ikonen 1997; Simons und Gerl 2010) und die sie *Lipid-Rafts* (englisch für Lipid-Flöße) nannten. Die physikalischen Eigenschaften dieser geordneten Lipidphasen sollten dann zu einer Anreicherung bestimmter *Raft*-Proteine in diesen Membrandomänen führen. Es wurde vermutet, dass *Lipid-Rafts* als Plattformen fungieren, welche spezielle *Raft*-Membranproteine räumlich nah zusammenbringen und so physiologische Interaktionen ermöglichen, z.B. bei Endo- und Exozytosevorgängen, sowie bei der Signalweiterleitung. Die Analyse der *Lipid-Rafts* erfolgte über ihre Solubilisierungsresistenz während der Lyse von Zellen in Detergenzien wie TritonX und CHAPS bei 4 °C. Die biochemisch auf diese Weise präparierten *Lipid-Rafts* wurden aufgrund dieser Solubilisierungsresistenz *Detergent Resistant Membranes* (DRMs) genannt. Im Vergleich zu vollständig solubilisierten Membranproteinen bilden Membranproteine in *Rafts* zusammen mit den Lipidbestandteilen während einer Dichtegradientenzentrifugation eine Phase niedriger Dichte, welche als *Raft*-Fraktion isoliert werden kann. Die



**Abbildung 11 Membrane-Rafts in der Plasmamembran**

Sphingolipide und Cholesterole bilden die Basis für die *Membrane-Raft*-Plattform, in welche sich *Raft*-Membranproteine anreichern. *Membrane-Rafts* werden durch Lipid-Lipid-, Protein-Lipid- und Protein-Protein-Interaktionen gebildet und können z.B. an Vorgängen der plasmalemmalen Signalweiterleitung und des zellulären Transportes beteiligt sein. Die Abbildung stammt aus Simons und Gerl (2010) und wurde modifiziert.

Proteinbestandteile der *Raft*-Fraktionen wurden dann als *Raft*-Proteine bezeichnet und im Weiteren als *Lipid-Raft*-Marker eingesetzt (Mairhofer et al. 2002; Foster et al. 2003). Das Kriterium der Flotation von *Raft*-Proteinen in Phasen niedriger Dichte wurde in der Folgezeit das Hauptkriterium zum Identifizieren von *Lipid-Raft*-Proteinen (Simons und Vaz 2004).

Allerdings stellte sich auch die Frage, ob die so erzeugten DRMs tatsächlich einer biologischen Struktur entsprechen bzw. eine physiologische Bedeutung haben könnten oder rein artifiziell sind. So wurde gezeigt, dass eine Behandlung von Zellmembranen mit Detergenzien diese künstlich neu ordnen können (Mayor und Maxfield 1995; Heerklotz 2002; Shogomori und Brown 2003). Deshalb avancierte die Nachweismethode von *Raft*-Proteinen durch Bildung von DRMs während der Detergenzienbehandlung gleichzeitig auch zum Hauptkritikpunkt am Konzept der *Lipid-Rafts* (Edidin 2001; Zurzolo et al. 2003).

Um sich von dem Kriterium der Detergenzresistenz zu lösen, wurde im Jahr 2006 auf dem „*Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function*“ das Konzept der *Lipid-Rafts* an den aktuellen Kenntnisstand angepasst und in *Membrane-Rafts* umbenannt (Pike 2006). *Membrane-Rafts* wurden als Membrandomänen mit einem Durchmesser von 10 bis 200 nm definiert. Sie sind heterogen aufgebaut und bilden hochdynamische Plattformen oder auch „Flöße“ (*raft*, englisch für Floß) auf der Basis von Sterolen oder Sphingolipiden (siehe Abb. 11). *Membrane-Rafts* können Membranproteinen durch Lipid-Lipid-, Protein-Lipid-

aber auch durch Protein-Protein-Wechselwirkungen als funktionelle Plattformen für ihre Anreicherung und Interaktion mit anderen Proteinen dienen (Simons und Gerl 2010).

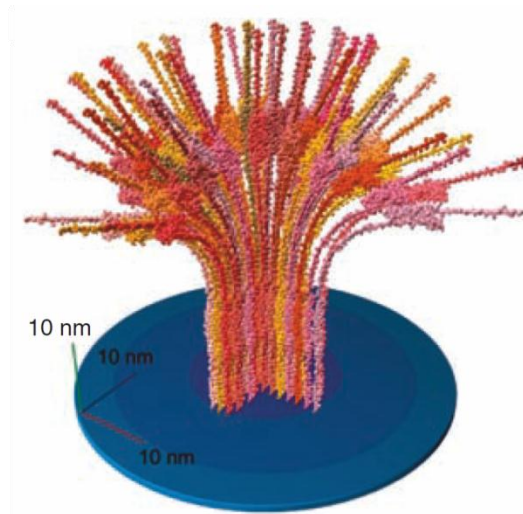
Ein wichtiger Konsens dieses Symposiums war, dass die Präparation von DRMs mittels Extraktion durch Detergenzien als Nachweis von *Raft*-Proteinen nicht mehr zulässig ist. Deshalb nutzen neuere Studien zu *Membrane-Rafts* z.B. die Möglichkeiten moderner Mikroskopieverfahren, wie die hochauflösende STED-Mikroskopie, die *Photoactivated Localization Microscopy* (PALM) oder auch die *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS), um Plasmamembrandomänen wie *Membrane-Rafts* auf Ebene der nativen Zellmembran zu analysieren (Schneider et al. 2008; Simons und Gerl 2010; Owen et al. 2012).

### 2.8.3 Proteincluster-Modell

Durch das *Picket-Fence*- und das *Membrane-Raft*-Modell können zwar einige, aber nicht alle Kompartimentierungsphänomene von Proteinen in der Zellmembran erklärt werden. Wenn im Falle von *Membrane-Rafts* hydrophobe Lipid-Lipid- oder Lipid-Protein-Interaktionen für die Kompartimentierung von Proteinen in Membrandomänen verantwortlich sind, dann sollten Proteine mit ähnlicher Transmembran- oder Membranankerregion in die gleichen Membrandomänen sortiert werden können. Im Falle des *Picket-Fence*-Modells sollten vor allem Proteine mit ähnlichen intrazellulären Domänen vergleichbaren Mobilitätsrestriktionen ausgesetzt sein und in denselben Membranbereichen lokalisiert sein.

Es konnte allerdings für verschiedene Membranproteine gezeigt werden, dass sie trotz hoher Sequenzidentität in unterschiedliche Membrandomänen segregiert werden (Uhles et al. 2003; Kai et al. 2006; Low et al. 2006; Sieber et al. 2006). Dies kann aufgrund der hohen Ähnlichkeit der entsprechenden Regionen weder durch *Membrane-Rafts* noch durch *Picket-Fences* hinreichend erklärt werden.

Für das SNARE-(*Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor*)-Protein Syntaxin 1a konnte gezeigt werden, dass weder Lipiddomänen noch das Zytoskelett für die Segregation in plasmalemmale Proteindomänen verantwortlich sind, sondern dass ein homophiler Protein-Protein-Interaktionsmechanismus der Aggregation von Syntaxin 1a zu Proteinclustern zugrunde liegt. Die Größe der Cluster wird dabei durch Proteinanziehungskräfte und -abstoßungskräfte definiert (Sieber et al. 2007). Bis zu einer bestimmten Größe können Syntaxincluster durch Protein-Protein-Interaktionen wachsen.



**Abbildung 12 Proteincluster-Modell von Syntaxin 1a**

Syntaxin 1a kann in der Plasmamembran Proteincluster bilden, deren Größe und Stabilität durch homophile Protein-Protein-Interaktionen bestimmt werden. Dabei spielen Anziehungs- und auch Abstoßungskräfte der Syntaxinmoleküle durch Ladungsverhältnisse oder sterische Hinderung eine bedeutende Rolle. Die Abbildung wurde aus Sieber et al. (2007) übernommen und verändert.

Ab einer gewissen Akkumulation überwiegen dann Abstoßungskräfte der Einzelmoleküle durch sterische Hinderung oder durch Ladungsabstoßung, so dass ein Gleichgewicht von Anziehung und Abstoßung erreicht wird (siehe Abb. 12).

Dieses Modell schließt die Involvierung anderer Mechanismen nicht aus. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Clusterbildung von SNARE-Proteinen auch durch Lipid-Protein-Interaktionen moduliert werden kann (Lang et al. 2001; Chamberlain und Gould 2002; Low et al. 2006; Murray und Tamm 2009).

#### **2.8.4 Membrankompartimentierung durch elektrostatische Wechselwirkungen**

Neben den bereits diskutierten Modellen zur Segregation von Proteinen in Membrandomänen konnte besonders bei SNARE-Proteinen auch eine elektrostatische Komponente bei der Clusterbildung beobachtet werden. Bei der Aggregation von Syntaxin 1a zu Plasmamembrancluster entsteht durch die intrazelluläre, polybasische Juxtamembranregion der Syntaxinmoleküle eine hohe positive Ladungsdichte nahe der Plasmamembran. Diese sollte destabilisierend auf die Größe der Syntaxin-Cluster wirken. Es konnte nun gezeigt werden, dass Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) das dominante Lipid in Membranclustern von Syntaxin 1a ist und dieses, durch Ladungsausgleich mit seiner negativen Kopfgruppe, Syntaxincluster stabilisieren kann (Murray und Tamm 2009; van den Bogaart G. et al. 2011).

Daneben können auch elektrostatische Wechselwirkungen von SNARE-Proteinen wie Syntaxin 1a und SNAP-(*Synaptosomal-Associated Protein*)-25 mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen die Bildung von Proteinclustern in der Plasmamembran durch Ladungsausgleich modulieren (Zilly et al. 2011). In diesem Zusammenhang

wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration auf einen niedrigen mikromolaren Wert, wie er z.B. lokal bei einem Kalziuminflux in die Zelle durchaus vorkommen kann, zu einer verstärkten Aggregation von SNARE-Proteinen in der Plasmamembran führt. Auch wenn diesem Clustermechanismus noch keine biologische Funktion zugeordnet werden konnte, sind Kalziumionen bereits bei physiologisch relevanten Konzentrationen an der lateralen Organisation von SNARE-Proteinen in der Plasmamembran beteiligt.

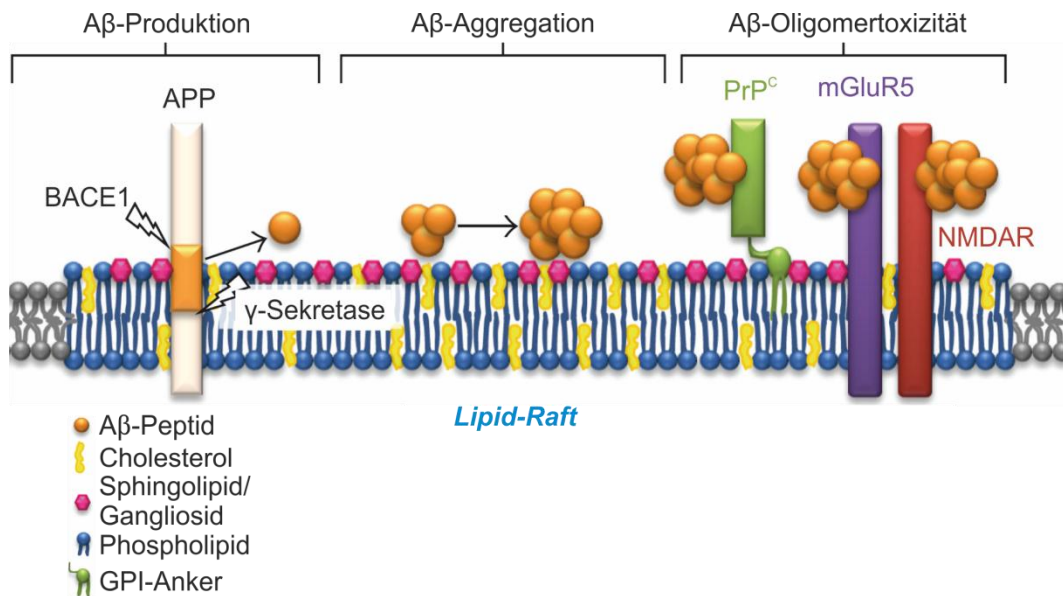
### **2.8.5 Oligomerisierung und Clusterbildung von APP in der Zellmembran**

Für APP wurde ebenfalls eine heterogene Verteilung in plasmalemmale Proteincluster gefunden (Schneider et al. 2008), auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus unbekannt ist. Die oben beschriebenen Modelle bzw. eine Mischung aus diesen sind aber im Prinzip auch für die APP-Segregation in der Plasmamembran denkbar.

So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Subpopulation von plasmalemmalen APP in cholesterol- bzw. sphingolipidreichen *Membrane-Rafts* anzutreffen bzw. in ihnen organisiert ist (Eehalt et al. 2003; Rushworth und Hooper 2011). Hier kann APP mit der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Sekretase funktionelle Komplexe bilden (siehe Abb. 13). Zudem ist das Cholesterol in *Membrane-Rafts* eine Grundvoraussetzung für die spezialisierte clathrinabhängige Endozytose und die amyloidogene Prozessierung von APP, und somit auch für die Entstehung von A $\beta$ -Peptiden (Eehalt et al. 2003; Schneider et al. 2008; Cossec et al. 2010). Als mögliche APP-Cholesterol-Interaktionsstelle konnte vor kurzem die N-terminale A $\beta$ -Region identifiziert werden, mit welcher APP membranständiges Cholesterol binden kann (Barrett et al. 2012; Beel et al. 2010). Daneben kann eine Peptid-Lipid-Interaktion zwischen A $\beta$ -Peptiden und dem *Membrane-Raft*-Gangliosid GM1 zu einer Konformationsänderung führen, welche die A $\beta$ -Aggregation zu neurotoxischen Oligomeren bedingt (Ikeda et al. 2011).

Auch Protein-Protein-Wechselwirkungen scheinen für die Bildung von APP-Membranclustern relevant sein. So wird die Größe von APP-Membranclustern durch eine Interaktion mit dem plasmalemmalen Gerüstprotein Flotillin-2 moduliert. Diese wird wahrscheinlich durch den C-Terminus von APP vermittelt (Schneider et al. 2008). Daneben gibt es für die Oligomerisierung von APP noch mindestens drei weitere Kontaktstellen für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Als mögliche Dimerisierungsstellen wurden die E1- bzw. E2-Domäne von APP





**Abbildung 13 Der Einfluss von Membrane-Rafts auf die Produktion, Aggregation und Toxizität von Aβ-Oligomeren**

APP wird in Membran-Rafts durch die β-Sekretase BACE1 und den γ-Sekretasekomplex prozessiert. Durch Peptid-Lipid-Interaktionen kann sich die Konformation von Aβ-Monomeren ändern und dadurch die Oligomerisierung von Aβ induzieren. Diese Oligomere können dann über verschiedene Mechanismen zytotoxisch wirken. PrP<sup>C</sup>: Cellular Prion Protein; mGluR5: metabotroper Glutamatrezeptor-5; NMDAR: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor. Die Abbildung stammt aus Rushworth und Hooper (2011) und wurde verändert.

identifiziert (Beher et al. 1996; Scheuermann et al. 2001; Wang und Ha 2004). Die dritte bekannte Kontaktstelle liegt in der TMR von APP und wird durch ein klassisches Dimerisierungsmotiv von aufeinanderfolgenden GxxxG-Aminosäuresequenzen gebildet (Senes et al. 2004; Munter et al. 2007). Besonders die G<sub>29</sub>xxxG<sub>33</sub>-Sequenz in der Aβ-Region scheint einen Einfluss auf die Stabilität von APP-Dimeren zu haben und die Prozessierung durch den γ-Sekretasekomplex zu beeinflussen (siehe Abb. 7).

Daneben kann möglicherweise auch die extrazelluläre Matrix zur Oligomerisierung von APP beitragen. So besitzt APP sowohl Heparin- als auch Kollagenbindungsstellen, welche an der Ausbildung von cis- und trans-Dimeren beteiligt sind (Beher et al. 1996; Gralle und Ferreira 2007).

### 3 Zielsetzung

Die Arbeit von Schneider et al. (2008) konnte zeigen, dass das APP in neuronalen N2a-Zellen in plasmalemmalen Membranclustern organisiert ist. Als beeinflussende Faktoren wurden die Menge an Cholesterol in der Zellmembran, aber auch die Interaktion mit dem intrazellulären Membrangerüstprotein Flotillin-2 diskutiert. Die künstlich verstärkte Bildung von APP-Clustern durch antikörperinduzierte Aggregation führte zu einer verstärkten Endozytose von APP und zu einer erhöhten A $\beta$ -Produktion.

Jenseits dieser modulierenden Bedingungen weiß man nur wenig über den grundlegenden Clustermechanismus von APP. Dies liegt auch daran, dass APP-Membrannanodomänen, mit Ausnahme von *Membrane-Rafts*, in der bisherigen Betrachtung der Membranorganisation von APP kaum eine Beachtung gefunden haben.

Ziel der Arbeit war es daher, die Organisation und Dynamik von APP in der Plasmamembran hinsichtlich der elementaren Clustermechanismen zu untersuchen. Der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit sollte dabei auf der Identifizierung von APP-Proteindomänen liegen, welche für den Clusterphänotyp verantwortlich sind. Fragen, z.B. nach der Rolle von Protein-Protein-, Protein-Glykokalyx-, Protein-Lipid- und Lipid-Lipid-Interaktionen bei der Clustergenese, sollten ebenfalls beleuchtet werden.

Hierzu sollten APP-Wildtypkonstrukte, sowie eine Vielzahl an APP-Deletionskonstrukten kloniert werden. Darauf aufbauend sollten dann umfangreiche Diffusionsstudien zu den Konstrukten in der basalen Plasmamembran von neuronalen PC12-Zellen durchgeführt werden, z.T. unter glykokalyxdegradierenden Bedingungen. Mögliche Änderungen in der Diffusibilität der Deletionskonstrukte können einen Hinweis auf die für die Mobilitätsregulation verantwortliche Proteindomäne geben. Da die Mobilität von Proteinen in der Plasmamembran eng mit dem Grad ihrer lateralen Organisation verbunden ist, können so auch Aussagen über die Stabilität von plasmalemmalen Nanodomänen getroffen werden. Um den Einfluss von neuronalen Faktoren zu bestimmen, sollten Diffusionsstudien auch in nicht-neuronalen HepG2-Zellen durchgeführt werden.

Als morphologisches Korrelat dieser Mobilitätsmessungen sollten TIRFM-Studien in ganzen Zellen mit diesen APP-Konstrukten durchgeführt werden. Zusätzlich

sollte die laterale Organisation der APP-Konstrukte fluoreszenzmikroskopisch auch in zellfreien Plasmamembranpräparationen studiert werden.

Zudem sollte die Frage nach der funktionellen Relevanz der APP-Clusterbildung beleuchtet werden.

## 4 Material

### 4.1 Materialien

Sofern nicht anders angegeben wurden Standardchemikalien und Reagenzien der Firmen *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe), *Sigma-Aldrich* (Hamburg), *GERBU Biotechnik GmbH* (Wieblingen), *Life Technologies GmbH* (Darmstadt), *Bio-Rad* (München), *Merck* (Darmstadt), *Promega* (Mannheim), *Fermentas* (St. Leon-Rot) oder *NEB* (Frankfurt am Main) in analytischer Reinheit bezogen.

#### 4.1.1 Pufferlösungen

Wenn unterschiedliche Varianten von Pufferlösungen in verschiedenen Experimenten verwendet wurden, ist dies bei den entsprechenden Puffern angegeben.

##### **PBS**

137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2,7 mM KCl; pH 7,4

##### **Hochsalz-PBS**

500 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2,7 mM KCl; pH 7,4

##### **Sonifizierungspuffer**

120 mM Kaliumglutamat, 20 mM Kaliumacetat, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA und 20 mM HEPES; pH 7,2

Für STED-Experimente:

120 mM Kaliumglutamat, 20 mM Kaliumacetat, 10 mM EGTA und 20 mM HEPES; pH 7,2

##### **PFA-Stammlösung**

16 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in ddH<sub>2</sub>O bei 65 °C unter Zugabe von NaOH-Plättchen auflösen. Nach Abkühlung auf RT auf pH 7,2 einstellen und bei -20 °C lagern

Für STED-Experimente:

10 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei 60 °C auflösen. Nach Abkühlung auf RT auf pH 7,4 einstellen, sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern

**PFA-Gebrauchslösung**

16 % (w/v) PFA-Stocklösung mit ddH<sub>2</sub>O und 10x PBS auf 4 % (w/v) verdünnen; pH 7,2

Für STED-Experimente:

10 % (w/v) PFA-Stocklösung mit PBS auf 4 % (w/v) verdünnen; pH 7,4

**Ringerlösung**

130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 48 mM D(+)-Glukose und 10 mM HEPES; pH 7,4

**TMA-DPH-Lösung**

Für eine gesättigte 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1;3;5;-Hexatrien-p-Toluolsulfonat (TMA-DPH; #T204, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt)-PBS-Lösung 1 mg TMA-DPH mit 1 ml PBS mischen, ca. 3 Minuten bei 13200 x g zentrifugieren. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:10 in PBS verwendet

**Mowiol-Eindeckelmedium**

2,4 g Mowiol (#4-88, *Hoechst AG*, Frankfurt), 6 g Glycerol, 6 ml ddH<sub>2</sub>O, 12 ml 200 mM Tris, pH 7,2. Zugabe von einigen DABCO (#0718.1, *Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe)-Kristallen. Bei RT auf einem Rotator unter Lichtausschluss lösen lassen. Anschließend mit 11000 x g für 5 Minuten zentrifugieren und den Überstand in 1,5 ml Aliquots bei -20 °C lagern

**50x TAE**

2 M Tris, 50 mM EDTA, mit 5,71 % (v/v) Eisessig; pH 8,0

**Lysepuffer für APP**

140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % Triton-X, 0,5 % NP-40 und 50 mM HEPES; pH 7,3

**4x SDS-Probenpuffer**

31 % (v/v) Glycerin, 6,3 % (w/v) SDS, 0,02 % (v/v) Bromphenolblau, 15,7 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 200 mM Tris, pH 6,8

**Tris-Puffer**

Sammelgel:

0,5 M Tris; pH 6,8

Trenngel:

1,5 M Tris; pH 8,8

### **TBS**

50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7,5

### **TBST**

TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

### **10x SDS-Laufpuffer**

250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

### **Western Blot Transferpuffer**

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3

### **Western Blot Blockierlösung „Blotto“**

5 % (w/v) Milchpulver in TBS gelöst

## **4.1.2 Zellkulturmedien**

### **PC12-Standardmedium**

DMEM mit 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin und Phenol-Rot (*PAA, Pasching, Österreich*), 10 % (v/v) Pferdeserum (*Biochrom AG, Berlin*), 5 % (v/v) *Fetal Bovine Serum* (FBS, *Biochrom AG, Berlin*), 4 mM L-Glutamin (*PAA, Pasching, Österreich*), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (*PAA, Pasching, Österreich*).

### **Hungermedium**

Das Hungermedium für die PC12-Zellkultur hat die gleiche Zusammensetzung wie das Zellkulturstandardmedium, allerdings ohne Zugabe von Pferdeserum und FBS.

### **HepG2-Standardmedium**

EMEM (*Lonza, Basel, Schweiz*), 10 % (v/v) FBS (*Biochrom AG, Berlin*), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (*PAA, Pasching, Österreich*).

### 4.1.3 Zelllinien

#### PC12-Zellen

PC12-Zellen sind sogenannte Phäochromozytomzellen, d.h. sie wurde aus einem Nebennierentumor einer Ratte (*rattus norvegicus*) gewonnen. Sie wachsen adhären in einschichtigen Zellaggregaten. Durch Inkubation mit dem neuronalen Wachstumsfaktor NGF kann diese Zelllinie einen neuronalen Phänotyp ausbilden. Daneben besitzt sie auch ohne NGF-Aktivierung ein Tableau an neuronalen Proteinen, z.B. an SNARE-Proteinen. Diese Zelllinie stammt aus der Arbeitsgruppe Heumann, Ruhr-Universität Bochum, Klon 251 (Heumann et al. 1983), der sich dadurch auszeichnet, dass die Zellen besonders sensitiv für NGF-Aktivierung sind.

#### HepG2-Zellen

Die HepG2-Zelllinie (*homo sapiens*) wurde aus dem Lebertumorgewebe eines 15-Jährigen argentinischen Jungen gewonnen (#HB-8065; ATCC). Die Zellen wachsen adhären und einschichtig in kleinen Zellansammlungen.

Die Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe Famulok, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, bezogen. Die Identität der Zellen wurde mit dem Nachweis einer Geneticin-(G418)- und Trypsinresistenz verifiziert.

### 4.1.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

$\alpha$ -APP, C-Terminus: Kaninchen, polyklonal, IgG (#A8717, SIGMA, Saint Louis, USA). Reaktiv gegen APP der Spezies Ratte, Maus und Mensch.

$\alpha$ -GFP (B-2): Maus, monoklonal, IgG (#sc-9996, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA).

$\alpha$ -A $\beta$  (6E10): Maus, monoklonal, IgG (#SIG-39300, Covance Inc., Princeton, USA). Reaktiv gegen APP der Spezies Mensch.

$\alpha$ -Clathrin-HC (C-20): Ziege, polyklonal, IgG (#sc-6579, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA).

#### Sekundäre Antikörper

Ziege- $\alpha$ -Kaninchen gekoppelt mit Atto647N (Farbstoffkopplung in der Abteilung NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen).

Ziege- $\alpha$ -Maus gekoppelt mit IRDye 800CW (#926-32210, *LI-COR Inc.*, Lincoln, USA).

Esel- $\alpha$ -Maus gekoppelt mit AlexaFluor 594 (#A-21203, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

Esel- $\alpha$ -Ziege gekoppelt mit AlexaFluor 594 (#A-11058, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

### **Lektin**

Wheat Germ Agglutinin (WGA) gekoppelt mit AlexaFluor 594 (#W11262, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

## **4.1.5 Reagenzien und Kits**

### **DNS-Aufreinigung**

NucleoSpin Extract II (#740609, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Düren).

NucleoSpin Plasmid (#740588, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Düren).

NucleoBond PC 500 (#740574, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Düren).

NucleoBond Xtra Maxi Plus (#740416, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Düren).

### **Klonierung**

Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (#K2800-20, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

pENTR/D-TOPO Cloning Kit (#K2400-20, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

Vivid Colors pcDNA6.2/C-EmGFP-DEST Vector (#K355-20, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

Gateway LR Clonase II Enzyme mix (#11791-020, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).

### **Zelltransfektion**

Neon Transfection System 100  $\mu$ l Kit (#MPK10096, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt).



**Proteaseinhibitoren**

*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpacks* (#04693116001, Roche, Mannheim).

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, #6367, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe).

**BCA-Test**

BCA protein Assay Reagent (#23225, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, USA).

**Enzyme für den Glykokalyxverdau**

$\alpha$ (2-3,6,8)-Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* (#N2876, Sigma-Aldrich, Hamburg).

PNGase F aus *Elizabethkingia meningoseptica* (#G5166, Sigma-Aldrich, Hamburg).

$\beta$ 1-4 Galaktosidase aus *Bacteroides fragilis* (#P0730, NEB, Frankfurt am Main).

**4.1.6 Bezogene DNS-Konstrukte**

APP<sub>695</sub> mit einer Myc-Sequenz (VPEQKLISEEDL) zwischen AS-Position 19 und 20 in einem pcDNA3.1-Expressionsvektor. Konstrukt stammt von der Arbeitsgruppe Kins (Abteilung Humanbiologie und Humangenetik, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern), beschrieben in (Tienari et al. 1996; Soba et al. 2005).

APP<sub>695</sub>-Sequenz mit deletierter extrazellulärer Domäne ( $\Delta$ 18-601) wurde von Eurofins MWG (Ebersberg) bezogen und wurde für das Konstrukt APP- $\Delta$ N verwendet.

## 5 Methoden

### 5.1 Klonierung der APP-Konstrukte

Als Ausgangskonstrukt für die APP-Deletionskonstrukte diente eine humane APP<sub>695</sub>-Sequenz (NCBI Referenzsequenz: NM\_201414) mit einer Myc-Tag-Sequenz (VPEQKLISEEDL) zwischen der AS-Position 19 und 20 in einem pcDNA3.1-Vektor. Dieses Konstrukt wurde durch die Arbeitsgruppe von Stefan Kins in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Daneben wurde ein N-terminal deletiertes APP Konstrukt ( $\Delta$ 18-601 der ursprünglichen APP<sub>695</sub>-Sequenz) von der Firma *Euofins MWG* (Ebersberg) bezogen.

Beide Konstrukte wurden durch Gateway-Klonierung der Firma *Life Technologies GmbH* (Darmstadt) nach Herstellerprotokoll und Klonierungsstandardmethoden (Sambrook und Russell 2006), wie z.B. der Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Amplifizierung, erst in den Einstiegsvektor pENTR/D-TOPO (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt) mittels einer gerichteten Topoisomerasereaktion eingefügt und anschließend durch die LC-Klonasereaktion in den Expressionsvektor pcDNA6.2/C-EmGFP-DEST (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt) überführt. Durch die Linker-Aminosäuren KGGRADPAFLYKVVDAVN sind die Konstrukte in dem Expressionsvektor C-terminal mit dem Emerald grün fluoreszierenden Protein (EmGFP) verbunden. Das Wildtyp-APP-Konstrukt mit der Myc-Sequenz wird im Folgenden als Myc-APP und das N-terminal deletierte Konstrukt als APP- $\Delta$ N bezeichnet. Zur Herstellung des C-terminal deletierten Konstrukts ( $\Delta$ 649-695) wurde das Myc-APP einfach ohne den C-Terminus mittels PCR amplifiziert und anschließend durch Gateway-Klonierung in den Vektor pcDNA6.2/C-EmGFP-DEST eingefügt. Dieses Konstrukt beinhaltet dadurch ebenfalls die Myc-Sequenz und wird als APP- $\Delta$ C bezeichnet.

Die N-terminalen Deletionskonstrukte wurden durch Standardklonierungsmethoden (Sambrook und Russell 2006) erstellt. Zur Klonierung des Wildtypkonstruktes ohne Myc-Sequenz bzw. der N-terminalen Deletionskonstrukte wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen Acc65I/EcoRI und Acc65I/SgsI große Bereiche der extrazellulären Domäne entfernt und durch entsprechende PCR-Amplimere wieder ersetzt, so dass entweder das Wildtyp-APP ohne Myc-Sequenz (APP) oder die N-terminal verkürzten Konstrukte entstanden sind ( $\Delta$ 22-283 bis  $\Delta$ 22-601). Durch

Bezeichnung	Protein	N-term. Tag	C-term. Tag	Deletion	Punktmutation
Myc-APP	humanes APP <sub>695</sub>	Myc	EmGFP		
APP-ΔN	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP	Δ18-601	
APP-ΔC	humanes APP <sub>695</sub>	Myc	EmGFP	Δ649-695	
APP	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP		
Δ22-283	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP	Δ22-283	
Δ22-435	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP	Δ22-435	
Δ22-537	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP	Δ22-537	
Δ22-596	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP	Δ22-596	
Δ22-601	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP	Δ22-601	
APP-N467S	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP		N467S
APP-ΔO	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP		T291G, T292G, T576G
APP-ΔN467S/ΔO	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP		T291G, T292G, N467S, T576G
APP-R601G	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP		R601G
APP-E618G	humanes APP <sub>695</sub>		EmGFP		E618G

**Tabelle 1 Übersicht und Informationen zu den verwendeten Konstrukten**

Alle Konstrukte befinden sich in dem Expressionvektor pcDNA6.2/C-EmGFP-DEST (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt) und sind über die Linker-Sequenz KGGRADPAFLYKVVDAVN C-terminal mit EmGFP verbunden.

Verwendung der Acc65I-Restriktionsschnittstelle verbleiben extrazellulär auf das Signalpeptid folgend die vier Aminosäuren LEVP. Analog wurden die Punktmutationskonstrukte erstellt. Anstelle der verkürzten Sequenzen wurden Sequenzen voller Länge eingefügt, bei denen die entsprechenden Punktmutationen durch Fusions-PCR erzeugt worden ist.

Amplifiziert wurden die Konstrukte je nach Bedarf in den *Escherichia coli*-Stämmen XL1-Blue, XL10-Gold, DH5α und Top10. Zur Aufreinigung der DNS wurden Produkte der Firma *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG* (Düren) verwendet (siehe Abschnitt 4.1.5). Alle Konstrukte wurden zur Überprüfung der korrekten Nukleotidabfolge sequenziert.

## 5.2 Präparation von Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Deckgläsern für die Fluoreszenzmikroskopie

Als Träger für die Zellen bei der Fluoreszenzmikroskopie wurden Deckgläser mit einem Durchmesser von 25 mm und der Stärke No. 0 (#0110650, *Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Lauda-Königshofen) verwendet.

Die Deckgläser wurden für 1 Stunde auf einem Kompaktschüttler mit 1M NaOH-Lösung sanft geschüttelt und anschließend mit ausreichend VE-Wasser gut gewaschen. Dann wurden die Deckgläser für 1 Stunde bei RT in einer 1M HCl-Lösung erneut geschüttelt und wieder sorgfältig mit VE-Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden nach diesen Schritten für mindestens 12 Stunden mit

Reinstethanol behandelt, bevor das Ethanol abgegossen und die Deckgläser autoklaviert wurden. Unter der Sterilwerkbank wurden die autoklavierten Deckgläser einzeln in die Mulden von sterilen 6-Well-Platten gelegt. So vereinzelt wurden die Deckgläser für 30 Minuten bei RT mit je 0,5 ml einer 100 mg/ml PLL-Lösung (#P1524, *Sigma-Aldrich*, Hamburg) inkubiert. Danach wurde die PLL-Lösung abgesaugt, die Deckgläser kurz mit je 2 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen, wieder abgesaugt und erneut mit 2 ml ddH<sub>2</sub>O pro Deckglas gewaschen. Nach dem Absaugen des ddH<sub>2</sub>O wurden die Deckgläser mittig in der 6-Well-Plattenmulde positioniert und unter der Sterilwerkbank für mindestens 3 Stunden getrocknet. Die trockenen Deckgläser wurden abgedeckt und bis zur Verwendung im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Für die STED-Experimente in Kapitel 6.1 wurden die Deckgläser nicht autoklaviert, sondern unter der Sterilwerkbank abgeflammt. Ansonsten wurden die Deckgläser wie oben beschrieben behandelt.

### 5.3 Zellkultur

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die Zelllinien PC12 und HepG2 verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3), deren Handhabung unter sterilen Bedingungen bis zur Endverwendung erfolgte. Zur Kultivierung wurden die üblichen Zellkultur-Plastikwaren der Firmen *Greiner Bio-One GmbH* (Frickenhausen), *Sarstedt AG & Co.* (Nürnbrecht) und *Becton Dickinson GmbH* (Heidelberg) verwendet.

#### 5.3.1 Auftauen von Zellen

Die Zelllinien wurden in kleinen Volumina von 1 ml bis 1,5 ml als Zellsuspensionen in einem DMSO-haltigen Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zur Verwendung wurden die Zellen kurze Zeit bei 37 °C im Wasserbad angetaut und in eine mit 10 ml 37 °C warmes Zellkulturstandardmedium bereitgestellte 50 ml Zentrifugenröhre überführt. Nach erfolgter Zentrifugation mit 200 x g für 3 Minuten bei RT wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in ca. 1 ml 37 °C warmem Standardmedium titriert. Die Zellsuspension wurde dann auf 10 ml mit warmem Standardmedium (siehe Abschnitt 4.1.2) aufgefüllt und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und als Passage 0 bezeichnet. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit (Zellkulturstandardbedingung) in einem Zellkulturinkubator für 48 Stunden kultiviert und anschließend in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche passagiert

(Passage 1). Die Zellen wurden ab der Passagennummer 5 für Experimente verwendet.

### **5.3.2 Passagieren von Zellen**

Zur Passage wurde den Zellkulturen je nach Konfluenz und Erfordernis alle 2 bis 5 Tage das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 37 °C warmem und kalziumfreiem PBS (*PAA*, Pasching, Österreich) gewaschen. Abhängig von der Größe der verwendeten Zellkulturflaschen wurden die Zellen dann mit 1 - 4 ml Trypsin-EDTA (*PAA*, Pasching, Österreich) bis zu 5 Minuten im Zellkulturinkubator unter Standardbedingungen für die Ablösung vorbereitet. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch Klopfen gegen den Boden der Zellkulturflasche von der Oberfläche abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde dann durch Zugabe der 5-fachen Menge an Standardmedium abgestoppt und die Zelllösung in eine 50 ml Zentrifugenröhre überführt. Nach der Zentrifugation mit 200 x g für 3 Minuten bei RT wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet durch Auf- und Absaugen mit auf den Gefäßboden angedrückter Pipettenspitze in 1 bis 2 ml Standardmedium retitriert. Die Suspension der vereinzelter Zellen wurde dann in 2 bis 4 neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und in Abhängigkeit von der verwendeten Flaschengröße mit 10 bis 50 ml frischem Zellkulturmedium aufgefüllt. Standardmäßig wurde ein Volumen von 10 ml für 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen, von 20 ml für 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen und von 50 ml für 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen verwendet. Dieser Vorgang wird Splitten genannt. Für Experimente wurden Zellen bis Passage 20 verwendet.

### **5.3.3 Passagieren von Zellen auf beschichtete Deckgläser**

Für die meisten Experimente wurden die Zellen final auf PLL-beschichteten Deckgläsern (siehe Abschnitt 5.2) kultiviert. Dazu wurden entweder während dem Splitten nicht-transfizierter oder nach der Transfektion von Zellen 500 µl der Zellsuspension mit ca. 150000 Zellen auf je ein Deckglas gegeben, so dass das Glas komplett mit der Zelllösung benetzt war. Zum Absetzen der Zellen aus der Suspension auf das beschichtete Deckglas wurden die Deckgläser für 20 Minuten im Zellkulturinkubator unter Standardbedingungen behandelt. Anschließend wurden pro Deckglas 2 ml Standardmedium hinzugegeben und bis zum Beginn des Experimentes weiter unter Zellkulturstandardbedingungen inkubiert.

### 5.3.4 Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff

Eingefroren wurden die Zellen bei 80 bis 100 % Konfluenz in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wie für die normale Passage mit kalziumfreiem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten im Zellkulturinkubator mit 2 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zelllösung für 3 Minuten mit 200 x g bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium, welches eine Mischung (v/v/v) aus 70 % Standardmedium, 20 % FBS und 10 % DMSO ist, retitriert. Im Schnitt wurde die Zellsuspension auf sechs bis sieben Einfrierröhrchen mit einem Volumen von 1 ml und einer Zellzahl von ca. 800000 Zellen aufgeteilt. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden in einem Gefriergefäß mit Isopropanolfüllung bei -80 °C gelagert. Hierdurch wurde ein zeitlicher Temperaturgradient erzeugt, in welchem die Zellen gleichmäßig einfroren. Danach wurden sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff und einer Temperatur von -196 °C überführt und bis zur erneuten Verwendung gelagert.

### 5.3.5 Transfektion von Zellen

Um Zellen zu transfizieren, wurden diese zunächst wie für eine normale Passage vom Zellboden gelöst und in Standardmedium aufgenommen. Dann wurden die Zellen in der gewünschten Menge auf 50 ml Zentrifugenröhren aufgeteilt und mit 200 x g für 3 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde entweder in 130 µl Lösung R (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt) oder alternativ in 130 µl Opti-MEM I (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt) mit 10 bis 40 µg DNS resuspendiert und von der Mikroporatorküvette (100 µl, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt) luftblasenfrei aufgezogen. Die Küvette wurde in die vorgesehene Halterung mit 3 ml Lösung E (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt) oder *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS, PAA, Pasching, Österreich) montiert.

Die Transfektion wurde dann mit dem Mikroporator „Neon“ der Firma *Life Technologies GmbH* (Darmstadt) und folgenden Einstellungen durchgeführt:

PC12: 1410 V, 30 Millisekunden, 1 Puls.

HepG2: 1200 V, 50 Millisekunden, 1 Puls.

Nach erfolgter Transfektion wurde die Zellsuspension in eine entsprechende Menge, 37 °C warmes Standardzellkulturmedium aufgenommen und für Experimente wie oben beschrieben auf PLL-beschichtete Deckgläser oder für die Zellyse pro Transfektionsansatz in eine Mulde einer 6-Well-Platte transferiert. Bis

zur Verwendung wurden die transfizierten Zellen im Inkubator bei Zellkulturstandardbedingungen aufbewahrt.

### **5.3.6 Lyse von transfizierten PC12-Zellen und Proteinkonzentrationsbestimmung**

Mit den APP-Konstrukten transfizierte PC12-Zellen wurden für 8 Stunden unter Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. Die nachfolgenden Schritte der Zellyse wurden dann auf Eis durchgeführt. Nachdem das Zellkulturmedium abgesaugt worden ist, wurden die Proben 2-mal kurz mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 50 µl Lysepuffer pro *Well* und Kondition einer 6-*Well*-Platte lysiert. Dazu wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber vom Boden des *Wells* gelöst und in Lysepuffer solubilisiert. Der Lysepuffer wurde vor der Verwendung mit 1 mM PMSF (*Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe) und mit *Protease Inhibitor Cocktail* Tabletten (*Roche*, Mannheim) nach Herstellerangaben versetzt. Das Lysat wurde dann in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppi) überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Aufgetaut wurden die Proben langsam bei 4 °C auf einem Rotator und dann mit 13000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurden dann einem BCA-Test nach Herstellerangaben (*Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products*, Rockford, USA) zur Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden 30 µg Protein pro Bande und Kondition aufgetragen.

