

# Expression und Prozessierung von APP *cis*- Dimeren in Abhängigkeit von LRP1

## Dissertation

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ



von

Uta-Mareike Herr

Geboren am 09. Dezember 1987 in Lichtenfels

Mainz, im Juni 2017

---

Dekan:

1. Berichtersteller:

2. Berichtersteller:

Tag der mündlichen Prüfung:

---

*Weisheit ist nicht das Ergebnis der Bildung,  
sondern des lebenslangen Versuchs sie zu erwerben.*

*(Albert Einstein)*

# Inhaltsverzeichnis

|  |      |
|--|------|
| Inhaltsverzeichnis .....   | IV   |
| Abkürzungen .....  | VIII |
| 1 Zusammenfassung .....  | 1    |
| 2 Summary.....   | 3    |
| 3 Einleitung .....   | 5    |
| 3.1 Die Alzheimer Krankheit .....  | 5    |
| 3.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP).....                                | 7    |
| 3.2.1 APP-Synthese.....  | 7    |
| 3.2.2 Proteinstruktur der APP-Familie.....                                 | 7    |
| 3.2.3 Die APP-Prozessierung .....  | 9    |
| 3.2.4 APP-Dimerisierung .....  | 13   |
| 3.3 <i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1)</i> ..... | 15   |
| 3.3.1 Interaktion von LRP1 und APP .....                                   | 17   |
| 4 Zielsetzung der Arbeit .....   | 19   |
| 5 Material und Methoden .....  | 21   |
| 5.1 Materialien .....  | 21   |
| 5.1.1 Chemikalien .....  | 21   |
| 5.1.2 Antibiotika .....  | 25   |
| 5.1.3 Arzneimittel und andere Materialien.....                             | 25   |
| 5.1.4 Puffer und Lösungen.....   | 26   |
| 5.1.5 Zellen .....   | 28   |
| 5.1.6 Plasmide .....   | 29   |
| 5.1.7 Antikörper.....  | 29   |

---

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 5.1.8     | Kits.....  | 31 |
| 5.1.9     | Laborgeräte.....   | 31 |
| 5.1.10    | Software.....  | 33 |
| 5.1.11    | Tiere und Tierhaltung.....   | 33 |
| 5.2       | Methoden.....  | 34 |
| 5.2.1     | Zellbiologische Methoden.....  | 34 |
| 5.2.1.1   | Kultivierung immortalisierter Zellen.....                                  | 34 |
| 5.2.1.2   | Kryokonservierung und Revitalisierung immortalisierter Zelllinien.....     | 34 |
| 5.2.1.3   | Isolation und Kultivierung von primären, kortikalen Neuronen (PCN).....    | 35 |
| 5.2.1.4   | Transfektion und Transduktion.....   | 36 |
| 5.2.1.4.1 | Transiente Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI).....                 | 36 |
| 5.2.1.4.2 | Stabile Transfektion.....  | 36 |
| 5.2.1.4.3 | Transduktion mittels adenoviralem Vektor.....                              | 38 |
| 5.2.2     | Molekularbiologische Methoden.....   | 38 |
| 5.2.2.1   | Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....                                       | 38 |
| 5.2.2.1.1 | Generieren der APP695 K587C-Sequenz.....                                   | 39 |
| 5.2.2.1.2 | Generieren der APP695 K587C NGYE-Sequenz.....                              | 42 |
| 5.2.2.1.3 | Genotypisierung von 5xFAD/ <i>Lrp1<sup>flox/flox</sup></i> -Embryonen..... | 43 |
| 5.2.2.2   | Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion.....                       | 44 |
| 5.2.2.3   | Klonierung von DNA-Fragmenten.....   | 45 |
| 5.2.2.3.1 | Restriktionsverdau und Aufreinigung von DNA-Molekülen.....                 | 45 |
| 5.2.2.3.2 | Ligation von DNA-Molekülen.....  | 46 |
| 5.2.2.3.3 | Vervielfältigung der APP-Konstrukte.....                                   | 47 |
| 5.2.2.4   | Bestimmung der DNA-Konzentration und Sequenzierung.....                    | 47 |
| 5.2.3     | Proteinbiochemische Methoden.....  | 47 |

---

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 5.2.3.1   | Zelllyse und Proteinextraktion.....   | 47 |
| 5.2.3.2   | Bestimmung der Proteinkonzentration und Probenvorbereitung .....                      | 48 |
| 5.2.3.3   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....   | 49 |
| 5.2.3.3.1 | SDS-PAGE.....   | 49 |
| 5.2.3.3.2 | Harnstoff SDS-PAGE .....  | 50 |
| 5.2.3.4   | Western Blot-Verfahren .....  | 52 |
| 5.2.3.4.1 | Nass-Blot-Verfahren.....  | 52 |
| 5.2.3.4.2 | <i>Semi-Dry</i> -Western Blot.....  | 53 |
| 5.2.3.5   | Chemilumineszenz-Detektion .....  | 54 |
| 5.2.3.6   | Tat-Cre-Behandlung von PCN aus 5xFAD/ <i>Lrp1<sup>flox/flox</sup></i> -Embryonen..... | 55 |
| 5.2.3.7   | <i>Pulse-Chase</i> -Analyse .....   | 55 |
| 5.2.3.8   | Immunpräzipitation (IP).....  | 56 |
| 5.2.3.8.1 | Immunpräzipitation von APP .....  | 56 |
| 5.2.3.8.2 | Immunpräzipitation von A $\beta$ -Peptiden.....                                       | 57 |
| 5.2.3.9   | Inhibitor-Behandlung von CHO-Zellen.....  | 57 |
| 5.2.3.10  | Oberflächenbiotinylierung.....  | 58 |
| 5.2.4     | <i>In vivo</i> -Methoden .....  | 58 |
| 5.2.4.1   | Induktion der Cre-vermittelten Rekombination.....                                     | 58 |
| 5.2.4.2   | Isolierung von Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) .....                                   | 59 |
| 5.2.5     | Densitometrische Analyse und statistische Auswertung .....                            | 60 |
| 6         | Ergebnisse .....  | 61 |
| 6.1       | APP-Dimere in Primärneuronen und HEK293T-Zellen .....                                 | 61 |
| 6.2       | Generierung und Expression des APP695 K587C-Konstruktes.....                          | 62 |
| 6.3       | Einfluss von LRP1 auf die Prozessierung von APP-Dimeren.....                          | 65 |
| 6.3.1     | APP-Dimer-Prozessierung in CHO-Zellen .....   | 65 |

---

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 6.3.2 | APP-Dimer-Prozessierung in Primärneuronen.....  | 66  |
| 6.4   | Zeitlicher Verlauf der Bildung von sAPP-Dimeren.....  | 68  |
| 6.5   | Internalisierung von APP-Dimeren.....   | 70  |
| 6.6   | Prozessierung von APP-Dimeren durch ADAM10 und Meprin $\beta$ .....   | 72  |
| 6.6.1 | APP-Dimer-Prozessierung durch Meprin $\beta$ .....  | 73  |
| 6.6.2 | Prozessierung von APP-Dimeren durch ADAM10 .....  | 76  |
| 6.7   | Einfluss von LRP1 auf die Bildung von sAPP-Dimeren <i>in vivo</i> .....                                     | 79  |
| 7     | Diskussion.....   | 81  |
| 7.1   | Die APP Cys-Mutante als geeignetes Modell für die Analyse von APP-Dimeren .....                             | 81  |
| 7.2   | APP <i>cis</i> -Dimere werden von ADAM10 und Meprin $\beta$ prozessiert .....                               | 84  |
| 7.2.1 | Meprin $\beta$ spaltet vermutlich bevorzugt APP <i>cis</i> -Dimere .....                                    | 85  |
| 7.2.2 | APP <i>cis</i> -Dimere werden von ADAM10 an der Zelloberfläche gespalten .....                              | 88  |
| 7.3   | Die LRP1-Expression scheint die Prozessierung von APP <i>cis</i> -Dimeren entscheidend zu beeinflussen..... | 89  |
| 7.4   | Die <i>cis</i> -Dimerisierung könnte physiologische und pathologische Funktionen von APP beeinflussen ..... | 93  |
| 8     | Literaturverzeichnis.....   | 97  |
| 9     | Anhang .....  | 116 |
| 9.1   | Ergänzende Abbildung.....   | 116 |
| 9.2   | Eidesstattliche Erklärung.....  | 117 |
| 9.3   | Danksagung.....   | 118 |
| 9.4   | Lebenslauf .....  | 119 |

---

# Abkürzungen

|                   |  |
|-------------------|--|
| °C                | Grad Celcius                                 |
| α-MEM             | <i>alpha-Modified Essential Medium</i>       |
| A                 | Adenin                                       |
| Aβ                | Amyloid beta                                 |
| AcD               | <i>Acidic Domain</i>                         |
| ADAM              | <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>   |
| AICD              | APP intrazelluläre Domäne                    |
| APH-1             | <i>Anterior Pharynx-defective-1</i>          |
| APLP              | <i>Amyloid Precursor Like Protein</i>        |
| apoE              | Apolipoprotein E                             |
| APP               | <i>Amyloid Precursor Protein</i>             |
| APS               | Ammoniumpersulfat                            |
| βME               | β-Mercaptoethanol                            |
| BACE1             | <i>β-site APP Cleaving Enzyme 1</i>          |
| BCA               | <i>Bicinchoninic Acid Assay</i>              |
| bp                | Basenpaare                                   |
| BSA               | Bovines Serumalbumin                         |
| bzw.              | beziehungsweise                              |
| C                 | Cystein (Einbuchstabencode der Aminosäuren)  |
| C-                | Carboxy-                                     |
| ca.               | circa  |
| CaCl <sub>2</sub> | Kalziumchlorid                               |
| cDNA              | <i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i>  |
| CHO               | <i>Chinese Hamster Ovary</i>                 |
| Clal              | <i>Caryophanon latum</i> I                   |
| cm                | Zentimeter                                   |
| CM                | konditioniertes Medium                       |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid                            |
| Cre               | <i>Causes recombination</i>                  |
| CRs               | <i>cysteine-rich Complement-type Repeats</i> |
| CSF               | Zerebrospinalflüssigkeit                     |
| CTF               | C-terminales Fragment                        |



|                  |  |
|------------------|--|
| Cu               | Kupfer   |
| Cys              | Cystein  |
| DIV              | <i>days in vitro</i>   |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid   |
| DNA              | <i>Desoxyribonucleic Acid</i>  |
| dNTP             | Desoxynukleosidtriphosphat   |
| Dr.              | Doktor   |
| E                | Embryonalstadium   |
| <i>E. coli</i>   | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGF              | <i>Epidermal Growth Factor</i>   |
| ER               | Endoplasmatischen Retikulum  |
| ER <sup>T2</sup> | <i>Estrogen Receptor<sup>T2</sup></i>                                      |
| EtBr             | Ethidiumbromid   |
| FAD              | <i>Familiar Alzheimer's Disease</i>  |
| FCS              | fötales Kälberserum  |
| fwd              | <i>forward</i>   |
| G                | Guanin   |
| GFLD             | <i>Growth Factor-Like Domain</i>   |
| ggf.             | gegebenenfalls   |
| GmbH & Co. KG    | Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie<br>Kommanditgesellschaft |
| H <sub>2</sub> O | Wasser   |
| HBSS             | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>                                       |
| HCl              | Hydrochlorid   |
| HEK              | <i>Human Embryonic Kidney</i>  |
| HEPES            | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                      |
| HF               | <i>High Fidelity</i>   |
| HindIII          | <i>Haemophilus influenzae</i> Rd III                                       |
| HIV              | <i>Human Immunodeficiency Virus</i>  |
| HRP              | <i>Horseradish Peroxidase</i>  |
| IgG              | Immunglobulin G  |
| IP               | Immunpräzipitation   |
| K                | Lysin (Einbuchstabencode der Aminosäuren)                                  |

## Abkürzungen

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| kb                | Kilobasen   |
| KKAA              | Lysin, Lysin, Alanin, Alanin (Einbuchstabencode der Aminosäuren)              |
| KPI               | Kunitz-Proteaseinhibitor  |
| LB                | <i>Lysogeny Broth</i>   |
| LDLR              | <i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>                                       |
| loxP              | <i>locus of X-over P1</i>   |
| LRP1              | <i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>                     |
| μCi               | Mikrocurie  |
| μg                | Mikrogramm  |
| μl                | Mikroliter  |
| μM                | Mikromolar  |
| M                 | Molar   |
| mA                | Milliampere   |
| MALDI-MS          | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Massspectrometry</i>           |
| MAP               | Mikrotubuli-assoziiertes Protein  |
| MES               | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure  |
| mg                | Milligramm  |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid  |
| min               | Minute/n  |
| ml                | Milliliter  |
| mM                | Millimolar  |
| mRNA              | <i>messenger Ribonucleic Acid</i>   |
| N                 | Stickstoff  |
| N-                | Amino   |
| N-APP             | Aminoterminales Fragment des <i>Amyloid Precursor Protein</i>                 |
| NBS               | Neurobasalmedium  |
| ng                | Nanogramm   |
| NGYE              | Asparagin, Glycin, Tyrosin, Glutaminsäure (Einbuchstabencode der Aminosäuren) |
| nm                | Nanometer   |
| nM                | Nanomolar   |
| NP-40             | Nonidet P40   |