## **5.4 SDS-PAGE und Western Blot Analyse**

Die SDS-PAGE und Semi-Dry Western Blot Analyse wurde im Wesentlichen wie bereits beschrieben durchgeführt (Laemmli 1970; Kyhse-Andersen 1984; Towbin et al. 1992). Pro Kondition wurden 30 µg Protein-Lysat mit 4-fach SDS-Probenpuffer versehen und für 10 Minuten bei 99 °C inkubiert. Die SDS-PAGE wurde mit 10 %-igen Gelen durchgeführt. Nach dem Lauf der Gelelektrophorese wurden die getrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Transfermembran (#10485376, *Whatman*, Dassel) durch einen Semi-Dry Western Blot (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) übertragen und gegen das GFP der exprimierten APP-Konstrukte mit Antikörpern gefärbt. Der Primärantikörper (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*, Santa Cruz, USA) wurde 1:80 verdünnt in Blotto verwendet. Der Sekundärantikörper (*LI-COR Inc.*, Lincoln, USA) mit dem Fluorophor IRDye

800CW wurde in einer 1:5000 Verdünnung in Blotto eingesetzt. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal mit dem *Odyssey Imaging System* (LI-COR Inc., Lincoln, USA).

## 5.5 Enzymatischer Glykokalyxverdau an lebenden Zellen

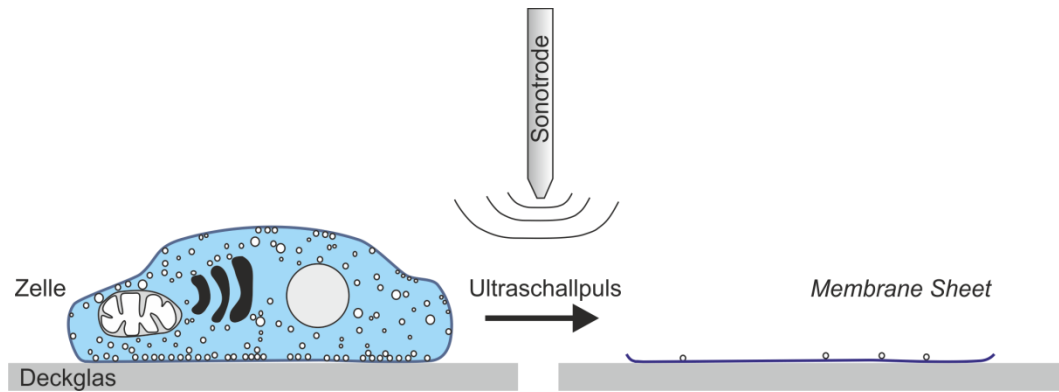
Mit dem Myc-APP-Konstrukt transfizierte PC12-Zellen wurden auf PLL-beschichtete Deckgläser für mindestens 7 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS bei RT gewaschen. Pro Probendeckglas wurde entweder 1 ml frisch angesetzter Enzymmix, welcher aus dem Hungermedium mit 0,5 Einheiten / ml Neuraminidase, 0,16 Einheiten / ml Galaktosidase und 0,1 Einheiten / ml PNGase F besteht, oder nur das Hungermedium als Kontrollbedingungen hinzugegeben. Die Proben wurden für 1 Stunde unter Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 2 ml Hungermedium pro Deckglas wurden die Proben für FRAP-Experimente weiterverwendet. Auch nicht-transfizierte PC12-Zellen wurden auf diese Art und Weise behandelt und für Lektinbindungsexperimente mit WGA benutzt.

## 5.6 Präparation von *Membrane Sheets*

*Membrane Sheets* sind zellfreie Plasmamembranpräparationen, bei denen die basale Plasmamembran vom Zellkörper adhärenter Zellen durch Scherkräfte befreit wurde (siehe Abb. 14). Die basale Plasmamembran verbleibt dabei auf dem Untergrund, welcher hier das PLL-beschichtete Deckglas ist. *Membrane Sheets* ermöglichen einen einfachen biochemischen Zugang zu den nativen Zellmembranbestandteilen (Lang 2003). Die Plasmamembranpräparation gewährt dabei ungehinderten Zugang zur zytosolischen Seite ohne Einsatz von Detergenzien, wodurch z.B. pharmakologische Untersuchungen oder immunhistochemische Antikörperfärbungen intrazellulärer gelegener Plasmamembranepitope, wie z.B. von Clathrin (siehe Abschnitt 5.7.3), möglich werden. Fluoreszenzmikroskopische Bilder dieser Präparationen zeigen zudem einen exakten optischen Schnitt der Plasmamembran, da kein *Out-of-Focus*-Streulicht, z.B. aus dem Zytosol oder dem Golgi-Apparat, die Qualität der Aufnahme beeinträchtigen kann.

Für die Präparation der *Membrane Sheets* wurden für 8 bis 60 Stunden auf Deckgläsern gewachsene transfizierte oder nicht-transfizierte Zellen verwendet.





#### Abbildung 14 Präparation von *Membrane Sheets*

Auf PLL-beschichteten Deckgläsern gewachsene Zellen werden einem kurzen Ultraschallpuls ausgesetzt. Dabei wird durch die erzeugten mechanischen Scherkräfte die basale Plasmamembran von dem restlichen Zellkörper befreit und verbleibt adhärent auf dem Deckglas. Hierdurch wird die zytosolische Seite zugänglich für pharmakologische Behandlungen oder für Antikörperfärbungen ohne vorherige Detergenzbehandlung. Zudem lassen sich die Plasmamembranpräparationen ohne *Out-of-Focus*-Streulicht mikroskopieren und eignen sich daher hervorragend zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse von nativen Membranstrukturen.

Die Deckgläser mit den Zellen wurden in ein Bad mit eiskaltem Sonifizierungspuffer gelegt und mittig über den Proben die Sonotrodenmikrospitze MS 73 (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, 3 mm Durchmesser), die mit dem Ultraschallgerät Sonopuls HD 2070 (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin) verbunden ist, im Abstand von ca. 0,5 bis 0,7 cm justiert. Dabei ist die Füllhöhe des Sonifizierungspufferbades so gewählt, dass sich die Spitze in dem Puffer befindet. Die Proben wurden dann einem kurzen Ultraschallpuls ausgesetzt. Die Stärke des Pulses war so gewählt, dass sich eine deutlich sichtbare, sternförmige Fläche im Zellbewuchs des Deckglases abzeichnete. Da die nötige Impulsstärke vom Zelltyp und auch von der Tagesform abhängig war, wurde die Impulsstärke vor jedem Versuch kurz getestet und ausgehend von Standardparametern optimiert. Die so behandelten Proben wurden dann kurz in PBS gewaschen und in eine 4 %-ige PFA-Gebrauchslösung (2 ml / Deckglas) zur Fixierung überführt. Es wurde entweder 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C fixiert.

## 5.7 Immunhistochemische Färbung

Für diese Arbeit wurden immunhistochemische Antikörperfärbungen sowohl an fixierten *Membrane Sheets* bei RT als auch an lebenden Zellen bei 4 °C durchgeführt, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 5.7.1 Antikörperfärbung gegen endogenes APP

Für 1 Stunde bei RT fixierte *Membrane Sheets* von PC12-Zellen auf Deckgläsern wurden 2 x kurz mit 2 ml 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS pro Deckglas gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei RT in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS inkubiert. Hierbei soll überschüssiges PFA abreagiert (gequencht) werden. Daraufhin wurden die Proben 3 x 4 Minuten mit 2 ml PBS pro Deckglas gewaschen und 1 Stunde bei RT mit dem primären Antikörper  $\alpha$ -APP (#A8717, SIGMA, Saint Louis, USA) in einer Verdünnung von 1: 50 bis 1:70 in 3 % BSA / PBS (w/v) inkubiert. Daraufhin wurde wieder 3 x 5 Minuten mit 2 ml PBS pro Deckglas gewaschen und 1 Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper, welcher an Atto647N gekoppelt ist, in einer Verdünnung von 1:80 bis 1:100 in 3 % BSA / PBS (w/v) gefärbt. Darauf folgte ein Waschschrift bestehend aus 3 x 4 Minuten waschen in 2 ml PBS pro Deckglas. Die gefärbten und gewaschenen Proben wurden in je 15  $\mu$ l Mowiol mit DABCO eingedeckelt, über Nacht getrocknet und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Danach konnten die Proben für die STED-Mikroskopie verwendet werden.

Für beide Antikörperfärbungen wurden pro Deckglas je nach Experiment 130 bis 150  $\mu$ l der Antikörperlösung auf den Boden einer mit Parafilm (#PM-996, *Pechiney Plastic Packaging Inc.*, Chicago, USA) ausgelegten Färbekammer aus rostfreiem Metall pipettiert. Das Deckglas wurde mit der Probenseite nach unten auf den Antikörpertropfen gelegt und mittels Pinzette mehrmals angehoben, wodurch sich die AK-Lösung gleichmäßig unter dem Deckglas verteilte. Die Luftfeuchtigkeit in der Kammer wurde durch feuchte Papiertücher erhöht, um mögliche Verdunstungseffekte der Antikörperlösung zu minimieren. Die Färbung erfolgte in verschlossener Kammer. Nach der AK-Inkubation wurden die Deckgläser wieder vorsichtig vom Parafilm abgehoben und mit der Probenseite nach oben in die Kammern von 6-Well-Platten mit frischem Puffer gelegt. Dieses Verfahren wurde für alle hier beschriebenen immunhistochemischen Färbungen benutzt.

### 5.7.2 Zelloberflächenfärbung gegen verschiedene APP-Konstrukte

PC12-Zellen wurden mit verschiedenen APP-Konstrukten transfiziert und 8 Stunden unter Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. Die daraufhin folgenden Schritte wurden alle im Kühlraum bei 4 bis 7 °C auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden 3 x 5 Minuten mit 2 ml HBSS (*PAA*, Pasching, Österreich) pro Deckglas gewaschen und mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -A $\beta$  (#SIG-39300, *Covance Inc.*, Princeton, USA) für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:100 in HBSS für 1

Stunde inkubiert. Nach 3 x 5 Minuten waschen mit 2 ml HBSS pro Deckglas wurden die Proben mit dem 1:200 in HBSS verdünnten Sekundärantikörper gekoppelt an AlexaFluor 594 (#A-21203, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt) für 40 Minuten gefärbt. Nach 3 x 5 Minuten waschen mit 2 ml HBSS pro Deckglas wurden die gefärbten Proben bei 4 °C über Nacht mit einer 4 %-ige PFA-Gebrauchslösung (2 ml / Deckglas) fixiert. Die Proben wurden anschließend wie oben beschrieben bei RT gequench, mit PBS gewaschen und 15 µl Mowiol mit DABCO pro Deckglas eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurden die Proben mittels Konfokalmikroskopie analysiert.

### 5.7.3 Antikörperfärbung gegen endogenes Clathrin

Die über Nacht fixierten *Membrane Sheets*, generiert aus mit APP-Konstrukten transfizierten PC12-Zellen, wurden 2 x kurz mit 2 ml 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS pro Deckglas gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei RT in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS gequench. Die Proben wurden dann 3 x 3 Minuten mit 2 ml PBS pro Deckglas gewaschen und 1 Stunde bei RT mit dem primären Antikörper α-Clathrin-HC (#sc-6579, *Santa Cruz Biotechnology Inc.*, Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in 3 % BSA / PBS (w/v) inkubiert. Die Proben wurden wieder 3 x 5 Minuten mit 2 ml PBS pro Deckglas gewaschen und 1 Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper gekoppelt an AlexaFluor 594 (#A-11058, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:200 in 3 % BSA / PBS (w/v) gefärbt. Nach 3 x 5 Minuten waschen mit 2 ml Hochsalz-PBS pro Deckglas und 1 x 5 Minuten mit 2 ml PBS pro Deckglas wurden die gegen Clathrin gefärbten *Membrane Sheets* mittels Epifluoreszenz noch am selben Tag mikroskopiert.

## 5.8 Glykokalyxfärbung durch das Lektin WGA

Für die Färbung wurden nicht-transfizierte, enzymatisch behandelte oder nicht-behandelte PC12-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 5.5). Aus diesen Zellen wurden *Membrane Sheets* hergestellt und fixiert. Die Proben wurden wie oben beschrieben mit 2 ml 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS pro Deckglas gequench und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden die Proben pro Deckglas mit 2 ml einer 1:200 (5 µg / ml) in PBS verdünnten WGA-(#W11262, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt, gekoppelt an AlexaFluor 594)-Lösung unter Lichtausschluss für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem anschließenden

Waschschritt im Dunkeln mit PBS (3 x 5 Minuten), wurden die Proben mit dem Epifluoreszenzmikroskop analysiert.

## 5.9 Mikroskopie

### 5.9.1 STED-Nanoskopie

Für die *Stimulated Emission Depletion* (STED) Nanoskopie wurde ein Leica TCS STED Mikroskop (*Leica Microsystems GmbH*, Wetzlar) mit einer maximalen Auflösung von 90 bis 100 nm verwendet. Dabei war die Auflösung in Richtung der x-Achse leicht schlechter als die in Richtung der y-Achse. Das Objektiv war ein 1,4 NA HCX PLAPO CS 100x Öbobjektiv und das Standard-STED-Filterset wurde benutzt. Für die Exzitation wurde ein 635 gepulster Diodenlaser (*PicoQuant GmbH*, Berlin) verwendet und für die Depletion der *Mai'Tai tunable Ti:sapphire femtosecond laser* (*Spectra-Physics Lasers*, Mountain View, USA) auf eine Wellenlänge von 750 nm eingestellt. Zur Signaldetektion wurde eine *Avalanche-Photodiode* (APD) verwendet. Um *Membrane Sheets* auf dem Deckglas aufzuspüren, wurde das Reflexionslicht des Anregungslasers mit der APD detektiert. Dadurch können Objekte auf dem Deckglas dargestellt werden, was das Erkennen von *Membrane Sheets* auf der Oberfläche des Deckglases ermöglicht. Durch diese Methode konnte zudem die Zweidimensionalität und Integrität der *Membrane Sheets* überprüft werden, analog zur Verwendung von TMA-DPH bei Proben, welche nicht in Mowiol eingebettet wurden (siehe unten). Die Bilder wurden in einem 2-Lineaverage-Verfahren mit einer Scanfrequenz von 10 Hz und einer Gesamtbildgröße von 512 x 512 Pixel oder 1024 x 1024 Pixel aufgenommen. Die Pixelgröße wurde auf 20,22 oder 21,61 nm eingestellt. Die Clustergrößen wurden mit einer halbautomatisierten Routine in Matlab (*The MathWorks*, Natick, USA) vermessen. Ein 3-Pixel breiter und 30-Pixel langer *Linescan* wurde innerhalb einer 150 x 150 Pixel großen Region auf den *Membrane Sheets* durch die Mitte eines einzelnen Clusters gelegt. Das Intensitätsprofil von jedem vermessenen APP-Cluster wurde mit einer Lorentz-Funktion angepasst und die Clustergröße mittels der FWHM bestimmt. Die Größe in Pixeln wurde mit der Größe des einzelnen Pixels multipliziert und alle Clustergrößen eines Versuchstages wurden gemittelt. Aus den mittleren Werten der einzelnen Versuchstage wurde dann ein Gesamtmittelwert gebildet.

### 5.9.2 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) Analyse

Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und für mindestens 8 Stunden exprimiert, bevor sie in der FRAP-Mikroskopie verwendet wurden. Die FRAP-Analyse wurde mit einem konfokalen Laserrastermikroskop FluoView1000 (*Olympus Europa Holding*, Hamburg) unter Verwendung eines UPlanSAPO x 60 NA 1,35 Öobjektivs in Ringerlösung durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden im Epifluoreszenzmodus ausgesucht. Im konfokalen Modus wurde dann auf die basale Plasmamembran fokussiert und ein Bereich von 100 x 100 Pixel mit einer Pixelgröße von 207 nm für die Aufnahme gewählt. In diesem Bildausschnitt wurde auf der basalen Membran eine 15 x 15 Pixel *Region Of Interest* (ROI) als Bleichregion definiert, welche je nach Experiment für 1 bis 2 Sekunden mit 100 % der Leistung der Laserlinien 488 nm und 405 nm gebleicht wurde. Es wurden 3 Bilder vor dem Bleichen und 67 Bilder nach dem Bleichen mit einer *Pixel Dwell Time* von 40 µs und einer Frequenz von 0,5 Hz aufgenommen. Als Anregungslaser wurde die Laserlinie 488 nm mit 0,1 % bis 0,5 % der maximalen Leistung verwendet. Nach der Messung wurden zwei weitere 15 x 15 Pixel ROIs definiert. Eine wurde neben der Zelle zur Messung der Hintergrundfluoreszenzintensität positioniert, die andere wurde auf einen nicht gebleichten Bereich der basalen Membran gelegt und diente als Referenzregion. Wenn sich in dieser Referenz-ROI die Fluoreszenzintensität stark veränderte, z.B. durch einen Fokusdrift oder zu starkes generelles Bleichen, wurde diese Messung aus der späteren Analyse ausgeschlossen.

Die Daten wurden in Excel (*Microsoft Corporation*, Redmond, USA) importiert und weiter bearbeitet. Der Hintergrundwert wurde von dem dazugehörigen Messwert der Bleich- und der Referenz-ROI abgezogen und für beide Messbereiche wurden die hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensitäten der Postbleichmessungen ( $F_{\text{Post}}$ ) auf den Durchschnittswert der jeweiligen Präbleichmessungen ( $F_{\text{Prä}}$ ) normalisiert ( $F_{\text{Norm}}$ ). Wenn die Abweichung der mittleren Fluoreszenzintensität der letzten drei Messwerte von  $F_{\text{Prä}}$  in der Referenz-ROI größer als 15 % war, dann wurde diese Messung nicht für die weitere Analyse berücksichtigt.

$$F_{\text{Norm}}(t) = \frac{F_{\text{Post}}(t)}{F_{\text{Prä}}}$$

Die so korrigierten Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und die erhaltenen FRAP-Kurven eines Tages und einer Kondition zu einer Durchschnittskurve gemittelt. Die mittlere Fluoreszenzrückkehrkurve wurde in Origin 8 Pro (*OriginLab Corporation*, Northampton, USA) dann einer hyperbolen Kurvenanpassung aus (Ficz et al. 2005) unterzogen.

$$y(t) = y_0 + \frac{Rec_{Max} * t}{t_{1/2} + t}$$

Durch die Kurvenanpassung kann man verschiedene Parameter ermitteln.  $y_0$  ist in der Gleichung der sogenannte *Offset*,  $Rec_{Max}$  der relative Intensitätswert bei maximaler Fluoreszenzrückkehr und  $t_{1/2}$  die Halbwertszeit des wiederkehrenden Fluoreszenzsignals. Die Berücksichtigung des *Offsets* ist notwendig, da in den hier vorliegenden FRAP-Experimenten das Fluoreszenzsignal in der Regel nicht auf die Grundlinie gebleicht werden konnte. Dieses könnte an der relativ niedrigen Aufnahme Frequenz von 0,5 Hz liegen, wenn in der Zeit zwischen Bleichen und der ersten Aufnahme ein Teil der nicht gebleichten Konstrukte schon wieder in die Bleichregion hineindiffundiert sind. Der Befund, dass Konstrukte mit kleinerer Halbwertszeit in der Regel einen höheren *Offset* aufweisen als Konstrukte mit größerer  $t_{1/2}$ , stützt diese Vermutung. Die Werte aller Versuchstage einer Kondition wurde erneut gemittelt und der Standardfehler bestimmt.

### 5.9.3 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)

TIRFM ist eine Methode in der Fluoreszenzmikroskopie, mit der man die Anregung in der z-Achse auf wenige 100 nm beschränken kann. Hierfür wird der Anregungslaserstrahl in einem kritischen Winkel der Totalreflexion auf das Deckglas mit den Proben gelenkt, wodurch ein evaneszentes Anregungsfeld an der Glas-Wasser-Grenzfläche entsteht. Dessen Intensität nimmt mit dem Quadrat der Entfernung zum Deckglas ab. Dadurch ist es möglich nur die Fluorophore anzuregen, deren Abstand zum Deckglas nicht größer als 100 bis 200 nm ist. Das Anregen der Fluorophore im deckglasnahen Bereich ermöglicht z.B. die gezielte Mikroskopie der basalen Plasmamembran von Zellen, welche Membranproteine, fusioniert mit einem fluoreszierenden Proteintag, exprimieren. Da das Proteintag nicht in Strukturen wie dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum zum Leuchten angeregt wird, lassen sich

plasmamembranständige Fusionsproteine in lebenden Zellen mit nur geringer *Out-of-Focus*-Fluoreszenz visualisieren.

Für die TIRFM-Aufnahmen wurde ein IX81-ZDC Mikroskop (*Olympus Europa Holding*, Hamburg) mit TIRF-Modul und einem 488 nm Argon-Laser mit dem Olympus-Filtersatz U-MTIR488-HC verwendet. Als Objektiv mit der nötigen hohen numerischen Apertur wurde ein NA 1,49 x 60 Aplanochromat Objektiv benutzt. Zusammen mit Nachvergrößerungslinsen im Strahlengang wurde eine 192-fache Gesamtvergrößerung erzielt. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal mit der 16 Bit EmCCD-Kamera ImagEM C9100-13 (*Hamamatsu Photonics K.K.*, Hamamatsu, Japan), welche einen Chip mit 512 x 512 Pixel der Pixelgröße 16 x 16  $\mu\text{m}^2$  besitzt. Dadurch ergibt sich eine Pixelgröße in den TIRFM-Aufnahmen von 83,3 x 83,3 nm<sup>2</sup>. Die Mikroskopeinstellungen und -aufnahmen wurden mit Hilfe der Olympus-Software *Cell<sup>R</sup>* (*Olympus Europa Holding*, Hamburg) gesteuert.

Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und für mindestens 24 Stunden bei Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. Die Messungen wurden in Ringerlösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Aufgenommen wurden TIRFM-Filme, bestehend aus 20 bis 50 Bildern und einer Aufnahmefrequenz von 1 Hz. Die Belichtungszeit betrug 100 bis 500 Millisekunden.

#### 5.9.4 Epifluoreszenzmikroskopie

Als Alternative zur TIRF-Mikroskopie der basalen Plasmamembran von lebenden Zellen wurde Epifluoreszenzmikroskopie an zellfreien Plasmamembranpräparationen durchgeführt (siehe auch Abschnitt 5.6). Ein Nachteil ist, dass sie keine Mikroskopie unter *in vivo* Bedingungen mehr erlauben. Dennoch erfahren Proteine in *Membrane Sheets* eine native Membranproteinumgebung, weshalb sich *Membrane Sheets* für die Untersuchung der lateralen Verteilung von Proteinstrukturen in der Plasmamembran gut eignen. Ein großer Vorteil zur TIRFM ist, dass zytosolische Fluorophore oder Fluoreszenzsignale von Membranstrukturen nahe an der Plasmamembran die Beobachtung nicht beeinträchtigen und die Interpretation erschweren.

Zur Mikroskopie der *Membrane Sheets* wurde ein Axio Observer D1 Epifluoreszenzmikroskop (*Carl Zeiss AG*, Oberkochen) verwendet. Das Ölobjektiv war ein NA 1,4 x 100 Plan-Apochromat und die verwendete 12 Bit

CCD-Kamera eine Sensicam QE (PCO AG, Kehlheim) mit einer Chipgröße von 1376 x 1040 Pixel und einer Pixelgröße von 6,45 x 6,45  $\mu\text{m}^2$ . Zur Anregung der Fluoreszenz wurde eine Xenon-Lampe XBO75 100.26B (LEJ GmbH, Jena) mit den folgenden Filtersatzkombinationen der Firma AHF analysentechnik AG (Tübingen) verwendet:

DAPI-Kanal:	F11-000, Anregungsfilter AT 350/50, Sperrfilter E 420 LP, Strahlenteiler 400 DCLP.
GFP-Kanal:	F36-525, Anregungsfilter BrightLine HC 472/30, Sperrfilter BrightLine HC 520/35, HC Strahlenteiler BS 495.
TRITC-Kanal:	F36-503, Anregungsfilter BrightLine HC 543/22, Sperrfilter BrightLine HC 593/40, HC Strahlenteiler BS 562.

Alle Kameraeinstellungen und die Bildaufnahmen wurden über die Software CamWare (PCO AG, Kehlheim) kontrolliert.

*Membrane Sheets* wurden in PBS mit 10 % (v/v) gesättigter TMA-DPH-Lösung bei RT mikroskopiert. TMA-DPH ist ein Membranfarbstoff, welcher erst durch Inkorporation in die Zellmembran effizient fluoresziert. Da dieser Farbstoff in der Membran schnell ausbleicht, ist es notwendig, dass das TMA-DPH in der Membran durch ständigen Austausch mit ungebleichten Fluorophoren des umgebenden Mediums erneuert wird. Durch eine TMA-DPH-Färbung können *Membrane Sheets* auf dem Deckglas im DAPI-Kanal detektiert und die Plasmamembranintegrität kontrolliert werden. Das GFP-Signal von plasmamembraninserierten Konstrukten wurde im GFP-Kanal aufgenommen und die Antikörperfärbung mit dem AlexaFluor 594 Fluorophor im TRITC-Kanal. Für Kollisionsstudien wurde 1:10000 verdünnte 0,1  $\mu\text{m}$  TetraSpeck microspheres (#T7279, Life Technologies GmbH, Darmstadt) dem Mikroskopiepuffer hinzugefügt. Diese waren in allen verwendeten Fluoreszenzkanälen sichtbar und dienten der Korrektur des lateralen Versatzes zwischen diesen Kanälen. Die Bildauswertung wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Schneider et al. 2012) durchgeführt.

### 5.9.5 Analyse des Glykokalyxverbaus

Die mit WGA gefärbten *Membrane Sheets* (siehe Abschnitt 5.8) wurden unter Verwendung des Epifluoreszenzmikroskopes Axio Observer D1 (siehe Abschnitt 5.9.4.) mit einer Belichtungszeit von 1 Sekunde im WGA-(TRITC)-Kanal in PBS



mit 10 % TMA-DPH mikroskopiert. Es wurde je ein Bild im DAPI-Kanal für die TMA-DPH-Färbung und im TRITC-Kanal für die WGA-Färbung aufgenommen. Zum Analysieren der Fluoreszenzintensität des WGA-Signals wurden ROIs auf den *Membrane Sheets* im TMA-DPH-Kanal definiert und anschließend die Signalstärke innerhalb der ROIs im AlexaFluor 594-Fluoreszenzkanal gemessen. Von dieser wurde dann die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes abgezogen. Die mittlere Signalstärke der Enzymbedingung eines Versuchstages wurde auf die mittlere Signalstärke der Kontrollbedingung desselben Versuchstages normalisiert. Die relativen Signalstärken wurden anschließend über alle Versuchstage gemittelt und der Standardfehler bestimmt.

### 5.9.6 Mikroskopie und Analyse der lateralen Verteilung der APP-Konstrukte

Aus PC12-Zellen, welche die entsprechenden Konstrukte für 8 Stunden unter Zellkulturstandardbedingungen exprimiert haben, wurden *Membrane Sheets* hergestellt (siehe Abschnitt 5.6), fixiert und mittels Epifluoreszenzmikroskopie visualisiert (s.o.). *Membrane Sheets* mit einer intakten Membran und exprimierten Konstrukten wurden ausgesucht und im DAPI- und im GFP-Kanal mit einer Belichtungszeit von je 1 Sekunde aufgenommen. Zur Clusteranalyse wurde eine ROI in ImageJ auf die intakte Membran eines *Membrane Sheets* im DAPI-Kanal gelegt und in dieser ROI im GFP-Kanal die Standardabweichung ( $SD_{ROI}$ ) der Fluoreszenzintensität gemessen. Da die Standardabweichung ein Ausdruck der Schwankung um einen Mittelwert ist, sollte ein homogen bzw. uniform verteiltes Fluoreszenzsignal eine niedrige Standardabweichung aufweisen. Ist das Fluoreszenzsignal hingegen heterogen verteilt, z.B. in Clustern, dann sollte die Standardabweichung eher groß sein. Da unterschiedliche Fluoreszenzintensitätsstärken das Ergebnis verzerren können, wurde in derselben ROI auch die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Von dieser wurde die Hintergrundfluoreszenzintensität, gemessen in einer ROI neben dem *Membrane Sheet*, abgezogen. Die Standardabweichung in der ROI wurde dann auf die hintergrundkorrigierte mittlere Fluoreszenzintensität ( $FL_{ROI}$ ) normalisiert (relative  $SD_{ROI}$ ).

$$Relative\ SD_{ROI} = \frac{SD_{ROI}}{FL_{ROI}}$$

Die relativen SD-Werte wurden dann gegen die dazugehörigen  $FL_{ROI}$ -Werte in einem Streudiagramm aufgetragen. An den Punktwolken der einzelnen Konditionen wurde dann eine Kurvenanpassung mit dem folgenden Funktionsterm in Excel durchgeführt.

$$f(x) = a * x^b$$

### 5.9.7 Mikroskopie und Analyse der Zelloberflächenimmunfärbung

Transfizierte PC12-Zellen wurden wie in Abschnitt 5.7.2 beschrieben mit Antikörpern gefärbt und in Mowiol mit DABCO eingedeckelt. Diese Proben wurden dann mit dem im Abschnitt 5.9.2 beschriebenen konfokalen Laserrastermikroskop visualisiert. Dazu wurde jeweils ein Bild mit transfizierten Zellen im differentiellen Interferenzkontrast-(DIK)-Modus, im GFP-Kanal mit der Anregungslaserlinie 488 nm und im AlexaFluor 594-Kanal mit der Anregungslaserlinie 543 nm aufgenommen. Zur Auswertung wurde ein 10-Pixel breiter *Linescan* über den Rand der Zellen im DIK-Bild gelegt, wobei Kontaktstellen zu benachbarten Zellen ausgelassen worden sind. Im DIK wurde auch eine ROI zur Messung der Hintergrundfluoreszenz in einen zellfreien Bereich des Bildes gelegt. Die mittlere Fluoreszenzintensität pro Pixel wurde dann von den *Linescans* im GFP- und AlexaFluor 594-Kanal ermittelt und die mittlere Fluoreszenzintensität für den jeweiligen Hintergrund korrigiert. Die hintergrundkorrigierten Fluoreszenzwerte der analysierten Zellen von allen Versuchstagen wurden in einem Streudiagramm aufgetragen. Dazu wurde der Wert des GFP-Kanals gegen den dazugehörigen Fluoreszenzwert des AlexaFluor 594-Kanals aufgetragen. Durch die Punktwolke jeder Bedingung wurde jeweils eine Gerade angepasst.

### 5.9.8 Kolokalisationsanalyse der APP-Konstrukte mit Clathrin

PC12-Zellen wurden mit den entsprechenden APP-Konstrukten transfiziert und für 8 Stunden mit Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. *Membrane Sheets* wurden erstellt und diese gegen Clathrin mit Antikörpern gefärbt (siehe auch die Abschnitte 5.6 und 5.7.3). Die *Membrane Sheets* wurden unter Epifluoreszenzbedingungen in den drei Fluoreszenzkanälen DAPI, GFP und TRITC mit einer Belichtungszeit von 1 Sekunde für DAPI und GFP sowie 0,5 Sekunden für TRITC nach Zugabe der TetraSpeck *microspheres* mikroskopiert.

Anhand dieser wurde eine mögliche laterale Verschiebung zwischen den Aufnahmen der verschiedenen Kanäle eines *Membrane Sheets* korrigiert. Eine ROI wurde in einem intakten Bereich der Plasmamembran eines *Membrane Sheets* zur Kolokalisationsanalyse zwischen dem Konstrukt-GFP- und dem Clathrin-AlexaFluor 594-Signal definiert. Zur Bestimmung der Kolokalisation der Strukturen in beiden Kanälen, wurde als objektive Methode die Fluoreszenzintensitätsverteilung in der ROI zwischen dem GFP-Kanal (g) und dem AlexaFluor 594-Kanal (a) korreliert. Als Maßzahl wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  mit dem ImageJ-Plugin „*Colocalization Indices*“ (Nakamura et al. 2007) berechnet. Dieser Koeffizient gibt den Grad der linearen Beziehung zweier Verteilungen, z.B. von Fluoreszenzintensitätsverteilungen in zwei Bildern, wieder (Manders et al. 1992).

$$r = \frac{\sum_i (a_i - a_{\text{mittel}}) * (g_i - g_{\text{mittel}})}{\sqrt{\sum_i (a_i - a_{\text{mittel}})^2 * \sum_i (g_i - g_{\text{mittel}})^2}}$$

Die Pearson-Korrelation ergibt für ein Bild und seine exakte Kopie den Wert  $r = 1$ , für ein Bild und sein inverses Bild den Wert  $r = -1$  und bei einem Nichtbezug zweier Bilder den Wert  $r = 0$ . Die Korrelationswerte wurden pro Versuchstag und Kondition gemittelt und diese Mittelwerte zu einem Gesamtmittelwert  $\pm$  Standardfehler aller Versuchstage der jeweiligen Konstrukte verrechnet.

Die Kolokalisation des APP-Wildtypkonstrukts mit Clathrin wurde zusätzlich noch auf individueller Clusterebene ermittelt. Dazu wurden in den ROIs der Korrelationsanalyse maximal 10 Kreise pro *Membrane Sheet* auf einzelne Cluster konzentrisch gelegt. Diese Kreise wurden positionsgetreu auf die korrespondierende Clathrinaufnahmen-ROIs übertragen. Kreise, in denen sich mittig ein Clathrinfluoreszenzmaximum befunden hat, wurden als kolokalisiert bewertet. Befand sich kein Maximum zentral im Kreis, wurde dieser als nicht-kolokalisiert gezählt. Um die Menge an zufälliger Hintergrundkolokalisation zu ermitteln, welche durch die große Anzahl an Fluoreszenzstrukturen in beiden Kanälen entsteht, wurde diese Prozedur an gespiegelten Clathrin-ROIs wiederholt. Die gewichtete, prozentuale Kolokalisation wurde dann aus der Kolokalisation und der Hintergrundkolokalisation nach folgender Formel berechnet (Lang et al. 2002).

$$Kolokalisation_{\text{korrigiert}} = \frac{Kolokalisation - Hintergrundkolokalisation}{1 - Hintergrundkolokalisation/100}$$

Durch diese Gleichung wird für den zufälligen Kolokalisationsbeitrag an der Gesamtkolokalisation korrigiert.

Die Kolokalisation wurde für alle *Membrane Sheets* eines Versuchstages gemittelt und aus den Werten der Einzeltage ein Durchschnittsgesamtwert  $\pm$  Standardfehler berechnet.

## 6 Ergebnisse

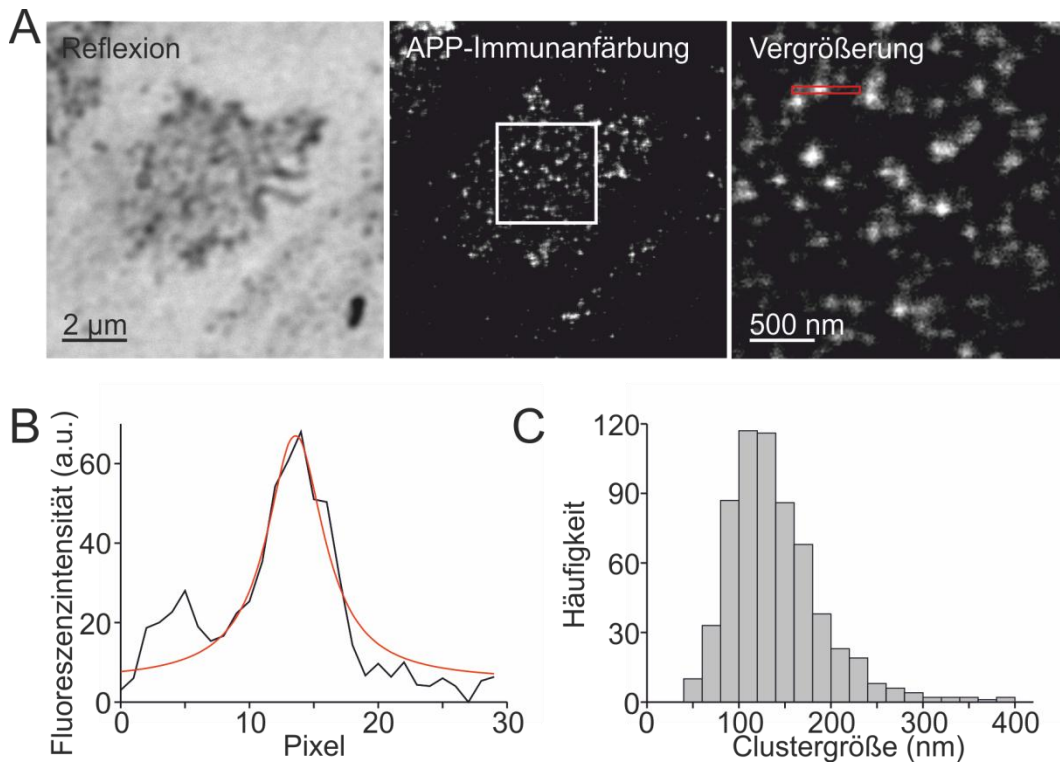
### 6.1 Charakterisierung der lateralen Organisation von APP mittels STED-Nanoskopie

Wie weiter oben bereits beschrieben, zeigt die Arbeit von Schneider et al. (2008), dass APP in der Plasmamembran von N2a-Zellen in Proteinclustern organisiert ist. Um die laterale Organisation von APP auch in PC12-Zellen zu untersuchen, wurde seine laterale Verteilung anhand von immunfluoreszenzgefärbten *Membrane Sheet* Präparationen und hochauflösender STED-Nanoskopie untersucht. Durch die hier verwendete STED-Nanoskopie ist es möglich, die von Ernst Abbe formulierte physikalische Auflösungsgrenze von mehreren 100 nm (Hell 2003), abhängig von der verwendeten Lichtwellenlänge, deutlich zu unterschreiten und eine Auflösung von an die 100 nm zu erzielen.

PC12-Zellen wurden auf Deckgläser plattiert und für 24 bis 60 Stunden unter Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. Die Zellen sind anschließend in eiskaltem Sonifizierungspuffer einem starken Ultraschallpuls ausgesetzt worden, durch welchen die oberen Teile der Zelle abgerissen wurden und nur die basale Plasmamembran am Substrat verblieben ist. Die so entstandenen zellfreien Plasmamembranpräparationen eignen sich z.B. sehr gut zur Antikörperfärbung gegen intrazelluläre Membranproteindomänen, da hier der Antikörperzugang, anders als bei Ganzzellpräparaten, nicht behindert wird und der Einsatz von Detergenzien deshalb unnötig ist. Zudem sind die sogenannten *Membrane Sheets* aufgrund fehlender *Out-of-Focus*-Fluoreszenz prädestiniert zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Anfärbungen der basalen Plasmamembran.

Nach dem Sonifizieren wurden die *Membrane Sheets* fixiert und mit Antikörpern gegen den C-Terminus von APP angefärbt (für ein genaues Färbeprotokoll siehe Abschnitt 5.7.1). Nach dem Eindeckeln der gefärbten *Membrane Sheets* in Mowiol mit DABCO, wurden die Plasmamembranpräparationen mit einem STED-Mikroskop analysiert.

Das verwendete STED-Mikroskop ermöglicht eine maximale Auflösung von 90 nm bis 100 nm, welche deutlich besser ist als die der herkömmlichen Konfokalmikroskopie. Dieser Auflösungsgewinn erlaubt die Vermessung zweier



**Abbildung 15 Laterale Organisation von APP in der basalen Plasmamembran von PC12-Zellen**

STED-Nanoskopie wurde zur Visualisierung der APP-Verteilung in zellfreien, basalen Plasmamembranpräparationen von PC12-Zellen verwendet. APP wurde für ein intrazelluläres Epitop mit Antikörpern gefärbt. (A) Das linke Bild des Panels zeigt einen *Membrane Sheet*, welcher durch die Detektion des reflektierten Exzitationslaserlichts visualisiert worden ist. Diese Methode erlaubt es, zweidimensionale Membranpräparationen auf dem Deckglas zu finden und auf deren Integrität hin zu überprüfen. Das mittlere Bild zeigt die Aufnahme des Atto647N-Fluoreszenzsignals der Antikörperfärbung desselben *Membrane Sheets* im Fluoreszenzkanal. Zur genauen Analyse wurde in der zellfreien Plasmamembranpräparation eine 150 x 150 Pixel große *Region-of-Interest* (ROI) definiert und in dieser die APP-Cluster mittels einem 3 x 30 Pixel großen *Line-Scan* vermessen (rechtes Bild, roter Kasten). Die Auflösung des hier verwendeten STED-Mikroskops ist in x-Achsenrichtung etwas schlechter als in y-Achsenrichtung (B) Um die Halbwertsbreite (FWHM), die ein Maß für die Objektgröße ist, zu berechnen, wurde die Fluoreszenzverteilung des *Line-Scans* mit einer Lorentz-Funktion angepasst. Aus dieser wurde dann die FWHM ermittelt. (C) Die Größen aller analysierter APP-Cluster wurden anschließend in Form eines Histogramms aufgetragen. Die Mehrheit der vermessenen APP-Strukturen hat dabei eine Größe oberhalb der Auflösungsgrenze des verwendeten STED-Mikroskops, die bei 100 nm liegt. Ausgewertet wurden insgesamt 624 APP-Cluster von drei unabhängigen Versuchstagen.

fluoreszenzmarkierter Strukturen, welche ansonsten unter Umständen nicht als zwei separate Objekte erkannt worden wären, oder die Größenbestimmung fluoreszenzmarkierter Plasmamembrannanodomänen.

Mit dem Reflexionssignal des verwendeten Anregungslasers wurden *Membrane Sheets* im Konfokalmodus lokalisiert und fokussiert (siehe Abschnitt 5.9.1, Abb. 15 A links). Anschließend wurde das emittierte Fluoreszenzsignal im STED-

Modus mit einem *2-Lineaverage*-Verfahren aufgenommen. Pro unabhängigen Versuchstag wurden mindestens drei, maximal aber elf *Membrane Sheets* mikroskopiert und für die weitere Analyse verwendet.