|           |  |
|-----------|--|
| NPxY      | Asparagin, Prolin, beliebig, Tyrosin (Einbuchstabencode der Aminosäuren) |
| O         | Sauerstoff   |
| PAGE      | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PBS       | Phosphatgepufferte Salzlösung  |
| PCN       | primäre, kortikale Neurone   |
| PCR       | Polymerase-Kettenreaktion  |
| PEI       | Polyethylenimin  |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin  |
| PEN-2     | <i>Presenilin Enhancer-2</i>   |
| pH        | <i>potentia hydrogenii</i>   |
| PI        | Proteaseinhibitor  |
| PID       | Phosphotyrosin-Interaktionsdomäne  |
| PM        | Plasmamembran  |
| Prof.     | Professor  |
| PS        | Präsenilin   |
| PVDF      | Polyvinylidenfluorid   |
| rev       | <i>reverse</i>   |
| RNA       | <i>Ribonucleic Acid</i>  |
| rpm       | <i>resolutions per minute</i>  |
| RT        | Raumtemperatur   |
| s         | Sekunden   |
| S         | Schwefel   |
| s.        | siehe  |
| s. o.     | siehe oben   |
| S2        | Sicherheitsstufe 2   |
| sAPP      | <i>soluble Amyloid Precursor Protein</i>                                 |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat   |
| Slco1c1   | <i>Solute carrier organic anion transporter 1c1</i>                      |
| sog.      | sogenannte   |
| SORLA     | <i>Sortilin-related Receptor with A-type Repeats</i>                     |
| T         | Tyrosin  |
| TACE      | <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math> Converting Enzyme</i>       |
| TAE       | TRIS-Acetat-EDTA   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| Tat                 | <i>Transactivator of transcription</i>  |
| TBST                | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20  |
| TGN                 | <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk  |
| TRIS                | Tris(hydroxymethyl)-aminoethan  |
| u. a.               | unter anderen   |
| ü. N.               | über Nacht  |
| V                   | Volt  |
| v. a.               | vor allem   |
| VE-H <sub>2</sub> O | vollentsalztes Wasser   |
| VSV-G               | <i>Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein</i>  |
| wt                  | Wildtyp   |
| YENPTY              | Tyrosin, Glutaminsäure, Asparagin, Prolin, Threonin, Tyrosin<br>(Einbuchstabencode der Aminosäuren) |
| YWTD                | Tyrosin, Tryptophan, Threonin, Asparaginsäure<br>(Einbuchstabencode der Aminosäuren)                |
| z. B.               | zum Beispiel  |
| ZNS                 | Zentrales Nervensystem  |

# 1 Zusammenfassung

Viele Studien zum Amyloid-Vorläuferprotein (APP) beschäftigten sich, aufgrund der Möglichkeit zur Generierung von A $\beta$ -Peptiden, mit dessen Beteiligung an der Pathogenese der Alzheimer Krankheit. Dabei konnte festgestellt werden, dass APP unter normalen physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf zwei Wegen prozessiert wird. So erfolgt neben der vorwiegend ablaufenden, enzymatischen Spaltung von APP durch ADAM10 auf dem nicht-amyloidogenen Weg auch die Bildung von A $\beta$ -Peptiden durch Prozessierung entlang des amyloidogenen Weges. Letzterer wird wohl hauptsächlich durch die Aktivität von BACE1 eingeleitet, wobei vor Kurzem Meprin  $\beta$  ebenfalls als Sekretase zur Produktion von A $\beta$ -Peptiden identifiziert wurde. Im Zusammenhang mit der Generierung von A $\beta$ -Peptiden wurde schon früh eine Beteiligung des Rezeptors LRP1 festgestellt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass dieser über direkte oder indirekte Interaktionen mit APP vermutlich die gemeinsame Endozytose der Proteine von der Zelloberfläche vermittelt, sodass APP der amyloidogenen Prozessierung durch BACE1 in endosomalen Zellkompartimenten zugeführt werden kann. Neben anderen Proteinen scheint auch der Oligomerisierungszustand von APP Einfluss auf dessen enzymatischen Spaltung durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen zu haben. Da ein großer Teil des synthetisierten APP wohl in dimerisierter Form vorliegt und sogar *in vivo* in Gehirnen von Mäusen nachweisbar war, wurde bereits in mehreren Studien der Zusammenhang zwischen der APP-Dimerisierung und der Bildung von A $\beta$ -Peptiden diskutiert. Die Untersuchungen ergaben jedoch kontroverse Ergebnisse, was wohl zumindest teilweise auf die verwendeten APP-Konstrukte zur Expression von APP-Dimeren zurückzuführen war.

Um die Expression und Prozessierung von dimerisierten APP-Proteinen sowie die Beteiligung von LRP1 an diesen Vorgängen weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Expressions-Konstrukt generiert, das zu APP-Proteinen führte, die bevorzugt dimerisierten. Die Expression dieser APP Cys-Mutante (APP695 K587C) resultierte in der Bildung Hitze-stabiler APP-Dimere und wurde für die stabile Transfektion von CHO-Zellen genutzt. Durch Untersuchungen von LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen sowie von kortikalen Primärneuronen mit induziertem *Lrp1-Knockout* konnte eine deutliche Steigerung der Prozessierung nicht nur des monomeren, sondern besonders auch des dimeren APP festgestellt werden.

Die *Pulse-Chase*-Analyse von CHO-Zellen mit stabiler APP695 K587C-Expression deutet darauf hin, dass LRP1 den Transport von APP-Dimeren zur Zelloberfläche beeinträchtigt und so dessen Prozessierung beeinflusst. Weiterhin scheint LRP1 auch in die Internalisierung von APP-Dimeren involviert zu sein. Folglich bewirkt die LRP1-Defizienz vermutlich eine Stabilisierung der dimerisierten APP-Proteine an der Zelloberfläche und somit deren gesteigerte Spaltung durch dort aktive Sekretasen.

An diesem Vorgang könnten sowohl ADAM10, als auch Meprin  $\beta$  beteiligt sein, da für beide Sekretasen eine Aktivität an dimerisierten APP-Molekülen gezeigt wurde. Für Meprin  $\beta$  wird sogar eine Favorisierung von APP-Dimeren gegenüber –Monomeren vermutet, was eventuell auf kooperative Effekte aufgrund der Dimerisierung von APP zurückzuführen ist.

Sowohl ein beschleunigter Transport zur Zelloberfläche, als auch eine verminderte Internalisierung von APP könnten die signifikante Zunahme insbesondere an sAPP-Fragmenten in der CSF von Mäusen mit *Lrp1-Knockout* erklären. Allerdings geben diese *in vivo*-Daten durch den besonders starken Effekt der fehlenden LRP1-Expression auf die sAPP-Dimer-Bildung zudem Anlass zur Annahme, dass LRP1 nicht nur die Prozessierung, sondern auch die Bildung von APP-Dimeren beeinflusst.

Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der in dieser Arbeit analysierten APP *cis*-Dimere zum monomeren APP in Bezug auf Transport, Internalisierung und Prozessierung könnten APP-Dimere, wie monomeres APP, verschiedene physiologische und pathologische Funktionen von APP regulieren. Dabei deuten die hier dargestellten Ergebnisse zudem auf eine entscheidende Rolle von LRP1 hin.