Zur Größenbestimmung der APP-Cluster wurde in den *Membrane Sheet* Aufnahmen eine 150 x 150 Pixel große Region definiert und in dieser die APP-Cluster mit 3 x 30 Pixel großen *Linescans* vermessen (Abb. 15 A, mittlere und rechte Aufnahme).

Das Intensitätsprofil dieser Linescans wurde dann an eine Lorentz-Funktion angepasst und aus dieser die Halbwertsbreite (FWHM) bestimmt (Abb. 15 B). Die FWHM gibt dabei die Größe eines fluoreszierenden Objektes in einer Mikroskopieaufnahme wieder. Aus den Clustergrößen wurde der Mittelwert pro Versuchstag bestimmt. Diese Werte wurden dann über alle drei unabhängigen Versuchstage erneut zu einer Durchschnittsclustergröße gemittelt.

Dabei zeigte sich eine mittlere APP-Clustergröße von  $123,19 \text{ nm} \pm 9,06$  (SEM). Diese liegt deutlich über der angegebenen maximalen Auflösung des verwendeten STED-Mikroskops, weshalb die Messung der APP-Clustergrößen wahrscheinlich nicht durch die Punktspreizfunktion (PSF) auflösungsbegrenzt ist, wengleich Auflösung und Clustergröße nahe beieinander liegen. Dies wird auch durch die Größenverteilung aller vermessener APP-Signale in Abb. 15 C deutlich. Die Mehrheit der gemessenen APP-Objektgrößen liegt jenseits der 100 nm und damit auch jenseits der Auflösungsgrenze (s.o.). Abgesehen von den Clustern war kein nennenswerter uniformer Hintergrund zu erkennen.

Zusammengefasst zeigt die hier beschriebene STED-mikroskopische Analyse, dass die Mehrheit des plasmalemalen APPs in supramolekularen Clustern organisiert ist.

## **6.2 Mobilität und Verteilung von überexprimierten APP-Konstrukten – Die generelle Rolle der extra- und intrazellulären Domäne**

Die STED-Mikroskopiedaten belegen, dass APP überwiegend in supramolekularen Domänen in der Zellmembran organisiert ist, was auch unabhängig von der hier vorliegenden Arbeit für APP bereits gezeigt wurde. Doch was ist der zugrundeliegende Segregationsmechanismus?

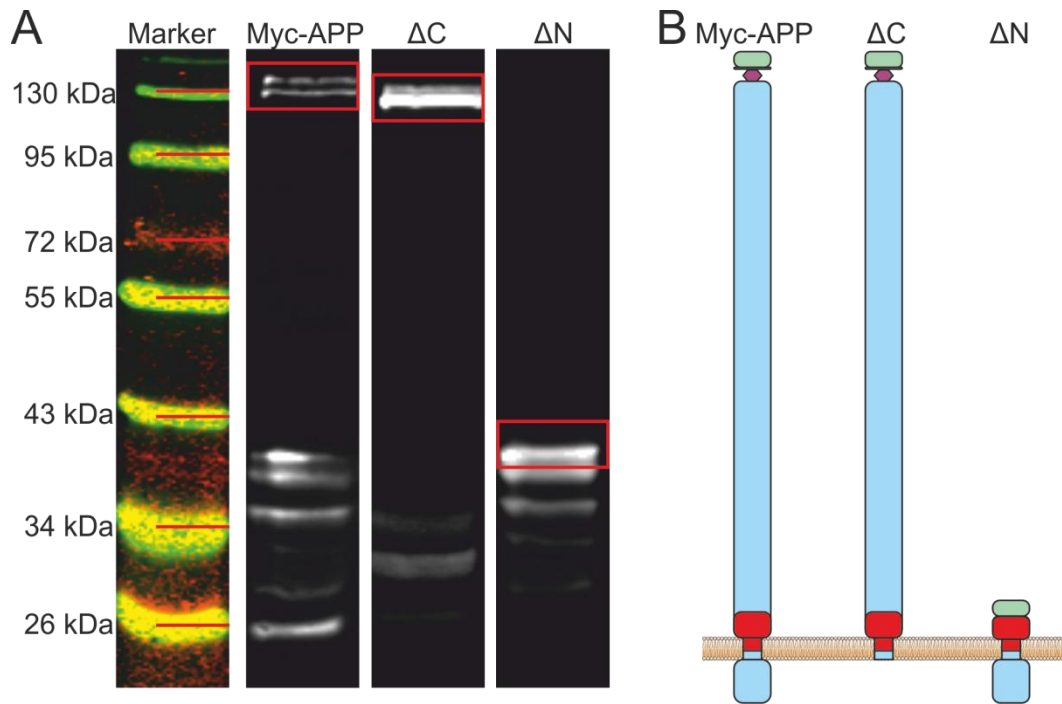
Z.B. sind die beiden Membranproteine Syntaxin 1a und Syntaxin 4, trotz hoher Sequenzidentität von 46 % (Bennett et al. 1993), in unterschiedlichen Membrandomänen lokalisiert (Sieber et al. 2006). Die Ursache der Trennung in unterschiedliche Zellmembrancluster konnte dabei auf homophile Proteinwechselwirkungen der SNARE-Domänen von Syntaxin 1a bzw. Syntaxin 4 zurückgeführt werden (Sieber et al. 2006; Sieber et al. 2007).

Um zu untersuchen, ob die extra- oder intrazelluläre Proteindomänen von APP ebenfalls Einfluss auf die Organisation von APP in Membranproteincluster haben, wurde die Mobilität von APP in der Plasmamembran gemessen und mit Varianten verglichen, denen die extra- oder intrazelluläre Domäne fehlt. Die Mobilität wurde mittels FRAP-Analyse bestimmt und diente dabei zunächst als erster Hinweis auf den Grad der Clusterbildung da bekannt ist, dass die Mobilität mit der Clusterbildung abnimmt (Sieber et al. 2007). Für die FRAP-Analyse muss APP fluoreszenzmarkiert werden. Deshalb wurde ein humanes APP-Konstrukt, welches N-terminal zwei Aminosäuren hinter dem Signalpeptid eine Myc-Sequenz besitzt, mittels Gateway-Klonierung (siehe Abschnitt 5.1) C-terminal an eine EmGFP-Sequenz in einem pcDNA6.2-Vektor fusioniert. Zusätzlich wurden zwei Deletionskonstrukte kloniert, bei denen entweder der Großteil der extrazellulären Domäne, oder die intrazelluläre Domäne entfernt wurde. Diese Konstrukte wurden in neuronalen PC12-Zellen exprimiert. Zur Bestimmung des Einflusses der in PC12-Zellen vorhandenen neuronalen Kofaktoren, wurden diese Konstrukte ebenfalls in nicht-neuronalen HepG2-Zellen exprimiert. Mögliche Deletionseffekte wurden mittels FRAP- und TIRF-Mikroskopie analysiert.

### **6.2.1 Western Blot Analyse der überexprimierten APP-Konstrukte Myc-APP, $\Delta C$ und $\Delta N$**

Um die Expression der klonierten Konstrukte Myc-APP,  $\Delta C$ ,  $\Delta N$  und potentieller Abbauprodukte nachzuweisen, wurden PC12-Zellen mit diesen transfiziert,





### Abbildung 16 Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und seiner Hauptdomänendeletionskonstrukte

APP und zwei Deletionsmutanten wurden in PC12-Zellen überexprimiert und lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und je 30 µg pro Bedingung mit Ladebuffer versehen, 10 min bei 99 °C inkubiert und auf ein 10 %-iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten Proteinbanden durch einen Semidry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die APP-Konstruktbanden wurden mittels einer Antikörperfluoreszenzfärbung gegen das in allen Konstrukten vorhandene, C-terminale EmGFP markiert und mit dem bildgebenden Analysegerät *Li-Cor Odyssey* aufgenommen. (A und B) Western Blot der APP-Konstrukte, sowie ein Piktogramm zu deren Veranschaulichung (das C-terminal vorhandene EmGFP ist nicht dargestellt). Deutlich zu erkennen sind die entsprechenden Banden der APP-Konstrukte bei der zu erwartenden Laufhöhe (rote Kästen). Ebenfalls gut zu erkennen sind auch die großen Laufhöhenunterschiede zwischen den Konstrukten Myc-APP und  $\Delta C$  gegenüber  $\Delta N$ , sowie der kleine aber sichtbare Unterschied zwischen Myc-APP und  $\Delta C$ . Die Doppelbanden bei Myc-APP und  $\Delta C$  entstehen durch Glykosylierung während des Transportes zur Zellmembran. Gut zu erkennen sind auch die Produkte der APP-Prozessierung und des APP-Abbaus. Die gezeigten Bilder sind aufgrund deutlicher Varianz im Expressionsgrad unterschiedlich skaliert. (B) Signalpeptid (SP): grün; Myc-Tag: violette Hexagon; APP-Sequenz: blau; A $\beta$ -Sequenz: rot.

nach 8 Stunden lysiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4).

Gut zu erkennen sind die Proteinbanden der exprimierten Konstrukte bei der ungefähr zu erwartenden Laufhöhe in Abb. 16 A (rote Kästen). Das C-terminal verkürzte Konstrukt  $\Delta C$  hat eine leicht geringere Laufhöhe als das Wildtyp-Myc-APP. Die geringste Laufhöhe von ca. 40 kDa hat die N-terminal deletierte Mutante  $\Delta N$  (für eine grafische Darstellung der Konstrukte siehe Abb. 16 B).

Dabei zeigen das Wildtyp-Konstrukt Myc-APP und die Hauptdomänendeletionsmutante  $\Delta C$  charakteristische Doppelbanden, welche durch einen unterschiedlichen Glykosylierungsgrad während des zellulären Transportes zur Plasmamembran entstehen, siehe auch Abb. 23, in welcher der Verlust der Doppelbande bei nicht-glykosylierten Mutanten zu beobachten ist. Die untere Bande stellt das unreife und die obere Bande das reife, glykosylierte APP dar (Schmidt et al. 2007).

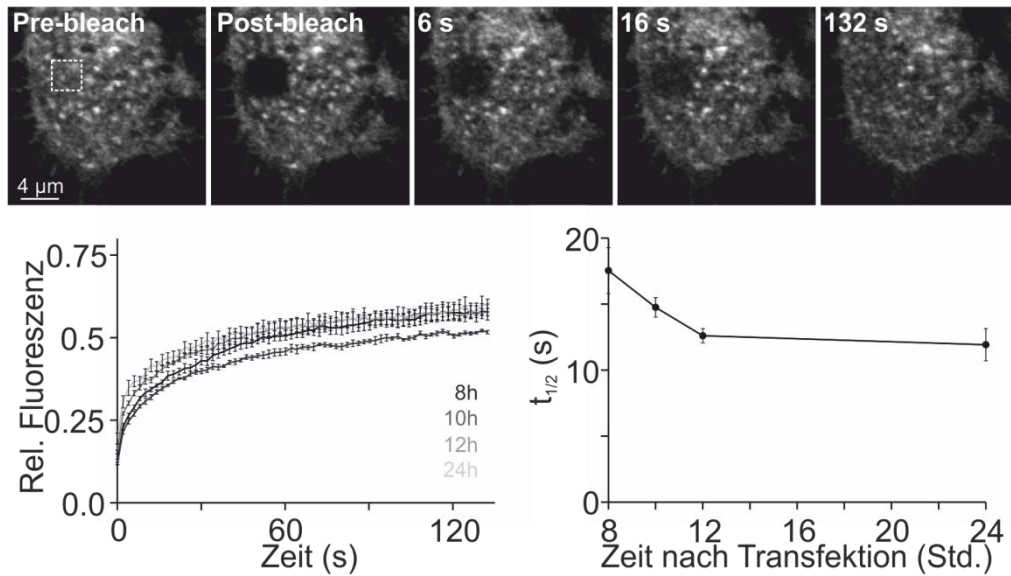
Das Deletionskonstrukt  $\Delta N$  besitzt keine Glykosylierungsstellen mehr, weshalb hier nur eine Hauptbande zu sehen ist. Zudem zeigen alle drei Konstrukte zusätzlich noch Prozessierungsbanden von geschnittenem APP verschiedenster Länge. Der Blot zeigt nur die C-terminalen Prozessierungs- bzw. Abbauprodukte, da bei diesen noch das detektierte GFP vorhanden ist. Daher sind auch nur diese Fragmente für die Fluoreszenzmikroskopie relevant, da die N-terminalen Abbauprodukte in dieser aufgrund des fehlenden Fluorophors nicht mehr nachweisbar sind.

Im Expressionsgrad der verschiedenen Konstrukte zeigen sich enorme Unterschiede. So wurde das Myc-APP-Konstrukt wesentlich schwächer exprimiert als die beiden Hauptdomänendeletionsmutanten  $\Delta N$  und  $\Delta C$ . Die stärkste Expression konnte für die  $\Delta N$ -Mutante nachgewiesen werden.

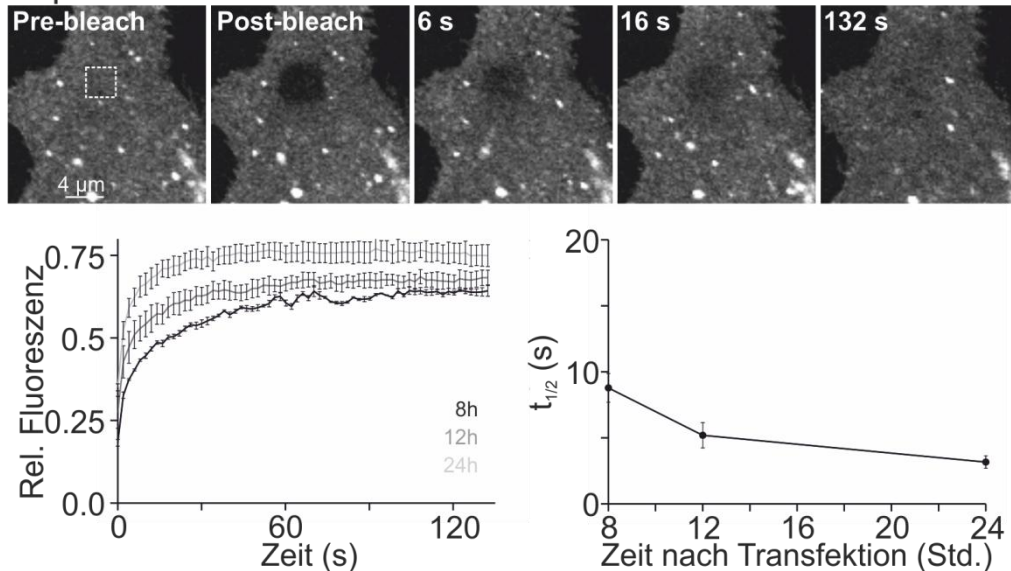
### **6.2.2 Die Mobilität von überexprimierten APP in Abhängigkeit von der Zeitdauer nach der Transfektion**

Um die Mobilität des Myc-APP-Konstrukts in der basalen Plasmamembran von transfizierten PC12- und HepG2-Zellen zu bestimmen, wurden quantitative FRAP-Analysen durchgeführt. Mittels eines konfokalen Laserrastermikroskops wurde die Verteilung von APP in dem optischen Schnitt der basalen Membran visualisiert. Innerhalb der Plasmamembran wurde Fluoreszenz in einer quadratischen Fläche ausgeblendet (ROI, 15x15 Pixel, 9,64  $\mu\text{m}^2$ ). Anschließend wurde in einer mehrminütigen Messung die Rückkehr der Fluoreszenz, und damit der GFP-markierten Myc-APP Fusionsproteine, in die ROI gemessen. Aus den ermittelten FRAP-Kurven wurde die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  sowie die maximale Fluoreszenzrückkehr  $\text{Rec}_{\text{Max}}$  als Kenngrößen der Proteindiffusionskinetik bestimmt. Je mobiler die GFP-markierten Moleküle sind, desto schneller kehrt die Fluoreszenz zurück, und desto kleiner ist  $t_{1/2}$ . Die Bestimmung der Halbwertszeit erlaubt es also, die Mobilität von APP von verschiedenen Zeitpunkten nach der

## A PC12



## B HepG2



**Abbildung 17 Die Mobilität von überexprimiertem APP in der Zellmembran ist abhängig von dem Zeitpunkt der FRAP-Messung nach der Transfektion**

PC12- oder HepG2 (A bzw. B) wurden mit dem Myc-APP-EmGFP Konstrukt transfiziert. Die basale Membran GFP-positiver Zellen wurde anschließend 8, 10, 12 oder 24 Stunden nach der Transfektion in Ringer bei Raumtemperatur mikroskopiert. Dabei wurde in der Membran eine 15 x 15 Pixel große ROI (gestricheltes Quadrat) gebleicht und die Rückkehr der Fluoreszenz durch die Aufnahme von Bildern alle 2 Sekunden in einem Zeitintervall von 132 Sekunden gemessen (obere Abbildungen in A und B). Von den erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerten wurde der Hintergrund abgezogen und auf die gemittelte Fluoreszenzintensität der drei Messwerte vor dem Bleichen („Pre-bleach“) normalisiert und die relativen Werte anschließend gegen den zugehörigen Messzeitpunkt aufgetragen. Die so erhaltenen Kurven wurden über einen Versuchstag und für jede Bedingung gemittelt. Aus dieser gemittelten Kurve wurde die Halbwertszeit bestimmt. Die Halbwertszeiten wurden gegen den Zeitpunkt nach der Transfektion aufgetragen. Die

gezeigten Fluoreszenzwiederherstellungskurven und Halbwertszeiten sind über je 3 unabhängige Versuchstage gemittelt (3 -7 Zellen pro Versuchstag und Kondition). Erkennbar ist eine deutliche Zunahme der Mobilität von APP über die Zeit (dokumentiert durch die Abnahme der Halbwertszeit). Die geringste Mobilität zeigt APP in beiden Zellsystemen 8 Stunden nach der Transfektion, innerhalb der folgenden 4 Stunden beginnt eine zügige Abnahme der Halbwertszeit und die geringste Mobilität wurde am 24-Stunden Zeitpunkt gemessen (alle gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM). Die Abbildung wurde in veränderter Form in Schreiber et al. (2012) publiziert.

Transfektion oder von verschiedenen APP-Varianten (in nachfolgenden Abschnitten) zu quantifizieren und zu vergleichen.

FRAP-Kurven von verschiedenen Zellen einer Kondition wurden pro Versuchstag gemittelt. An die mittleren Fluoreszenzrückkehrkurven wurde dann eine hyperbole Funktion angepasst, wobei diese Funktion die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  liefert (siehe Abschnitt 5.9.2). Die durchschnittliche  $t_{1/2}$  wurde dann aus je drei Versuchstagen gemittelt.

Zunächst wurde nur die Kinetik von Myc-APP in der basalen Zellmembran bestimmt (Abb. 17). Dabei konnte eine Zunahme der Mobilität mit zunehmender Zeit nach der Transfektion sowohl in PC12- als auch HepG2-Zellen beobachtet werden (Abb. 17 A und B). Die größten  $t_{1/2}$ -Werte wurden 8 Stunden nach der Transfektion mit Myc-APP gemessen. Für PC12-Zellen beträgt  $t_{1/2} = 17,54 \text{ s} \pm 1,74$  (SEM) und für HepG2-Zellen  $t_{1/2} = 9,61 \text{ s} \pm 1,63$  (SEM). Der deutliche Unterschied in der APP-Kinetik zwischen den beiden Zelltypen könnte durch neuronale Interaktionspartner, welche in HepG2-Zellen nicht oder nur im veränderten Maße vorkommen, verursacht sein. Der Unterschied könnte auch eine Funktion der generellen Membranzusammensetzung sein, welche bei verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sein kann. Nach 8 Stunden erhöht sich die Mobilität von APP in beiden Zelltypen schnell und erreicht nach 12 Stunden eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 12,6 \text{ s} \pm 0,54$  (SEM) in PC12-Zellen und  $t_{1/2} = 4,97 \text{ s} \pm 0,77$  (SEM) in HepG2-Zellen. Nach 24 Stunden erhöht sich die Mobilität nur noch leicht auf  $t_{1/2} = 11,92 \text{ s} \pm 1,22$  (SEM) und  $t_{1/2} = 3,16 \text{ s} \pm 0,47$  (SEM) in PC12- bzw. HepG2-Zellen. Die Halbwertszeiten werden nicht nur mit zunehmender Dauer kleiner, aus den mittleren FRAP-Kurven in Abb. 17 A und B wird auch das ansteigende Maximalniveau der Fluoreszenzrückkehr ersichtlich, d.h. der immobile Anteil an der Myc-APP Gesamtpopulation sinkt. Beide Entwicklungen sind Indizien für eine immer geringer werdende Stabilität der APP-Zellmembrancluster über die Zeit.

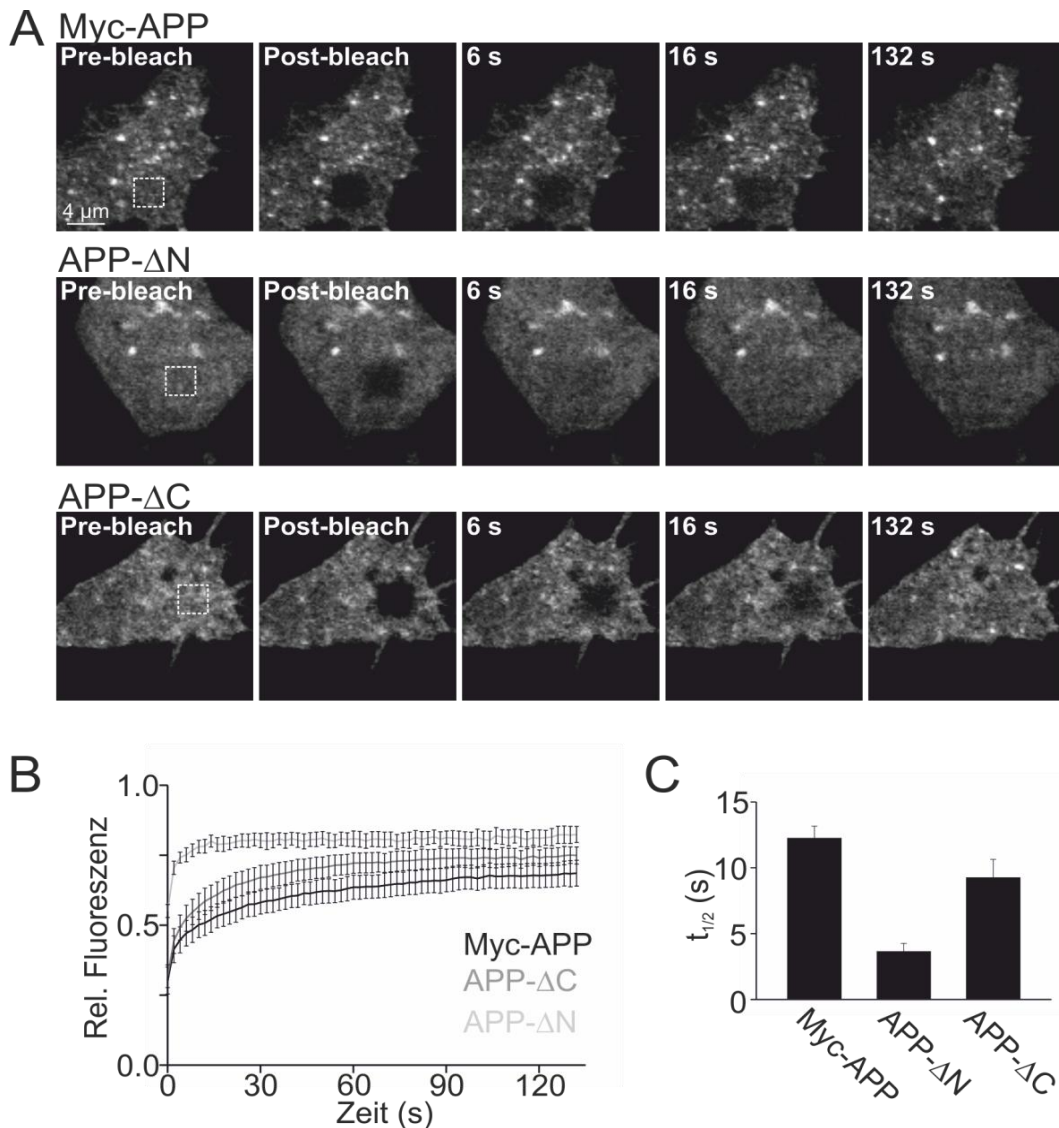
Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Sekretaseprozessierung von APP begründet liegen. Wenn APP die Plasmamembran erreicht, dann wird es früher

oder später von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretasen geschnitten (siehe Abschnitt 2.7). In der Zellmembran verbleiben dann nur die kurzen C-terminalen Reste, die sogenannten CTFs, bis diese dann durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex weiter prozessiert werden und die Spaltprodukte aus der Membran in das Zytosol bzw. in das extrazelluläre Lumen diffundieren. Wenn die CTFs in der Membran verweilen, vielleicht sogar über die Expressionsdauer dort akkumulieren, dann könnte diese Spaltproduktsubpopulation für die Erhöhung der Mobilität ursächlich sein. In Betracht kommt hier vor allem das  $\alpha$ -CTF, da die  $\beta$ -Sekretase im Gegensatz zur  $\alpha$ -Sekretase weniger an der Plasmamembran als im frühen Endosomenkompartiment aktiv ist (Kinoshita et al. 2003; Rajendran et al. 2006; He et al. 2007). Der in den CTFs fehlende, größte Teil der extrazellulären Domäne könnte also eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung supramolekularer Plasmamembrancluster von APP spielen.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde deshalb die Kinetik der Hauptdomänendeletionsmutanten in beiden Zelltypen ebenfalls bestimmt. Besonders APP- $\Delta$ N ist interessant, da dieser Variante von Beginn an die extrazelluläre Region fehlt, welche für die Verlangsamung der Diffusion verantwortlich sein könnte.

### **6.2.3 Mobilität von überexprimiertem APP und der Hauptdomänendeletionsmutanten in der Plasmamembran von PC12-Zellen**

Zur Messung eines möglichen Unterschieds in der Mobilität von Myc-APP und den Hauptdomänendeletionskonstrukten, wurden FRAP-Messungen, wie bereits in Kapitel 6.2.2 (siehe auch Abschnitt 5.9.2) beschrieben, in PC12-Zellen 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Abb. 18 A zeigt beispielhafte Aufnahmen aus Messungen von Myc-APP, APP- $\Delta$ N oder APP- $\Delta$ C exprimierenden Zellen. Die gemittelten FRAP-Kurven in Abb. 18 B zeigen eine deutlich schnellere Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals zu einem höheren Maximalwert der Fluoreszenzrückkehr von der Deletionsmutante  $\Delta$ N im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Varianten. Das von der Endodomäne befreite APP- $\Delta$ C zeigt allerdings ebenfalls einen leicht beschleunigten Anstieg der FRAP-Kurve zu einem etwas höheren maximalen Fluoreszenzniveau, als dies bei dem Myc-APP zu beobachten ist.



**Abbildung 18 Mobilität von überexprimiertem APP, APP- $\Delta$ N und APP- $\Delta$ C in der Zellmembran von PC12-Zellen**

FRAP-Analyse wie in Abb. 17 von Myc-APP und der beiden Deletionsmutanten  $\Delta$ N und  $\Delta$ C, denen entweder der größte Teil der extrazellulären oder respektive die komplette intrazelluläre Domäne fehlt (siehe auch die Piktogramme der verwendeten Konstrukte in Abb. 16). (A) Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzrückkehr in dem gebleichten Areal der basalen Plasmamembran. Die Deletion der Ektodomäne hat eine deutliche Beschleunigung der Fluoreszenzwiederherstellungsrates zur Folge. In (B) sind die über alle Versuchstage gemittelten Fluoreszenzwiederherstellungskurven der drei verwendeten Konstrukte dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der wesentlich schnellere Anstieg des Fluoreszenzsignals des  $\Delta$ N-Konstrukts verglichen mit APP und APP- $\Delta$ C. Bezogen auf das Myc-APP weist allerdings auch die intrazelluläre Deletionsvariante  $\Delta$ C eine leicht schnellere Wiederherstellungskinetik auf. Dies spiegelt sich auch in den gemittelten Halbwertszeiten der drei Konstrukte wider. (C) Hier zeigt APP- $\Delta$ N die kleinste Halbwertszeit und APP die größte. Die Halbwertszeit von APP- $\Delta$ C ist etwas geringer als die von APP. (3 - 5 Versuchstage mit jeweils 4 bis 11 Zellen, Mittelwert  $\pm$  SEM, Abbildung verändert aus Schreiber et al. (2012) entnommen)

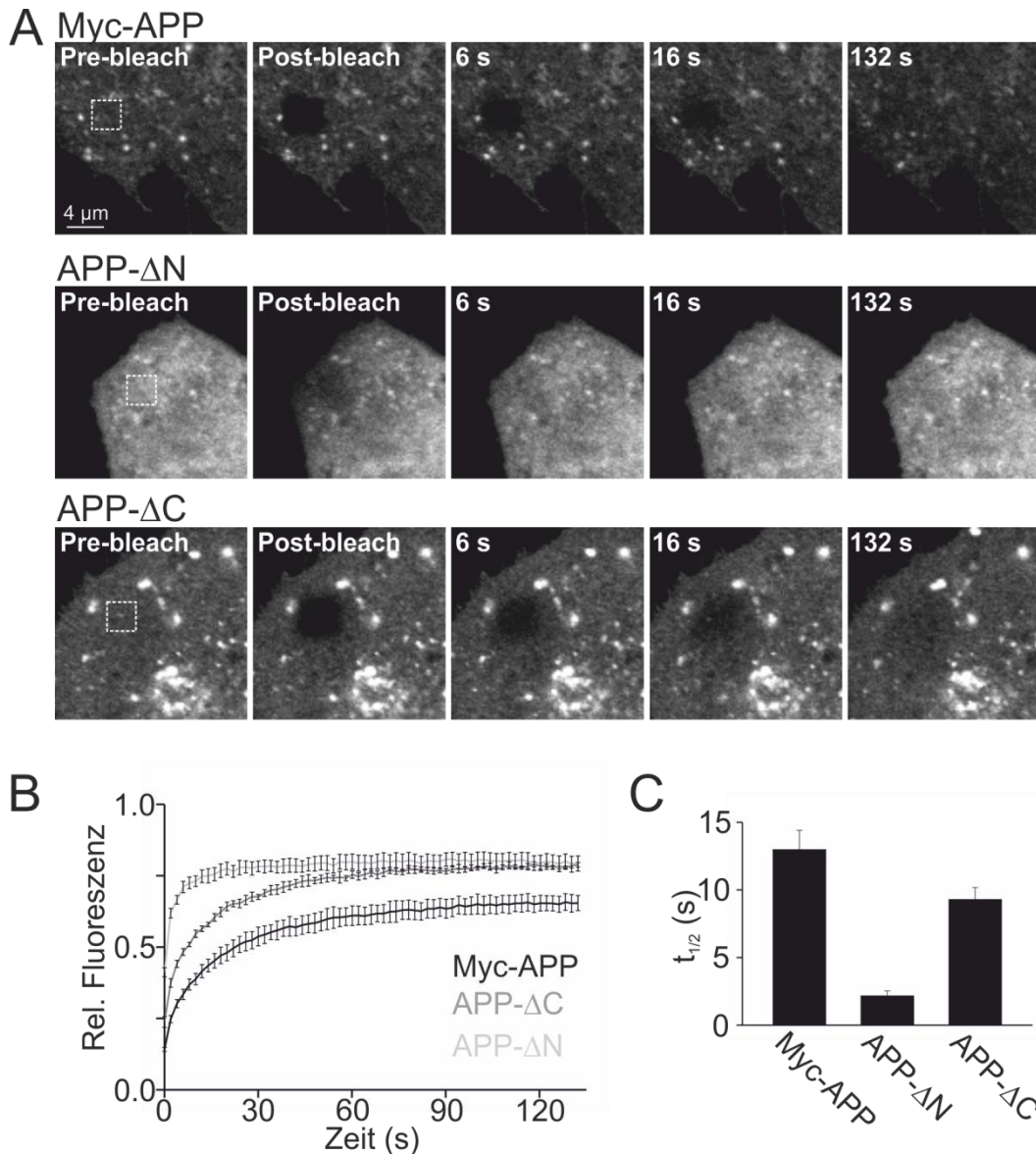
Dies spiegelt sich auch in den gemessenen Halbwertszeiten wider. Myc-APP zeigt mit  $t_{1/2} = 12,25 \text{ s} \pm 0,91$  (SEM) die langsamste Kinetik, dahingegen ist die  $\Delta N$ -Mutante mit  $t_{1/2} = 3,65 \text{ s} \pm 0,61$  (SEM) am schnellsten. Auch die  $\Delta C$ -Mutante ist leicht schneller als Myc-APP mit  $t_{1/2} = 9,25 \text{ s} \pm 1,39$  (SEM), aber dennoch deutlich langsamer als  $\Delta N$ .

Sowohl die maximale Fluoreszenzrückkehr, die ein Maß für die mobile bzw. immobile Fraktion darstellt, als auch die Halbwertszeit zeigen die Bedeutung der extrazellulären Domäne für die Mobilität von APP in der Zellmembran von PC12-Zellen. Die intrazelluläre Domäne hat zwar auch einen leichten Einfluss auf die Diffusionskinetik, allerdings in einem erheblich geringeren Umfang.

#### **6.2.4 Mobilität von überexprimiertem APP und der Hauptdomänendeletionsmutanten in der Plasmamembran von HepG2-Zellen**

Aber trifft dieser Befund auch für die Kinetik von Myc-APP und seiner Hauptdomänendeletionsmutanten für nicht-neuronale HepG2-Zellen zu? Um diese Frage zu beantworten, wurden die Konstrukte für 24 Stunden in Zellen dieser Zelllinie exprimiert. Anschließend wurden wieder FRAP-Messungen, wie für PC12-Zellen beschrieben (siehe Kapitel 6.2.3), durchgeführt.

Abb. 19 A zeigt repräsentative Aufnahmen aus FRAP-Messungen von mit Myc-APP und den Deletionsmutanten  $\Delta N$  und  $\Delta C$  transfizierten HepG2-Zellen. In Abb. 19 B sind die über je vier Tage gemittelten FRAP-Kurven der drei Konstrukte dargestellt. Ähnlich wie in PC12-Zellen zeigt das Ektodomänendeletionskonstrukt  $\Delta N$  die schnellste Fluoreszenzwiederherstellungskurve mit dem größten maximalen Fluoreszenzrückkehrwert. Das Endodomänendeletionskonstrukt  $\Delta C$  zeigt ebenfalls in Analogie zu den Ergebnissen in PC12-Zellen eine leicht schnellere Rückkehrkinetik als das Myc-APP-Konstrukt, welche dennoch wesentlich langsamer ist als die von APP- $\Delta N$ , auch wenn der Maximalwert der Fluoreszenzrückkehr von APP- $\Delta C$  nur knapp unter dem der ektodomänenverkürzten Variante liegt. Die kleinste maximale Fluoreszenzrückkehr und damit die größte immobile Fraktion besitzt wie auch in PC12-Zellen das Myc-APP-Konstrukt. Die gemittelten Halbwertszeiten in Abb. 19 C stützen den visuellen Eindruck aus der Betrachtung der Wiederherstellungskurven. Hier hat Myc-APP eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 12,98 \text{ s} \pm 1,42 \text{ s}$  (SEM). Das C-terminal verkürzte Konstrukt APP- $\Delta C$  zeigt eine etwas kleinere Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 9,30 \text{ s} \pm 0,87$  (SEM) und die deutlich schnellste Halbwertszeit weist  $\Delta N$  mit  $t_{1/2} = 2,17 \text{ s} \pm 0,37$  (SEM) auf.



**Abbildung 19 Mobilität von überexprimiertem APP und seiner Hauptdomänendeletionsmutanten in der Zellmembran von HepG2-Zellen**

Die Abbildung dokumentiert ähnlich wie Abb. 18 die Mobilität von APP und seiner Hauptdomänendeletionsmutanten diesmal in der basalen Plasmamembran von HepG2-Zellen. (A) Beispielhafte Darstellung von FRAP-Aufnahmen von HepG2-Zellen, die mit Myc-APP oder den Deletionskonstrukten  $\Delta$ N und  $\Delta$ C transfiziert wurden. (B und C) Die aus vier Tagen mit je 4 bis 7 Zellen pro Kondition und Tag gemittelte FRAP-Kurven bzw. Halbwertszeiten  $\pm$  SEM offenbaren vergleichbare Kinetiken der Konstrukte mit denen von PC12-Zellen. Die Abbildung wurde in ähnlicher Weise in Schreiber et al. (2012) veröffentlicht.

Auch in HepG2-Zellen liefert die intrazelluläre Domäne nur einen kleinen Beitrag zu der Mobilitätsrestriktion von APP in der Zellmembran, während das Fehlen des N-Terminus zu einer starken Zunahme an Mobilität führt, welche die Grenze des technisch exakt Messbaren berührt, da bei einem Aufnahmeintervall von



zwei Sekunden die zeitliche Auflösung im Bereich von einigen Sekunden liegt. Die extrazelluläre Domäne scheint also die treibende Kraft bei der Regulation der Diffusionskinetik von APP in der Plasmamembran zu sein. Aber spiegelt sich dieser Einfluss auf die Mobilität auch in der lateralen Verteilung der Membranproteine wider?

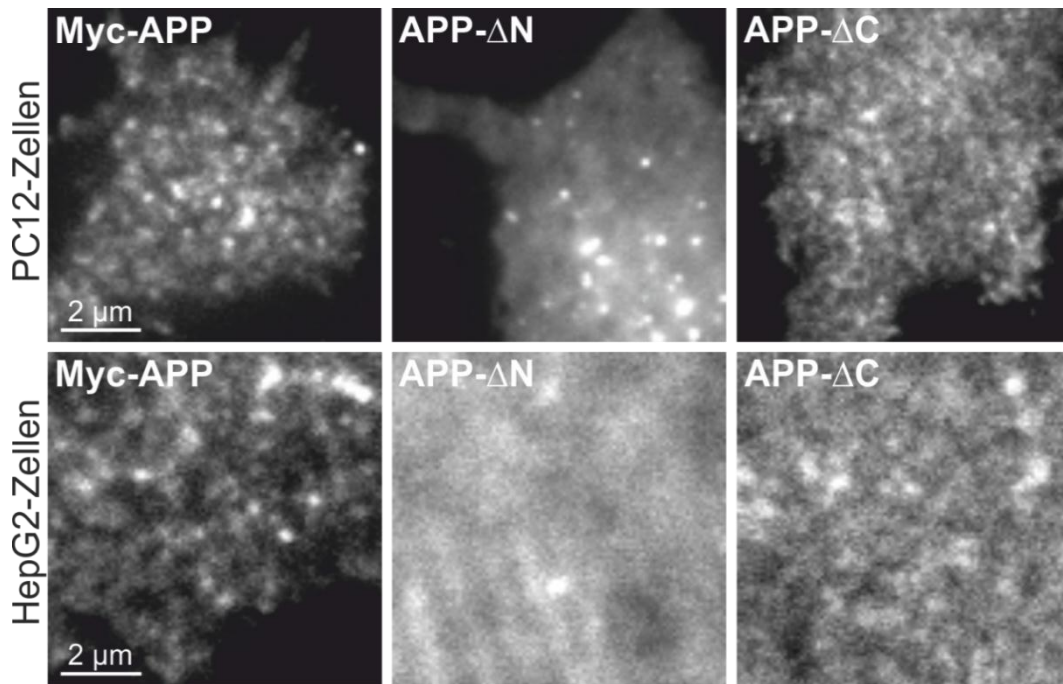
Dazu wurde die Plasmamembranorganisation von Myc-APP und der beiden Deletionsmutanten  $\Delta N$  und  $\Delta C$  mittels TIRF-Mikroskopie untersucht.

### **6.2.5 Laterale Organisation von überexprimiertem APP und der Deletionsmutanten $\Delta N$ und $\Delta C$**

Um einen Eindruck von der Organisation von Myc-APP,  $\Delta N$  und  $\Delta C$  in der Plasmamembran von PC12- und HepG2-Zellen zu erhalten, wurden mit diesen Konstrukten transfizierte Zellen mittels TIRF-Mikroskopie analysiert. Bei der TIRF-Mikroskopie wird das einfallende Exzitationslicht so eingekoppelt, dass es an der Wasser-Glas-Grenzfläche totalreflektiert wird. Durch die Totalreflexion entsteht im wässrigen Milieu eine evaneszente Exzitationslichtwelle, welche den Anhaftungsbereich der Zellen bis zu einer Tiefe von 100 nm bis 200 nm illuminiert. Dadurch können gezielt Fluorophore in der basalen Zellmembran angeregt werden, ohne störende Emission von Fluoreszenzlicht außerhalb der Fokusebene. Dies ist besonders wichtig, da sich in der Plasmamembran nur 10 % des zellulären APPs befindet (Thinakaran und Koo 2008). Diese selektive Anregung ermöglicht ein rauscharmes mikroskopieren der plasmalemalen Verteilung der Konstrukte in der basalen Zellmembran (siehe Abschnitt 5.9.3).

Gezeigt sind in Abb. 20 repräsentative TIRFM-Aufnahmen der mit Myc-APP und den beiden Deletionskonstrukten  $\Delta N$  und  $\Delta C$  transfizierten PC12- (oberes Panel) oder HepG2-Zellen (unteres Panel). Erkennbar sind in beiden Zelltypen distinkte Membranproteincluster von Myc-APP. Auch das  $\Delta C$ -Konstrukt zeigt einen überwiegenden Clusterphänotyp, auch wenn die Verteilung weniger klar ausgeprägt ist. Die Verteilung von dem Ektodomänendeletionskonstrukt ist im Kontrast zu den beiden anderen Konstrukten überwiegend uniform. Gelegentliche fluoreszenzintensitätsstarke Punkte auf der basalen Membran erscheinen auf einem uniformen Hintergrund, wie in der mittleren Aufnahme des oberen Panels dokumentiert wird.

Daher spiegelt sich die stark erhöhte Diffusionskinetik der  $\Delta N$ -Mutante in den oben gezeigten FRAP-Experimenten in einer hauptsächlich uniformen Membranproteinverteilung wider. Auch die verglichen mit Myc-APP leicht höhere Mobilität der Endodomänendeletionsmutante  $\Delta C$  scheint mit einer etwas



**Abbildung 20 Laterale Organisation der Mutanten APP,  $\Delta N$  und  $\Delta C$  in der Zellmembran von PC12- und HepG2-Zellen**

Um die morphologische Verteilung von APP und seiner Hauptdomänendeletionskonstrukte in der basalen Plasmamembran von PC12- und HepG2-Zellen zu studieren, wurden diese mit Myc-APP bzw. mit seinen Deletionskonstrukten  $\Delta N$  und  $\Delta C$  transfiziert. Nach 24 Stunden im Zellkulturinkubator wurden diese Zellen in Ringerlösung bei Raumtemperatur mit der *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* (TIRFM) mikroskopiert. Mit dieser wird, durch die bei Totalreflexion entstehende evaneszente Welle, maximal in einer Tiefe von 100 bis 200 nm hinter dem Deckglas Fluoreszenz angeregt. Dadurch werden hauptsächlich die GFP-Moleküle in der basalen Zellmembran zum Leuchten angeregt, weiter distal gelegene GFP-Fluorophore aber nicht. Dies führt zu einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis und somit zu einer qualitativ hochwertigen Mikroskopie der basalen Plasmamembran. Sowohl in PC12-Zellen (obere Abbildung) als auch in HepG2-Zellen (untere Abbildung) zeigt das Myc-APP-Konstrukt und die C-terminale Deletionsvariante  $\Delta C$  einen hohen Clustergrad verglichen mit der N-terminalen Deletionsvariante  $\Delta N$ , die mehr uniform verteilt vorliegt (Abbildung Mitte, oben und unten). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen aus 3 bis 4 unabhängigen Versuchstagen und diese sind aufgrund verschiedener Expressionslevel unterschiedlich skaliert. Verändert publiziert in Schreiber et al. (2012).

weniger scharfen Segregation in Membranproteincluster einherzugehen.

Sowohl die Mobilitätsstudien als auch die TIRFM-Untersuchungen von Myc-APP und der Ekto- bzw. Endodomänendeletionsmutante zeigen eindeutig, dass der extrazelluläre N-Terminus von APP eine zentrale Rolle in der Aggregation von APP-Clustern einnimmt. Der intrazelluläre C-Terminus scheint hingegen eine nachgeschaltete, eher stabilisierende Funktion in der Clusterbildung zu haben, da er alleine nicht hinreichend ist um Membranproteincluster auszubilden.

### **6.3 Abhängigkeit der APP-Mobilität von der Glykokalyx und dem Glykosylierungsstatus der extrazellulären Domäne**

Die Hauptdomänendeletionsexperimente charakterisieren den N-Terminus von APP als wichtigste regulatorische Domäne bezüglich der Mobilität und Clusterbildung in der Plasmamembran. Aber über welchen Mechanismus wird dies gesteuert?

So könnte die Clusterdynamik z.B. durch Protein-Protein-oder Protein-Lipid-Interaktionen definierter Bereiche innerhalb der N-terminalen Domäne spezifisch reguliert werden. Auch die pure Länge der extrazellulären Domäne könnte durch Friktion eine rein passive Rolle spielen. Weiterhin, in Analogie zum *Picket-Fence*-Modell, der Mobilitätsbegrenzung über ein Protein-Zaunsystem (Kusumi et al. 2005), wäre ein ebensolches Szenario auch auf der extrazellulären Plasmamembranseite vorstellbar, wobei hier APP durch seine Länge in begrenzten Bereichen eingefangen bleibt.

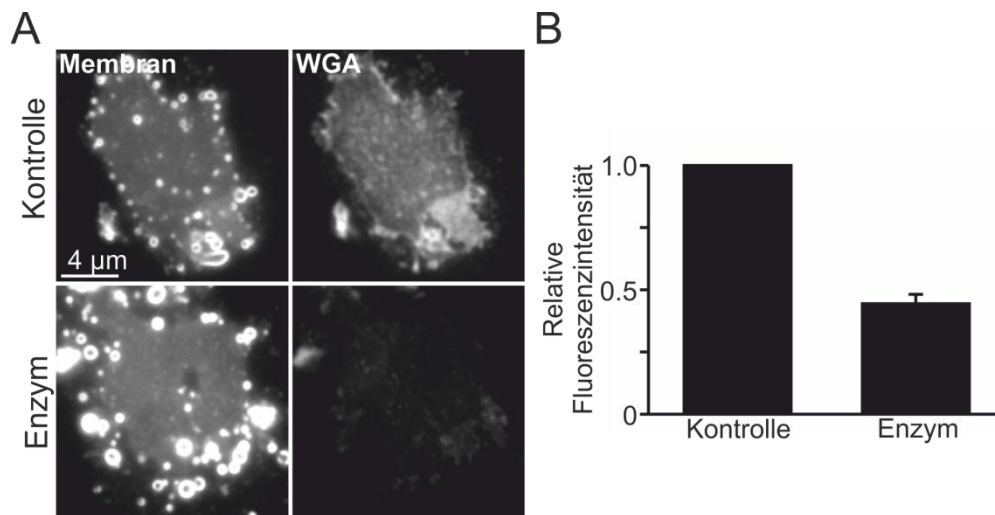
In diesem Zusammenhang könnte die Zellglykokalyx eine Rolle spielen, welche über ein Geflecht von Zuckerresten Diffusionsbarrieren für plasmalemmales APP erzeugen oder Nukleationsstellen durch Protein-Zucker-Interaktionen bieten könnte. So zeigte z.B. die Arbeitsgruppe um Ivan Nabi einen Einfluss der Glykokalyx auf die laterale Diffusion und die supramolekulare Plasmamembranorganisation des EGF-Rezeptors (Lajoie et al. 2007).

APP ist durch seine O- und N-Glykosylierungen ebenfalls Bestandteil der Glykokalyx (Dyrks et al. 1988; Weidemann et al. 1989). Auch wenn bisher nur wenig über physiologisch relevante Wechselwirkungen zwischen APP und dem extrazellulären Zuckernetzwerk bekannt ist, so scheint dieses zumindest eine Rolle bei der Stabilisierung von APP-Dimeren zu spielen (Gralle et al. 2009).

Um herauszufinden, ob Interaktionen mit der Glykokalyx ursächlich für die Clusterbildung und Dynamik von APP in der Zellmembran sein kann, wurde zum einen die plasmalemmale Diffusionskinetik von APP in deglykosylierten Zellen gemessen, zum anderen wurde die Diffusion von nicht-glykosylierten APP-Mutanten bestimmt.

#### **6.3.1 Enzymatischer Abbau der Glykokalyx**

Zum Abbau der Glykokalyx wurden Zellen mit deglykosylierenden Enzymen behandelt. Die Wirksamkeit dieser enzymatischen Deglykosylierung wurde durch



**Abbildung 21 Lektin-Bindungsstudie nach enzymatischem Glykokalyxverdau**

(A) Die obere Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von *Membrane Sheets* aus PC12-Zellen. Links sind die Aufnahmen im TMA-DPH-Kanal und rechts im AlexaFluor 594-Kanal dargestellt. Die Bilder im WGA-Kanal sind gleichskaliert und zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität durch eine weniger starke Lektinbindung nach der Behandlung mit Deglykosylierungsenzymen (unteres Bildpaar). (B) Das Balkendiagramm gibt das quantifizierte Signal, der auf die Kontrollbedingung normierten Fluoreszenzintensitäten der *Membrane Sheets* mit und ohne Verdau, als Mittelwert  $\pm$  SEM wieder. Beobachtet wurde eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um ca. 60 %. In das Experiment sind drei unabhängige Versuchstage mit jeweils 24 bis 39 analysierten *Membrane Sheets* eingegangen. Die Abbildung wurde abgewandelt in Schreiber et al. (2012) publiziert.

eine *Wheat Germ Agglutinin*-(WGA)-Bindungsstudie verifiziert. Dabei wird die Bindungsaffinität des Lektins WGA an die Zuckerreste der Plasmamembran ausgenutzt.

Hierzu wurden PC12-Zellen für eine Stunde mit serumfreiem Medium (Kontrolle) oder serumfreiem Medium mit 0,5 Einheiten / ml  $\alpha$ -Neuraminidase, 0,1 Einheiten / ml PNGase F und 0,16 Einheiten / ml  $\beta$ -Galaktosidase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden *Membrane Sheets* hergestellt und fixiert. Diese wurden dann mit 5  $\mu$ g / ml fluoreszenzmarkiertem WGA gefärbt. Die gefärbten Plasmamembranpräparationen wurden unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops in der Gegenwart von TMA-DPH zur Visualisierung der Membranen mikroskopiert (siehe Abschnitt 5.9.5).

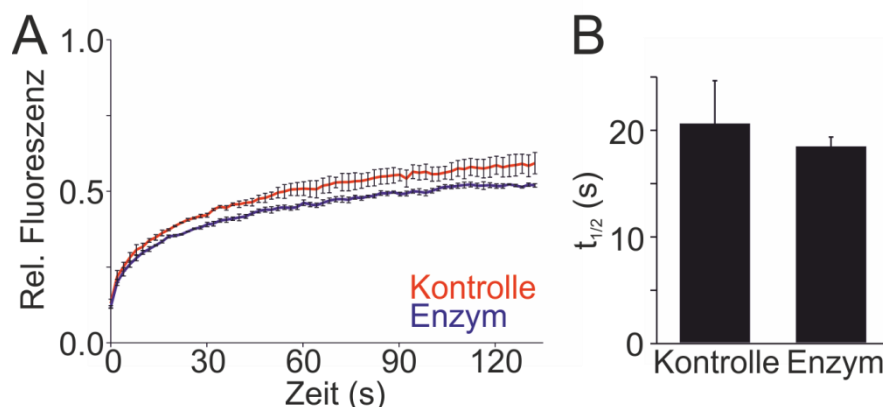
Dabei lässt sich ein signifikanter Abfall des WGA-Bindungsniveaus um ca. 60 % nach enzymatischem Abbau der Glykokalyx feststellen (Abb. 21). Da WGA hauptsächlich an die Subpopulation der endständigen N-Acetylneuraminsäurereste und der N-Acetylglucosaminreste in der Zuckerhülle bindet (Maierhofer et al. 2007; Schwefel et al. 2010), liefert die WGA-Bindungsstudie

allerdings keinen vollständigen Nachweis über den tatsächlichen Grad des enzymatischen Abbaus der Glykokalyx.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass der Ansatz, die Glykokalyx durch einen Enzymcocktail zu verdauen, im Grundsatz gut funktioniert hat. Deshalb wurden auf diese Art und Weise deglykosylierte Zellen, welche vorher mit APP transfiziert worden sind, für FRAP-Messungen verwendet.

### 6.3.2 Mobilität von überexprimiertem APP in Abhängigkeit einer intakten Glykokalyx

Transfizierte PC12-Zellen wurden nach mindestens 7 Stunden Expression von Myc-APP, wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 5.5), mit einem Enzymcocktail behandelt. Nach einem kurzen Waschschrift mit serumfreien Medium, wurden die Zellen in Ringerlösung auf das Mikroskop montiert und es wurden bei RT FRAP-Messungen durchgeführt.



#### Abbildung 22 Mobilität von überexprimiertem APP ohne und mit enzymatischer Degradation der Glykokalyx

Um den Effekt der Glykokalyx auf die Mobilität von überexprimiertem Myc-APP in der basalen Zellmembran von PC12-Zellen zu bestimmen, wurden FRAP-Messungen ohne und mit enzymatischem Abbau der Glykokalyx in diesen Zellen durchgeführt. (A) Mittlere FRAP-Wiederherstellungskurven von Myc-APP exprimierenden PC12-Zellen. Die rote Kurve zeigt die mittlere Fluoreszenzrückkehr ohne und die blaue Kurve mit Glykokalyxverdau. (B) Balkendiagramm der Fluoreszenzwiederherstellungs-Halbwertszeit ohne bzw. mit Enzymverdau. Die Werte zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Versuchstagen. Es ist kein Einfluss des Glykokalyxverbaus auf die Mobilität von APP in der Zellmembran feststellbar. Die Abbildung wurde aus Schreiber et al. (2012) entnommen und verändert.

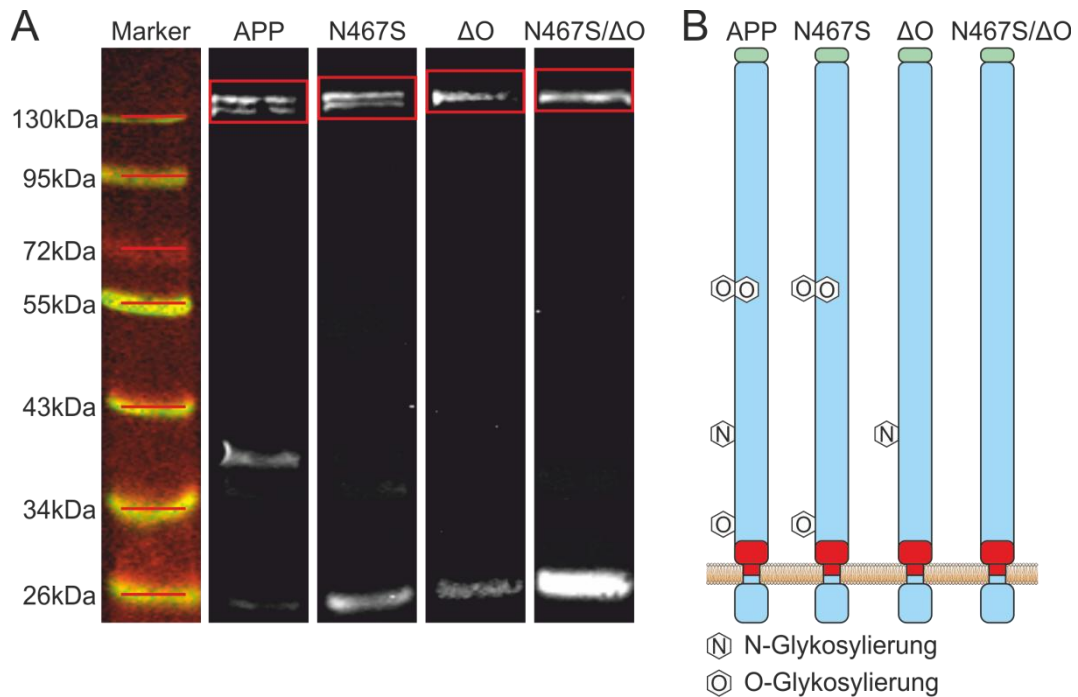
Abb. 22 A zeigt über je drei Versuchstage gemittelte FRAP-Kurven für die Kontroll- und Enzymbedingung. Dabei sind nur marginale Unterschiede im Verlauf der Rückkehrkurve und der maximalen Fluoreszenzrückkehrwerte

zwischen den beiden Konditionen zu erkennen. Dies spiegelt sich auch in den ermittelten Halbwertszeiten wider (B). Es konnten Werte von  $t_{1/2} = 20,63 \text{ s} \pm 4,06$  (SEM) für die Kontrollbedingung ohne enzymatischen Verdau und von  $t_{1/2} = 18,47 \text{ s} \pm 0,91$  (SEM) mit enzymatischen Verdau bestimmt werden. Die leichte Abnahme der Halbwertszeit durch Deglykosylierung liegt noch deutlich im Bereich der Wertevarianz der Kontrollbedingung. Es lässt sich demnach kein signifikanter Unterschied in der Mobilität von Myc-APP mit oder ohne Verdau feststellen und somit keine Interaktion von APP mit der Zuckermatrix nachweisen. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass eine nicht hinreichende Verdaueffizienz (siehe Abschnitt 6.3.1) einen möglichen Glykokalypseffekt verdeckt. Daher wurden APP-Konstrukte kloniert, welche nicht mehr N-, O- oder N- und O-glykosyliert werden können. Deren Diffusionskinetik wurde dann in FRAP-Studien untersucht.

### **6.3.3 Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und nicht-glykosylierten Mutanten**

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der lateralen Kinetik plasmalemalen APPs von seinem Glykosylierungsstatus, wurden vier neue Konstrukte kloniert. Als Kontrolle wurde ein Wildtyp-APP-Konstrukt ohne Myc-Tag generiert. Von diesem Wildtyp-APP wurden drei Mutanten hergestellt. Bei dem N467S-Konstrukt wurde das an Aminosäureposition 467 befindliche Asparagin durch ein Serin ausgetauscht. Dadurch wurde die einzige N-Glykosylierungsstelle des APP unwirksam gemacht (Pahlsson et al. 1992). Die Arbeitsgruppe um Michael Przybylski konnte zeigen, dass APP<sub>695</sub> lediglich drei O-Glykosylierungsstellen an den Aminosäurepositionen T291, T292 und T576 besitzt (Perdivara et al. 2009). Diese drei Threonine wurden in dem Konstrukt  $\Delta O$  durch Glycin ersetzt. Die Mutante N467S/ $\Delta O$  ist eine Kombination der Konstrukte N467S und  $\Delta O$ , d.h. es wurden alle vier Glykosylierungsstellen ausgetauscht.

Die vier Konstrukte wurden in PC12-Zellen 8 Stunden lang überexprimiert und dann, wie in Abschnitt 5.4 beschrieben, in einer Western Blot Analyse



**Abbildung 23 Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und nicht-glykosylierten Mutanten in PC12-Zellen**

(A) Western Blot Analyse in PC12-Zellen von dem vollständig glykosyliertem Wildtyp-APP und seiner Punktmutanten, welche entweder keine N-Glykosylierung, O-Glykosylierung oder N- und O-Glykosylierung aufweisen. (B) Piktogramm der verwendeten Konstrukte mit eingezeichneten Glykosylierungsstellen. Bei der Mutante N467S wurde die N-Glykosylierungsstelle Asparagin durch Serin ersetzt, während bei der Mutante  $\Delta O$  die Aminosäuren Threonin 291, 292 und 576, welche durch ihre Hydroxyl-Restgruppe als O-Glykosylierungsstelle fungieren, durch Glycin ausgetauscht wurden. Das Konstrukt N467S/ $\Delta O$  kombiniert die Punktmutationen von N467S und  $\Delta O$ , besitzt also keine Glykosylierungsstelle mehr. Die Western Blot Analyse ist wie für Abb. 16 beschrieben durchgeführt worden. Für alle vier Konstrukte konnte eine Expression in PC12-Zellen nachgewiesen werden (roter Kasten). Aufgrund Unterschiede im Expressionsgrad der verschiedenen Konstrukte sind die Bilder unterschiedlich skaliert.

untersucht (Abb. 23). Das Wildtypkonstrukt APP zeigt wieder bei der erwarteten Laufhöhe (roter Kasten) die charakteristischen Doppelbanden, zudem sind Prozessierungsbanden erkennbar. Das Konstrukt N467S, dem die N-Glykosylierung fehlt, zeigt ebenfalls die typische Doppelbande bei knapp über 130 kDa. Dafür sind im Vergleich zum Wildtyp weniger Prozessierungsprodukte zu erkennen, lediglich die Menge an freiem GFP (unterste Bande bei 26 kDa) scheint zuzunehmen.

Sowohl bei dem Konstrukt  $\Delta O$ , welchem die O-Glykosylierungen fehlen, als auch bei dem Konstrukt N467S/ $\Delta O$ , bei dem alle Glykosylierungsstellen ausgetauscht worden sind, findet man keine Doppelbanden mehr. Lediglich die untere der beiden Banden ist jeweils verblieben (rote Kästen). Die Laufhöhe täuscht in der

Abbildung, da die Banden ungleichmäßig gelaufen sind und es so aussieht, als wären die oberen Banden verblieben. Der hier gezeigte Western Blot gibt einen deutlichen Hinweis, dass die O-Glykosylierung für das Erscheinungsbild mit Doppelbanden verantwortlich ist, nicht aber die N-Glykosylierung.

Auch die beiden O-deglykosylierten Konstrukte weisen kaum Prozessierungsprodukte auf, dafür aber einen hohen Anteil an GFP. So könnte der Glykosylierungsstatus von APP eine größere Rolle bei seiner Prozessierung spielen als bisher bekannt ist.

Zusammenfassend demonstriert die hier gezeigte Western Blot Analyse die Präsenz der vier Konstrukte und belegt zumindest für die beiden Mutanten  $\Delta O$  und N467S/ $\Delta O$  eine erfolgreiche Deglykosylierungsstrategie.

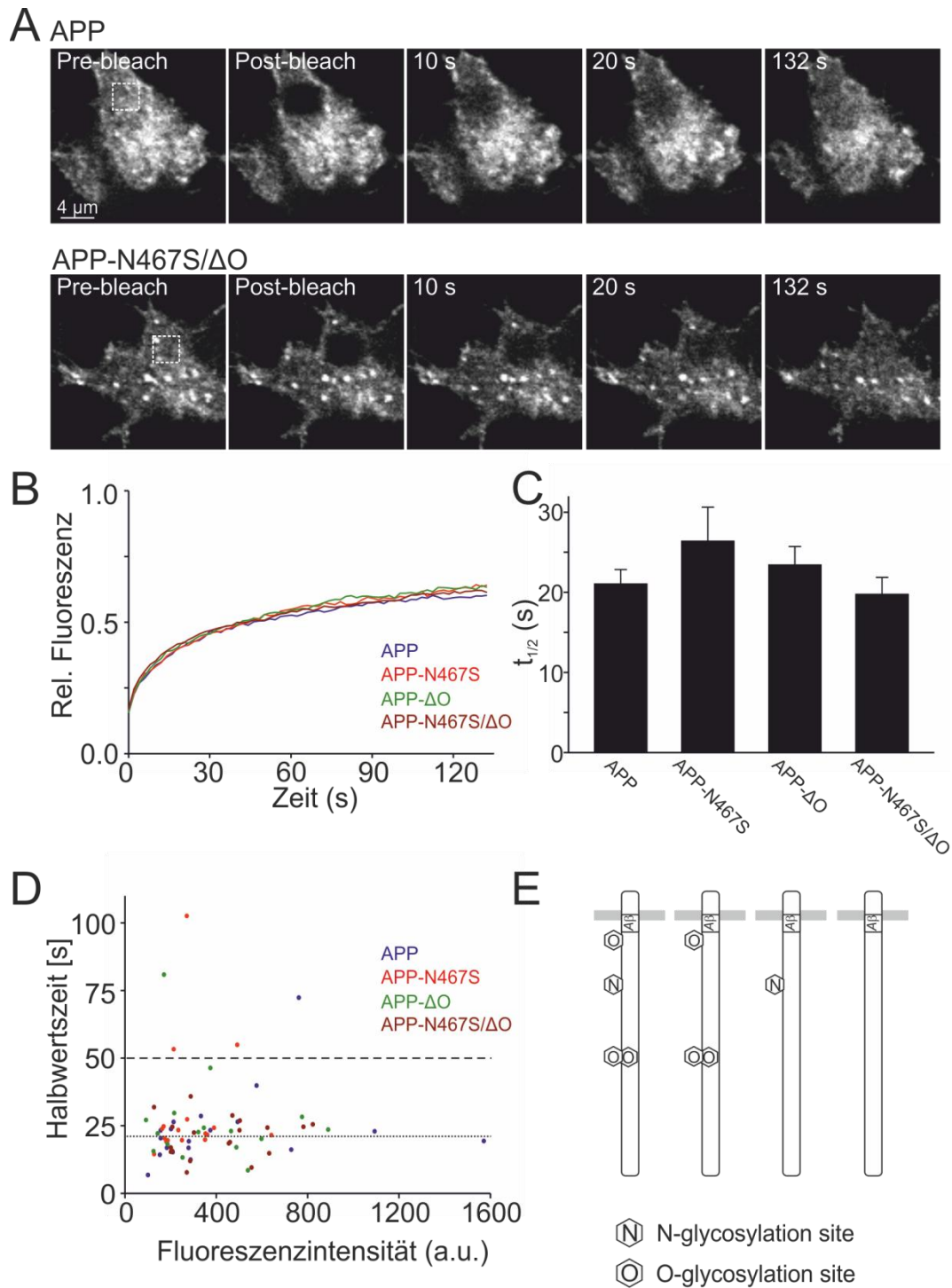
### **6.3.4 Mobilität von APP und nicht-glykosylierter Mutanten in PC12-Zellen**

Zur Bestimmung der plasmalemalen Diffusionskinetik von APP und nicht-glykosylierter APP-Mutanten wurde die FRAP-Analyse verwendet. Dazu wurden das Wildtyp-APP-Konstrukt bzw. die nicht-glykosylierten Mutanten in PC12-Zellen für 8 Stunden überexprimiert und anschließend in Ringerlösung bei Raumtemperatur mikroskopiert.

In den repräsentativen FRAP-Aufnahmen vom Wildtyp-Konstrukt und N467S/ $\Delta O$  (Abb. 24 A), sowie in den mittleren Fluoreszenzrückkehrkurven der hier verwendeten Konstrukte (Abb. 24 B) sind keine relevanten Unterschiede feststellbar. Betrachtet man die mittleren Halbwertszeiten aus drei Versuchstagen, dann ergeben sich für das Wildtyp-Konstrukt und die vollständig nicht-glykosylierte Variante N467S/ $\Delta O$  Werte von  $t_{1/2} = 21,04 \pm 1,80$  (SEM) bzw.  $t_{1/2} = 19,75 \text{ s} \pm 2,12$  (SEM). Bei einer Abweichung von knapp 6 % ist also kein deutlicher Unterschied messbar. Auch für das  $\Delta O$ -Konstrukt ist lediglich eine unwesentlich höhere Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 23,41 \text{ s} \pm 2,31$  (SEM) im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt feststellbar. Berechnet man hingegen die mittlere Halbwertszeit der Mutante N467S, so zeigt sich mit  $t_{1/2} = 26,38 \text{ s} \pm 4,25$  (SEM) schon eine deutliche Abweichung zum Wildtyp von gut 25 %.

Diese deutlich langsamere Kinetik findet zumindest keine offensichtliche Entsprechung in den mittleren FRAP-Kurven in Abb. 24 B wieder. Zudem stellt sich hier generell die Frage nach einer möglichen physiologischen Relevanz des langsameren  $t_{1/2}$ -Wertes.





### Abbildung 24 Mobilitätsanalyse von APP und nicht-glykosylierter Mutanten in der Zellmembran von PC12-Zellen

Zur Bestimmung des Einflusses der N- und O-Glykosylierung auf die Mobilität von APP in der Zellmembran wurden FRAP-Messungen von Wildtyp-APP oder von nicht-glykosylierten APP-Mutanten überexprimierenden PC12-Zellen in der basalen Plasmamembran durchgeführt. (A) Die Abbildungen zeigen repräsentative FRAP-Aufnahmen von PC12-Zellen, welche entweder APP (oberes Panel) oder die vollständig nicht-glykosylierte Mutante N467S/ $\Delta$ O (unteres Panel) exprimieren. (B) Das Diagramm zeigt die gemittelten FRAP-Kurven der vier verwendeten APP-Konstrukte. Die Fluoreszenzrückkehrkurven von APP und seiner drei nicht-glykosylierten Mutanten

verlaufen nahezu gleich. (C) Das Balkendiagramm gibt die  $t_{1/2}$ -Mittelwerte  $\pm$  SEM wieder, welche aus je drei unabhängigen Experimenten mit 5 bis 7 Zellen pro Tag und Kondition gewonnen wurden. (E) Das Piktogramm darunter skizziert die N- bzw. O-Glykosylierungsstellen der vier Konstrukte. N- oder O-Glykosylierung von APP hat demnach keinen mobilitätsbeschränkenden Einfluss auf die Kinetik von APP in der Zellmembran. Eher beschleunigt die N-Glykosylierung APP, da ihre Deletion (N467S) zu einer höheren Halbwertszeit führt. Diese Verlangsamung spiegelt sich allerdings nicht mehr in dem  $t_{1/2}$ -Wert der vollständig deglykosylierten Mutante (N467S/ $\Delta$ O) wider, welcher wieder auf dem Niveau der Wildtyp-Halbwertszeit liegt. (D) Die Halbwertszeit der FRAP-Messung jeder einzelnen Zelle, welche in die Auswertung eingegangen ist, wurde gegen ihre Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die meisten  $t_{1/2}$ -Werte der vier Konstrukte liegen hierbei auf demselben Niveau um 21 Sekunden (gepunktete Linie). Teile der Abbildung sind in abgewandelter Form auch in Schreiber et al. (2012) veröffentlicht.

Deshalb wurden die Halbwertszeit jeder analysierten Zelle gegen ihre mittlere Fluoreszenzintensität aufgetragen (Abb. 24 D). Bei dieser Darstellung liegen die einzelnen Halbwertszeiten aller vier Konstrukte auf einem ähnlich hohen Niveau von um 21 Sekunden (gepunktete Linie). Allerdings hat die N467S-Mutante deutliche Ausreißer nach oben mit Werten über 50 Sekunden (gestrichelte Linie) und einem Wert über 100 Sekunden, welcher den Mittelwert eines Tages deutlich nach oben verändert. Demgegenüber weisen das APP-Konstrukt und die  $\Delta$ O-Mutante nur jeweils einen Wert über 50 Sekunden auf und die N467S/ $\Delta$ O - Mutante sogar keinen. Da die übrigen  $t_{1/2}$ -Werte von N467S vergleichbar mit denen der anderen Konstrukte sind, ist die erhöhte mittlere Halbwertszeit von N467S durch einige Ausnahmemessungen begründet und hat vermutlich keine Relevanz.

Diese Analyse zeigt zusätzlich, dass generell kein Zusammenhang zwischen  $t_{1/2}$  und dem Expressionsspiegel besteht.

Insgesamt suggerieren die Daten zur enzymatischen Deglykosylierung sowie zu den nicht-glykosylierten Mutanten, dass die Glykokalyx keinen nennenswerten Einfluss auf die Mobilität und damit auf das Clusterverhalten von APP hat.

## **6.4 Detaillierte Analyse des Einflusses der Ektodomäne von APP auf die Clusterdynamik**

Wenn die Glykokalyx keine Rolle bei der plasmalemalen Mobilität und Verteilung von APP spielt, über welchen Mechanismus reguliert die APP-Ektodomäne die Clusterdynamik dann?

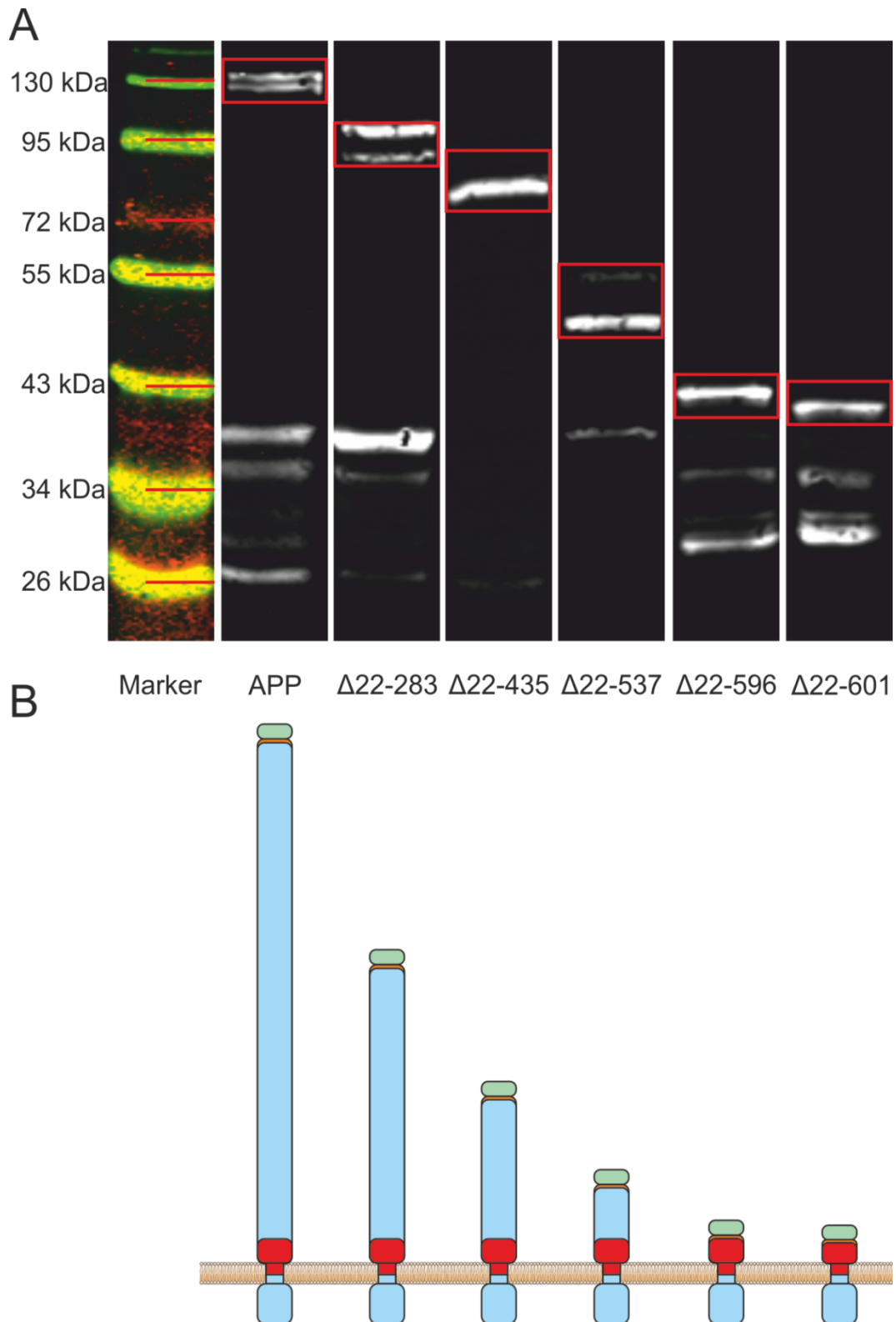
Als denkbare Möglichkeiten bleiben noch der Einfluss der reinen Ektodomänengröße und/oder bestimmter N-terminaler Bereiche auf die Diffusionskinetik und die Organisation von APP. Frühere Publikationen haben nahegelegt, dass bestimmte Bereiche innerhalb der Ektodomäne zumindest bei der Dimerisierung von APP von Bedeutung sind (z.B. Behr et al. 1996; Scheuermann et al. 2001; Wang und Ha 2004), d.h. Protein-Protein-Interaktionen der Ektodomäne könnten auch bei höherzähliger Oligomerisierung eine Rolle spielen.

Um diese Hypothese zu testen, wurden APP-Varianten mit fortlaufend verkürzter Ektodomäne kloniert und in PC12-Zellen zur weiteren Untersuchung exprimiert.

### **6.4.1 Western Blot Analyse der Ektodomänendeletionskonstrukte**

Die Deletionsmutanten wurden ausgehend von dem bereits für die nicht-glykosylierten Mutanten verwendeten Wildtyp-APP-Konstrukt generiert (siehe Abschnitt 5.1). Hierbei wurden immer größere N-terminale Abschnitte von der extrazellulären Domäne entfernt, wobei die Signalsequenz für die korrekte plasmalemale Sortierung erhalten wurde. Aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie, mit in der Wildtypsequenz natürlich vorhandenen Restriktionsschnittstellen, beinhalten alle fünf Deletionsmutanten außer der Signalsequenz auch noch die direkt folgenden vier Aminosäuren Leucin, Glutaminsäure, Valin und Prolin. Die Deletionen wurden so erstellt, dass hinter bekannten Domänen des N-Terminus trunkiert wurde bzw. innerhalb der A $\beta$ -Sequenz im Fall der  $\Delta$ 22-601-Mutante.

Das Wildtyp-APP-Konstrukt und die fünf Ektodomänendeletionskonstrukte wurden für je 8 Stunden in PC12-Zellen exprimiert und anschließend für die Western Blot Analyse geerntet. SDS-PAGE und Western Blot wurden wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 5.4) durchgeführt.



**Abbildung 25 Western Blot Analyse der Ektodomänendeletionsmutanten**  
 Wildtyp-APP und die Ektodomänendeletionskonstrukte  $\Delta 22-283$ ,  $\Delta 22-435$ ,  $\Delta 22-537$ ,  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$  wurden in PC12-Zellen für 8 Stunden exprimiert. Anschließend wurde eine Western Blot Analyse wie für Abb. 16 beschrieben durchgeführt. (A) zeigt die Proteinbanden der Konstrukte in der zu erwartenden Höhe (rote Kästen) mit der stufenweise Abnahme zu den kürzeren Mutanten hin. Deutlich zu erkennen ist der

Unterschied von fünf AS in der N-terminalen A $\beta$ -Sequenz zwischen den Konstrukten  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601. Die teilweise prominenten Banden der Prozessierungsprodukte sind unterhalb der Proteinbande des  $\Delta$ 22-601-Konstruktes sichtbar. Die Bilder sind aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen verschieden skaliert. (B) Piktogramm der verwendeten Konstrukte. Jede Deletionsmutante besitzt aufgrund der Klonierungsstrategie noch die ersten vier auf das Signalpeptid (17 AS, MLPGLALLLLAAWTARA, grün) folgenden Aminosäuren (LEVP, orange). In Rot ist die A $\beta$ -Region und in Blau die restliche Sequenz markiert.

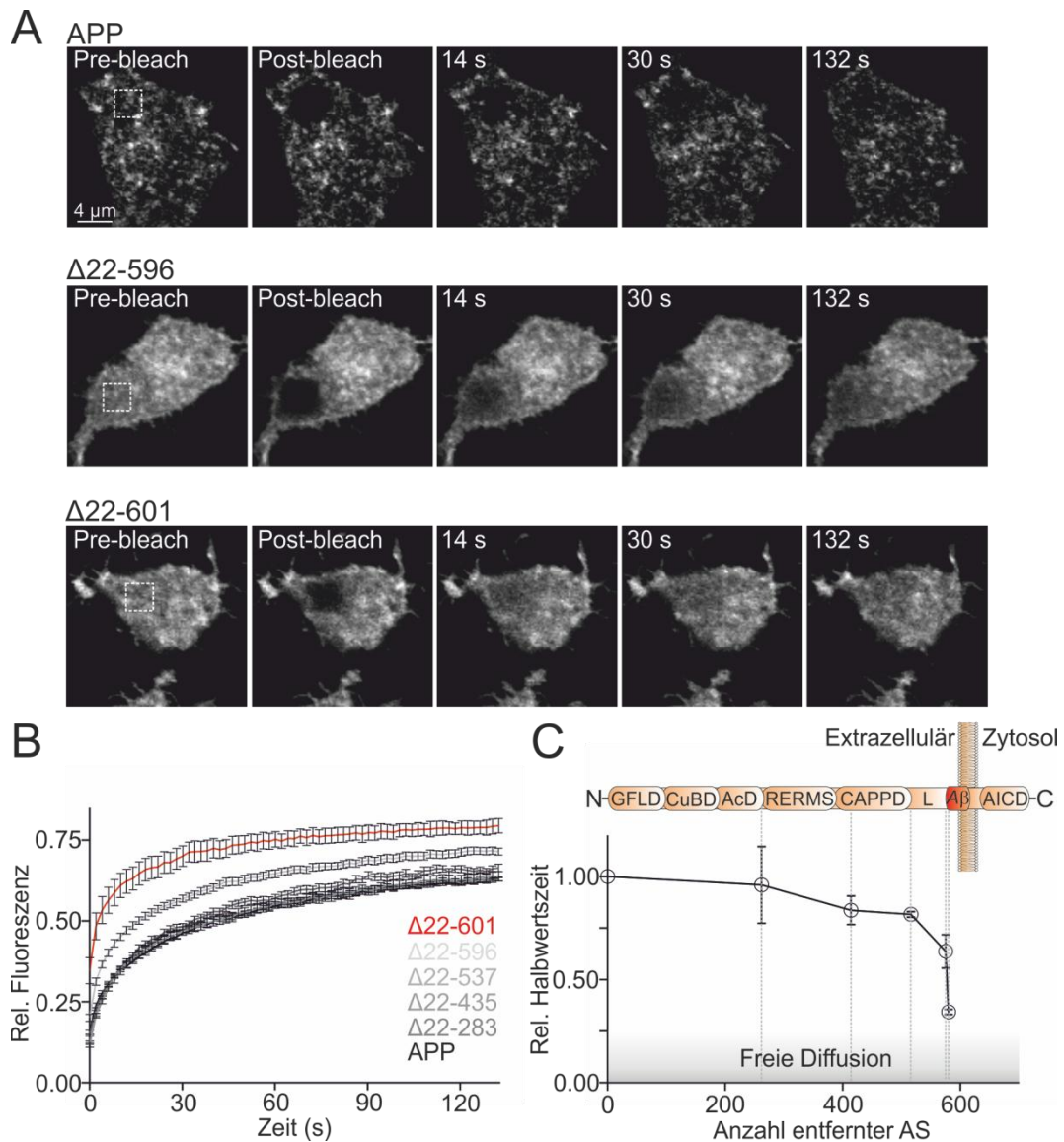
Der in Abb. 25 A gezeigte Western Blot dokumentiert, die durch fortschreitende Deletion der extrazellulären Domäne erzeugte, stufenweise Abnahme der Masse und damit der Bandenlaufhöhe von den verschiedenen Konstrukten. Alle Konstrukte, bis auf die beiden kürzesten Varianten  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601, zeigen bei der erwarteten Laufhöhe (rote Kästen) die typischen Glykosylierungsdoppelbanden, auch wenn dies aufgrund der notwendigen Skalierung bei der Mutante  $\Delta$ 22-435 nicht ersichtlich ist. Die zwei kürzesten Deletionsmutanten besitzen keine O-Glykosylierungsstellen und weisen folgerichtig dadurch auch keine Doppelbanden mehr auf. Gut zu beobachten ist die verglichen mit dem Konstrukt  $\Delta$ 22-601 leicht größere Laufhöhe von  $\Delta$ 22-596, welche durch die Deletion von nur fünf weiteren Aminosäuren verursacht wird. Insgesamt belegt die hier gezeigte Western Blot Analyse die zu erwartende Expression der Ektodomänendeletionskonstrukte in PC12-Zellen.