## 2 Summary

Many studies of the amyloid precursor protein (APP) focused on its involvement in the pathogenesis of Alzheimer's disease due to its ability to generate A $\beta$  peptides. Though, APP was shown to be processed mainly on two pathways under physiological conditions. In contrast to the predominant cleavage by ADAM10 during the non-amyloidogenic pathway, processing of APP by the amyloidogenic pathway results in the production of A $\beta$  peptides. This is mainly based on BACE1 activity but can also be performed by meprin  $\beta$ , a secretase that has recently been identified to generate N-terminally truncated A $\beta$  variants by cleavage of APP. Due to its direct or indirect interaction with APP the receptor protein LRP1 has been assumed to participate in the formation of A $\beta$  peptides. Several studies showed that LRP1 expression facilitates A $\beta$  production probably by mediating APP endocytosis from the cell surface, thereby supporting the accessibility of APP for BACE1 cleavage in endosomal compartments. Not only the interaction with LRP1 or other receptors, but also the oligomerisation state of APP itself seems to play a role in APP processing by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. Recently it has been shown that a large fraction of APP exists in a dimerised form and that APP dimers also occur *in vivo* in mouse brains. Thus, several studies already tried to reveal the context between APP dimerization and the generation of A $\beta$  peptides. However, the analyses resulted in controversial results, probably at least in part due to the various constructs used to induce APP dimerisation.

To further analyse the expression and the processing of dimerised APP and the involvement of LRP1 in these events, an expression construct for preferential formation of APP dimers was generated. This APP mutant (APP695 K587C) resulted in heat-stable APP dimers and was used to stably transfect CHO K1 and CHO 13-5-1 cells with an APP dimer construct. The investigation of the LRP1-deficient CHO 13-5-1 cells as well as of primary cortical neurons with an induced *Lrp1* knockout revealed a significantly increased processing not only of APP monomers but also of APP dimers.

A pulse-chase assay of the stably transfected CHO cells indicated that LRP1 may impact the trafficking of APP dimers to the cell surface, thereby affecting their processing. Furthermore, the results of this study point to an impact of LRP1 in endocytosis of APP dimers from the cell surface. Thus, LRP1 deficiency may lead to a

stabilisation of dimerised APP and along with this to an increased sAPP dimer generation by secretases active at the cell surface.

In this process ADAM10 as well as meprin  $\beta$  may be involved, as for both secretases an activity on APP dimers could be detected. Moreover, meprin  $\beta$  seems to preferentially cleave dimeric compared to monomeric APP, suggesting a cooperative effect of APP dimerisation on meprin  $\beta$  activity.

The *in vivo* data showing a significant increase in sAPP generation in the CSF of mice with an induced *Lrp1* knockout may result from a faster trafficking of APP to as well as from a reduced internalisation from the cell surface in absence of LRP1. Nevertheless, the particularly immense gain of soluble APP dimers further points to a role of LRP1 not only in processing but also in formation of APP dimers.

The similar characteristics in transport, endocytosis and processing of monomeric APP and the analysed APP *cis*-dimers in this study indicate that these dimers may also control various physiological and pathological functions of APP. In addition, the here depicted results implicate a crucial role of LRP1 in those processes.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil veröffentlicht in:

Herr et al. (2017): "LRP1 Modulates APP Intraneuronal Transport and Processing in Its Monomeric and Dimeric State."

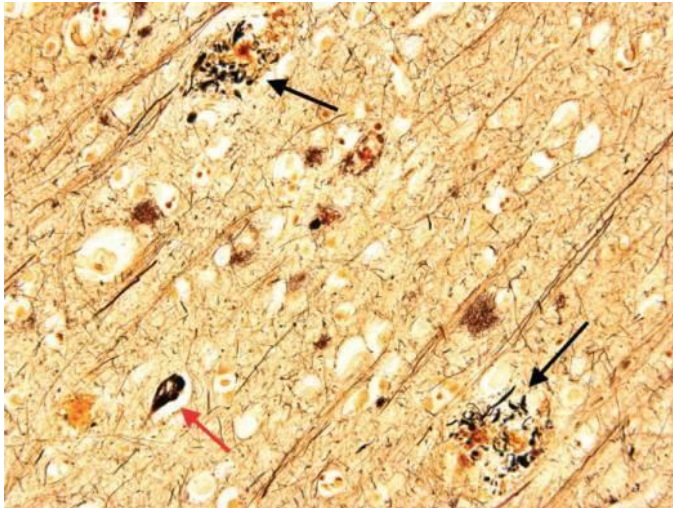


## 3 Einleitung

### 3.1 Die Alzheimer Krankheit

Demenz ist heutzutage, aufgrund der demografischen Entwicklung unserer Gesellschaft, eine der bedeutendsten Erkrankungen im Alter (Holtzman et al., 2011; Iadecola, 2016). Charakterisiert durch den Verlust des Gedächtnisses und anderer kognitiver Fähigkeiten erlangt sie einen Schweregrad, der das alltägliche Leben maßgeblich beeinträchtigt (Holtzman et al., 2011).

Mit 60 – 70 % aller auftretenden Demenz-Erkrankungen stellt die Alzheimer Krankheit die häufigste Form der Demenz in der alternden Bevölkerung dar (Prince et al., 2013). Diese progressive und irreversible, neurodegenerative Erkrankung wurde erstmals 1906 vom Psychologen Alois Alzheimer beschrieben, nachdem er histologische Veränderungen im Gehirn seiner verstorbenen Patientin Auguste D. festgestellt hatte (Hippius and Neundörfer, 2003). Die mittlerweile als intrazelluläre Neurofibrillen (*neurofibrillary tangles*) und extrazelluläre Proteinablagerungen (*senile plaques*) bekannten Kennzeichen von Alzheimer (s. Abbildung 1) führen insbesondere im zerebralen Kortex sowie im Hippocampus zu einer ausgeprägten Atrophie der Nervenzellen (Blennow et al., 2006; Braak et al., 1999). Heute ist bekannt, dass hyperphosphorylierte Tau-Proteine zur Bildung der Neurofibrillen führen (Baner et al., 1989; Gong and Iqbal, 2008; Grundke-Iqbal et al., 1986). Dieses Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) ist insbesondere in den Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) für den Aufbau der Mikrotubuli aus Tubulin-Molekülen verantwortlich (Cleveland et al., 1977; Weingarten et al., 1975). Durch die veränderte Phosphorylierung wird die physiologische Funktion des Tau-Proteins gestört und dessen Selbstaggregation gefördert (Baner et al., 1989; Gong and Iqbal, 2008; Grundke-Iqbal et al., 1986; Liu et al., 2008). Die extrazellulären Ablagerungen bestehen im Kernbereich aus verschiedenen A $\beta$ -Peptiden, die zusammen mit weiteren, abgelagerten Proteinen und Metallionen die sogenannten senilen Plaques bilden (Atwood et al., 2002; Masters et al., 1985; Merz et al., 1983; Näslund et al., 1994).