#### **6.4.2 Die Mobilität der Ektodomänendeletionsmutanten wird von maximal fünf Aminosäuren bestimmt**

Die Mobilität der mindestens für 8 Stunden in PC12-Zellen exprimierten Konstrukte wurde wie bereits vorher beschrieben mittels FRAP-Analyse bei RT bestimmt.

Abb. 26 A zeigt repräsentative FRAP-Aufnahmen von PC12-Zellen, welche mit dem Wildtyp-APP-Konstrukt und den beiden kürzesten Mutanten  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601 transfiziert worden sind. Schon anhand der Aufnahmen lässt sich ein starker Unterschied in der Fluoreszenzrückkehrkinetik zwischen den beiden kürzesten Konstrukten ausmachen, wobei das Konstrukt  $\Delta$ 22-596 mit der intakten A $\beta$ -Sequenz eine langsamere Kinetik zeigt als das Konstrukt  $\Delta$ 22-601, welchem die ersten fünf Aminosäuren der A $\beta$ -Sequenz fehlen.

Dieser Eindruck bestätigt sich bei dem Betrachten der gemittelten FRAP-Kurven (B). Hier haben die Ektodomänendeletionskonstrukte bis einschließlich der Mutante  $\Delta$ 22-537 eine mit dem Wildtypkonstrukt vergleichbare Fluoreszenzrückkehrkinetik.



### Abbildung 26 Mobilität der Ektodomänendeletionsmutanten

Getestet wurde die Mobilität von Wildtyp-APP und der Ektodomänendeletionsmutanten in der basalen Zellmembran von PC12-Zellen mittels FRAP-Mikroskopie.

(A) Gezeigt werden charakteristische FRAP-Aufnahmen von APP (Panel oben) und den Deletionsmutanten  $\Delta$ 22-596 (mittig) und  $\Delta$ 22-601 (unten) mit langsamer, mittlerer und schneller Fluoreszenzrückkehr.

(B) Abgebildet sind FRAP-Kurven vom Wildtyp-APP und von allen getesteten Deletionskonstrukten. Die Fluoreszenzwiederherstellungskurven von Wildtyp-APP bis  $\Delta$ 22-537 weisen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Rückkehrgeschwindigkeit und des Maximalwertes der Fluoreszenzrückkehr  $Rec_{Max}$  auf. Erst die  $\Delta$ 22-596-Mutante, welche noch über die vollständige A $\beta$ -Region verfügt, zeigt eine deutlich schnellere Wiederherstellungskinetik und einen größeren  $Rec_{Max}$ -Wert. Die schnellste Fluoreszenzrückkehr mit dem kleinsten immobilien Anteil (hoher  $Rec_{Max}$ -Wert) hat das  $\Delta$ 22-601-Konstrukt, dem die ersten fünf AS der A $\beta$ -Region fehlen.

(C) Auf den Wildtyp normierte und gemittelte Halbwertszeiten, aufgetragen gegen die Anzahl der entfernten Aminosäuren. Das Piktogramm darüber gibt die ungefähre Domänenstruktur des N-terminalen Endes von APP für jedes Konstrukt wieder (nach Reinhard et al. (2005)). Die gestrichelten Linien zeigen die Stellen an denen trunziert wurde. Die grau unterlegte Fläche gibt den Halbwertszeitbereich an, welcher der freien

Diffusion eines Proteins mit einer TMR entspricht (für unser System berechnet nach Kenworthy et al. 2004 und Ficzy 2005). Bis einschließlich der Mutante  $\Delta 22-537$  zeigen die Deletionen der Ektodomäne keinen signifikanten Einfluss auf die Halbwertszeit der Fluoreszenzrückkehr. Das Konstrukt  $\Delta 22-596$  zeigt eine deutliche Erhöhung der Mobilität. Aber erst durch die Deletion der ersten fünf AS von der A $\beta$ -Region ( $\Delta 22-601$ ) wird eine Proteinmobilität erreicht, die nahe der freien Diffusion liegt. GFLD: *Growth-factor-like domain*; CuBD: *Copper-binding domain*; AcD: *Acidic domain*; RERMS: *five amino acid peptide sequence*; CAPPD: *Central APP domain*; L: *Linker domain*; A $\beta$ : *A $\beta$  peptide sequence*; AICD: *APP intracellular domain*. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, von 3 bis 12 Versuchstagen; In abgewandelter Form wurde die Abbildungen B und C in Schreiber et al. (2012) veröffentlicht.

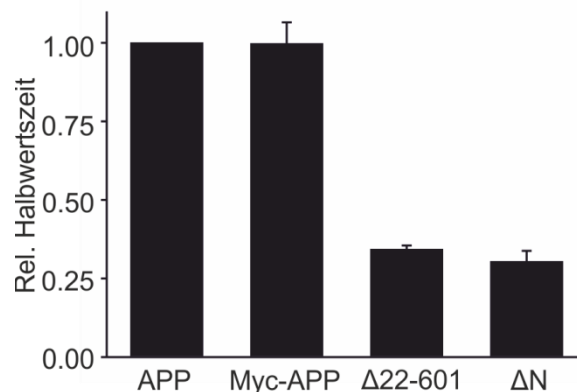
Die Deletionsmutante  $\Delta 22-601$  mit der verkürzten A $\beta$ -Region zeigt hingegen die schnellste Kinetik mit dem größten maximalen Fluoreszenzrückkehrwert. Die FRAP-Kurve der zweitkürzesten Mutante mit einer intakten A $\beta$ -Region  $\Delta 22-596$  liegt zwischen den Kurven von Wildtyp-APP und  $\Delta 22-601$ . Dies ist besonders bemerkenswert, da  $\Delta 22-596$  bereits ein Großteil der Ektodomäne fehlt, der Unterschied zu  $\Delta 22-601$  aber gerade einmal die Deletion von fünf weiteren Aminosäuren ist.

Zur Quantifizierung der Kinetik wurden wieder die Halbwertszeiten bestimmt. Da diese diesmal aufgrund der Menge an verwendeten Konstrukten nicht immer von denselben Versuchstagen stammen, wurden sie auf die jeweilige Halbwertszeit von dem Wildtypreferenzkonstrukt APP normalisiert, welches an jedem Versuchstag mitanalysiert wurde. Das ist nötig, da das Halbwertszeitspektrum von verschiedenen Versuchstagen allein schon für die Wildtypreferenz von  $t_{1/2} = 11,85$  s bis  $t_{1/2} = 32,57$  s mit einem Mittelwert von  $t_{1/2} = 22,8$  s  $\pm$  1,9 (SEM) reicht. Die relativen Halbwertszeiten wurden dann über alle Versuchstage gemittelt und gegen die Länge der deletierten Aminosäuresequenz aufgetragen (C). Die relative Halbwertszeit beträgt für  $\Delta 22-283$ :  $t_{1/2} = 0,96 \pm 0,19$  (SEM);  $\Delta 22-435$ :  $t_{1/2} = 0,84 \pm 0,07$  (SEM);  $\Delta 22-537$ :  $t_{1/2} = 0,82 \pm 0,01$  (SEM);  $\Delta 22-596$ :  $t_{1/2} = 0,64 \pm 0,08$  (SEM);  $\Delta 22-601$ :  $t_{1/2} = 0,34 \pm 0,01$  (SEM).

Während die Deletion von dem größten Teil der extrazellulären Domäne kaum einen Einfluss auf die Mobilität von APP zu haben scheint (bis einschließlich  $\Delta 22-537$ ) und das Entfernen weiterer 59 AS schon einen moderaten ( $\Delta 22-596$ ) Einfluss hat, hat die Deletion von nur fünf AS der N-terminalen A $\beta$ -Region den stärksten Einfluss auf die APP-Kinetik ( $\Delta 22-601$ ).

Um die hier beobachteten relativen Halbwertszeiten mit einem publizierten Wert für freie Diffusion abzugleichen, wurde die zu erwartende  $t_{1/2}$  für freie Diffusion des verwendeten Systems in Anlehnung des freien Diffusionswertes von Kenworthy et al. (2004)  $D = 0,23$   $\mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,02$  (SD) nach Ficzy (2005) berechnet.

Dazu wurde die Formel  $t_{1/2} = \frac{w^2 \times \gamma D}{4D}$  verwendet.  $w$  entspricht dabei der halben Kantenlänge des Bleichquadrates,  $\gamma D \cong 1,0872$  ist ein Umrechnungsfaktor von kreisförmigen auf quadratische ROIs (Axelrod et al. 1976) und  $D$  ist der Diffusionskoeffizient. Mit der oben genannten Formel und dem Diffusionskoeffizienten wurde die Halbwertszeit für freie Diffusion  $t_{1/2} = 2,85$  s berechnet. Normalisiert auf die mittlere  $t_{1/2}$  des Wildtyp-APP-Konstrukts von  $t_{1/2} = 22,8$  s ergibt dies eine relative Halbwertszeit für freie Diffusion von  $t_{1/2} = 0,13$ . Dieser Wert ist zwar kleiner als die entsprechenden  $t_{1/2} = 0,34$  für die schnellste Variante  $\Delta 22-601$ , allerdings sollte man beachten, dass Kenworthy den Koeffizient für freie Diffusion bei einer Umgebungstemperatur von 37°C bestimmt hat. Daher kann man bei Raumtemperatur von einer deutlich langsameren freien Diffusion ausgehen, weshalb sich die Mobilität von  $\Delta 22-601$  nahe an dem Bereich der ungehinderten, freien lateralen Diffusion von Proteinen in der Zellmembran bewegen sollte.



**Abbildung 27 Einfluss des Myc-Tags und der vier AS LEVP auf die Mobilität**

Vergleich der auf APP-normierten und gemittelten Halbwertszeiten von APP, Myc-APP,  $\Delta 22-601$  und  $\Delta N$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, für Myc-APP drei unabhängige Experimente bzw. für  $\Delta N$  zwei).

Die hier vorgelegte Studie zur lateralen Diffusionskinetik von APP zeigt, dass das Entfernen des überwiegenden Teils des N-Terminus von 516 AS kaum Einfluss auf die Mobilität von APP hat, weshalb die reine Ektodomänengröße als Bestandteil des Regulationsmechanismus ausfällt. Werden weitere 64 Aminosäuren entfernt, führt dies schon zu einer deutlichen Zunahme der Mobilität. Aber erst die Deletion der fünf ersten, N-terminalen Aminosäuren der A $\beta$ -Peptidregion führt zu der dramatischen Beschleunigung der FRAP-Kinetik nahe der freien Diffusion. Dies legt eine zentrale Rolle dieser Fünf-Aminosäurenregion bei der lateralen Organisation von APP nahe, auch wenn der



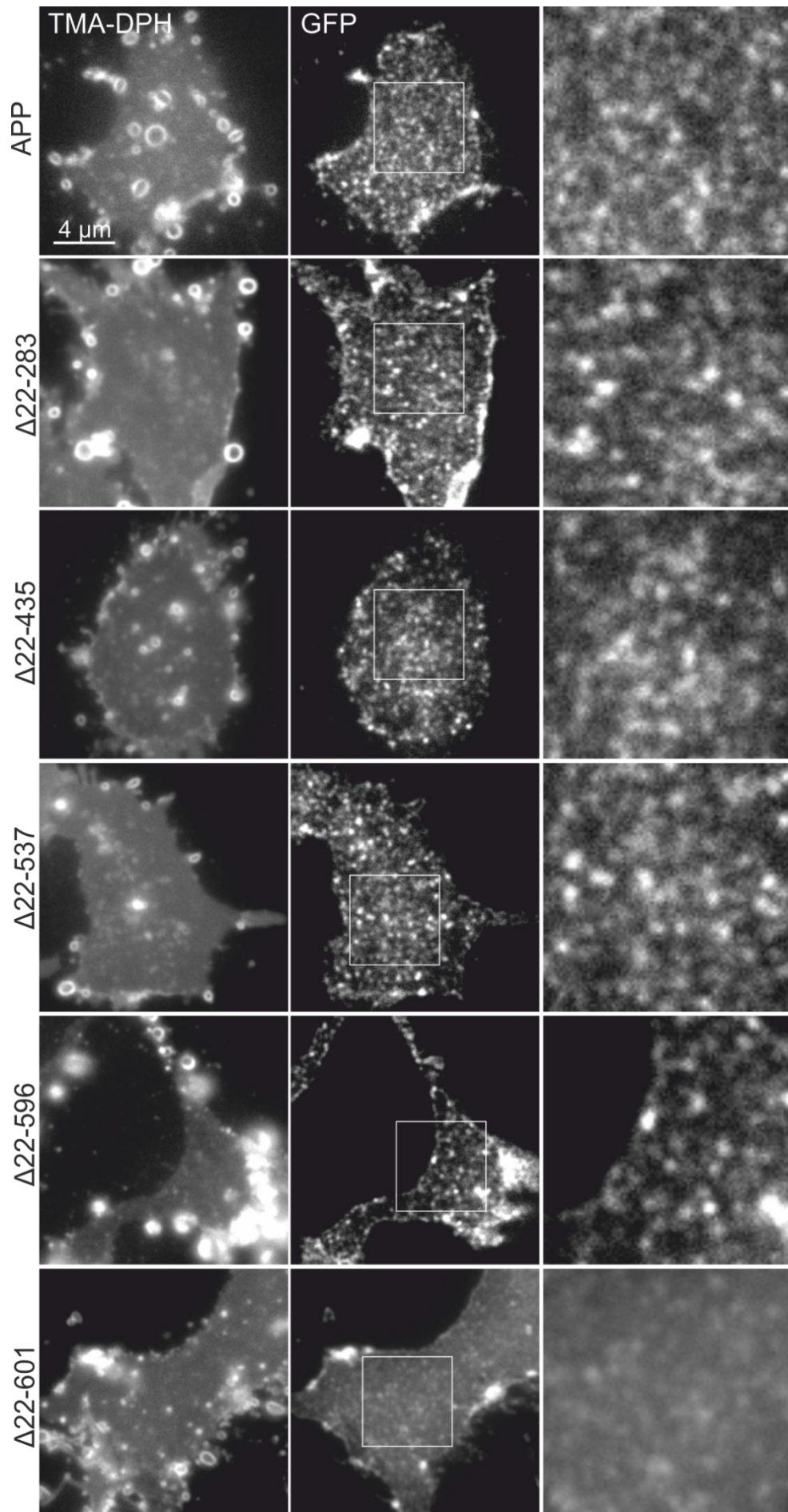
davorliegende Sequenzabschnitt von 59 AS ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf die Diffusibilität zu haben scheint.

Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang die Mobilität von APP und  $\Delta 22-601$  mit der von Myc-APP und  $\Delta N$  verglichen um zu überprüfen, ob das Myc-Tag in Myc-APP oder die vier auf das Signalpeptid folgenden Aminosäuren LEVP der Ektodomänendeletionsmutanten einen Einfluss auf die Diffusibilität haben. Das Balkendiagramm in Abb. 27 gibt die mittleren relativen Halbwertszeiten, die auf die APP-Wildtypreferenz normalisiert wurden, von Myc-APP mit  $t_{1/2} = 1,00 \pm 0,07$  (SEM), von  $\Delta 22-601$  mit  $t_{1/2} = 0,34 \pm 0,01$  (SEM) und von  $\Delta N$  mit  $t_{1/2} = 0,30 \pm 0,03$  (SEM) wieder. Deshalb kann für diese Konstrukte kein Einfluss des Myc-Tags oder der vier AS LEVP auf die Mobilität festgestellt werden, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Myc-APP und  $\Delta N$  mit denen der Ektodomänendeletionskonstrukte belegt.

#### **6.4.3 Laterale Organisation der Ektodomänendeletionsmutanten in *Membrane Sheets***

Zur Untersuchung der lateralen Verteilung von überexprimiertem APP und Ektodomänendeletionskonstrukten wurden *Membrane Sheets* verwendet.

*Membrane Sheets* eignen sich besonders gut zur Analyse plasmalemmaler Strukturen, da hierbei kein störendes Fluoreszenzsignal aus anderen Fokalebene das Bild überlagert. Somit wird ein optimales Signal-zu-Rauschen-Verhältnis bei der Aufnahme von z.B. überexprimiertem APP erzielt, besonders, da sich mindestens 90 % des zellulären APPs außerhalb plasmalemmaler Fokalebene befindet (Thinakaran und Koo 2008). Außerdem können hier zytosolische, membrannahe GFP-markierte Strukturen, anders als bei der TIRF-Mikroskopie von der basalen Plasmamembran ganzer Zellen, die Interpretation der Ergebnisse nicht verfälschen. Die physiologische Relevanz der Beobachtungen ist im Vergleich zu Ganzzellpräparationen hinsichtlich der lateralen Organisation von Membranproteinen kaum beeinträchtigt, da sich diese noch in ihrer nativen Protein-Lipid-Umgebung befinden. Allerdings kann ein Beitrag zellmembranadhärenter Organellen, wie z.B. von Vesikeln, zur wahrgenommenen Morphologie von *Membrane-Sheets*-Strukturen nicht mit letzter Gewissheit ausgeschlossen werden. Dennoch eignen sich *Membrane Sheets* in hervorragender Art und Weise zur Untersuchung von Proteinverteilungen in der Zellmembran.



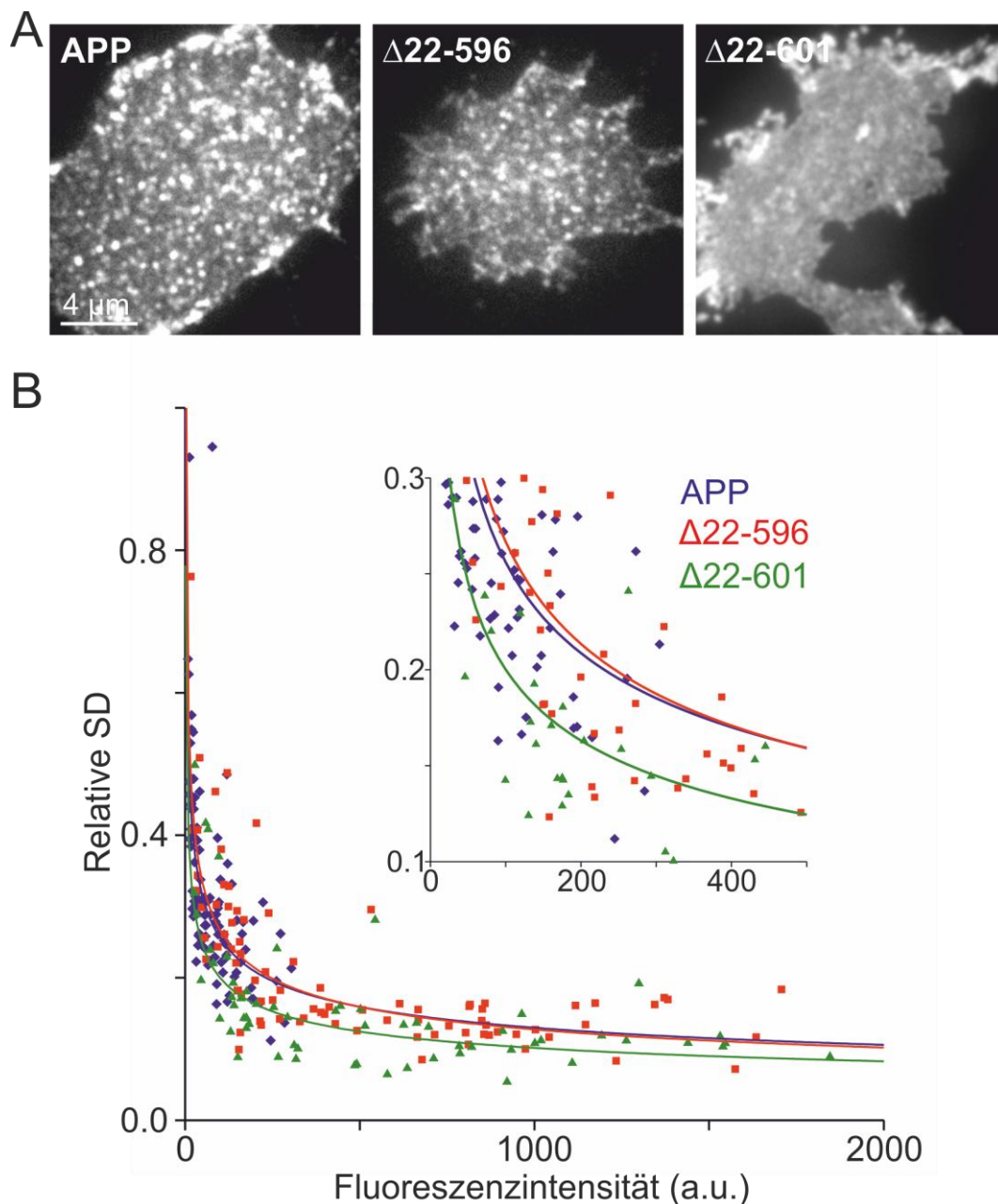
**Abbildung 28 Laterale Organisation der Ektodomänendeletionsmutanten in *Membrane Sheets***

Um die laterale Organisation von Wildtyp-APP und seiner Ektodomänendeletionsmutanten in der Zellmembran von PC12-Zellen zu untersuchen, wurden PC12-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Nach acht Stunden Inkubation auf Deckgläsern unter Standardbedingungen wurden die Zellen zur Generierung von *Membrane Sheets* einem starken Ultraschallimpuls ausgesetzt und anschließend fixiert. Die fixierten Proben wurden dann mit einem Epifluoreszenzmikroskop in PBS, mit TMA-DPH zur Anfärbung der Zellmembran, mikroskopiert. TMA-DPH wurde im DAPI-Kanal (linke Spalte), GFP im GFP-Kanal (mittlere Spalte) aufgenommen. Die weißen Kästen markieren die ROI im GFP-Kanal, welche in der rechten Spalte vergrößert dargestellt ist. Sowohl das Wildtypkonstrukt als auch die Deletionsmutanten bis einschließlich  $\Delta 22-596$  zeigen einen hauptsächlich punktierten Phänotyp in der Plasmamembran. Die  $\Delta 22-601$ -Mutante zeigt hingegen eine überwiegend uniforme Verteilung in den untersuchten *Membrane Sheets*. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen, ausgesucht aus insgesamt 44 – 161 *Membrane Sheets* von 3 bis 7 unabhängigen Versuchstagen. Die Bilder der verschiedenen Konstrukte sind unabhängig skaliert.

Um die plasmalemmale Organisation der Ektodomänendeletionskonstrukte zu untersuchen, wurden PC12-Zellen mit diesen Konstrukten transfiziert. Nach 8 Stunden Expressionszeit wurden aus den Zellen *Membrane Sheets* hergestellt, fixiert und anschließend in PBS mit TMA-DPH mikroskopiert (siehe Abschnitt 5.9.6). Der Membranfarbstoff TMA-DPH diente dazu, die Unversehrtheit der Membranpräparationen zu kontrollieren.

In Abb. 28 sind repräsentative *Membrane Sheets* abgebildet. In der linken Spalte sind die Aufnahmen der Zellmembran im TMA-DPH-Kanal, in der Mitte die Aufnahmen der Ektodomänendeletionskonstrukte im GFP-Kanal und rechts die vergrößerten Aufnahmen der jeweiligen weißen Kästen im mittleren Panel dargestellt. Während das Wildtyp-APP und die Ektodomänendeletionskonstrukte bis einschließlich  $\Delta 22-596$  vornehmlich einen Clusterphänotyp aufweisen, ist  $\Delta 22-601$  hauptsächlich uniform in der Plasmamembran verteilt.

Um die unterschiedlichen Phänotypen genauer herauszuarbeiten, wurde der Grad der Clusterbildung der drei Konstrukte Wildtyp-APP,  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$  quantifiziert. Für die Clustergradanalyse wurde eine ROI im TMA-DPH-Kanal in einen GFP-positiven *Membrane Sheet* gelegt. Zudem wurde eine Hintergrund-ROI in einem Bildbereich ohne Membran definiert. Dann wurde in den ROIs im GFP-Kanal das mittlere Fluoreszenzsignal pro Pixel und die Standardabweichung von diesen bestimmt. Von dem Fluoreszenzintensitätswert des *Membrane Sheets* wurde der Hintergrundwert abgezogen. Eine komplett uniforme Verteilung in einer ROI hat aufgrund der gleichen Signalstärke jedes Pixels eine Standardabweichung von  $SD = 0$ .



**Abbildung 29 Quantitative Analyse des Clustergrades von APP,  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$**

Zur Quantifizierung der Clusterbildung von APP und den Ektodomänendeletionsmutanten  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$  in PC12-Zellen wurde eine Clustergradanalyse durchgeführt. Hierbei wurde auf einzelnen *Membrane Sheets* wie in Abb. 28 innerhalb einer ROI die Standardabweichung vom Mittelwert der Fluoreszenzintensität (SD) bestimmt. Diese wurde dann auf die hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität dieser ROI normalisiert. Die so erhaltene relative SD wurde dann für alle analysierten *Membrane Sheets* gegen die dazugehörige Fluoreszenzintensität in einem Streudiagramm aufgetragen. Uniforme Verteilungen haben hierbei einen niedrigen Wert, punktierte Verteilungen dagegen einen hohen Wert. Durch die Punktwolken der einzelnen Konstrukte wurde in Excel jeweils eine Kurve mit dem Funktionsterm  $f(x) = a \cdot x^b$  angepasst. (A) Die Abbildung zeigt repräsentative Mikroskopieaufnahmen von *Membrane Sheets* mit APP (links),  $\Delta 22-596$  (mittig) und  $\Delta 22-601$  (rechts). (B) Streudiagramm der Clusteranalyse zu den Konstrukten APP (blau),  $\Delta 22-596$  (rot) und  $\Delta 22-601$  (grün) und die vergrößerte Ansicht von 0,1 bis 0,3

(relative SD) und 0 bis 500 (Fluoreszenzintensität). Im Vergleich zu den Konstrukten mit vollständiger A $\beta$ -Region zeigt die  $\Delta$ 22-601-Mutante mit N-terminal verkürzter A $\beta$ -Domäne eine deutliche Verlagerung der Verteilung zu niedrigeren relativen SD-Werten. Im Schnitt waren bei den Mutanten  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601 höhere Fluoreszenzintensitätswerte zu beobachten. Ausgewertet wurden 62 bis 105 *Membrane Sheets*, gesammelt aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten. Die Abbildung ist leicht verändert entnommen aus Schreiber et al. (2012).

Wenn der Clustergrad in der ROI zunimmt, dann entstehen hellere und dunklere Bereiche im Bild, weshalb die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen Pixeln zunehmen und die Standardabweichung dadurch ebenfalls größer wird. Das heißt, je größer die Standardabweichung ist, desto größer ist auch der Clustergrad. Allerdings hängt die Größe der Standardabweichung auch von der Stärke des zugrundeliegenden Fluoreszenzsignals ab. Deshalb wird bei der Clusteranalyse die Standardabweichung innerhalb einer Membran-ROI auf die hintergrundkorrigierte mittlere Fluoreszenzintensität derselben ROI normalisiert, wodurch die SD-Werte aller *Membrane Sheets* und Konstrukte vergleichbar werden. Mit steigender Dichte der Cluster nimmt die relative SD wieder ab, weshalb diese immer bei ähnlichen Intensitätswerten verglichen werden muss.

Abb. 29 zeigt die Clustergradanalyse für die drei Ektodomänen-deletionskonstrukte. In A sind wie bereits in Abb. 28 beispielhafte *Membrane Sheets* von Wildtyp-APP,  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601 exprimierenden PC12-Zellen im GFP-Kanal dargestellt. Das Wildtyp- und das  $\Delta$ 22-596-Konstrukt zeigen einen punktierten und die  $\Delta$ 22-601-Mutante einen uniformen Phänotyp.

In B wurden die relativen SD-Werte von den *Membrane Sheets* der einzelnen Konstrukte gegen deren hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität in einem Streudiagramm aufgetragen und jeweils eine Kurvenanpassung mit dem Funktionsterm  $f(x) = a * x^b$  durchgeführt. Während die relativen SD-Werte der Konstrukte Wildtyp-APP und  $\Delta$ 22-596 kaum unterschiedlich sind, ist die Verteilung der Werte der Deletionsvariante  $\Delta$ 22-601, mit der N-terminal um fünf AS verkürzten A $\beta$ -Peptidsequenz, über den gesamten Fluoreszenzintensitätsbereich zu niedrigeren SD-Werten verschoben. Das belegt die uniformere plasmalemmale Organisation dieser Mutante im Vergleich zu den Konstrukten mit intakter A $\beta$ -Region und bestätigt das Ergebnis der Mobilitätsuntersuchungen. So ist für APP ein intaktes A $\beta$ -Peptid zur Bildung seiner Cluster in der Zellmembran essentiell, während andere Bereiche der Ektodomäne dafür nicht zwingend erforderlich sind.

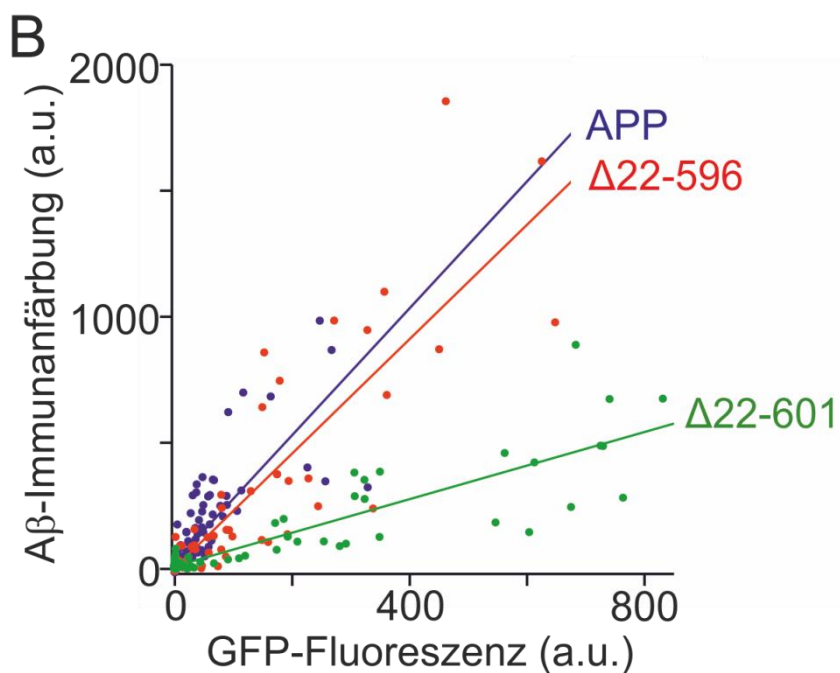
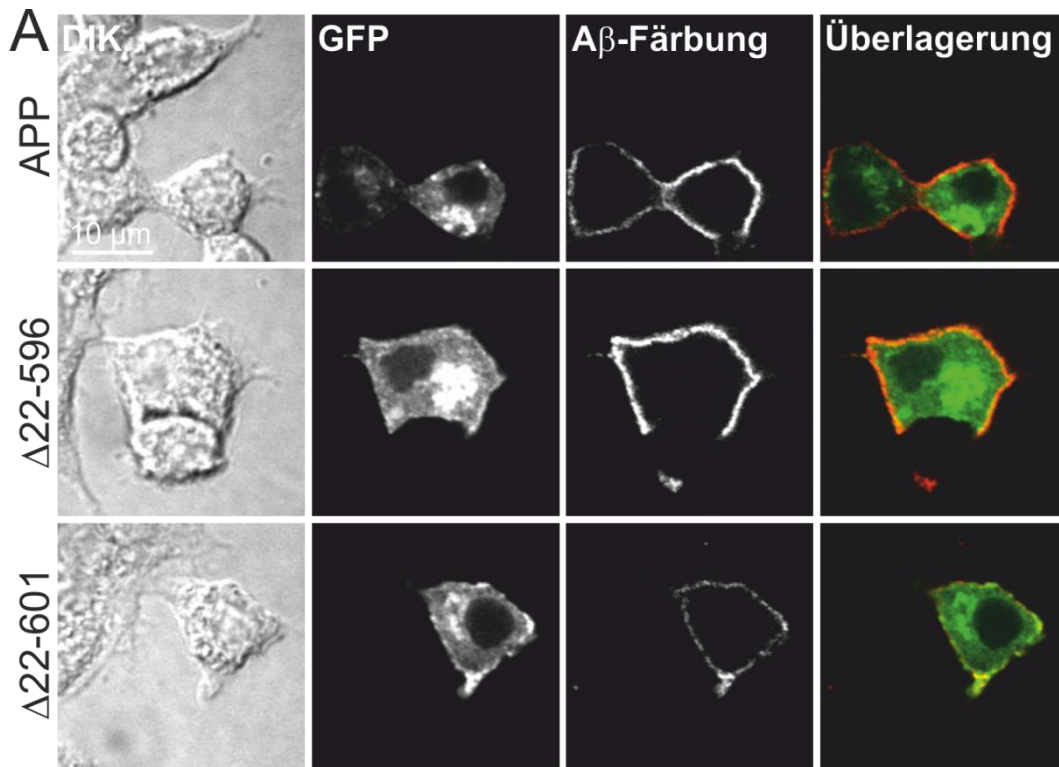
#### 6.4.4 Zellmembranständigkeit von überexprimiertem APP, $\Delta 22-596$ und $\Delta 22-601$

Wie vorher bereits beschrieben, kann man bei Aufnahmen von *Membrane Sheets* Signale von verbliebenen, membranständigen Organellen nicht ganz ausschließen. So ist es denkbar, dass der clusterförmige Phänotyp der Konstrukte bis einschließlich  $\Delta 22-596$  nicht aus der lateralen Organisation plasmalemmer Konstrukte resultiert, sondern von vesikelständigen Konstrukten herrührt, welche an der zytosolischen Seite der Plasmamembran adhärirt sind.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurden die drei Konstrukte Wildtyp-APP,  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$  in PC12-Zellen für 8 Stunden exprimiert. Anschließend wurde eine Antikörperanfärbung der äußeren Plasmamembran lebender Zellen auf Eis durchgeführt (siehe Abschnitt 5.7.2), wodurch eine Internalisierung der verwendeten Antikörper durch Endozytose vermieden wurde. Da der Antikörper die extrazellulär liegende A $\beta$ -Region erkennt, wird auf diese Weise nur in der Zellmembran inseriertes APP detektiert, nicht aber das in Vesikeln oder anderen Organellen vorhandene.

Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Mausantikörper verwendet, dessen spezifische Erkennungssequenz die ersten 16 Aminosäuren der A $\beta$ -Peptidregion sind. Diese Region ist in APP und  $\Delta 22-596$  voll, in  $\Delta 22-601$  größtenteils vorhanden. Da ein Antikörper mit nur einem unvollständigem Epitop in  $\Delta 22-601$  verwendet wurde, war mangels alternativer Antikörper mit einem vollständigen extrazellulären Epitop in  $\Delta 22-601$  nicht zu vermeiden. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass die Bindungseffizienz des Antikörpers für  $\Delta 22-601$  herabgesetzt ist. Als Sekundärantikörper wurde ein mit AlexaFluor 594 gekoppelter Anti-Maus-Antikörper verwendet. Im Anschluss an die Immunfärbung wurden die Proben fixiert, eingebettet und mikroskopiert (siehe Abschnitt 5.9.7). Zusätzlich zu GFP und der Antikörperfärbung wurde ein Bild mit differentiellem Interferenzkontrast (DIK) zur Dokumentation des Zellumrisses aufgenommen. Mikroskopiert wurden sowohl transfizierte als auch nicht transfizierte PC12-Zellen in der Äquatorialebene.

Für die Analyse der Zelloberflächenfluoreszenzintensitäten in den einzelnen Kanälen wurden im DIK-Kanal die Zellumrisse mit einer 10-pixelbreiten Linie nachgezeichnet. Kontaktflächen mit angrenzenden Zellen wurden ausgelassen. Zudem wurden im DIK-Bild zur Messung der Hintergrundfluoreszenz eine Hintergrund-ROI gelegt. Von den Zellumrisslinien wurden dann *Linescans* in dem



**Abbildung 30 Zelloberflächendetektion von überexprimiertem APP,  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601 in PC12-Zellen**

Um die Zellmembranständigkeit von APP und der Deletionsmutanten  $\Delta$ 22-596 und  $\Delta$ 22-601 in PC12-Zellen zu überprüfen, wurde der extrazelluläre Teil der A $\beta$ -Domäne durch eine Antikörperanfärbung detektiert. Dazu wurden transfizierte, lebende PC12-Zellen auf Eis mit einem monoklonalen Antikörper, welcher gegen die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren des A $\beta$ -Peptids reaktiv ist (die ersten fünf Aminosäuren des Primärantikörper-Epitops fehlen der  $\Delta$ 22-601-Mutante), inkubiert. Anschließend wurde dieser Antikörper mit einem sekundären AlexaFluor 594 markiertem Antikörper ebenfalls

auf Eis gefärbt. (A) Fixierte und in Mowiol/DABCO eingebettete PC12-Zellen wurden mit einem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) in der Äquatorialebene mikroskopiert. Die repräsentativen Aufnahmen zeigen, dass alle Konstrukte an der Zelloberfläche detektierbar sind, solange diese nicht von einer anderen Zelle verdeckt ist (siehe mittleres Panel, Antikörperzugang wird an einer Stelle durch eine nicht transfizierte Zelle blockiert). Gezeigt werden von links nach rechts: Differentieller Interferenzkontrast (DIK); Aufnahme im GFP-Kanal; Aufnahme im AlexaFluor 594-Kanal; Überlagerung des GFP- und AlexaFluor 594-Bildes. Die Bilder der einzelnen Kanäle sind mit Ausnahme des DIK-Kanals gleich skaliert. (B) Für jede analysierte Zelle wurde die hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität der A $\beta$ -Färbung an der Oberfläche gegen die hintergrundkorrigierte GFP-Fluoreszenz der Zellmembran in einem Streudiagramm aufgetragen. Durch die Punktwolken der einzelnen Konditionen wurde dann in Excel eine Geradenanpassung durchgeführt. Alle drei Konstrukte zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der Oberflächen-GFP-Intensität und der A $\beta$ -Färbungsintensität. Analysiert wurden 154 – 165 Zellen aus je drei Experimenten. Die Abbildung stammt aus Schreiber et al. (2012) und wurde modifiziert.

GFP- und dem AlexaFluor 594-Kanal durchgeführt, um die mittlere Fluoreszenzintensität pro Pixel der Zelloberfläche zu bestimmen. Dabei kann für das GFP-Signal aufgrund der Auflösung nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des Signals intrazellulären Ursprungs ist. Die mittlere Pixelfluoreszenzintensität der Hintergrund-ROI in denselben CLSM-Kanälen wurde von den *Linescan*-Werten dann abgezogen.

Die Bilder in Abb. 30 A zeigen, dass alle Konstrukte an der äußeren Zellmembran von transfizierten Zellen von dem Primärantikörper detektiert wurden, auch das Konstrukt  $\Delta$ 22-601, welches ein verkürztes Epitop besitzt. Die Detektion funktionierte allerdings nur, wenn die Bindungsstelle nicht maskiert wurde, z.B. durch Kontakt zu einer angrenzenden Zelle. Nicht transfizierte Zellen werden von dem Antikörper dagegen nicht erkannt.

Um die Bindungseffizienz des Primärantiköpers zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenzintensität der Oberflächenimmunanfärbung für alle analysierten Zellen und Konstrukte jedes Versuchstages gegen die dazugehörige GFP-Fluoreszenzintensität der Zellmembran in einem Streudiagramm aufgetragen. Durch die Punktwolke von jedem Konstrukt wurde eine Gerade angepasst.

Deutlich zu erkennen ist der lineare Anstieg und ähnliche Verlauf der Geradenanpassung für Wildtyp-APP und  $\Delta$ 22-596. Die Linearität zwischen der GFP-Signalstärke und der A $\beta$ -Immunanfärbungsintensität zeigt die große Spezifität des Primärantiköpers bezüglich der Erkennung des A $\beta$ -Epitops. Denn je unspezifischer die Anfärbung, desto größer ist der detektierte Hintergrund bzw. der *Offset*. Bei allen drei APP-Varianten liegt der *Offset* jedoch nahe der Grundlinie (siehe Abb. 30 B).



Obwohl ein nicht unerheblicher Teil von fünf Aminosäuren im Epitop des Primärantikörpers bei dem Konstrukt  $\Delta 22-601$  fehlt, erkennt dieser dennoch die in der Plasmamembran inkorporierte Mutante. Dessen ungeachtet ist die Bindungsstärke zu dem Epitop wesentlich schwächer ausgebildet im Vergleich zu den beiden vorher genannten Konstrukten. So zeigt die Geradenanpassung trotz der vorhandenen Linearität zwischen dem GFP- und AlexaFluor 594-Signal einen wesentlich schwächeren Anstieg als die vom Wildtyp-APP und  $\Delta 22-596$ . Auch wenn sich dieses Verhalten gut mit der verkürzten Erkennungssequenz erklären lässt, könnte das Ergebnis alternativ auch auf eine schlechte Sortierung zu der Plasmamembran hindeuten. Das ist jedoch für  $\Delta 22-601$  sehr unwahrscheinlich, da die Insertion dieser Variante in die Plasmamembran zusätzlich durch die uniforme Verteilung, die eine Lokalisation in Vesikeln ausschließt, belegt ist (siehe Abschnitt 6.4.3).