**Abbildung 1: Neurofibrille und senile Plaques im Gehirn eines Alzheimer Patienten.** Der dargestellte Hirnschnitt eines Alzheimer Patienten weist mit der Neurofibrille (roter Pfeil) und den senilen Plaques (schwarze Pfeile) die typischen Kennzeichen der Erkrankung auf.

A $\beta$ -Peptide entstehen auch unter normalen physiologischen Bedingungen durch eine Abfolge an enzymatischen Spaltungen des Amyloid-Vorläuferproteins (*Amyloid Precursor Protein*, APP) (Kang et al., 1987). Dabei wird hauptsächlich A $\beta_{40}$  gefolgt von A $\beta_{42}$  gebildet, dem eine besondere Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit zukommt (Burdick et al., 1992; Haass et al., 1993; Kuo et al., 1996; Pietrzik and Behl, 2005; Selkoe, 2000). Da A $\beta_{42}$  eine stärkere Tendenz zur Bildung neurotoxischer Aggregate besitzt als A $\beta_{40}$  (Iwatsubo et al., 1994; Roher et al., 1993), könnte eine Verschiebung im Verhältnis von A $\beta_{42}$  zu A $\beta_{40}$  Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer Erkrankung haben.

Alzheimer kann in seltenen Fällen genetisch bedingt sein. Hierbei führen autosomal dominante Mutationen in den Genen für APP (Goate et al., 1991) oder für Präsenilin-1 bzw. Präsenilin-2 (Levy-lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995) zur familiären Form der Krankheit (*Familial Alzheimer's Disease*, FAD). Häufiger tritt die Erkrankung dagegen sporadisch auf, wobei das Altern den größten Risikofaktor darstellt (Pietrzik and Behl, 2005). Aufgrund des stetig steigenden Alters der Bevölkerung und des fehlenden Therapieerfolges wird bis 2050 eine Verdrei- bis Vervierfachung der heute weltweit rund 40 Millionen Betroffenen erwartet (Brookmeyer and Gray, 2000; Iadecola, 2016; Prince et al., 2013).

## 3.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

APP ist ein Typ-I Transmembranprotein, das erstmals in Zusammenhang mit Alzheimer als Vorläufer von A $\beta$ -Peptiden identifiziert wurde (Kang et al., 1987). Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA von *APP* werden verschiedene Isoformen dieses Proteins exprimiert. Es entstehen vorwiegend drei Varianten mit 695, 751 oder 770 Aminosäuren (s. Abbildung 2). Während die kürzeste Form, APP695, vor allem in neuronalen Zellen gebildet wird, findet die Expression der längeren Isoformen, APP751 und APP770, mehr ubiquitär statt (Beyreuther et al., 1993; Haass et al., 1991; Kitaguchi et al., 1988; Selkoe, 2001). Daher wird angenommen, dass APP695 für den Großteil der im ZNS generierten A $\beta$ -Peptide verantwortlich ist (Sisodia et al., 1993).

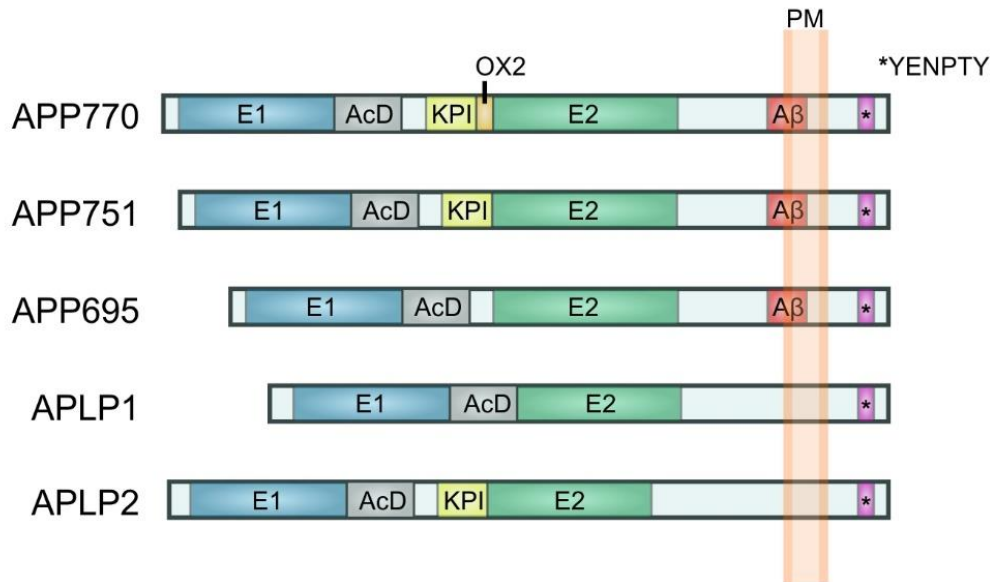
### 3.2.1 APP-Synthese

Die Synthese von APP beginnt im endoplasmatischen Retikulum (ER), aus dem es nach der N-Glykosylierung in den Golgi-Apparat gelangt, wo weitere posttranslationale Modifikationen, wie O-Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung stattfinden (Buxbaum et al., 1990; Oltersdorf et al., 1990; Saito et al., 1993; Weidemann et al., 1989). Nur etwa 10 % des nun reifen APP werden in sekretorischen Vesikeln über das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran transportiert. Der überwiegende Teil verbleibt dagegen im Golgi-Apparat oder im TGN (Haass et al., 2012). Das an der Zelloberfläche exprimierte APP kann entweder proteolytisch gespalten oder nach wenigen Minuten wieder internalisiert werden (Lai et al., 1995; MarquezSterling et al., 1997). Über Sortierungsvesikel gelangt es entweder zurück an die Zelloberfläche (*recycling*) oder in Lysosomen, in denen das Protein degradiert wird (Haass et al., 1992).

### 3.2.2 Proteinstruktur der APP-Familie

Zusammen mit seinen in Säugetieren vorkommenden Paralogen APLP1 und APLP2 (*Amyloid Precursor Like Proteins*) bildet APP eine Gen-Familie (Coulson et al., 2000; Wasco et al., 1992, 1993), deren Mitglieder eine konservierte Proteinstruktur teilen (s. Abbildung 2). Diese umfasst eine große Ektodomäne, eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus mit dem Proteininteraktionsmotiv YENPTY, welches für die Clathrin-vermittelte Endozytose essenziell ist (Dyrks et al.,

1988; Kang et al., 1987; King and Turner, 2004; Lai et al., 1995; MarquezSterling et al., 1997).