Zusammengenommen untermauern die hier präsentierten Daten die Zellmembranständigkeit der Ektodomänendeletionskonstrukte in PC12-Zellen.

## 6.5 Einfluss einzelner Aminosäuren der A $\beta$ -Peptidsequenz auf die plasmalemmale Organisation von APP

Die bisher gezeigten Daten demonstrieren die grundlegende Bedeutung der ersten fünf Aminosäuren der A $\beta$ -Region auf die Clusterbildung. Möglicherweise trägt jedoch die gesamte A $\beta$ -Sequenz zu der lateralen Organisation von APP in der Plasmamembran bei. Aber lassen sich einzelne Aminosäuren in der A $\beta$ -Sequenz identifizieren, denen eine besondere Rolle bei der Clusterentstehung zukommt?

Beim APP-Konstrukt R601G wurde das Arginin an fünfter Position des A $\beta$ -Peptids gegen ein Glycin ausgetauscht. Das Arginin ist eine von drei Aminosäuren, in welchen sich die A $\beta$ -Peptidregion von Mensch und Maus unterscheidet (Yamada et al. 1987). Sie ist daher potentiell ursächlich für die fehlende Neurotoxizität des A $\beta$ -Peptids der Maus (Atamna 2009). Durch die räumliche Überschneidung mit denen für die Clusterentstehung grundlegend relevanten ersten fünf A $\beta$ -Aminosäuren, wurde dieses Punktmutationskonstrukt für eine weitergehende Untersuchung seiner Clusterdynamik verwendet.

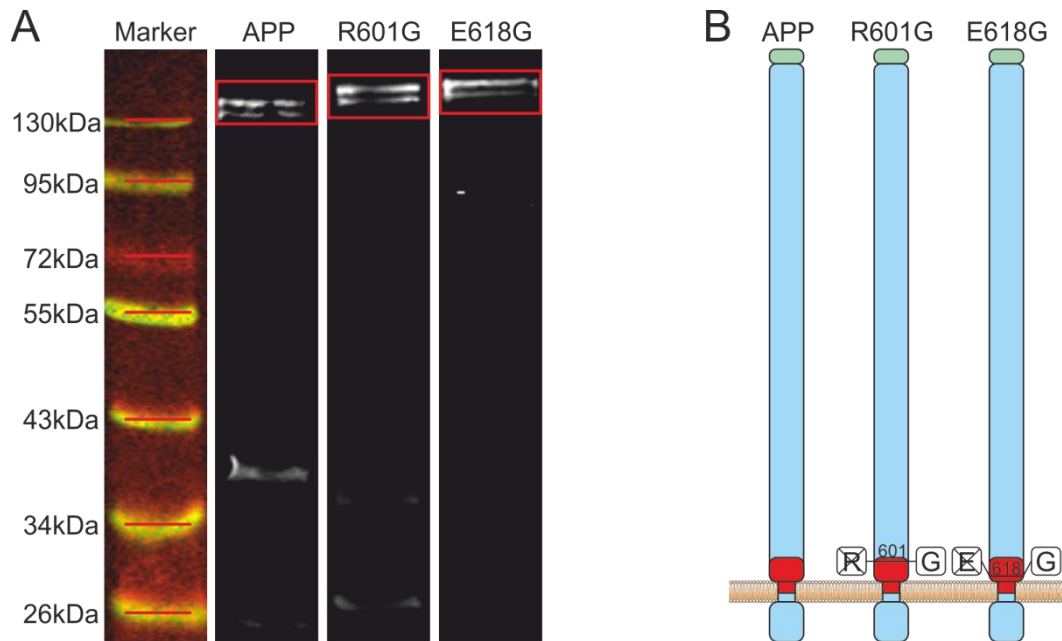
Die Punktmutation APP-E618G entspricht der sogenannten *Arctic Mutant*, welche eine der genetischen Ursachen der familiären Alzheimerschen Erkrankung sein kann (Cheng et al. 2007). A $\beta$ -Peptide, die eine solche Mutation besitzen, neigen zu einer starken Aggregation in unlösliche A $\beta$ -Fibrillen, welche das Grundgerüst für A $\beta$ -Plaques darstellen. Interessant ist daher die Frage, ob sich dieses Aggregationsverhalten der A $\beta$ -Peptide auch im Holoprotein widerspiegelt.

### 6.5.1 Western Blot Analyse

Die beiden Punktmutationen APP-R601G und APP-E618G wurden auf Basis des APP-Wildtypkonstrukts kloniert und sind wie dieses C-terminal über eine Linkersequenz mit EmGFP fusioniert.

Wildtyp-APP, APP-R601G und APP-E618G wurden für 8 Stunden in PC12-Zellen überexprimiert, danach lysiert und mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert (siehe Abschnitt 5.4).

Abb. 31 A zeigt die drei Konstrukte mit charakteristischen Glykosylierungsdoppelbanden bei der zu erwartenden Laufhöhe. Die ansteigende Laufhöhe von APP zu APP-E618G hin ist durch einen leicht schrägen SDS-PAGE-Lauf bedingt.



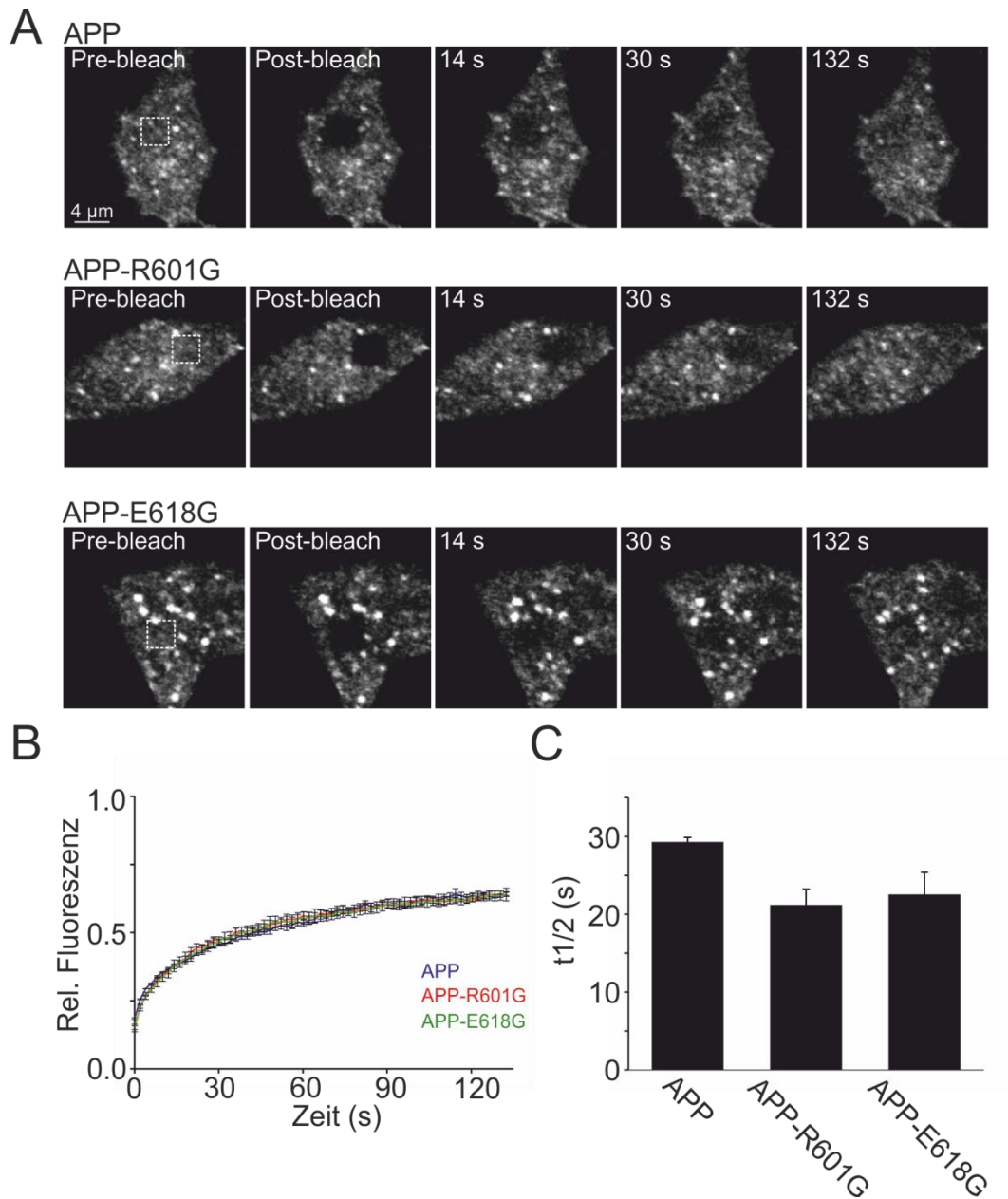
**Abbildung 31 Western Blot Analyse von überexprimiertem APP und der Punktmutanten APP-R601G und APP-E618G**

Gezeigt ist hier, wie für Abb. 16 bereits beschrieben, eine Western Blot Analyse von PC12-Zelllysate für das Wildtyp-APP-Konstrukt, sowie für die Punktmutante APP-R601G und die sogenannte „Arctic Mutant“ APP-E618G. Bei beiden Konstrukten wurde je eine Aminosäure in der extrazellulären A $\beta$ -Sequenz ausgetauscht. (A) Western Blot von APP und seiner beiden Punktmutanten. Alle drei Konstrukte sind unprozessiert nachweisbar (rote Kästen). Die scheinbare Verschiebung zu schwereren Banden von APP bis hin zur *Arctic Mutant* resultiert aus einem leicht schrägen Lauf in der SDS-PAGE. Auch Prozessierungsprodukte und Abbaubanden wurden detektiert, im Falle der R601G- und E618G-Konstrukte aber in deutlich geringerem Umfang. Aufgrund des abweichenden Expressionsgrades sind die Abbildungen unterschiedlich skaliert. (B) Piktogramm der verwendeten Konstrukte APP, APP-R601G und APP-E618G. Der jeweilige Ort der Punktmutation innerhalb der A $\beta$ -Region von den APP-Varianten R601G und E618G ist entsprechend gekennzeichnet.

Insgesamt zeigt die Western Blot Analyse eine stabile Expression der beiden Punktmutanten, vergleichbar mit der des Wildtyp-APP-Konstrukts.

### 6.5.2 Mobilität der Punktmutanten APP-R601G und APP-E618G

Um zu testen, ob die in die APP-Wildtypsequenz eingeführten Punktmutationen Einfluss auf die Mobilität von APP ausüben, wurden an APP, APP-R601G oder APP-E618G exprimierenden PC12-Zellen FRAP-Messungen durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden für mindestens 8 Stunden inkubiert, bevor sie bei Raumtemperatur in Ringerlösung mikroskopiert wurden.



**Abbildung 32 FRAP-Analyse der Mobilität von überexprimiertem APP, APP-R601G und APP-E618G**

FRAP-Messungen wurden zur Bestimmung der Kinetik von Wildtyp-APP, APP-R601G oder APP-E618G in der basalen Plasmamembran transfizierter PC12-Zellen durchgeführt. (A) Abgebildet sind repräsentative FRAP-Aufnahmen von PC12-Zellen, welche die entsprechenden Konstrukte exprimieren. (B) Gemittelte FRAP-Kurven von Wildtyp-APP bzw. der Punktmutations-Konstrukte APP-R601G und APP-E618G (C) Das Balkendiagramm zeigt die Halbwertszeiten der Konstrukte aus der FRAP-Analyse. Die Punktmutanten scheinen beide eine leicht höhere Mobilität aufzuweisen als das Wildtyp-Konstrukt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) mit 5 bis 10 analysierten Zellen pro Tag und Bedingung.

Dabei lassen sich aus den FRAP-Aufnahmen (Abb. 32 A) oder den über drei Versuchstage gemittelten Fluoreszenzrückkehrkurven (Abb. 32 B) keine

deutlichen Unterschiede in der Kinetik ableiten. Erst auf der Ebene der gemittelten Halbwertszeiten offenbart sich eine leichte Beschleunigung in der lateralen Diffusion der punktmutierten Konstrukte. So beträgt die Halbwertszeit für das Wildtypkonstrukt  $t_{1/2} = 29,25 \text{ s} \pm 0,62 \text{ (SEM)}$ . Die Punktmutanten APP-R601G und APP-E618G zeigen mit  $t_{1/2} = 21,16 \text{ s} \pm 2,08 \text{ (SEM)}$  bzw.  $t_{1/2} = 22,50 \text{ s} \pm 2,89 \text{ (SEM)}$  um ca. 25 % niedrigere Halbwertszeiten.

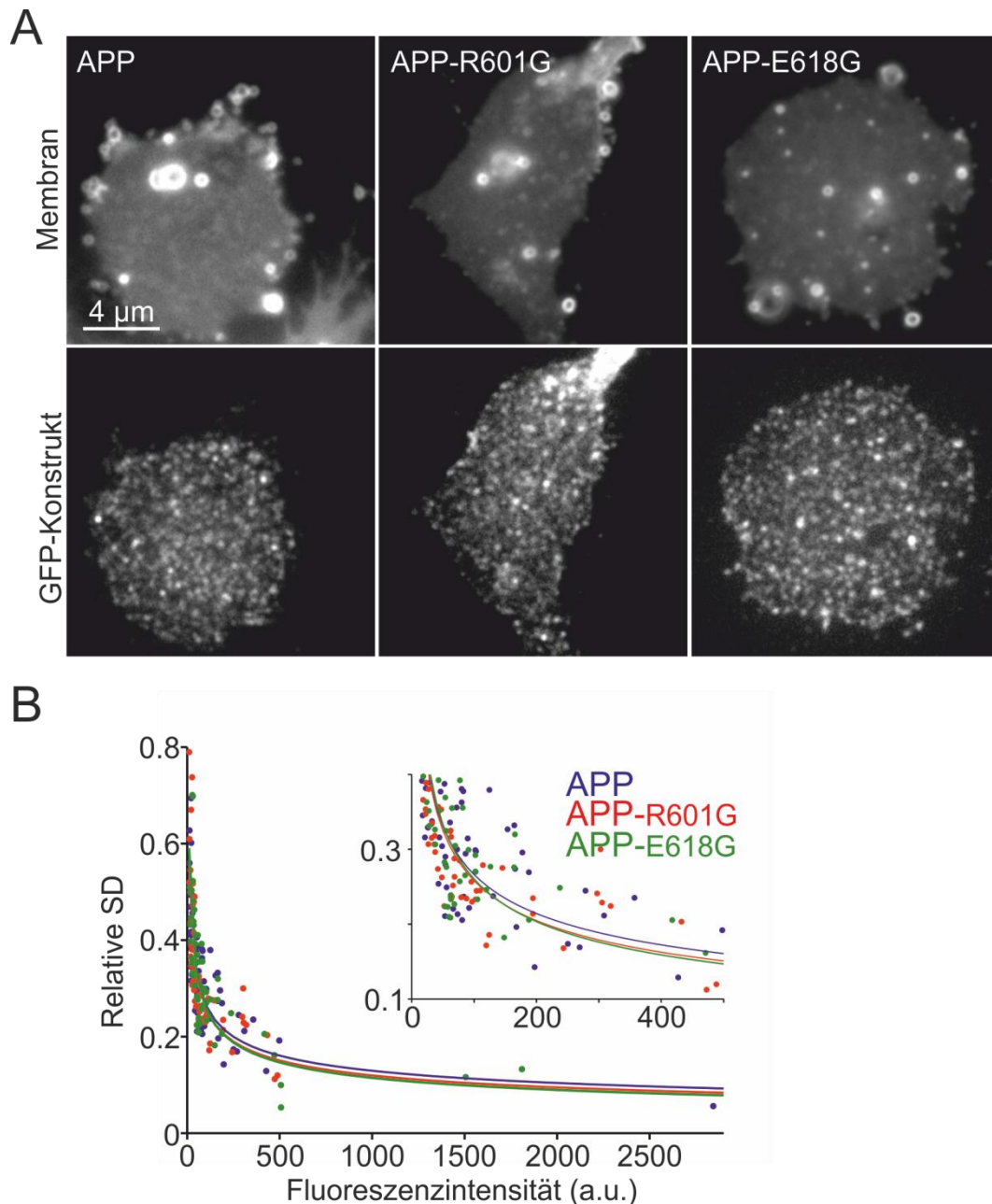
Die erhöhte Kinetik der R601G-Mutante könnte auf eine exponierte Stellung dieser Aminosäure bei der lateralen Organisation von APP hinweisen. Glycin (Maus) anstelle von Arginin (Mensch) an der fünften Stelle der A $\beta$ -Sequenz ist einer von drei Aminosäureunterschieden zwischen Mensch und Maus in der A $\beta$ -Region. In der Tat weisen A $\beta$ -Peptide von Nagetieren keine besondere Neigung zur Bildung von A $\beta$ -Fibrillen auf. Insofern könnte Arginin an dieser Stelle beim Menschen von besonderer Bedeutung für die Aggregation von A $\beta$  und damit möglicherweise auch von APP insgesamt sein.

Demgegenüber ist die erhöhte Mobilität der E618G-Mutante weniger leicht nachzuvollziehen. So polymerisieren A $\beta$ -Peptide mit der arktischen Mutation wesentlich leichter zu A $\beta$ -Fibrillen aus und zeigen einen verstärkten Plaque-Phänotypen verglichen mit Wildtyp-APP. Demnach sollte dieses Konstrukt also eher eine restringierte Mobilität durch verstärkte Protein-Protein-Interaktion aufweisen. Dies könnte auf einen unterschiedlichen Aggregationsmechanismus für APP-Cluster und A $\beta$ -Fibrillen hinweisen (siehe Abschnitt 7.3).

### 6.5.3 Laterale Organisation von APP-R601G und APP-E618G

Sollte die beschleunigte plasmalemmale Kinetik der beiden Konstrukte durch eine schwächere Proteininteraktionsstärke hervorgerufen worden sein, sollte dies auch Auswirkung auf die Ausprägung der APP-Cluster haben. Daher wurden PC12-Zellen mit dem Wildtyp-APP-Konstrukt oder mit den beiden Punktmutanten APP-R601G bzw. APP-E618G transfiziert. Nach 8-stündiger Expression wurden von diesen Zellen *Membrane Sheets* hergestellt, fixiert und wie für Kapitel 6.4.3 beschrieben mikroskopiert und analysiert (siehe auch Abschnitt 5.9.6).

Abb. 33 A zeigt repräsentative Aufnahmen von *Membrane Sheets* transfizierter PC12-Zellen mit Wildtyp-APP oder mit den Punktmutationskonstrukten APP-R601G bzw. APP-E618G, welche alle drei einen deutlichen Clusterphänotyp aufweisen. Um den Grad des Clusters zu quantifizieren, wurde an *Membrane Sheets* aller drei Konstrukte eine Analyse der relativen SD-Werte durchgeführt.



**Abbildung 33 Laterale Organisation von überexprimiertem APP, APP-R601G und APP-E618G**

Um zu testen, ob sich die leichten Unterschiede in der Mobilität von APP verglichen mit den Konstrukten APP-R601G und APP-E618G auch in einer veränderten lateralen Verteilung in der Zellmembran widerspiegeln, wurden *Membrane Sheets* von mit den Konstrukten transfizierten PC12-Zellen hergestellt. (A) Repräsentative Bilder von PC12 *Membrane Sheets* mit den überexprimierten Konstrukten. Oberes Panel zeigt die Anfärbung der Membran mit TMA-DPH. Unteres Panel zeigt die Verteilung der Konstrukte in der Membran derselben *Membrane Sheets* im GFP-Kanal. Sowohl das Wildtyp-APP als auch die Punktmutationskonstrukte zeigen eine charakteristische punktförmige Verteilung. Unterschiede im Grad der Clusterbildung lassen sich mit dem bloßen Auge nicht erkennen. (B) Clustergradanalyse der supramolekularen Organisation von APP und den beiden Mutanten APP-R601G und APP-E618G wie für Abb. 29 bereits beschrieben. Passend zu dem Ergebnis der FRAP-Halbwertszeitbestimmung, lässt sich hier bei den beiden Punktmutanten, verglichen mit Wildtyp-APP, eine leichte

Verschiebung des Clustergrades zu kleineren relativen SD-Werten hin feststellen. Damit suggerieren sowohl die FRAP-Analyse als auch die Clustergradanalyse, dass die Mutationen zu einer kaum merklichen Reduktion der Clusterstabilität führen. Analysiert wurden pro Bedingung 56 bis 64 *Membrane Sheets* aus drei unabhängigen Versuchstagen.

Die Verteilungen der relativen SD-Werte für APP, APP-R601G und APP-E618G in Abb. 33 B weisen eine große Ähnlichkeit auf. Dabei ist der Verlauf der für die Punktwolken von APP-R601G und APP-E618G angepassten Kurven nahezu identisch, während die Kurve vom Wildtyp-Konstrukt minimal zu höheren relativen SD-Werten verschoben ist.

Für sich genommen, ist dies weder ein signifikanter noch ein relevanter Unterschied zwischen dem Wildtyp-APP und den beiden Punktmutanten. Erst durch die ähnliche Tendenz in der FRAP-Analyse (siehe Abb. 32) wird dieses Ergebnis validiert. Die beiden Experimente geben einen Hinweis darauf, dass einzelne Aminosäuren in der A $\beta$ -Sequenz bei der lateralen Organisation von APP in der Zellmembran eine Rolle spielen können. Ob so kleine Effekte eine physiologische Relevanz haben könnten, bleibt allerdings unklar.

## 6.6 Kolokalisation von APP-Clustern mit Clathrinstrukturen in der Plasmamembran

Das APP in plasmalemmalen Clustern organisiert ist, ist ein relativ neuer Befund. Die erste Veröffentlichung zu diesem Thema datiert aus dem Jahr 2008 (Schneider et al. 2008) und in der Zwischenzeit sind dieser erst zwei weitere Publikationen gefolgt (Sakurai et al. 2008; Schreiber et al. 2012). Dementsprechend wenig ist daher über die physiologische Relevanz der Clusterbildung von APP in der Plasmamembran bekannt.

In Schneider et al., 2008, konnte gezeigt werden, dass eine Modulation der APP-Clusterbildung, z.B. durch Antikörper-Patching, ebenfalls Auswirkung auf die Internalisierung von APP hat, und dass so ein positiver Zusammenhang zwischen dem Grad der Organisation von APP in Membranclustern und seiner Endozytose besteht.

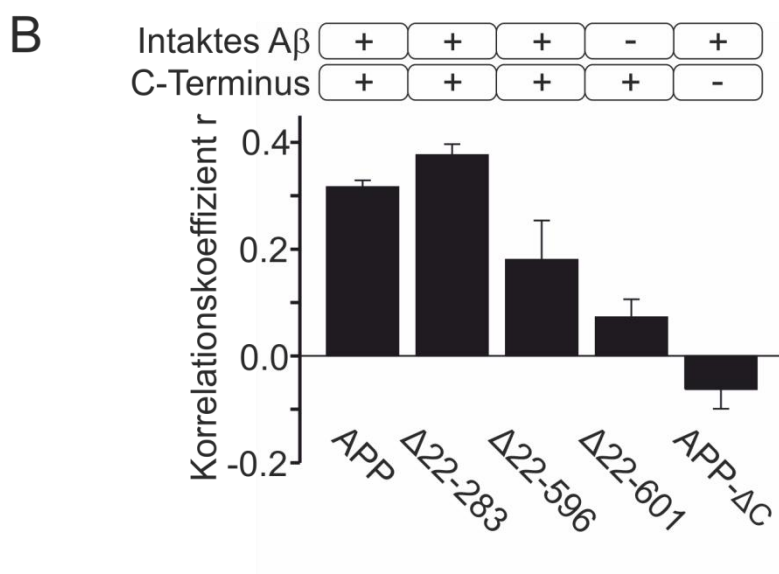
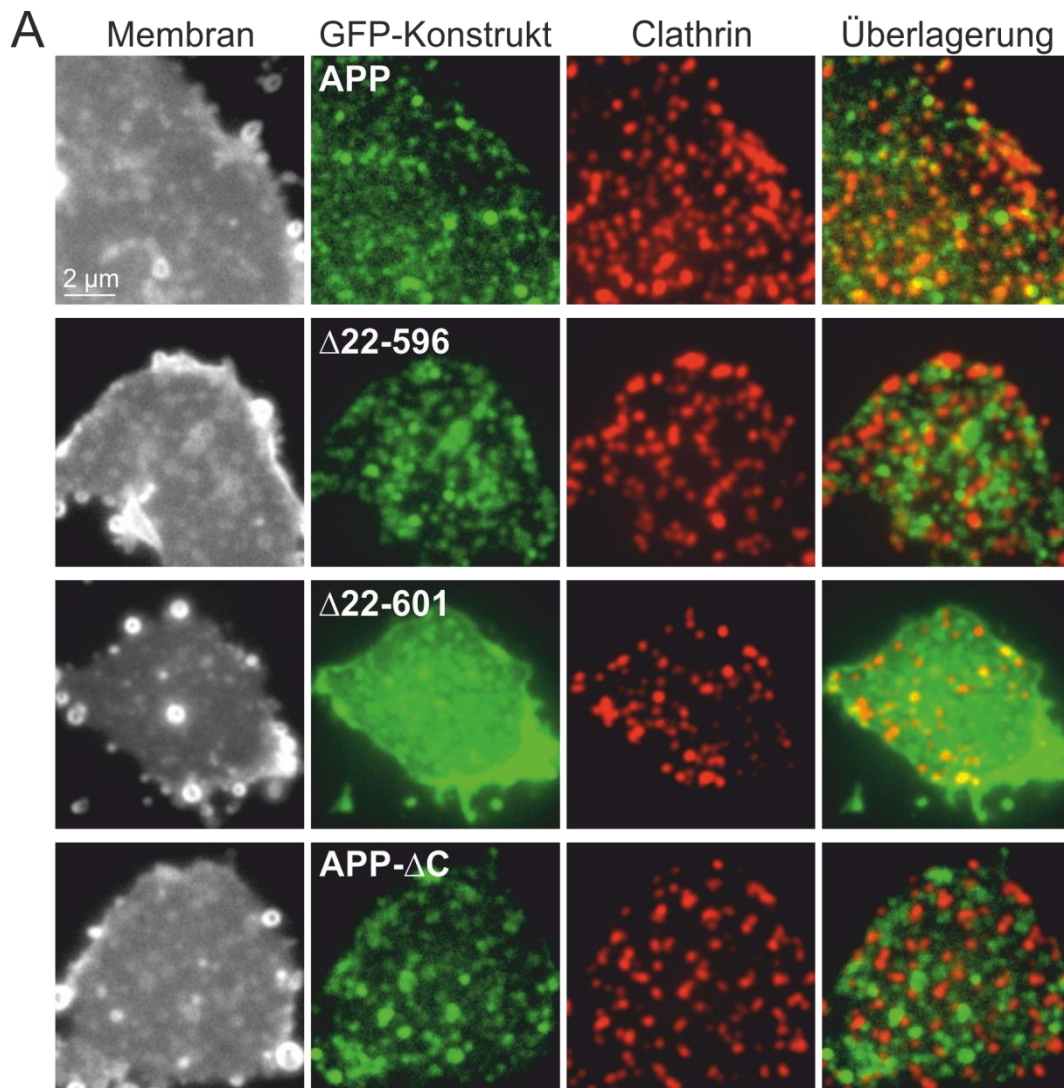
Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob APP-Membranproteinclustering für die Sortierung von APP in endozytotische Clathrinstrukturen in der Plasmamembran bedeutsam ist.

Um die Rolle der Clusterbildung bei der Sortierung von APP in die endozytotische Maschinerie zu untersuchen, wurden zum einen die Ektodomänendeletionskonstrukte Wildtyp-APP,  $\Delta 22-283$ ,  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$ , zum anderen die Endodomänendeletionsmutante APP- $\Delta C$  in PC12-Zellen für 8 Stunden exprimiert. Aus den transfizierten Zellen wurden dann *Membrane Sheets* hergestellt. Anschließend wurde an diesen eine Immunanfärbung gegen Clathrin mit dem Fluorophor AlexaFluor 594 durchgeführt. Mikroskopiert wurde unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops in einer TMA-DPH/PBS-Lösung (siehe auch Abschnitt 5.9.8).

Zur exakten Überlagerung der Aufnahmen eines *Membrane Sheets* im GFP- und AlexaFluor 594-Kanal wurden 100 nm große, fluoreszierende Kügelchen verwendet, welche in allen drei benutzten Fluoreszenzkanälen Licht emittieren. Dadurch kann man die Bilder der verschiedenen Kanäle nachträglich positionsgenau übereinanderlegen, um Positionsungenauigkeiten, wie sie beim Wechsel des Fluoreszenzkanals vorkommen können, auszugleichen.

In Abb. 34 A sind repräsentative *Membrane Sheets* aus mit den verwendeten Konstrukten transfizierten PC12-Zellen abgebildet. Die Ektodomänendeletionskonstrukte zeigen einen Phänotyp wie er bereits in Abschnitt 6.4.3 beschrieben wurde. Das intrazelluläre Deletionskonstrukt weist hingegen in Übereinstimmung mit den TIRFM-Aufnahmen in Abschnitt 6.2.5 eine Clustermorphologie auf. Auch





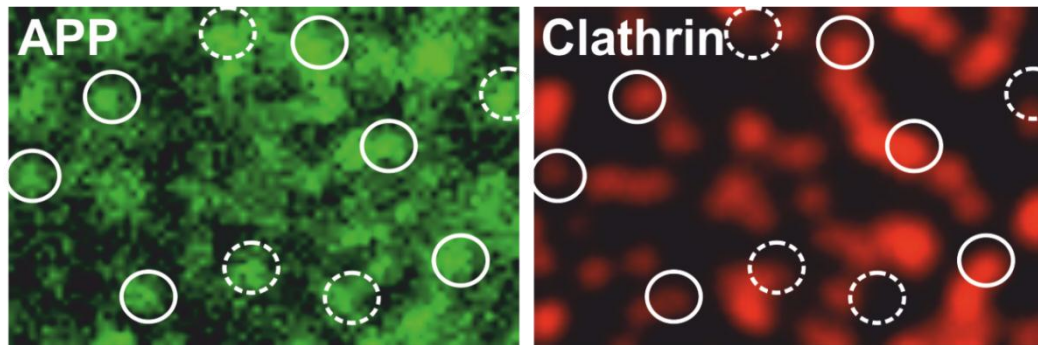
**Abbildung 34 Abhängigkeit der Kolokalisation von APP mit Clathrinstrukturen erfordert eine intakte A $\beta$ -Sequenz und die C-terminale Domäne**

Um den Einfluss der lateralen Organisation von APP in der Plasmamembran auf die Sortierung in endozytotische Strukturen zu untersuchen, wurden *Membrane Sheets* aus Wildtyp-APP, den Ektodomänendeletionsmutanten oder APP- $\Delta$ C exprimierenden PC12-Zellen hergestellt und fixiert. Anschließend wurde eine Immunanfärbung gegen Clathrin durchgeführt. Zur Überprüfung der Membranintegrität wurde zusätzlich beim Mikroskopieren TMA-DPH verwendet. (A) Die Abbildungen zeigen von links nach rechts repräsentative Aufnahmen im TMA-DPH-, im GFP- und im Clathrin-Kanal, bzw. die Überlagerung der GFP- und der zugehörigen Clathrinaufnahme. Die Bilder der verschiedenen Konstrukte sind verschieden skaliert. (B) Die Korrelation der Fluoreszenzverteilung von den APP-Konstrukten mit dem Signalmuster der Clathrinanfärbung wurde über eine Pearson-Korrelationsanalyse zentraler ROIs auf den analysierten *Membrane Sheets* bestimmt. Das Balkendiagramm gibt die aus 3 - 4 Versuchstagen gezogenen Mittelwerte  $\pm$  SEM wieder. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde kein Beispiel von  $\Delta$ 22-283 in (A) gezeigt. Die Abbildung stammt aus Schreiber et al. (2012) und wurde modifiziert.

Clathrin besitzt eine deutlich gepunktete Verteilung in der Plasmamembran von PC12-Zellen, die z.B. von clathrinummantelten Bereichen auf zytosolischer Seite der Plasmamembran, den sogenannten *Clathrin Coated Pits*, kommen kann. Die Überlagerung des GFP- mit dem Clathrin-Kanal zeigt für die Konstrukte Wildtyp-APP bis  $\Delta$ 22-596 eine deutliche Kolokalisation, während bei APP- $\Delta$ C keine Überlagerung der Fluoreszenzsignale zu beobachten ist. Die uniform verteilte Mutante  $\Delta$ 22-601 zeigt nur eine schwache Überlagerung mit Clathrin.

Um die Kolokalisation der einzelnen Konstrukte mit Clathrin quantitativ zu erfassen, wurde eine ROI im TMA-DPH-Kanal eines *Membrane Sheets* gelegt und anschließend eine Pearson Korrelation der Signalverteilung der positionskorrigierten ROIs im GFP- und Clathrin-Kanal durchgeführt (siehe Abschnitt 5.9.8).

Die Pearson Korrelation ist eine mathematische Operation, um z.B. die Fluoreszenzintensitätsverteilung zweier Bilder miteinander zu vergleichen. Sind die beiden Bilder identisch, so ergibt die Korrelation einen sogenannten Korrelationskoeffizienten  $r$  von  $r = 1$ . Für ein Bild und sein inverses Bild ergibt sich einen Wert von  $r = -1$  und bei keinem Zusammenhang ist  $r = 0$ . Allerdings hat eine im Prinzip identische Signalverteilung von Mikroskopiebildern derselben biologischen Probe in zwei verschiedenen Fluoreszenzkanälen in der Praxis niemals einen Korrelationskoeffizienten  $r = 1$ . Trotz der Kontrolle durch die fluoreszierenden Kügelchen können Verschiebungen im Sub-Pixelbereich auftreten. Auch Unterschiede in der PSF bei verschiedenen Lichtwellenlängen sorgen dafür, dass Bilder derselben Verteilung in unterschiedlichen



**Abbildung 35 Kollokalisierung von überexprimiertem APP und Clathrin auf der Ebene einzelner Cluster**

Um einen Eindruck zu erhalten, was ein Pearson Korrelationswert von  $r = 0,32$  im Falle des Wildtyp-Konstrukts (siehe Abb. 34) auf der Ebene einzelner Cluster von APP und Clathrin bedeutet, wurden in den ROIs des APP-Wildtypkonstrukts über einzelne GFP-Punkte Kreise konzentrisch gelegt. Diese wurden dann positionsgetreu in die dazugehörigen Clathrin-ROIs transferiert. Wenn im Zentrum dieser übertragenen Kreise ein Clathrinsignalmaximum zu finden ist, gilt dieser als positiv kollokalisiert (durchgängiger Kreis). Wenn kein mittiges Signalmaximum vorhanden ist, gilt dieser als negativ kollokalisiert (gestrichelter Kreis). Um die zufällige Kollokalisierung herauszurechnen, wurde dieses Vorgehen an gespiegelten Clathrin-ROIs wiederholt (Hintergrundkollokalisierung; Bild wird hier nicht gezeigt). Die korrigierte Kollokalisierung, d.h. der relative Anteil positiver Kreise an der Gesamtkreiszahl einer ROI wurde berechnet nach der Formel:  $\text{Kollokalisierung}_{\text{korrigiert}} = (\text{Kollokalisierung} - \text{Hintergrundkollokalisierung}) / (1 - \text{Hintergrundkollokalisierung} / 100)$ . Die Formel korrigierte den von der Signaldichte abhängigen zufälligen Kollokalisationsbeitrag (siehe Lang et al. 2002). Der Mittelwert  $\pm$  SEM aus vier unabhängigen Experimenten ergibt eine Kollokalisierung von  $54 \pm 1 \%$ . Die Abbildung wurde Schreiber et al. (2012) entnommen.

Fluoreszenzkanälen niemals identisch sind. Zudem sind Markierungen mit Antikörpern und Markierungen mit GFP unterschiedlich effizient. Nicht jedes APP-Molekül, welches mit Clathrin kollokalisiert, besitzt ein GFP (endogenes APP) und nicht jedes Clathrinmolekül, welches mit APP assembliert ist, wird auch durch Antikörper markiert. Hinzu kommen noch Unterschiede zwischen den Intensitätsstärken verschiedener Fluorophore sowie Signalrauschen. All diese Faktoren zusammengenommen reduzieren, auch im Falle einer Verteilungsidentität, den Korrelationswert deutlich.

Die berechneten  $r$ -Werte wurden für jeden Versuchstag und jedes verwendete Konstrukt gemittelt. Die Versuchstagsmittelwerte wurden anschließend für die jeweiligen Konstrukte zu einem Gesamtmittelwert verrechnet. Für das Wildtypkonstrukt beträgt  $r = 0,32 \pm 0,01$  (SEM), für  $\Delta 22-283$  ist  $r = 0,38 \pm 0,02$  (SEM), für  $\Delta 22-596$  ist  $r = 0,18 \pm 0,07$  (SEM), für  $\Delta 22-601$  ist  $r = 0,07 \pm 0,03$  (SEM) und für APP- $\Delta C$  ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = -0,06 \pm 0,04$  (SEM).

Dabei entspricht der Pearson Korrelationswert von  $r = 0,32$  für das Wildtypkonstrukt einer Kolokalisation von APP-Clustern und Clathrinstrukturen von  $54 \% \pm 1$  (SEM) (siehe Abb. 35), d. h. über die Hälfte aller APP-Cluster befinden sich in einer clathrinreichen Umgebung.

Während  $\Delta 22-283$ , dem N-terminal ein großer Teil der extrazellulären Domäne deletiert worden ist, sogar noch stärker als der Wildtyp mit Clathrin zu kolokalisieren scheint (siehe Abb. 34 B), reduziert sich die Kolokalisation von  $\Delta 22-596$  mit Clathrin schon deutlich, wobei sie immer noch vorhanden ist. Bei der kürzesten Variante  $\Delta 22-601$  ist die Korrelation fast nur noch zufälliger Natur. Dabei wird die mehrheitlich uniform verteilte Fluoreszenz von  $\Delta 22-601$  durch die Pearson Korrelation im r-Wert nicht berücksichtigt. Nur die Korrelation der plasmalemalen Reststrukturen dieser Mutante mit Clathrin gehen in den Korrelationskoeffizienten ein und zeigen mit  $r = 0,07$  eine eher schwache Korrelation. Die Endodomänendeletionsmutante APP- $\Delta C$  zeigt sogar eine leicht negative Korrelation, d.h. das Konstrukt und Clathrin schließen sich in der Plasmamembran eher aus. Dies passt gut zu früheren Beobachtungen, nach denen der C-Terminus von APP eine bedeutende Rolle beim endozytotischen Transport von APP hat (King und Scott 2004).

Zusammengenommen zeigt die hier präsentierte Kolokalisationsstudie, dass ein intakter C-Terminus allein nicht ausreicht APP in Clathrinmembrandomänen zu sortieren. Vielmehr ist die Organisation von APP in Membranclustern ebenfalls eine grundlegende Voraussetzung für die Kolokalisation mit Clathrin. Dabei zeigt die stufenartige Reduktion des Korrelationskoeffizienten eine gewisse Parallelität mit der Abnahme der Halbwertszeiten in der FRAP-Analyse von diesen Konstrukten aus Abschnitt 6.4.2. Das zeigt, dass die Mobilitätsrestriktion von APP in der Plasmamembran eine Notwendigkeit für die intrazelluläre Aggregation von Clathrin mit APP darstellt. Die erhöhte Mobilität von  $\Delta 22-596$  könnte somit die Interaktion von Clathrin mit dieser Mutante erschweren, was schlussendlich die Kolokalisation reduziert. Die nahezu ungehinderte Diffusion von  $\Delta 22-601$  könnte dann eine Assemblierung mit Clathrin, aufgrund zu kurzer Retentionszeiten in endozytotischen Plasmamembranstrukturen, vollständig verhindern. Ist die Clusterstabilität von APP ausreichend groß, reguliert der C-Terminus als Interaktionsschnittstelle mit Clathrin die Internalisierung in endozytotische Kompartimente.

## 7 Diskussion

Das *Amyloid Precursor Protein* APP ist ein zentrales Element in der Entstehung der Alzheimerschen Demenz, von dem seit 30 Jahren unterschiedlichste Aspekte erforscht wurden. Es gibt erste Hinweise auf eine nicht-homogene Verteilung von APP in Membranproteinclustern, die auch physiologisch relevant sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Verteilung und die Mobilität von APP in der Plasmamembran von PC12- und HepG2-Zellen untersucht. Dazu wurden sowohl lebende Zellen, als auch zellfreie Plasmamembranpräparationen, sogenannte *Membrane Sheets*, verwendet. Methodisch wurden moderne Mikroskopietechniken wie Epifluoreszenz-, FRAP-, TIRF- und STED-Mikroskopie genutzt. Aus den gewonnenen Daten wurden dann Rückschlüsse auf den Bildungsmechanismus der APP-Membranproteincluster gezogen. Diese Proteincluster sind von Bedeutung, da die Aggregation von APP in der Plasmamembran Einfluss auf die Entstehung des A $\beta$ -Peptides haben kann (Schneider et al. 2008). Daher wurde in dieser Arbeit auch die Frage adressiert, ob die Bildung von APP-Clustern einen Einfluss auf die Endozytose von APP haben kann. Denn die Internalisierung von APP ist eine Grundvoraussetzung für die Spaltung von APP im amyloidogenen Prozessierungsweg, und damit für die Bildung des neurotoxischen A $\beta$ -Peptides.

### 7.1 Laterale Organisation von APP in plasmalemalen Proteinclustern

Seit der Entdeckung von APP als Vorläuferprotein des A $\beta$ -Peptides wurde über eine mögliche Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von APP in der Plasmamembran spekuliert. Es ist auch bekannt, dass sich eine Subpopulation von APP in Cholesterolanodomänen in der Plasmamembran aufhält. Dennoch wurde eine Existenz von plasmalemalen APP-Proteinclustern erst für N2a-Zellen publiziert (Schneider et al. 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich auch in PC12- und HepG2-Zellen der überwiegende Teil von plasmalemalen APP in Proteinclustern befindet.

Der durchschnittliche Durchmesser endogener APP-Strukturen in der basalen Plasmamembran von PC12-Zellen konnte durch die Verwendung von STED-Mikroskopie auf ca. 120 nm bestimmt werden (siehe Abschnitt 6.1). Würde plasmalemmales APP hauptsächlich als Monomer oder Dimer vorliegen, dann

müsste die gemessene Größe der Objekte aufgrund der Auflösung des verwendeten STED-Mikroskops im Schnitt bei maximal 90 bis 100 nm liegen. Tatsächlich ist der überwiegende Teil der vermessenen Strukturen jedoch deutlich größer als 100 nm. Dies kann durch Monomere, Dimere, ja selbst Oligomere kaum erklärt werden. Vielmehr spricht dies für eine Organisation von APP in supramolekularen Proteinclustern, die entweder homophil oder heterophil sind.

Ein weiteres Argument spricht gegen eine mehrheitlich monomere Verteilung von APP. Das plasmalemmale Erscheinungsbild überexprimierten APPs wird punktförmig konzentriert, wofür die A $\beta$ -Domäne ursächlich ist. Fehlen die ersten fünf Aminosäuren der N-terminalen A $\beta$ -Region wie bei den Mutanten APP- $\Delta$ N und  $\Delta$ 22-601, dann zeigt sich hingegen eine uniforme Verteilung, welche auf eine Auflösung der Clusterintegrität hin zu Monomeren schließen lässt (siehe Abschnitt 6.2.5 und 6.4.3). Diese fundamentale Änderung im Phänotyp der lateralen Verteilung wäre bei einem ebenfalls mehrheitlich monomeren Vorkommen von APP in der Plasmamembran nicht zu erwarten. Daher liegt es näher, dass sich das uniforme Konstrukt nicht mehr in polymeren Proteinclustern organisieren kann und feinverteilt in der Plasmamembran vorliegt, weshalb die Verteilung durch die mangelnde Auflösung des Epifluoreszenzmikroskopes uniform erscheint.

Zudem spricht die beobachtete Fluoreszenzintensitätsstärke der APP-Signale eher für supramolekulare Komplexe als für Einzelmoleküle und es konnte weder das typische Blinken von Einzelmolekül-GFP-Fluoreszenzsignalen (Dickson et al. 1997) noch ein schrittweiser Bleichvorgang beobachtet werden. Tatsächlich war ein kontinuierliches, stufenloses Bleichen bei den einzelnen APP-Fluoreszenzsignalen messbar.

## **7.2 Plasmamembranlokalisation überexprimierter APP-Mutanten**

Sind die beobachteten APP-Strukturen auch wirklich plasmamembraninsetzte Moleküle? Oder hat der clusterförmige Eindruck vieler APP-Konstrukte vielmehr seinen Ursprung in APP-Vesikeln, welche nur mit der Zellmembran assoziiert sind?

Tatsächlich könnte vesikuläres APP einen großen Einfluss auf das laterale Erscheinungsbild der APP-Konstrukte haben. So lässt sich die relativ hohe immobile Fraktion des APP-Wildtypkonstrukts auch durch einen fehlenden Beitrag der vesikulären Komponente zur Fluoreszenzrückkehr erklären (siehe

Abschnitt 6.4.2). Um dies zu klären, wurde eine Zelloberflächenimmunanfärbung mit den drei relevanten Konstrukten Wildtyp-APP,  $\Delta 22-596$  und  $\Delta 22-601$  durchgeführt (siehe Abschnitt 6.4.4). Bei dieser wurden, mit den Konstrukten transfizierte, lebende PC12-Zellen mit einem Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop auf Eis, zur Vermeidung von Endozytoseprozessen, gefärbt. Daher wird durch diese Methode ausschließlich die plasmamembraninserierte Population an Proteinen detektiert, nicht aber die vesikuläre.

Weil im Falle der beiden letztgenannten Konstrukte der größte Teil der extrazellulären Domäne entfernt wurde, kommt als mögliches Epitop nur der extrazelluläre Part der A $\beta$ -Sequenz in Frage. Aufgrund der geringen Auswahl der auf dem Markt erhältlichen Antikörper gegen diese APP-Region, wurde ein Antikörper verwendet (siehe Abschnitt 4.1.4), dessen Epitop die ersten 16 Aminosäuren des menschlichen A $\beta$ -Peptides sind. In dem durchgeführten Experiment zeigte dieser Antikörper dann auch vor allem eine gute Antigenizität für die Konstrukte APP und  $\Delta 22-596$ . Zudem erkennt der eingesetzte Antikörper nur die APP-Konstrukte humanen Ursprungs, da in diesem Experiment das endogene APP der PC12-Rattenzelllinie nicht detektiert wird. Eine Hintergrundfärbung hätte die Interpretation des Ergebnisses vermutlich sehr erschwert oder sogar unmöglich gemacht.

Für APP und  $\Delta 22-596$  offenbarte sich eine Linearität zwischen dem Expressionsgrad und der Oberflächenfärbung die belegt, dass beide Varianten gut in die Plasmamembran inseriert werden. Deshalb muss zumindest ein großer Teil des Fluoreszenzsignals in *Membrane Sheets* mit diesen beiden Konstrukten (siehe Abb. 28) von plasmamembraninserierten Molekülen und nicht von vesikulären Strukturen ausgehen. Daher kann man annehmen, dass der Hauptteil des Clusterphänotyps durch die plasmamembraninserierte Proteinpopulation erzeugt wird.

Auch das  $\Delta 22-601$ -Konstrukt weist eine lineare Beziehung zwischen dem Expressionsgrad und der Oberflächenanfärbung auf, nur ist diese weit weniger steil als die der beiden anderen Konstrukte. Dies lässt sich durch eine geringere Bindungseffizienz des Antikörpers an diese Mutante erklären, da  $\Delta 22-601$  die ersten fünf Aminosäuren des Antikörperepitopes fehlen. Alternativ kann der flachere lineare Zusammenhang zwischen Expressionsgrad und Oberflächendetektion auch für eine schlechtere Sortierung dieser Mutante zur Plasmamembran sprechen. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich, da der uniforme Charakter der lateralen Verteilung von  $\Delta 22-601$  in *Membrane Sheets* (siehe Abb. 28) eine Insertion des Konstrukts in die Plasmamembran belegt.

### 7.3 Die Rolle der A $\beta$ -Region bei der Bildung von APP-Clustern

Da APP-Membranproteincluster in der Literatur bisher kaum Beachtung gefunden haben, ist die publizierte Datenlage zu möglichen Aggregationsmechanismen von APP dementsprechend gering. Dennoch sind verschiedene Regionen von APP bekannt, die als homo- oder heterophile Interaktionsstellen für andere Proteine dienen können (siehe Abschnitt 2.8.5).

Extrazellulär wurde vor allem die E1- und E2-Domäne als mögliche cis- und trans-Dimerisierungsstelle für APP identifiziert. In der Transmembranregion ist es das konsekutive GxxxG-Motiv, das die Dimerisierung von APP forcieren könnte. Des Weiteren ist die intrazelluläre Domäne als Interaktionsschnittstelle mit einer Vielzahl von zytosolischen Proteinen in Verbindung gebracht worden. So konnte Schneider et al. (2008) zeigen, dass das intrazelluläre Flotillin-2 einen modulierenden Einfluss auf die Größe von APP-Membranproteinclustern hat, da ein *Knock-Down* von Flotillin-2 die Größe der APP-Cluster reduziert. Tatsächlich zeigt das Endodomänendeletionskonstrukt APP- $\Delta$ C auch eine leicht erhöhte Mobilität im FRAP-Experiment (siehe Abschnitt 6.2.3). Dennoch ist diese Mutante weiterhin in der Lage Membranproteincluster zu bilden (Abschnitt 6.2.5 und 6.6). Das uniforme Konstrukt  $\Delta$ 22-601 besitzt zudem die komplette intrazelluläre Domäne, weshalb diese weder notwendig noch hinreichend für die Clustergeneration sein kann. Das GxxxG-Motiv in der TMR fällt als treibende Kraft hinter der plasmalemalen APP-Aggregation ebenfalls aus, da alle für diese Arbeit verwendeten Konstrukte im Besitz einer vollständigen TMR sind. Betrachtet man den Mobilitätswachstum in Abhängigkeit von der Anzahl der deletierten Aminosäuren (siehe Abb. 26) und die laterale Verteilung dieser Konstrukte in *Membrane Sheets* (siehe Abschnitt 6.4.3), dann kann auch die E1- und E2-Domäne keine Rolle bei der Segregation von APP in Proteinmembrandomänen spielen.

Erst die Deletion der ersten fünf Aminosäuren der A $\beta$ -Sequenz in der APP- $\Delta$ N- und der  $\Delta$ 22-601-Mutante sorgt für eine Auflösung der Clusterintegrität, was durch die Ergebnisse der hier gezeigten FRAP-, TIRF- und *Membrane Sheet* Experimente belegt wird. Ob alle fünf Aminosäuren bei der Aggregation gleich bedeutend sind, oder ob sogar eine Deletion weiterer Aminosäuren in der A $\beta$ -Sequenz einen noch stärkeren Phänotyp zeigen würde, lässt sich aufgrund der vorliegenden Datenlage nicht sicher beantworten. Eine zusätzlich erstellte Mutante  $\Delta$ 22-623, mit einer noch weiter verkürzten extrazellulären A $\beta$ -Region als



dies bei  $\Delta 22-601$  der Fall ist, wird z.B. nicht zur Plasmamembran sortiert (in dieser Arbeit nicht gezeigte Daten).

Daher wurden alternativ einzelne Aminosäuren der A $\beta$ -Region ausgetauscht, welche bekanntermaßen eine Relevanz für die Pathologie des A $\beta$ -Peptids haben (siehe Abschnitt 6.5). Der Austausch der fünften N-terminalen Aminosäure der A $\beta$ -Sequenz im R601G-Konstrukt zeigt dabei keinen starken Einfluss auf die Clusterdynamik von APP. Durch die leicht erhöhte Diffusionskinetik im FRAP-Experiment und die minimale Verschiebung der relativen SD Kurve zu niedrigeren Werten, kann man lediglich von einer minimalen Tendenz zur Clusterdestabilisierung ausgehen. Gerade diese Aminosäure ist aber von besonderer Bedeutung, da sie eine der drei Aminosäuren in der A $\beta$ -Sequenz ist, in welcher sich das Nagetier-A $\beta$ -Peptid, das nur eine geringe Neigung zur Oligomerisierung hat, von dem humanen A $\beta$ -Peptid unterscheidet.

Interessanterweise weist auch die zweite Punktmutation E618G (siehe Abschnitt 6.5), weiter C-terminal in der extrazellulären A $\beta$ -Sequenz gelegen, einen mit R601G vergleichbaren Phänotyp auf. Dies lässt möglicherweise auch auf eine Rolle der weiter zentral in der A $\beta$ -Region gelegenen Aminosäuren bei der Clusterbildung schließen. Über einen möglichen Mechanismus der unerwarteten Clusterdestabilisierung der E618G-Mutante lässt sich nur spekulieren. Eigentlich polymerisieren A $\beta$ -Peptide mit dieser Mutation wesentlich leichter zu A $\beta$ -Fibrillen und zeigen, verglichen mit A $\beta$ -Peptiden aus Wildtyp-APP, einen verstärkten Plaque-Phänotyp. Demnach sollte dieses Konstrukt durch eine verstärkte Protein-Protein-Interaktion also eher eine verlangsamte Mobilität aufweisen.

Die vorgelegten Daten können nun aber auf einen unterschiedlichen Aggregationsmechanismus von APP-Clustern und A $\beta$ -Fibrillen hinweisen. Für die Oligomerisation von A $\beta$ -Peptiden müssen diese zunächst ihre Sekundärstruktur von einer  $\alpha$ -helikalen Konformation in die hydrophobere  $\beta$ -Faltblattkonformation ändern (Ikeda et al. 2011; Oda et al. 1995). Daher könnten beim intakten APP eher hydrophile Aminosäuren zur Clusterbildung benötigt werden, während die Fibrillenpolymerisation von hydrophoben A $\beta$ -Peptidinteraktionen profitiert.

#### **7.4 Mögliche Interaktionsmechanismen bei der plasmalemmalen Organisation von APP**

Membranproteine können durch unterschiedliche Mechanismen in separate Membrannanodomänen segregieren (siehe auch Abschnitt 2.8). Die freie Diffusion von Molekülen könnte z.B. durch einen *Picket-Fence*-Mechanismus behindert werden. In diesem bildet das Zytoskelett intrazellulär einen Zaun, der

die Mobilität von z.B. Transmembranproteinen durch sterische Hinderung und Friktion beschränkt. Dagegen geht die *Membrane-Raft*-Hypothese von Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Interaktionen aus, welche zu der Kompartimentierung von Zellmembranen führen. Auch Protein-Protein-Interaktionen können zu einem starken lateralen Organisationsgrad führen, wie z.B. für Syntaxin 1a gezeigt werden konnte. Die Verteilung des EGF-Rezeptors in der Plasmamembran hingegen wird auch durch die Interaktion mit der extrazellulären Matrix reguliert. Neuere Studien legen u.a. für SNARE-Proteine auch einen starke Beteiligung elektrostatischer Mechanismen bei der Entstehung von Membranclustern nahe (van den Bogaart G. et al. 2011; Zilly et al. 2011), insbesondere von Metallionen (Zilly et al. 2011). Diese können Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen als Mediatoren durch Ladungsausgleich fördern.

Aber welche dieser Mechanismen trifft für die APP-Segregation in der Zellmembran zu?

Dass ein intrazellulärer Zauneffekt des Zytoskeletts, wie er im Picket-Fence-Modell beschrieben wird, einen maßgeblichen Einfluss auf die Bildung der APP-Plasmamembrannanodomänen hat, kann man ausschließen. So lässt sich bei der Variante APP- $\Delta$ C mit deletierter intrazellulärer Domäne nur ein moderater Anstieg der Diffusionskinetik feststellen (siehe Abschnitt 6.2.3 und 6.2.4). Dahingegen besitzt die Mutante  $\Delta$ 22-601 noch die komplette Endodomäne, obwohl sie die größte Mobilität und eine uniforme laterale Verteilung aufweist (siehe Abschnitt 6.4.2 und 6.4.3).

Um den Effekt der Glykokalyx auf die Mobilität von APP zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde eine FRAP-Analyse von APP mit und ohne enzymatischen Abbau der Glykokalyx durchgeführt (siehe Abb. 22). Hier zeigte sich kein Unterschied in der Mobilität von APP. Da ein Abbau der Glykokalyx potentiell immer auch eine unerwünschte Wirkung auf die restlichen Membrankomponenten haben kann, und damit auch auf mögliche Interaktionspartner von APP, sind Schlussfolgerungen auf die direkte Interaktion von APP mit der Zellmatrix nur schwer möglich. Daher wurden zum anderen in einem zweiten, direkteren Ansatz die Glykosylierungsstellen von APP durch Punktmutationen entfernt. Die FRAP-Analyse dieser Konstrukte (siehe Abb. 24) offenbarte keinen wesentlichen Einfluss der APP-Glykosylierung auf die Clusterstabilität. Die im Schnitt leichte Abnahme der Mobilität von APP durch die Entfernung der N-Glykosylierung lässt sich auf drei extreme Ausreißerwerte beim N467S-Konstrukt zurückführen (siehe Abb. 24 D).

Neben der spezifischen Interaktion der APP-Glykosylierung mit der extrazellulären Matrix kommt auch eine Verlangsamung der Diffusion von APP durch Friktion der großen extrazellulären Domäne mit dem die Zelle umgebenden Matrixgeflecht in Frage. Dabei könnte die Matrix in Analogie zu dem intrazellulären *Picket-Fence*-Modell, ein extrazelluläres Netzwerk aus „Zäunen“ bilden, welches die Diffusion von APP beschränkt. Dem steht aber die relativ geringe Zunahme der Mobilität von APP durch die Deletion eines Großteils seiner Ektodomäne entgegen (siehe Abb. 26). Zusammenfassend kann daher ein Einfluss der extrazellulären Matrix auf die laterale Organisation von APP nicht bestätigt werden.

Als treibende Kraft hinter der APP-Nanodomänenbildung können Lipid-Lipid-Interaktionen ebenfalls ausgeschlossen werden. Denn eine Deletion von nur fünf Aminosäuren der N-terminalen A $\beta$ -Region ist hinreichend, um bei gleichzeitig ungeänderter Lipidzusammensetzung, einen geclusterten in einen mehrheitlich uniformen Phänotyp mit dramatisch erhöhter plasmalemalem Proteinmobilität umzuwandeln (siehe Abb. 26 und Abb. 28). Somit ist eine reine Lipidabhängigkeit der Clusterbildung von APP kaum denkbar.

Auch die extrazelluläre Ionenkonzentration war in den jeweiligen Experimenten für alle verwendeten APP-Konstrukte gleich, weshalb ein rein durch Ionen vermittelter Clustermechanismus auszuschließen ist.

Letztendlich bleiben nur Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktion als ursächliche Mechanismen der lateralen Organisation von APP wahrscheinlich. Welche von beiden mechanistisch für die Clusterbildung verantwortlich ist, kann aufgrund der hier vorliegenden Datenlage nicht eindeutig geklärt werden. Zwar scheint die TMR von APP, welche naturgemäß den direktesten Kontakt mit Membranlipiden hat, für die Clustergeneration, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da in allen getesteten Konstrukten die TMR vollständig erhalten blieb. Andererseits liegt die entscheidende Proteinregion räumlich nah an der extrazellulären Zellmembran, wodurch eine Interaktion mit Lipiden zumindest möglich scheint. Besonders, da eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit den cholesterolbindenden Charakter der juxtamembranen A $\beta$ -Region belegen konnte (Barrett et al. 2012). Laut dieser Studie gibt es jedoch keinen Hinweis, dass die für die Clusterbildung relevanten ersten fünf Aminosäuren der A $\beta$ -Region an der Cholesterolbindung beteiligt sind. Ein wichtiger Punkt ist auch die Verteilung von APP in der Plasmamembran. Der mengenmäßig größere Anteil von plasmalemalem APP ist in Nicht-*Raft*-Regionen lokalisiert (Rushworth und Hooper 2011). Deshalb scheint als

dominanter Mechanismus der Clusterentstehung eine Wechselbeziehung von Cholesterol und Sphingolipiden mit APP eher fraglich.

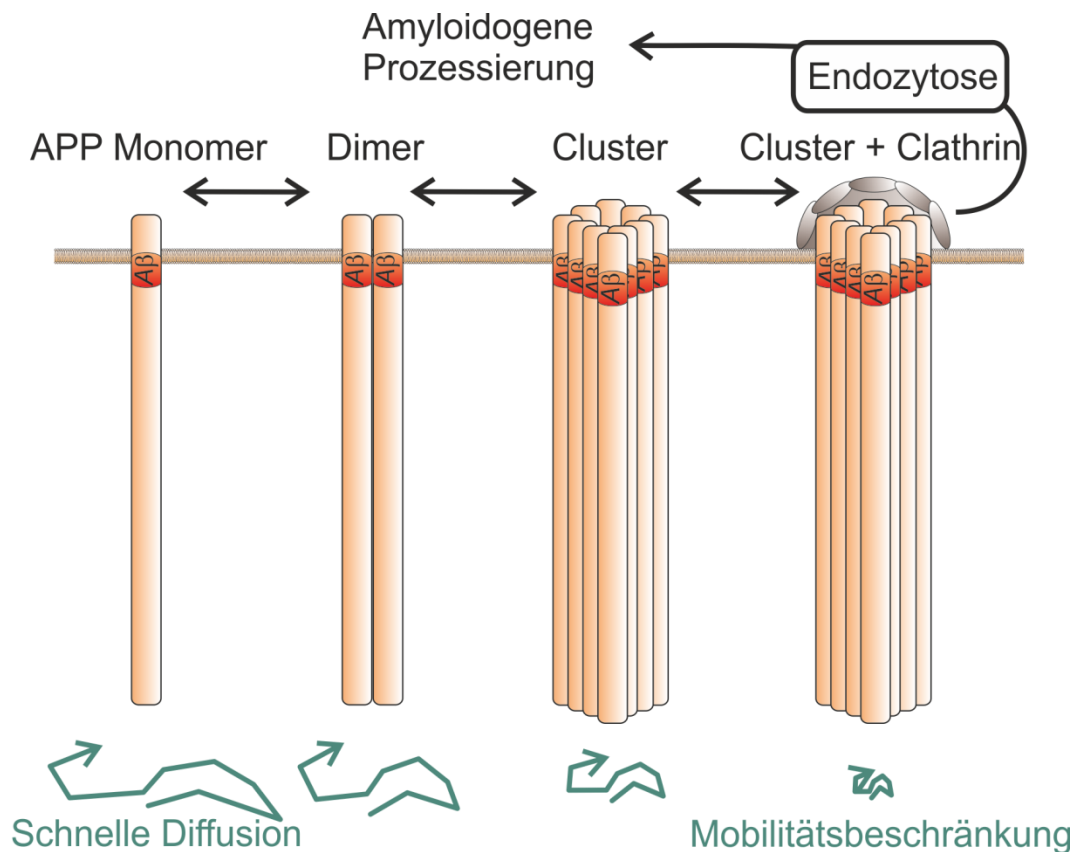
So bleibt ein durch die extrazelluläre A $\beta$ -Region vermittelter Protein-Protein-Interaktionsmechanismus bei der lateralen Segregation von APP in Proteincluster am wahrscheinlichsten.

## **7.5 Modell der lateralen Organisation von APP in plasmalemalen Nanodomänen**

Es ist schon länger bekannt, dass APP in der Plasmamembran Dimere bzw. Oligomere bilden kann. Diese können physiologisch bedeutsam sein, z.B. bei der Wirkung von APP als Zelloberflächenrezeptor, Adhäsionsmolekül oder auch bei seiner proteolytischen Spaltung. Auch die Lokalisierung von zumindest einer Subpopulation der APP-Moleküle in cholesterolreichen Membrandomänen legen viele Studien zumindest nahe.

Dass APP supramolekulare Proteincluster nicht nur in der Zellmembran von N2a-Zellen (Schneider et al. 2008) bildet, sondern auch in HepG2- und in PC12-Zellen (siehe Abschnitt 6.1 und 6.2), zeigt die generelle Bedeutung der APP-Clusterbildung. Die Größe der von Schneider et al. (2008) beobachteten APP-Membrandomänen kann durch das Gerüstprotein Flotillin-2 moduliert werden. Diese Protein-Protein-Interaktion ist abhängig von Cholesterol in der Membran, und die Bildung der Cluster stimuliert die Endozytose von APP. Dass prinzipiell eine verstärkte Aggregation von APP in der Plasmamembran die Endozytoserate erhöht, konnte ebenfalls schon früher durch Eehalt et al. (2003) gezeigt werden. Da aber durch einen *Knock-Down* von Flotillin-2 die Clusterbildung von APP nicht grundlegend gestört werden kann, muss der ursächliche Clusterbildungsmechanismus ein anderer sein. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die ersten fünf Aminosäuren der N-terminalen A $\beta$ -Region die Schlüsselrolle bei der Entstehung von plasmalemalen APP-Clustern spielen. Damit ergibt sich ein Modell (siehe auch Abb. 36), welches im Folgenden erläutert wird.

Erreicht APP über den konstitutiven sekretorischen Weg die Plasmamembran, dann kann APP, vorausgesetzt es wird nicht unmittelbar durch  $\alpha$ -Sekretasen prozessiert, Cluster bilden und schlussendlich endozytiert werden. Monomeres APP würde dabei eine hohe Mobilität, die nahe an freie Diffusion in einer zweidimensionalen Matrix heranreicht, besitzen. Dies legen die Studien an den



### Abbildung 36 Modell zur Bildung von APP-Clustern in der Plasmamembran

Nicht prozessierte APP-Moleküle erreichen über den konstitutiven sekretorischen Weg die Plasmamembran. Hier können sie entweder durch die nicht-amyloidogene Prozessierung geschnitten oder durch die Bildung von APP-Clustern endozytiert werden. Die Clusterbildung wird dabei hauptsächlich durch die ersten fünf Aminosäuren der N-terminalen A $\beta$ -Region reguliert. Auch alternative Dimerisierungsmechanismen über Regionen der Ektodomäne oder über konsekutive GxxxG-Motive in der Transmembranregion könnten eine unterstützende Wirkung auf die Dynamik und Stabilität von APP-Zellmembrandomänen haben. Durch den zunehmenden Mobilitätsverlust während des Clusterwachstums könnte die Interaktion zwischen der Endodomäne von APP und Clathrin begünstigt werden. Dadurch ist es möglich, dass sich Clathrin intrazellulär besser an die Cluster anlagern kann oder aber die Sortierung der Cluster in Clathrinmembrandomänen erleichtert wird. Durch die verstärkte Interaktion der Cluster mit Clathrin werden diese dann internalisiert und APP kann in dem frühen Endosomenkompartiment der amyloidogenen Prozessierung zugeführt werden. Durch diesen Mechanismus kann die A $\beta$ -Region die Produktion von A $\beta$ -Peptiden regulieren. Die Abbildung wurde aus Schreiber et al. (2012) entnommen und modifiziert.

Konstrukten APP- $\Delta$ N und  $\Delta$ 22-601 nahe (siehe Abschnitt 6.2.5 und 6.4.2), welche aufgrund der uniformen Verteilung vermutlich monomer sind und über eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit verfügen. Eine Oligomerisierung von APP führt dann zu einer geringeren Diffusibilität. Darüber, ob APP über spezielle Regionen der Endodomäne und über das konsekutive GxxxG-Motiv in der TMR zunächst dimerisiert, wie frühere Arbeiten vermuten lassen (siehe Abschnitt

2.8.5), oder aber ausschließlich über die N-terminale A $\beta$ -Region höhere Oligomere bzw. Cluster bildet, kann aufgrund der hier vorliegenden Daten nur spekuliert werden. So bewirkt allerdings die Deletion der extrazellulären E1- und E2-Domäne in Abb. 26 eine leichte Zunahme der Mobilität, welche auch durch den Verlust einer dimeren Subpopulation von APP erklärt werden kann. Sicher geschlussfolgert werden kann aber, dass die weitere Aggregation von APP in supramolekulare Cluster zwingend durch die N-terminale A $\beta$ -Region reguliert wird.

Die Aggregation von APP reduziert seine Membrandynamik schließlich soweit, dass Clathrin entweder am zytosolischen Part der Cluster assemblieren kann, oder dass die Cluster stabil in Clathrinmembrandomänen sortiert werden können. Die Rolle der APP-Clusterdynamik in diesem Prozess dokumentiert das Konstrukt  $\Delta 22-596$ . Dieses kommt hauptsächlich in Proteinclustern in der Plasmamembran von PC12-Zellen vor (siehe Abschnitt 6.4.3), zeigt aber schon eine deutlich erhöhte Mobilität (siehe Abb. 26). Dass die Kolkalisationsanalyse von  $\Delta 22-596$  mit Clathrin eine geringere Überlagerung beider Membrandomänen zeigt (siehe Abb. 34), demonstriert daher die negative Korrelation von der APP-Membrandiffusibilität mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit in Clathrinmembranstrukturen. Stabile APP-Cluster erhöhen dagegen die Wahrscheinlichkeit mit Clathrin zu interagieren, und damit auch internalisiert zu werden. Diese Annahme wird, wie oben beschrieben, zusätzlich auch durch die Arbeiten von Eehalt et al. (2003) und Schneider et al. (2008) gestützt. Diese haben gezeigt, dass artifizielles Clustern durch Antikörper induzierte Aggregation zu einer verstärkten Internalisierung von plasmalemmalen APP führt.

Durch die Endozytose der APP-Cluster in das frühe Endosomenkompartiment wird APP dem amyloidogenen Prozessierungsweg zugeführt, in welchem das möglicherweise neurotoxische A $\beta$ -Peptid produziert wird (siehe Abschnitt 2.7). In dieser Arbeit konnte daher gezeigt werden, dass die A $\beta$ -Region im intakten APP-Molekül schlussendlich die Bildung des A $\beta$ -Peptides reguliert. Dies könnte ein interessanter therapeutischer Ansatz für die Heilung bzw. Prävention der Alzheimerschen Erkrankung sein (siehe Abschnitt 7.7).

Ob die APP-Cluster mit  $\alpha$ -Sekretasen interagieren können, oder ob sich Clusterbildung und nicht-amyloidogene Prozessierung ausschließen, kann hier leider nicht beantwortet werden. Auch ist nicht klar, ob neben Clathrin noch weitere Proteine mit den APP-Clustern assoziiert sind, gleichwohl eine Interaktion mit Flotillin-2 wahrscheinlich ist (Schneider et al. 2008).

## 7.6 APP-Membranproteincluster und ihre physiologische Bedeutung

In der Theorie können supramolekulare Proteinmembrancluster verschiedene Funktionen erfüllen (Lang und Rizzoli 2010). So kann ein Proteincluster eine Plattform für funktionell zusammengehörige Proteine bieten und dadurch erst eine Funktionalität ermöglichen, indem er sonst voneinander getrennte Bestandteile eines physiologisch aktiven Komplexes räumlich eng zusammenbringt. Ist dieser Proteincluster stabil genug, kann dieser Komplex auch vor einem Verlust einzelner Komponenten und somit vor dem Verlust seiner Funktionalität schützen, was z.B. bei Endo- und Exozytosevorgängen von Vorteil sein kann. Schließlich kann ein Proteincluster, der sich in der Zellmembran in einem dynamischen Gleichgewicht mit seinen monomeren Bestandteilen befindet, auch als ein Reservelager dienen. Durch seine hohe Packungsdichte und der daraus resultierenden sterischen Hinderung für z.B. Proteasen, kann ein solcher Komplex seine Komponenten vor proteolytischer Spaltung schützen und sein Umfeld mit intakten Monomeren versorgen.

Diese Schutzfunktion kann auch im Falle von APP von Interesse sein, da APP als Monomer bzw. Dimer als Plasmamembranrezeptor dient (siehe Abschnitt 2.5), gleichzeitig aber Gefahr läuft, von  $\alpha$ -Sekretasen in der Zellmembran prozessiert und dadurch inaktiviert zu werden. Da der Verlust der APP-Funktion aber potentiell nachteilig für die Zelle ist, könnte ein supramolekularer Cluster das APP vor der proteolytischen Spaltung schützen und über eine fortlaufende Abgabe für eine konstante Konzentration des unprozessierten Moleküls in der Plasmamembran sorgen. Gleichzeitig könnte ein solcher Cluster durch Aufnahme von freien Monomeren auch eine zu hohe Konzentration an freiem APP in der Zellmembran verhindern.

Neben dieser möglichen Pufferfunktion kann der supramolekulare APP-Komplex auch eine funktionelle Plattform bilden. Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 2.5), kann APP im Zusammenspiel mit diversen zytosolischen Proteinen G-Protein assoziierte Signalwege auslösen und der APP-Cluster könnte dabei der Ort der heterophilen Interaktion sein. Gut belegt ist ein heterophiler Charakter der APP-Cluster durch die Wechselwirkung mit Flotillin-2 (Schneider et al. 2008) und Clathrin (siehe Abschnitt 6.6), die funktionell bei der Endozytose von APP bedeutsam ist.

## 7.7 Therapeutische Bedeutung des APP-Clusterbildungsmechanismus

Trotz intensiver Forschung ist die Suche nach einer Therapie zur Heilung bzw. Prävention der Alzheimerschen Demenz bisher erfolglos geblieben. Deshalb ist es bis heute nur möglich Alzheimerpatienten symptomatisch zu behandeln, z.B. mit Cholinesteraseinhibitoren oder NMDAR-Antagonisten, die in der Lage sind, die kognitive Leistungsfähigkeit der Patienten zu verbessern (Ballard et al. 2011). Dennoch sind aufgrund starker Bemühungen der letzten 30 Jahre Schlüsselfaktoren und –mechanismen aufgeklärt worden, welche bei der Entstehung und Entwicklung dieser Demenz entscheidend beteiligt sein könnten. Dabei spielt das A $\beta$ -Peptid und seine Entstehung eine zentrale Rolle. Aufgrund dieser Erkenntnisse sind verschiedene Therapieansätze entwickelt worden. Dazu zählen z.B. die aktive und passive Immunisierung gegen das A $\beta$ -Peptid und die Modulation, Stimulation oder Inhibition der an seiner Entstehung beteiligten Sekretasen (z.B. Ballard et al. 2011). Bisher zeigten aber alle diese Ansätze entweder schwere Nebenwirkung oder keine messbaren positiven Effekte auf Alzheimerpatienten. So mussten klinische Studien zur aktiven Immunisierung aufgrund akut entzündlicher Reaktionen abgebrochen werden (Nicoll et al. 2003). Tests mit  $\gamma$ -Sekretasemodulatoren, wie z.B. Flurbiprofen oder seinem Enantiomer Tarenflurbil, zeigten dahingegen keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Alzheimerschen Demenz (Green et al. 2009).

Da das A $\beta$ -Peptid als zentraler Baustein der Alzheimergenese gilt, wurde bisher ein besonderes Augenmerk auf die Inhibition seiner Sekretasen gelegt. Weil diese aber ein breites physiologisches Wirkspektrum aufweisen, besteht auch immer die Gefahr, dass unerwünschte Nebenwirkungen beim Ausschalten ihrer Funktionalität auftreten. *Knock-Out*-Experimente mit der  $\beta$ -Sekretase in der Maus zeigen, im Gegensatz zum *Knock-Out* des  $\gamma$ -Sekretasekomplexes, nur einen milden Phänotyp (siehe Abschnitt 2.7.2). Deshalb gilt besonders die  $\beta$ -Sekretase als lohnendes Ziel. Dies muss aber nicht heißen, dass die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase im Menschen ebenfalls komplikationsarm realisierbar ist. Eine zusätzliche Erschwernis bei der Entwicklung geeigneter Inhibitoren ist, dass diese intrazellulär agieren können müssen, um die Funktionalität der  $\beta$ -Sekretase wirkungsvoll zu vermindern.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Clustermechanismus bietet hier nun einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt. Da die entscheidende Region bei der Aggregation von APP innerhalb der ersten fünf Aminosäuren der N-terminalen



A $\beta$ -Sequenz liegt und damit extrazellulär lokalisiert ist, könnte man genau hier eingreifen. So ist es denkbar, dass ein Molekül, welches mit dieser Region interferiert, die Clusterstabilität entscheidend schwächt. Dies sollte zu einer verminderten Endozytoserate führen, welche einerseits die Produktion des A $\beta$ -Peptids reduzieren kann und andererseits, durch eine erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit von APP in der Plasmamembran, die neuroprotektive, nicht-amyloidogene Prozessierung bevorzugen sollte. Dass die Modulation der Clusterstabilität die Lokalisierung von APP in Clathrinmembrandomänen vermindert, dessen Endozytoserate verändern kann und dass eben diese Verminderung der APP-Endozytose zu einer geringeren A $\beta$ -Produktion führt, konnte in dieser Arbeit und durch Arbeiten anderer bereits demonstriert werden (Eehalt et al. 2003; Schneider et al. 2008).

Der oben beschriebene Zusammenhang kann auch die derzeit positiven Ergebnisse aus klinischen Studien zur passiven Immunisierung gegen das A $\beta$ -Peptid mit Antikörpern, welche oftmals gegen den N-Terminus des Peptides gerichtet sind (Lee et al. 2005), in einem anderen Licht erscheinen lassen. So könnte deren Wirkweise nicht nur in der Störung der A $\beta$ -Aggregation zu neurotoxischen Oligomeren oder Plaques begründet liegen, sondern auch in der Störung der Clusterbildung von APP in der Zellmembran von Neuronen.

In dieses Bild passt auch, dass manche extrazellulär ansetzenden Antiphlogistika in der Lage sind, die Dimerisierung von APP zu stören und als Folge die Produktion von A $\beta_{42}$ -Peptiden reduziert ist (Richter et al. 2010). Auch hier könnte eine Destabilisierung der APP-Cluster durch Störung des initialen Dimerisierungsschrittes eine Rolle spielen.

Ein Vorteil, das APP-Molekül selber als Ziel für eine Strategie gegen die Bildung von A $\beta$ -Peptiden zu benutzen, sind die zu erwartenden geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zur Inhibition der Sekretasen sowie die einfache extrazelluläre Zugänglichkeit. Eine mögliche Substanzklasse, die hier ansetzt und, durch Interaktion mit der N-terminalen A $\beta$ -Region, die Clustergenerierung von APP unterbinden könnte, sind z.B. Antikörper. So könnte man Fab-Fragmente oder *Nanobodies* benutzen, um einerseits eine artifizielle Aggregation durch „*Patching*“-Effekte der Antikörper zu vermeiden und andererseits mit diesen die Interaktionsstellen der A $\beta$ -Region maskieren, um so eine APP-Clusterbildung zu unterbinden.

## 7.8 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass APP nicht nur in N2a-Zellen (Schneider et al. 2008), sondern auch in PC12- und HepG2-Zellen plasmalemmale Proteincluster bildet. Dabei konnte ein rein durch Lipid-Lipid-Interaktionen gesteuerter Clusterbildungsmechanismus, wie er z.B. ursprünglich für *Membrane-Rafts* angenommen wurde, ausgeschlossen werden. Auch eine Beteiligung der Glykokalyx an der Clustermorphologie wurde widerlegt. Vielmehr wurde die APP-Aminosäuresequenz, genauer die ersten fünf Aminosäuren der N-terminalen A $\beta$ -Region, als fundamentales Element der APP-Aggregation identifiziert. Somit konnte in dieser Arbeit ein neues regulatorisches Motiv zur Oligomerisierung von APP vorgestellt werden, welches eine notwendige Bedingung innerhalb der APP-Sequenz für die Assemblierung der Plasmamembranproteincluster darstellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aggregation plasmalemalen APPs eine Voraussetzung für dessen Lokalisation in Clathrinmembrandomänen und schlussendlich auch für dessen Endozytose ist. Damit konnte zum ersten Mal seit der Erwähnung einer Rolle beim axonalen Transport (Tienari et al. 1996), eine physiologische Funktion der A $\beta$ -Region in intaktem APP beschrieben werden. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die A $\beta$ -Region im APP die eigene Prozessierung zum A $\beta$ -Peptid reguliert, oder zumindest ein wichtiger Teil innerhalb dieser Regulation ist. Diese Erkenntnis ermöglicht auch einen neuen Ansatz in der Prävention oder der Therapie der Alzheimerschen Erkrankung.

## 7.9 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine essentielle Aminosäuresequenz für die APP-Membranproteinclusterbildung innerhalb der A $\beta$ -Region identifiziert werden. Es ist aber nicht bekannt, aus wie vielen APP-Molekülen sich diese Cluster zusammensetzen. Um diese Frage zu adressieren, könnte man APP z.B. mit einem photoaktivierbaren fluoreszierenden Protein fusionieren und die quantitative *Photoactivated Localization Microscopy* (PALM) verwenden. Mit PALM lässt sich die Position und Anzahl einzelner fluoreszierender Moleküle im Cluster bestimmen. Aufgrund des endogenen APPs kann bei diesem Ansatz die Molekülanzahl pro Cluster unterschätzt werden und es sollte zusätzlich noch ein biochemischer Ansatz gewählt werden. Dazu kann eine quantitative Western Blot Analyse von biotinyliertem, plasmalemalen APP durchgeführt werden. Mit der dadurch erzielten Mengenkenntnis von Oberflächen-APP pro Zelle und der

Kenntnis der Clusterdichte von APP in der Zellmembran, z.B. durch Zählung in gegen APP immungefärbten *Membrane Sheets*, kann die mittlere Anzahl von APP pro Cluster bestimmt werden. Zusammen mit dem Ergebnis der PALM-Analyse sollte sich dann ein verlässliches Bild von der mittleren Anzahl der APP-Moleküle pro Cluster ergeben.

Um einen tieferen Einblick in die molekulare Zusammensetzung der APP-Cluster zu gewinnen, könnte man APP-Cluster, z.B. der Myc-APP-Variante, mittels einer Immunpräzipitation (IP) gegen das Myc-Tag solubilisieren. So isolierte APP-Cluster können dann mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Auf diese Weise neu identifizierte Bindungspartner können dann, z.B. durch Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 6.6), auf eine mögliche Kolokalisation mit APP-Clustern untersucht werden.

Für ein tiefergehendes Verständnis des Aggregationsmechanismus von APP sollte noch die genaue Natur der Interaktion geklärt werden. Um den Einfluss von Membranlipiden auf APP-Cluster zu untersuchen, kann z.B. der plasmalemmale Cholesterolspiegel mittels Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin oder dem Protein StarD1 erhöht oder verringert werden. Effekte auf die Clusterstabilität könnten dann in lebenden Zellen, welche eine GFP gekoppelte APP-Wildtypmutante exprimieren, unkompliziert durch die in dieser Arbeit verwendete FRAP-Mikroskopie untersucht werden. Diese Methode eignet sich auch gut, um den Einfluss veränderter extrazellulärer Ionen-Konzentrationen auf die Clusterdynamik zu analysieren.

Daneben sollte geklärt werden, ob es möglich ist, die Clusterstabilität durch Moleküle, welche mit der extrazellulären A $\beta$ -Region interagieren, z.B. Antikörper, zu stören. Ob daraus eine verringerte A $\beta$ -Produktion resultiert, kann man dann durch eine IP gegen das A $\beta$ -Peptid im Zellmedium mit anschließender quantitativer Western Blot Analyse ermitteln.

Insgesamt eröffnen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit einige spannende Fragestellungen. Dabei könnte besonders die experimentelle Verifizierung des therapeutischen Ansatzes zur Störung der APP-Clusterbildung von großer Bedeutung sein.

## 8 Literaturverzeichnis

2012 Alzheimer's disease facts and figures (2012). *Alzheimers Dement* 8 (2), S. 131–168.

Alberts, B. (2011): Molekularbiologie der Zelle. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.