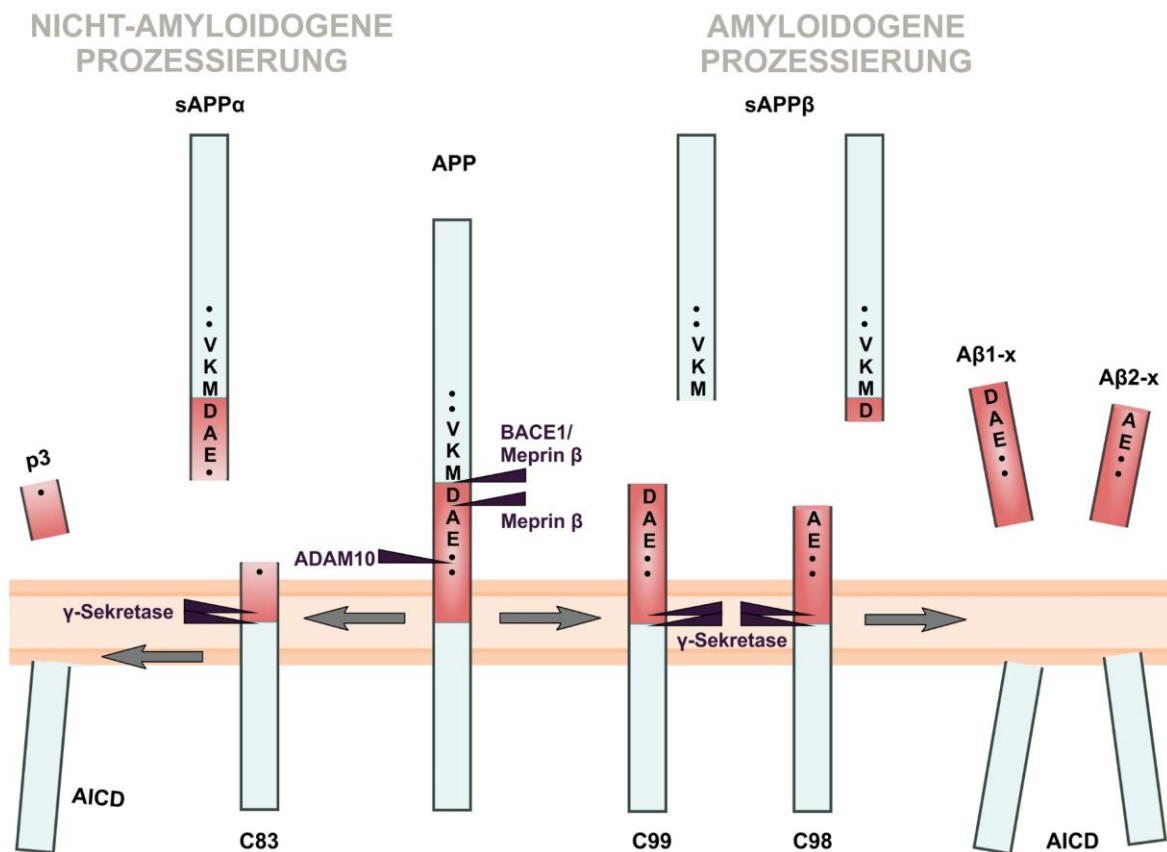
**Abbildung 2: Die APP-Familie.** Dargestellt sind die drei häufigsten Spleißformen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) mit 770, 751 bzw. 695 Aminosäuren sowie dessen Paraloge, die Amyloid-Vorläufer-ähnlichen Proteine (APLP1 und APLP2). Alle Mitglieder teilen gewisse Strukturen, wie die E1- und E2-Domänen im extrazellulären Bereich, die durch die saure Region (AcD) voneinander getrennt sind, sowie das Internalisierungsmotiv YENPTY am zytoplasmatischen Terminus. Neben APP770, bei dem zusätzlich die OX2-Domäne zwischen E1 und E2 liegt, trennt auch in APP751 und APLP2 die Kunitz-Proteaseinhibitor-Domäne (KPI) diese beiden Regionen. (PM = Plasmamembran).

Die Ektodomäne ist in die Subdomänen E1 und E2 unterteilt, die über eine saure Aminosäureregion (*Acidic Domain*, AcD) miteinander verbunden sind. Bei den längeren APP-Isoformen sowie bei APLP2 enthält dieser Bereich zusätzlich die Kunitz-Proteaseinhibitor-Domäne (KPI-Domäne), die APP695 und APLP1 fehlt (Kitaguchi et al., 1988). Außerdem besitzt APP770 anschließend an die KPI-Domäne noch eine OX2-Domäne. E1- und E2-Domäne sind jeweils in weitere Sektionen wie die Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (*Growth Factor-Like Domain*, GFLD) oder die Bindedomänen für Metallionen bzw. Heparin unterteilt. Zudem enthält die E2-Domäne einen Abschnitt, an dem die N-Glykosylierung stattfindet (Coburger et al., 2013; Coulson et al., 2000; Gralle and Ferreira, 2007; Reinhard et al., 2005). Der wohl größte

Unterschied zwischen APP und seinen Paralogen APLP1/2 liegt im Vorhandensein der A $\beta$ -Sequenz bei APP, die in der Transmembranregion des Proteins endet. Somit kann, trotz Beteiligung der selben Sekretasen an der enzymatischen Prozessierung aller Mitglieder der APP-Familie, nur die Spaltung von APP zur Bildung von A $\beta$ -Peptiden führen (Kuan et al., 2006; Li and Südhof, 2004; Müller and Zheng, 2012; Sisodia et al., 1993; Walsh et al., 2003).

### 3.2.3 Die APP-Prozessierung

Die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins kann grundlegend in zwei Wege unterteilt werden, die beide unter physiologischen Bedingungen ablaufen (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992, 1993; Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992). Abhängig von der Sekretase, die die enzymatische Spaltung der Ektodomäne übernimmt, unterscheidet man den amyloidogenen und den nicht-amyloidogenen Weg (Pietrzik and Behl, 2005) (s. Abbildung 3). Im Letzteren wird APP zunächst durch eine  $\alpha$ -Sekretase geschnitten, wodurch ein großes N-terminales Fragment, das sogenannte lösliche APP $\alpha$  (*soluble APP $\alpha$* , sAPP $\alpha$ ), und ein membrangebundenes C-terminales Fragment (CTF) aus 83 Aminosäureresten (auch C83, CTF $\alpha$ ) entstehen (Chow et al., 2010; Pietrzik and Behl, 2005; Postina et al., 2004; Selkoe, 1999; Sisodia, 1992; Zhang et al., 2011). Die folgende Spaltung von CTF $\alpha$  unterliegt der Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase (De Strooper et al., 1998), einem integralen Membranproteinkomplex. Dieser setzt sich aus den vier Proteinuntereinheiten Nicastrin, APH-1 (*Anterior Pharynx-defective-1*), PEN-2 (*Presenilin Enhancer-2*) und dem katalytisch aktiven Präsenilin (PS-1 oder PS-2) zusammen (De Strooper, 2003; Edbauer et al., 2003; Wolfe et al., 1999). Durch den Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase wird von CTF $\alpha$  zum einen ein kurzes Peptid (p3) in den extrazellulären Raum, zum anderen die APP intrazelluläre Domäne (AICD) ins Zytosol freigesetzt (Chow et al., 2010; Gu et al., 2001; Haass et al., 1993; Pietrzik and Behl, 2005; Sastre et al., 2001) (s. Abbildung 3).



**Abbildung 3: APP-Prozessierung.** Bei der nicht-amyloiden Prozessierung von APP durch ADAM10 entsteht zunächst das lösliche N-terminale Fragment sAPP $\alpha$  sowie das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (CTF) C83. Die anschließende Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase setzt das Peptid p3 sowie die APP intrazelluläre Domäne (AICD) frei. Bei der amyloiden Prozessierung von APP schneiden zunächst BACE1 oder Meprin  $\beta$ , wodurch lösliche sAPP $\beta$ -Fragmente und die membrangebundenen CTFs C99 bzw. C98 entstehen. Hier führt die folgende Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase zu A $\beta$ -Peptiden, die entweder an Position 1 oder, im Falle der Meprin  $\beta$ -Prozessierung, auch an Position 2 beginnen. Zudem wird so ebenfalls die AICD ins Zytosol freigesetzt.

Bereits in frühen Studien konnten, u.a. mit Hilfe von Proteaseinhibitoren, Zink-Metalloproteinasen der ADAM-Familie (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) als mögliche  $\alpha$ -Sekretasen von APP identifiziert werden (Allinson et al., 2003; Roberts et al., 1994; Sisodia, 1992). Dabei wurde insbesondere bei vier Mitgliedern dieser Proteinfamilie, nämlich ADAM9, ADAM10, ADAM17 und ADAM19, ein direkter Einfluss auf die sAPP $\alpha$ -Produktion festgestellt (Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999; Slack et al., 2001; Tanabe et al., 2006). Bei allen Kandidaten handelt es sich, ebenso wie



bei APP, um Typ-I Transmembranproteine, die hauptsächlich an der Zelloberfläche enzymatisch aktiv sind (Allinson et al., 2003; Zhang et al., 2011). Während ADAM9 und ADAM17 (auch TACE, *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme*) an der regulatorischen  $\alpha$ -Prozessierung von APP beteiligt sind (Blacker et al., 2002; Buxbaum et al., 1998; Koike et al., 1999; Kuhn et al., 2010; Merlos-Suárez et al., 1998), wurde ADAM10 und ADAM19 eine konstitutive  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität an APP zugesprochen (De Strooper and Annaert, 2000; Esch et al., 1990; Kuhn et al., 2010; Lammich et al., 1999; Lopez-Perez et al., 2001; Tanabe et al., 2006; Weidemann et al., 1989). Dennoch gilt ADAM10 als die relevanteste  $\alpha$ -Sekretase in Neuronen, nicht zuletzt dadurch, dass sie dort vorwiegend aktiv ist. Verschiedene Studien haben bereits die Bedeutung von ADAM10 für die Bildung von sAPP $\alpha$  und somit für die Reduktion von A $\beta$ -Peptiden gezeigt (Colciaghi et al., 2002; Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010; Postina et al., 2004; Tyler et al., 2002). So konnte bei Alzheimer Patienten beispielsweise eine verringerte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität im temporalen Kortex und ein verringerter sAPP $\alpha$ -Level in der Zerebrospinalflüssigkeit (*cerebrospinal fluid*, CSF) nachgewiesen werden (Colciaghi et al., 2002; Tyler et al., 2002). Es wird suggeriert, dass dieses lösliche Fragment von APP bedeutend für das Überleben sowie die Plastizität neuronaler Zellen ist und wichtige Funktionen in der Entwicklung des ZNS übernimmt (Caille et al., 2004; Furukawa et al., 1996; Mattson, 1997; Meziane et al., 1998; Ohsawa et al., 1999; Ring et al., 2007). Die Prozessierung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase verhindert mit ihrem Schnitt innerhalb der A $\beta$ -Sequenz (s. Abbildung 3) folglich nicht nur die Entstehung des A $\beta$ -Peptids, sondern hat sogar neuroprotektive Effekte.

Im Gegensatz zum nicht-amyloidogenen Weg, der unter physiologischen Bedingungen vorwiegend abläuft (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990; Wang and Lehmann, 1991), entstehen bei der Prozessierung von APP über den amyloidogenen Weg A $\beta$ -Peptide (Selkoe, 1999; Seubert et al., 1993). Hierbei erfolgt die Spaltung von APP im ersten Schritt durch die Aspartylprotease BACE1 ( *$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme 1*), welche als Haupt- $\beta$ -Sekretase gilt (Cai et al., 2001; Haass, 2004; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE1-Expression wurde vorwiegend im TGN sowie in Endosomen mit saurem Milieu nachgewiesen. Da das Aktivitätsoptimum dieser Sekretase gerade im aziden pH-Bereich liegt, findet die Prozessierung von APP durch BACE1 nahezu ausschließlich intrazellulär statt. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die enzymatische Spaltung von APP durch

diese  $\beta$ -Sekretase nach Internalisierung von APP von der Zelloberfläche, in endosomalen Kompartimenten abläuft (Das et al., 2014; Golde et al., 1992; Haass et al., 1992; Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1999). Durch das Schneiden von BACE1 wird APP in das lösliche N-Terminale Fragment sAPP $\beta$  und das membranständige CTF $\beta$  mit 99 Aminosäureresten (auch C99 genannt) gespalten (Pietrzik and Behl, 2005; Selkoe, 1999, 2001; Seubert et al., 1992; Zhang et al., 2011). Letzteres wird wiederum durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert, wobei die AICD freigesetzt wird (s. Abbildung 3). Jedoch entstehen bei dieser Spaltung, je nachdem, an welcher Position die  $\gamma$ -Sekretase schneidet, A $\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge, wie u.a. A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> (Haass and Selkoe, 2007; Qi-Takahara et al., 2005; Sastre et al., 2001; Takami et al., 2009; Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2004). Aufgrund ihrer Rolle in der Entstehung dieser pathologisch relevanten Peptide, stellt die Sekretase BACE1 den Hauptansatzpunkt für die medikamentöse Behandlung von Alzheimer dar. Allerdings würde die vollständige Inhibierung dieser Sekretase mehrere unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Da BACE1 neben APP viele andere Substrate enzymatisch spaltet, ist die Sekretase auch an physiologischen Prozessen, wie u.a. der Myelinisierung von Axonen oder der neuronalen Konnektivität, beteiligt (Cheret et al., 2013; Fleck et al., 2012; Hu et al., 2006; Lichtenthaler, 2013; Vassar et al., 2009, 2014; Willem et al., 2006). Somit ist die Analyse weiterer Ansatzpunkte für eine mögliche Therapie der Alzheimer-Erkrankung von Bedeutung.