Alzheimer, A.: A Characteristic disease of the cerebral cortex. Meeting of South-West Germany Psychiatrists held in Tübingen on November 3rd and 4th, 1906.

American Psychiatric Association (1994): Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-IV. 4. ed., 1. print. Washington, DC.

Atamna, H. (2009): Amino acids variations in amyloid-beta peptides, mitochondrial dysfunction, and new therapies for Alzheimer's disease. *J Bioenerg Biomembr* 41 (5), S. 457–464.

Axelrod, D.; Koppel, D. E.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W. W. (1976): Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16 (9), S. 1055–1069.

Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D.; Jones, E. (2011): Alzheimer's disease. *Lancet* 377 (9770), S. 1019–1031.

Bamberger, M. E.; Harris, M. E.; McDonald, D. R.; Husemann, J.; Landreth, G. E. (2003): A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J. Neurosci* 23 (7), S. 2665–2674.

Bandyopadhyay, S.; Goldstein, L. E.; Lahiri, D. K.; Rogers, J. T. (2007): Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 14 (27), S. 2848–2864.

Barrett, P. J.; Song, Y.; van Horn, W. D.; Hustedt, E. J.; Schafer, J. M.; Hadziselimovic, A. et al. (2012): The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* 336 (6085), S. 1168–1171.

Baruch-Suchodolsky, R.; Fischer, B. (2009): Aβ<sub>40</sub>, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry* 48 (20), S. 4354–4370. Online verfügbar unter doi:10.1021/bi802361k.

Bateman, R. J.; Munsell, L. Y.; Morris, J. C.; Swarm, R.; Yarasheski, K. E.; Holtzman, D. M. (2006): Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* 12 (7), S. 856–861.

Beel, A. J.; Sakakura, M.; Barrett, P. J.; Sanders, C. R. (2010): Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochim Biophys Acta* 1801 (8), S. 975–982.

Behr, D.; Hesse, L.; Masters, C. L.; Multhaup, G. (1996): Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J. Biol. Chem.* 271 (3), S. 1613–1620.

Bell, R. D.; Deane, R.; Chow, N.; Long, X.; Sagare, A.; Singh, I. et al. (2009): SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol* 11 (2), S. 143–153.

- Benilova, I.; Karran, E.; Strooper, B. de (2012): The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15 (3), S. 349–357.
- Bennett, M. K.; Garcia-Ararras, J. E.; Elferink, L. A.; Peterson, K.; Fleming, A. M.; Hazuka, C. D.; Scheller, R. H. (1993): The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74 (5), S. 863–873.
- Bennhold, H. (1922): Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot. *Munch. Med. Wochenschr.* 1922 (69), S. 1537–1538.
- Bertrand, E.; Brouillet, E.; Caillé, I.; Bouillot, C.; Cole, G. M.; Prochiantz, A.; Allinquant, B. (2001): A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci* 18 (5), S. 503–511.
- Bonifacino, J. S. (2004): The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (1), S. 23–32.
- Brunkan, A. L.; Martinez, M.; Walker, E. S.; Goate, A. M. (2005): Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol. Cell. Neurosci* 29 (1), S. 65–73.
- Caporaso, G. L.; Gandy, S. E.; Buxbaum, J. D.; Ramabhadran, T. V.; Greengard, P. (1992): Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89 (7), S. 3055–3059.
- Chamberlain, L. H.; Gould, G. W. (2002): The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J Biol Chem* 277 (51), S. 49750–49754.
- Chan, D.; Janssen, J.; Whitwell, J.; Watt, H.; Jenkins, R.; Frost, C. et al. (2003): Change in rates of cerebral atrophy over time in early-onset Alzheimer's disease: longitudinal MRI study. *Lancet* 362 (9390), S. 1121–1122.
- Cheng, I.; Scearce-Levie, K.; Legleiter, J.; Palop, J.; Gerstein, H.; Bien-Ly, N. et al. (2007): Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 282 (33), S. 23818–23828.
- Chyung, J. H.; Raper, D. M.; Selkoe, D. J. (2005): Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280 (6), S. 4383–4392.
- Cossec, J. C.; Simon, A.; Marquer, C.; Moldrich, R. X.; Leterrier, C.; Rossier, J. et al. (2010): Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (8), S. 846–852.
- Crews, L.; Masliah, E. (2010): Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet* 19 (R1), S. R12–20.
- Daigle, I.; Li, C. (1993): apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (24), S. 12045–12049.
- Danielli, J. F.; Davson, H. (1935): A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol* 5 (4), S. 495–508.
- DeKosky, S. T.; Scheff, S. W.; Styren, S. D. (1996): Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5 (4), S. 417–421.

- Delacourte, A.; Defossez, A. (1986): Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 76 (2-3), S. 173–186.
- Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. (1997): On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388 (6640), S. 355–358.
- Dominguez, D.; Tournoy, J.; Hartmann, D.; Huth, T.; Cryns, K.; Deforce, S. et al. (2005): Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem* 280 (35), S. 30797–30806.
- Dotti, C. G.; Strooper, B. de (2009): Alzheimer's dementia by circulation disorders: when trees hide the forest. *Nat Cell Biol* 11 (2), S. 114–116.
- Dyrks, T.; Weidemann, A.; Multhaup, G.; Salbaum, J. M.; Lemaire, H. G.; Kang, J. et al. (1988): Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7 (4), S. 949–957.
- Edbauer, D.; Winkler, E.; Regula, J. T.; Pesold, B.; Steiner, H.; Haass, C. (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5 (5), S. 486–488.
- Eddin, M. (2001): Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts. *Sci STKE* 2001 (67), S. pe1.
- Eehalt, R.; Keller, P.; Haass, C.; Thiele, C.; Simons, K. (2003): Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160 (1), S. 113–123.
- Engelman, D. M. (2005): Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438 (7068), S. 578–580.
- Farris, W.; Mansourian, S.; Chang, Y.; Lindsley, L.; Eckman, E. A.; Frosch, M. P. et al. (2003): Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (7), S. 4162–4167.
- Farzan, M.; Schnitzler, C. E.; Vasilieva, N.; Leung, D.; Choe, H. (2000): BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (17), S. 9712–9717.
- Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M. et al. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366 (9503), S. 2112–2117.
- Ficz, G. (2005): Protein dynamics in the nucleus: Implications for gene expression. Dissertation. Georg August Universität, Göttingen. Online verfügbar unter <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2005/ficz/ficz.pdf>.
- Ficz, G.; Heintzmann, R.; Arndt-Jovin, D. J. (2005): Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living Drosophila. *Development* 132 (17), S. 3963–3976. Online verfügbar unter doi:10.1242/dev.01950.
- Fluhrer, R.; Capell, A.; Westmeyer, G.; Willem, M.; Hartung, B.; Condrón, M. M. et al. (2002): A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J Neurochem* 81 (5), S. 1011–1020.
- Foster, L. J.; Hoog, C. L. de; Mann, M. (2003): Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (10), S. 5813–5818.

- Fraering, P. C.; Ye, W.; Strub, J.-M.; Dolios, G.; LaVoie, M. J.; Ostaszewski, B. L. et al. (2004): Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* 43 (30), S. 9774–9789.
- Fratiglioni, L.; Ahlbom, A.; Viitanen, M.; Winblad, B. (1993): Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Ann Neurol* 33 (3), S. 258–266.
- Frykman, S.; Hur, J.-Y.; Franberg, J.; Aoki, M.; Winblad, B.; Nahalkova, J. et al. (2010): Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain. *PLoS One* 5 (1), S. e8948.
- Fujiwara, T.; Ritchie, K.; Murakoshi, H.; Jacobson, K.; Kusumi, A. (2002): Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* 157 (6), S. 1071–1081.
- Galvan, V.; Gorostiza, O. F.; Banwait, S.; Ataie, M.; Logvinova, A. V.; Sitaraman, S. et al. (2006): Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (18), S. 7130–7135.
- Ghosal, K.; Vogt, D. L.; Liang, M.; Shen, Y.; Lamb, B. T.; Pimplikar, S. W. (2009): Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106 (43), S. 18367–18372.
- Glabe, C. G. (2008): Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem* 283 (44), S. 29639–29643.
- Glenner, G. G.; Wong, C. W. (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 120 (3), S. 885–890.
- Goedert, M.; Wischik, C. M.; Crowther, R. A.; Walker, J. E.; Klug, A. (1988): Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (11), S. 4051–4055.
- Goldgaber, D.; Lerman, M. I.; McBride, O. W.; Saffiotti, U.; Gajdusek, D. C. (1987): Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235 (4791), S. 877–880.
- Gorter, E.; Grendel, F. (1925): On biomolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med* 41 (4), S. 439–443.
- Gotz, J.; Chen, F.; van Dorpe, J.; Nitsch, R. M. (2001): Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293 (5534), S. 1491–1495.
- Gowing, E.; Roher, A. E.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Chaney, M.; Little, S. P.; Ball, M. J. (1994): Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem* 269 (15), S. 10987–10990.
- Gralle, M.; Ferreira, S. T. (2007): Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* 82 (1), S. 11–32.
- Gralle, M.; Botelho, M. M.; Oliveira, C. L. P. de; Torriani, I.; Ferreira, S. T. (2002): Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *Biophys J* 83 (6), S. 3513–3524.

- Gralle, M.; Botelho, M.; Wouters, F. (2009): Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem* 284 (22), S. 15016–15025.
- Green, R. C.; Cupples, L. A.; Go, R.; Benke, K. S.; Edeki, T.; Griffith, P. A. et al. (2002): Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 287 (3), S. 329–336.
- Green, R. C.; Schneider, L. S.; Amato, D. A.; Beelen, A. P.; Wilcock, G.; Swabb, E. A.; Zavitz, K. H. (2009): Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 302 (23), S. 2557–2564.
- Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (13), S. 4913–4917.
- Haass, C.; Selkoe, D. J. (1993): Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75 (6), S. 1039–1042.
- Haass, C.; Kaether, C.; Thinakaran, G.; Sisodia, S. (2012): Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (5), S. a006270.
- Harrison, S. M.; Harper, A. J.; Hawkins, J.; Duddy, G.; Grau, E.; Pugh, P. L. et al. (2003): BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol Cell Neurosci* 24 (3), S. 646–655.
- He, X.; Cooley, K.; Chung, C. H.; Dashti, N.; Tang, J. (2007): Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production. *J Neurosci* 27 (15), S. 4052–4060. Online verfügbar unter doi:10.1523/JNEUROSCI.3993-06.2007.
- Heerklotz, H. (2002): Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* 83 (5), S. 2693–2701.
- Hell, S. W. (2003): Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21 (11), S. 1347–1355.
- Hesse, L.; Beher, D.; Masters, C. L.; Multhaup, G. (1994): The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett* 349 (1), S. 109–116.
- Heumann, R.; Kachel, V.; Thoenen, H. (1983): Relationship between NGF-mediated volume increase and "priming effect" in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells. Role of cAMP. *Exp. Cell Res* 145 (1), S. 179–190.
- Ho, A.; Südhof, T. C. (2004): Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101 (8), S. 2548–2553.
- Hooke, R. (1665): Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon / by R. Hooke.: London :: Printed by Jo. Martyn and Ja. Allestry ... and are to be sold at their shop ...; Ann Arbor, Michigan: University of Michigan, Digital Library Production Service.



- Hsieh, H.; Boehm, J.; Sato, C.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sisodia, S.; Malinow, R. (2006): AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52 (5), S. 831–843.
- Hussain, I.; Powell, D.; Howlett, D. R.; Tew, D. G.; Meek, T. D.; Chapman, C. et al. (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14 (6), S. 419–427.
- Igbavboa, U.; Sun, G. Y.; Weisman, G. A.; He, Y.; Wood, W. G. (2009): Amyloid beta-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. *Neuroscience* 162 (2), S. 328–338. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.049.
- Iino, R.; Koyama, I.; Kusumi, A. (2001): Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys J* 80 (6), S. 2667–2677.
- Ikeda, K.; Yamaguchi, T.; Fukunaga, S.; Hoshino, M.; Matsuzaki, K. (2011): Mechanism of amyloid beta-protein aggregation mediated by GM1 ganglioside clusters. *Biochemistry* 50 (29), S. 6433–6440.
- Irvine, G. B.; El-Agnaf, O. M.; Shankar, G. M.; Walsh, D. M. (2008): Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Med* 14 (7-8), S. 451–464.
- Iwata, N.; Tsubuki, S.; Takaki, Y.; Shirotani, K.; Lu, B.; Gerard, N. P. et al. (2001): Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292 (5521), S. 1550–1552.
- Jacobsen, J. S.; Comery, T. A.; Martone, R. L.; Elokda, H.; Crandall, D. L.; Oganessian, A. et al. (2008): Enhanced clearance of Abeta in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (25), S. 8754–8759.
- Jacobson, K.; Mouritsen, O. G.; Anderson, R. G. W. (2007): Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9 (1), S. 7–14.
- Jacobson, K.; Sheets, E. D.; Simson, R. (1995): Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268 (5216), S. 1441–1442.
- Kaden, D.; Munter, L. M.; Reif, B.; Multhaup, G. (2012): The amyloid precursor protein and its homologues: Structural and functional aspects of native and pathogenic oligomerization. *Structure and Function of Membrane Receptors. European Journal of Cell Biology* 91 (4), S. 234–239. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933511000380>.
- Kaden, D.; Munter, L.-M.; Joshi, M.; Treiber, C.; Weise, C.; Bethge, T. et al. (2008): Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J Biol Chem* 283 (11), S. 7271–7279.
- Kai, M.; Sakane, F.; Jia, Y.-J.; Imai, S.-I.; Yasuda, S.; Kanoh, H. (2006): Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts. *J Biochem* 140 (5), S. 677–686.
- Kamal, A.; Almenar-Queralt, A.; LeBlanc, J. F.; Roberts, E. A.; Goldstein, L. S. (2001): Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414 (6864), S. 643–648.

- Kamal, A.; Stokin, G. B.; Yang, Z.; Xia, C. H.; Goldstein, L. S. (2000): Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28 (2), S. 449–459.
- Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H. et al. (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 (6106), S. 733–736.
- Kayed, R. (2010): Anti-tau oligomers passive vaccination for the treatment of Alzheimer disease. *Hum Vaccin* 6 (11), S. 931–935.
- Kenworthy, A. K.; Nichols, B. J.; Remmert, C. L.; Hendrix, G. M.; Kumar, M.; Zimmerberg, J.; Lippincott-Schwartz, J. (2004): Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol* 165 (5), S. 735–746. Online verfügbar unter doi:10.1083/jcb.200312170.
- Kimberly, W. T.; LaVoie, M. J.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. (2003): Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (11), S. 6382–6387.
- Kimberly, W. T.; Xia, W.; Rahmati, T.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. (2000): The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275 (5), S. 3173–3178.
- King, G.; Scott, T. (2004): Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk? *Exp Neurol* 185 (2), S. 208–219.
- Kinoshita, A.; Fukumoto, H.; Shah, T.; Whelan, C. M.; Irizarry, M. C.; Hyman, B. T. (2003): Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci* 116 (Pt 16), S. 3339–3346. Online verfügbar unter doi:10.1242/jcs.00643.
- Kuchibhotla, K. V.; Goldman, S. T.; Lattarulo, C. R.; Wu, H.-Y.; Hyman, B. T.; Bacskai, B. J. (2008): Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59 (2), S. 214–225.
- Kuhn, P.-H.; Wang, H.; Dislich, B.; Colombo, A.; Zeitschel, U.; Ellwart, J. W. et al. (2010): ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29 (17), S. 3020–3032.
- Kukar, T.; Golde, T. E. (2008): Possible mechanisms of action of NSAIDs and related compounds that modulate gamma-secretase cleavage. *Curr Top Med Chem* 8 (1), S. 47–53.
- Kusumi, A.; Nakada, C.; Ritchie, K.; Murase, K.; Suzuki, K.; Murakoshi, H. et al. (2005): Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, S. 351–378. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144637.
- Kusumi, A.; Sako, Y.; Yamamoto, M. (1993): Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65 (5), S. 2021–2040.

- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10 (3-4), S. 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S. (2007): Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8 (7), S. 499–509.
- Lajoie, P.; Partridge, E. A.; Guay, G.; Goetz, J. G.; Pawling, J.; Lagana, A. et al. (2007): Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J Cell Biol* 179 (2), S. 341–356.
- Lang, T. (2003): Imaging SNAREs at work in 'unroofed' cells—approaches that may be of general interest for functional studies on membrane proteins. *Biochem. Soc. Trans* 31 (Pt 4), S. 861–864.
- Lang, T.; Rizzoli, S. O. (2010): Membrane protein clusters at nanoscale resolution: more than pretty pictures. *Physiology (Bethesda)* 25 (2), S. 116–124.
- Lang, T.; Bruns, D.; Wenzel, D.; Riedel, D.; Holroyd, P.; Thiele, C.; Jahn, R. (2001): SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J* 20 (9), S. 2202–2213.
- Lang, T.; Margittai, M.; Holzler, H.; Jahn, R. (2002): SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J Cell Biol* 158 (4), S. 751–760. Online verfügbar unter doi:10.1083/jcb.200203088.
- Lautenschlager, N. T.; Cupples, L. A.; Rao, V. S.; Auerbach, S. A.; Becker, R.; Burke, J. et al. (1996): Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 46 (3), S. 641–650.
- Lazarov, O.; Morfini, G. A.; Lee, E. B.; Farah, M. H.; Szodorai, A.; DeBoer, S. R. et al. (2005): Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited. *J. Neurosci* 25 (9), S. 2386–2395.
- Lee, G.; Rook, S. L. (1992): Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J Cell Sci* 102 (Pt 2), S. 227–237.
- Lee, M.; Bard, F.; Johnson-Wood, K.; Lee, C.; Hu, K.; Griffith, S. G. et al. (2005): Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Ann Neurol* 58 (3), S. 430–435.
- LeVine, H. 3. (1993): Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2 (3), S. 404–410. Online verfügbar unter [http://www.biospektrum.de/blatt/d\\_bs\\_pdf&\\_id=932088](http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=932088).
- Lin, X.; Koelsch, G.; Wu, S.; Downs, D.; Dashti, A.; Tang, J. (2000): Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (4), S. 1456–1460.
- Lorenzo, A.; Yuan, M.; Zhang, Z.; Paganetti, P. A.; Sturchler-Pierrat, C.; Staufenbiel, M. et al. (2000): Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci* 3 (5), S. 460–464.
- Lourenço, F. C.; Galvan, V.; Fombonne, J.; Corset, V.; Llambi, F.; Müller, U. et al. (2009): Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ* 16 (5), S. 655–663.

- Low, S. H.; Vasanji, A.; Nanduri, J.; He, M.; Sharma, N.; Koo, M. et al. (2006): Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. *Mol Biol Cell* 17 (2), S. 977–989.
- Lue, L. F.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L. et al. (1999): Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155 (3), S. 853–862.
- Luo, L. Q.; Martin-Morris, L. E.; White, K. (1990): Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10 (12), S. 3849–3861.
- Luo, Y.; Bolon, B.; Kahn, S.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Denis, P. et al. (2001): Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4 (3), S. 231–232.
- Lye, T. C.; Shores, E. A. (2000): Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychol Rev* 10 (2), S. 115–129.
- Mackic, J. B.; Stins, M.; McComb, J. G.; Calero, M.; Ghiso, J.; Kim, K. S. et al. (1998): Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest* 102 (4), S. 734–743.
- Maierhofer, C.; Rohmer, K.; Wittmann, V. (2007): Probing multivalent carbohydrate-lectin interactions by an enzyme-linked lectin assay employing covalently immobilized carbohydrates. *Bioorg Med Chem* 15 (24), S. 7661–7676.
- Mairhofer, M.; Steiner, M.; Mosgoeller, W.; Prohaska, R.; Salzer, U. (2002): Stomatin is a major lipid-raft component of platelet alpha granules. *Blood* 100 (3), S. 897–904.
- Manders, E. M.; Stap, J.; Brakenhoff, G. J.; van Driel, R.; Aten, J. A. (1992): Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell. Sci* 103 (Pt 3), S. 857–862.
- Matsuda, S.; Matsuda, Y.; D'Adamio, L. (2003): Amyloid beta protein precursor (AbetaPP), but not AbetaPP-like protein 2, is bridged to the kinesin light chain by the scaffold protein JNK-interacting protein 1. *J. Biol. Chem* 278 (40), S. 38601–38606.
- Mattson, M. P. (1997): Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77 (4), S. 1081–1132.
- Maynard, C. J.; Bush, A. I.; Masters, C. L.; Cappai, R.; Li, Q.-X. (2005): Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* 86 (3), S. 147–159.
- Mayor, S.; Maxfield, F. R. (1995): Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol Biol Cell* 6 (7), S. 929–944.
- McCarthy, J. V.; Twomey, C.; Wujek, P. (2009): Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cell Mol Life Sci* 66 (9), S. 1534–1555.
- McConlogue, L.; Buttini, M.; Anderson, J. P.; Brigham, E. F.; Chen, K. S.; Freedman, S. B. et al. (2007): Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem* 282 (36), S. 26326–26334.

- McKee, A. C.; Carreras, I.; Hossain, L.; Ryu, H.; Klein, W. L.; Oddo, S. et al. (2008): Ibuprofen reduces Abeta, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res* 1207, S. 225–236.
- McLean, C. A.; Cherny, R. A.; Fraser, F. W.; Fuller, S. J.; Smith, M. J.; Beyreuther, K. et al. (1999): Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46 (6), S. 860–866.
- Medeiros, R.; Baglietto-Vargas, D.; LaFerla, F. M. (2011): The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neurosci Ther* 17 (5), S. 514–524.
- Muller, U.; Zheng, H. (2012): Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (2), S. a006288.
- Munter, L. M.; Voigt, P.; Harmeier, A.; Kaden, D.; Gottschalk, K. E.; Weise, C. et al. (2007): GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* 26 (6), S. 1702–1712. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.emboj.7601616.
- Murray, D. H.; Tamm, L. K. (2009): Clustering of syntaxin-1A in model membranes is modulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and cholesterol. *Biochemistry* 48 (21), S. 4617–4625.
- Musa, A.; Lehrach, H.; Russo, V. A. (2001): Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Dev. Genes Evol* 211 (11), S. 563–567.
- Nakamura, K.; Watakabe, A.; Hioki, H.; Fujiyama, F.; Tanaka, Y.; Yamamori, T.; Kaneko, T. (2007): Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient. *Eur J Neurosci* 26 (11), S. 3054–3067. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05868.x.
- Naslund, J.; Haroutunian, V.; Mohs, R.; Davis, K. L.; Davies, P.; Greengard, P.; Buxbaum, J. D. (2000): Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283 (12), S. 1571–1577.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L. (2001): Lehninger Biochemie. Mit 40 Tabellen. 3. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer.
- Nicoll, J. A. R.; Wilkinson, D.; Holmes, C.; Steart, P.; Markham, H.; Weller, R. O. (2003): Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9 (4), S. 448–452.
- Ninomiya, H.; Roch, J. M.; Jin, L. W.; Saitoh, T. (1994): Secreted form of amyloid beta/A4 protein precursor (APP) binds to two distinct APP binding sites on rat B103 neuron-like cells through two different domains, but only one site is involved in neuritotropic activity. *J Neurochem* 63 (2), S. 495–500.
- Nordstedt, C.; Caporaso, G. L.; Thyberg, J.; Gandy, S. E.; Greengard, P. (1993): Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem* 268 (1), S. 608–612.
- O'Brien, R. J.; Wong, P. C. (2011): Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34, S. 185–204. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613.

- Obulesu, M.; Venu, R.; Somashekhar, R. (2011): Tau mediated neurodegeneration: an insight into Alzheimer's disease pathology. *Neurochem Res* 36 (8), S. 1329–1335.
- Oda, T.; Wals, P.; Osterburg, H. H.; Johnson, S. A.; Pasinetti, G. M.; Morgan, T. E. et al. (1995): Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136 (1), S. 22–31.
- Okado, H.; Okamoto, H. (1992): A *Xenopus* homologue of the human beta-amyloid precursor protein: developmental regulation of its gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 189 (3), S. 1561–1568.
- Overton, C. E. (1895): Ueber die osmotischen eigenschaften der lebenden pflanzen- und tierzelle. [Zurich: Fäsi & Beer.
- Owen, D. M.; Williamson, D.; Magenau, A.; Gaus, K. (2012): Optical techniques for imaging membrane domains in live cells (live-cell palm of protein clustering). *Methods Enzymol* 504, S. 221–235.
- Pahlsson, P.; Shakin-Eshleman, S. H.; Spitalnik, S. L. (1992): N-linked glycosylation of beta-amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 189 (3), S. 1667–1673.
- Pardossi-Piquard, R.; Checler, F. (2012): The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1, S. 109–124.
- Park, S. A.; Shaked, G. M.; Bredesen, D. E.; Koo, E. H. (2009): Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 388 (2), S. 450–455.
- Perdivara, I.; Petrovich, R.; Allinquant, B.; Deterding, L. J.; Tomer, K. B.; Przybylski, M. (2009): Elucidation of O-glycosylation structures of the beta-amyloid precursor protein by liquid chromatography-mass spectrometry using electron transfer dissociation and collision induced dissociation. *J Proteome Res* 8 (2), S. 631–642. Online verfügbar unter doi:10.1021/pr800758g.
- Pike, L. J. (2006): Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47 (7), S. 1597–1598.
- Prox, J.; Rittger, A.; Saftig, P. (2011): Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and Presenilin. *Exp Brain Res*. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00221-011-2952-0.
- Qi-Takahara, Y.; Morishima-Kawashima, M.; Tanimura, Y.; Dolios, G.; Hirofani, N.; Horikoshi, Y. et al. (2005): Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25 (2), S. 436–445.
- Rajendran, L.; Honsho, M.; Zahn, T. R.; Keller, P.; Geiger, K. D.; Verkade, P.; Simons, K. (2006): Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (30), S. 11172–11177. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0603838103.
- Rajendran, L.; Schneider, A.; Schlechtingen, G.; Weidlich, S.; Ries, J.; Braxmeier, T. et al. (2008): Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* 320 (5875), S. 520–523. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1156609.

- Reinhard, C.; Hebert, S. S.; De, S. B. (2005): The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 24 (23), S. 3996–4006. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.emboj.7600860.
- Renner, M.; Lacor, P. N.; Velasco, P. T.; Xu, J.; Contractor, A.; Klein, W. L.; Triller, A. (2010): Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66 (5), S. 739–754.
- Richter, L.; Munter, L. M.; Ness, J.; Hildebrand, P. W.; Dasari, M.; Unterreitmeier, S. et al. (2010): Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (33), S. 14597–14602.
- Ritchie, K.; Iino, R.; Fujiwara, T.; Murase, K.; Kusumi, A. (2003): The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review). *Mol Membr Biol* 20 (1), S. 13–18.
- Robakis, N. K.; Ramakrishna, N.; Wolfe, G.; Wisniewski, H. M. (1987): Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84 (12), S. 4190–4194.
- Roberds, S. L.; Anderson, J.; Basi, G.; Bienkowski, M. J.; Branstetter, D. G.; Chen, K. S. 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 (12), S. 1317–1324.
- Roberts, B. R.; Ryan, T. M.; Bush, A. I.; Masters, C. L.; Duce, J. A. (2012): The role of metallobiology and amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1, S. 149–166.
- Roher, A. E.; Lowenson, J. D.; Clarke, S.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Gowing, E.; Ball, M. J. (1993): beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (22), S. 10836–10840.
- Rosen, D. R.; Martin-Morris, L.; Luo, L. Q.; White, K. (1989): A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (7), S. 2478–2482.
- Rossjohn, J.; Cappai, R.; Feil, S. C.; Henry, A.; McKinsty, W. J.; Galatis, D. et al. (1999): Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* 6 (4), S. 327–331. Online verfügbar unter doi:10.1038/7562.
- Rushworth, J. V.; Hooper, N. M. (2011): Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011.
- Sako, Y.; Kusumi, A. (1995): Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether. *J Cell Biol* 129 (6), S. 1559–1574.
- Sakono, M.; Zako, T. (2010): Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J* 277 (6), S. 1348–1358. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x.
- Sakurai, T.; Kaneko, K.; Okuno, M.; Wada, K.; Kashiwayama, T.; Shimizu, H. et al. (2008): Membrane microdomain switching: a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. *J Cell Biol* 183 (2), S. 339–352.

Sambrook, J.; Russell, D. W. (2006): The condensed protocols. From molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sankaranarayanan, S.; Holahan, M. A.; Colussi, D.; Crouthamel, M. C.; Devanarayan, V.; Ellis, J. et al. (2009): First demonstration of cerebrospinal fluid and plasma A beta lowering with oral administration of a beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 inhibitor in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 328 (1), S. 131–140.

Sannerud, R.; Declerck, I.; Peric, A.; Raemaekers, T.; Menendez, G.; Zhou, L. et al. (2011): ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (34), S. E559-68.

Sato, T.; Diehl, T. S.; Narayanan, S.; Funamoto, S.; Ihara, Y.; Strooper, B. de et al. (2007): Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* 282 (47), S. 33985–33993.

Scheuermann, S.; Hamsch, B.; Hesse, L.; Stumm, J.; Schmidt, C.; Beher, D. et al. (2001): Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 276 (36), S. 33923–33929. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M105410200.

Schleiden, M. J. (1838): Beiträge zur Phytogenese. [S.l: s.n.].

Schmidt, V.; Sporbert, A.; Rohe, M.; Reimer, T.; Rehm, A.; Andersen, O.; Willnow, T. (2007): SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *J Biol Chem* 282 (45), S. 32956–32964.

Schneider, A.; Rajendran, L.; Honsho, M.; Gralle, M.; Donnert, G.; Wouters, F. et al. (2008): Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci* 28 (11), S. 2874–2882. Online verfügbar unter doi:10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008.

Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9 (7), S. 671–675.

Schreiber, A.; Fischer, S.; Lang, T. (2012): The Amyloid Precursor Protein Forms Plasmalemmal Clusters via Its Pathogenic Amyloid- $\beta$  Domain. *Biophys. J* 102 (6), S. 1411–1417.

Schroeter, E. H.; Ilagan, M. X. G.; Brunkan, A. L.; Hecimovic, S.; Li, Y. M.; Xu, M. et al. (2003): A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (22), S. 13075–13080.

Schwann, T.; Schleiden, M. J. (1847): Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants. London: The Sydenham Society.

Schwefel, D.; Maierhofer, C.; Beck, J. G.; Seeberger, S.; Diederichs, K.; Moller, H. M. et al. (2010): Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. *J Am Chem Soc* 132 (25), S. 8704–8719.

Selkoe, D. J. (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81 (2), S. 741–766.

Selkoe, D. J. (2011): Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med* 17 (9), S. 1060–1065.



- Selkoe, D.; Kopan, R. (2003): Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci* 26, S. 565–597.
- Senes, A.; Engel, D. E.; DeGrado, W. F. (2004): Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol* 14 (4), S. 465–479.
- Shaked, G. M.; Kummer, M. P.; Lu, D. C.; Galvan, V.; Bredesen, D. E.; Koo, E. H. (2006): Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J* 20 (8), S. 1254–1256.
- Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I. et al. (2008): Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14 (8), S. 837–842.
- Sheetz, M. P. (1983): Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol* 20 (3), S. 175–188.
- Sheetz, M. P.; Schindler, M.; Koppel, D. E. (1980): Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature* 285 (5765), S. 510–511.
- Shogomori, H.; Brown, D. A. (2003): Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 384 (9), S. 1259–1263.
- Sieber, J. J.; Willig, K. I.; Kutzner, C.; Gerding-Reimers, C.; Harke, B.; Donnert, G. et al. (2007): Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317 (5841), S. 1072–1076. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1141727.
- Sieber, J.; Willig, K.; Heintzmann, R.; Hell, S.; Lang, T. (2006): The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys J* 90 (8), S. 2843–2851.
- Silvestri, R. (2009): Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev* 29 (2), S. 295–338.
- Simons, K.; Gerl, M. J. (2010): Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (10), S. 688–699.
- Simons, K.; Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633), S. 569–572.
- Simons, K.; Vaz, W. L. C. (2004): Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, S. 269–295.
- Singer, S. J.; Nicolson, G. L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (4023), S. 720–731.
- Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D. et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402 (6761), S. 537–540.
- Sisodia, S. S. (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (13), S. 6075–6079.
- Small, D. H.; Clarris, H. L.; Williamson, T. G.; Reed, G.; Key, B.; Mok, S. S. et al. (1999): Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis* 1 (4-5), S. 275–285.

- Soba, P.; Eggert, S.; Wagner, K.; Zentgraf, H.; Siehl, K.; Kreger, S. et al. (2005): Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24 (20), S. 3624–3634. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.emboj.7600824.
- Stein, T. D.; Anders, N. J.; DeCarli, C.; Chan, S. L.; Mattson, M. P.; Johnson, J. A. (2004): Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24 (35), S. 7707–7717.
- Storey, E.; Cappai, R. (1999): The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathol. Appl. Neurobiol* 25 (2), S. 81–97.
- Strooper, B. de (2010): Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev* 90 (2), S. 465–494.
- Strooper, B. de; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Vanderstichele, H.; Guhde, G.; Annaert, W. et al. (1998): Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391 (6665), S. 387–390.
- Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Gronborg, M.; Riedel, D. et al. (2006): Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127 (4), S. 831–846.
- Tanzi, R. E.; Gusella, J. F.; Watkins, P. C.; Bruns, G. A.; St George-Hyslop, P.; van Keuren, M. L. et al. (1987): Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235 (4791), S. 880–884.
- Terry, R. D.; Masliah, E.; Salmon, D. P.; Butters, N.; DeTeresa, R.; Hill, R. et al. (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol* 30 (4), S. 572–580.
- Thinakaran, G.; Koo, E. H. (2008): Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem* 283 (44), S. 29615–29619.
- Thinakaran, G.; Borchelt, D. R.; Lee, M. K.; Slunt, H. H.; Spitzer, L.; Kim, G. et al. (1996): Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17 (1), S. 181–190.
- Tienari, P. J.; De, S. B.; Ikonen, E.; Simons, M.; Weidemann, A.; Czech, C. et al. (1996): The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *EMBO J* 15 (19), S. 5218–5229.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, S. 145–149.
- Townsend, M.; Shankar, G. M.; Mehta, T.; Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. (2006): Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572 (Pt 2), S. 477–492.
- Trapp, B. D.; Hauer, P. E. (1994): Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development. *J. Neurosci. Res* 37 (4), S. 538–550.
- Tsuji, A.; Ohnishi, S. (1986): Restriction of the lateral motion of band 3 in the erythrocyte membrane by the cytoskeletal network: dependence on spectrin association state. *Biochemistry* 25 (20), S. 6133–6139.
- Tsuji, A.; Kawasaki, K.; Ohnishi, S.; Merkle, H.; Kusumi, A. (1988): Regulation of band 3 mobilities in erythrocyte ghost membranes by protein association and cytoskeletal meshwork. *Biochemistry* 27 (19), S. 7447–7452.

- Turner, P. R.; O'Connor, K.; Tate, W. P.; Abraham, W. C. (2003): Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol* 70 (1), S. 1–32.
- Uhles, S.; Moede, T.; Leibiger, B.; Berggren, P. O.; Leibiger, I. B. (2003): Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol* 163 (6), S. 1327–1337.
- Valensin, D.; Mancini, F. M.; Łuczowski, M.; Janicka, A.; Wisniewska, K.; Gaggelli, E. et al. (2004): Identification of a novel high affinity copper binding site in the APP(145-155) fragment of amyloid precursor protein. *Dalton Trans* (1), S. 16–22.
- van den Bogaart G.; Meyenberg, K.; Risselada, H. J.; Amin, H.; Willig, K. I.; Hubrich, B. E. et al. (2011): Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature* 479 (7374), S. 552–555. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature10545.
- van den Hurk, W. H.; Bloemen, M.; Martens, G. J. (2001): Expression of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein APP in *Xenopus laevis*. *Brain Res. Mol. Brain Res* 97 (1), S. 13–20.
- Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P. et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286 (5440), S. 735–741.
- Vassar, R.; Kovacs, D. M.; Yan, R.; Wong, P. C. (2009): The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29 (41), S. 12787–12794. Online verfügbar unter doi:10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.
- Vetrivel, K. S.; Cheng, H.; Lin, W.; Sakurai, T.; Li, T.; Nukina, N. et al. (2004): Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279 (43), S. 44945–44954.
- Virchow, R. L. K. (1858): Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen. ... Zweite neu durchgesehene Auflage. Mit 144 Holschnitten. Berlin: Verlag von August Hirschwald.
- Wahle, T.; Prager, K.; Raffler, N.; Haass, C.; Famulok, M.; Walter, J. (2005): GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol Cell Neurosci* 29 (3), S. 453–461.
- Wakabayashi, T.; Craessaerts, K.; Bammens, L.; Bentahir, M.; Borgions, F.; Herdewijn, P. et al. (2009): Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat Cell Biol* 11 (11), S. 1340–1346.
- Wang, Y.; Ha, Y. (2004): The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol. Cell* 15 (3), S. 343–353. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.molcel.2004.06.037.
- Wehner, R.; Gehring, W.; Kühn, A. (1995): Zoologie. Glossar mit 730 Stichworten ; 29 Tabellen. 23. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Weidemann, A.; König, G.; Bunke, D.; Fischer, P.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. (1989): Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57 (1), S. 115–126.

- Weingarten, M. D.; Lockwood, A. H.; Hwo, S. Y.; Kirschner, M. W. (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (5), S. 1858–1862.
- Wertkin, A. M.; Turner, R. S.; Pleasure, S. J.; Golde, T. E.; Younkin, S. G.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. (1993): Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (20), S. 9513–9517.
- Willem, M.; Garrat, A. N.; Novak, B.; Citron, M.; Kaufmann, S.; Rittger, A. et al. (2006): Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314 (5799), S. 664–666.
- Wolfe, M. S.; Xia, W.; Ostaszewski, B. L.; Diehl, T. S.; Kimberly, W. T.; Selkoe, D. J. (1999): Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398 (6727), S. 513–517.
- Yamada, T.; Sasaki, H.; Furuya, H.; Miyata, T.; Goto, I.; Sakaki, Y. (1987): Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 149 (2), S. 665–671.
- Yamaguchi, H.; Hirai, S.; Morimatsu, M.; Shoji, M.; Ihara, Y. (1988): A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by beta protein immunostaining. *Acta Neuropathol* 76 (6), S. 541–549.
- Yan, R.; Bienkowski, M. J.; Shuck, M. E.; Miao, H.; Tory, M. C.; Pauley, A. M. et al. (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402 (6761), S. 533–537.
- Yoshikai, S.; Sasaki, H.; Doh-ura, K.; Furuya, H.; Sakaki, Y. (1991): Genomic organization of the human-amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 102 (2), S. 291–292.
- Zhao, G.; Cui, M. Z.; Mao, G.; Dong, Y.; Tan, J.; Sun, L.; Xu, X. (2005): gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280 (45), S. 37689–37697.
- Zheng, H.; Koo, E. H. (2011): Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6 (1), S. 27.
- Zilly, F. E.; Halemani, N. D.; Walrafen, D.; Spitta, L.; Schreiber, A.; Jahn, R.; Lang, T. (2011): Ca<sup>2+</sup> induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions. *EMBO J* 30 (7), S. 1209–1220. Online verfügbar unter doi:10.1038/emboj.2011.53.
- Zou, K.; Gong, J. S.; Yanagisawa, K.; Michikawa, M. (2002): A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22 (12), S. 4833–4841.
- Zurzolo, C.; van Meer, G.; Mayor, S. (2003): The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae. *EMBO Rep* 4 (12), S. 1117–1121.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst herzlich bei Prof. Dr. Thorsten Lang für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Überlassung des Themas bedanken. Mein Dank gilt vor allem auch der intensiven Betreuung meiner Dissertation sowie den spannenden Diskussionen zu dieser. Zuletzt möchte ich Ihm auch für die Übernahme des Erstgutachtens danken.

Auch möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken, sowie bei Prof. Dr. Waldemar Kolanus und Prof. Dr. Klemens Rottner als fachnahem bzw. fachfremdem Prüfer.

Prof. Dr. Reinhard Jahn sowie allen Mitarbeitern der Abteilung für Neurobiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen danke ich für die tolle und inspirierende Zeit, die ich dort verbringen und arbeiten durfte. Auch möchte ich Prof. Dr. Stefan W. Hell und seiner Arbeitsgruppe für NanoBiophotonik am gleichen Max-Planck-Institut für die Möglichkeit der STED-Mikroskopnutzung und für deren bereitwillige Unterstützung danken.

Prof. Dr. Silvio Rizzoli vom European Neuroscience Institute (ENI) in Göttingen möchte ich für das Programmieren der Matlab-Routinen danken, welche das Leben so viel einfacher gemacht haben.

Mein Dank gilt natürlich auch Prof. Dr. Waldemar Kolanus und seiner gesamten Arbeitsgruppe am LIMES-Institut in Bonn, deren großartige Unterstützung und Beherbergung gerade zu Beginn meiner Zeit in Bonn, aber auch später noch, die Arbeit an meiner Dissertation erst möglich gemacht hat. Zudem möchte ich allen Mitarbeitern des LIMES-Institutes für den kooperativen und freundschaftlichen Geist danken, welcher das Institut zu einem ganz außergewöhnlichen Ort macht.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Lang möchte ich meine tiefste Verbundenheit ausdrücken. Für deren wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen sowie der großartigen Zeit im Allgemeinen empfinde ich ein intensives Gefühl der Dankbarkeit.

Sebastian Fischer möchte ich für die Bereitstellung einiger Daten aus seiner Bachelorarbeit danken. Es war mir ein großes Vergnügen mit Ihm zu arbeiten.

David Walrafen und Bea Bönemann möchte ich für die konstruktiven Anmerkungen zu der hier vorliegenden Arbeit danken.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für die seelische und moralische Unterstützung während der langen und entbehrungsreichen Zeit der Promotion.

Mein größter Dank gilt aber meiner Lebensgefährtin Bea Bönemann, deren Liebe und Verständnis so manche dunkle Stunde mit warmem Licht gefüllt hat.