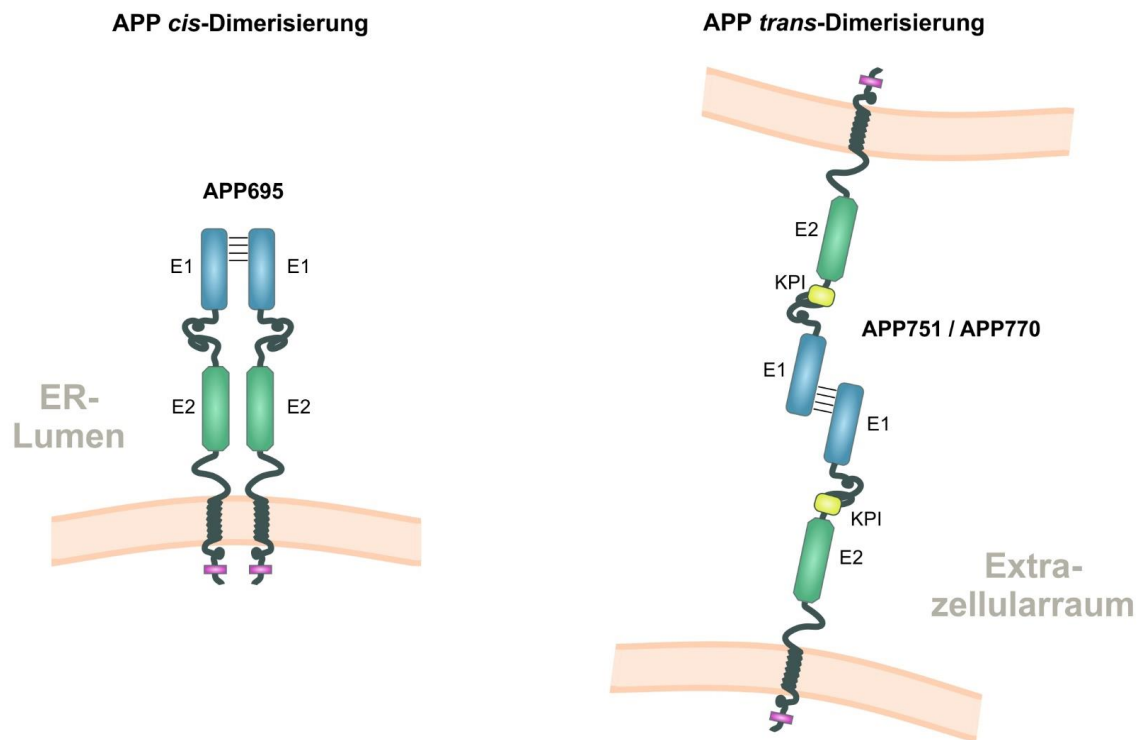
Vor Kurzem wurde Meprin  $\beta$ , eine weitere Zink-Metalloproteinase aus der Familie der Astazin-Proteasen und Mitglied der Metinzin-Superfamilie (Sterchi et al., 2008), als APP-prozessierende Sekretase identifiziert (Jefferson et al., 2011). Die phylogenetisch mit Matrixmetalloproteinasen verwandten Meprins (*Metallo-endoprotease from renal tissue*) wurden erstmals als hoch exprimierte Proteine in Niere und Darm beschrieben (Beynon et al., 1981). Meprin  $\beta$  formt über Disulfidbrücken verknüpfte Homodimere (Bertenshaw et al., 2003; Kruse et al., 2004) und ist vorwiegend membrangebunden, kann jedoch durch die Abspaltung der Ektodomäne von der Plasmamembran freigesetzt werden (Hahn et al., 2003). Die Protease wird bei Menschen in vielen Geweben, u.a. auch im Gehirn, exprimiert (Becker-Pauly et al., 2007; Kronenberg et al., 2010; Kruse et al., 2004; Schütte et al., 2007; Sterchi et al., 2008; Vizcaíno et al., 2009) und schneidet präferiert an sauren Aminosäureresten (Becker-Pauly et al., 2011; Bertenshaw et al., 2001). Neuere Studien haben gezeigt, dass die Spaltung von APP durch Meprin  $\beta$  zu N-terminal verkürzten A $\beta$ -Peptiden führt (Bien et al., 2012;



Jefferson et al., 2011). Diese trunkierten A $\beta$ -Varianten beginnen mit dem Alanin an Position 2 (P2) der A $\beta$ -Sequenz (s. Abbildung 3) und weisen eine starke Tendenz zur Aggregation auf (Bien et al., 2012). Verkürzte A $\beta$ -Peptide, die nicht mittels Prozessierung von APP durch BACE1 entstehen können (Citron et al., 1996; Vassar et al., 1999), wurden bereits in Patienten mit Alzheimer beschrieben (Becker et al., 2013; Bibl et al., 2012; Bouter et al., 2013; Jawhar et al., 2011; Lewczuk et al., 2004a, 2004b; Maler et al., 2007; Wiltfang et al., 2001; Wirths et al., 2010). Die Produktion von A $\beta_{2-40}$  und A $\beta_{2-42}$  durch die Spaltung von endogenem APP in den Gehirnen von Mäusen unterstreicht die Bedeutung von Meprin  $\beta$  an diesem Prozess (Bien et al., 2012; Jefferson et al., 2011; Schönherr et al., 2016). Somit deutet die Tatsache, dass sie ihre Aktivität unabhängig von BACE1 noch vor der Endozytose von APP von der Zelloberfläche ausübt, darauf hin, dass Meprin  $\beta$  eine alternative Protease für die amyloidogene Prozessierung von APP ist (Bien et al., 2012; Schönherr et al., 2016). Meprin  $\beta$  ist folglich möglicherweise an der Bildung der die Alzheimer Krankheit kennzeichnenden Plaques sowie an der physiologischen Spaltung von APP beteiligt.

### 3.2.4 APP-Dimerisierung

Neben der Relevanz für die Bildung von A $\beta$ -Peptiden und der damit einhergehenden Pathogenese der Alzheimer Krankheit spielt APP auch in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Verschiedene Analysen haben gezeigt, dass APP u.a. an der intrazellulären Signaltransduktion, der trophischen Aktivität in Neuronen und an Synapsen sowie an der synaptischen und interzellulären Adhäsion beteiligt ist (Baumkötter et al., 2012; Müller and Zheng, 2012). Dabei scheint auch der Dimerisierung von APP eine besondere Rolle zuzukommen. Neuere Studien belegen, dass APP sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit seinen beiden Paralogen (APLP1 und 2) bilden kann. Die Oligomerisierung von APP erfolgt entweder in *cis*- oder in *trans*-Orientierung (Baumkötter et al., 2014; Isbert et al., 2012; Kaden et al., 2008; Klevanski et al., 2014; Munter et al., 2007; Scheuermann et al., 2001; Soba et al., 2005; Stahl et al., 2014; Wang et al., 2009) (s. Abbildung 4) und findet vermutlich auch *in vivo* statt, worauf der Nachweis von APP-Dimeren in Mäusegehirnen hindeutet (Schmidt et al., 2012).



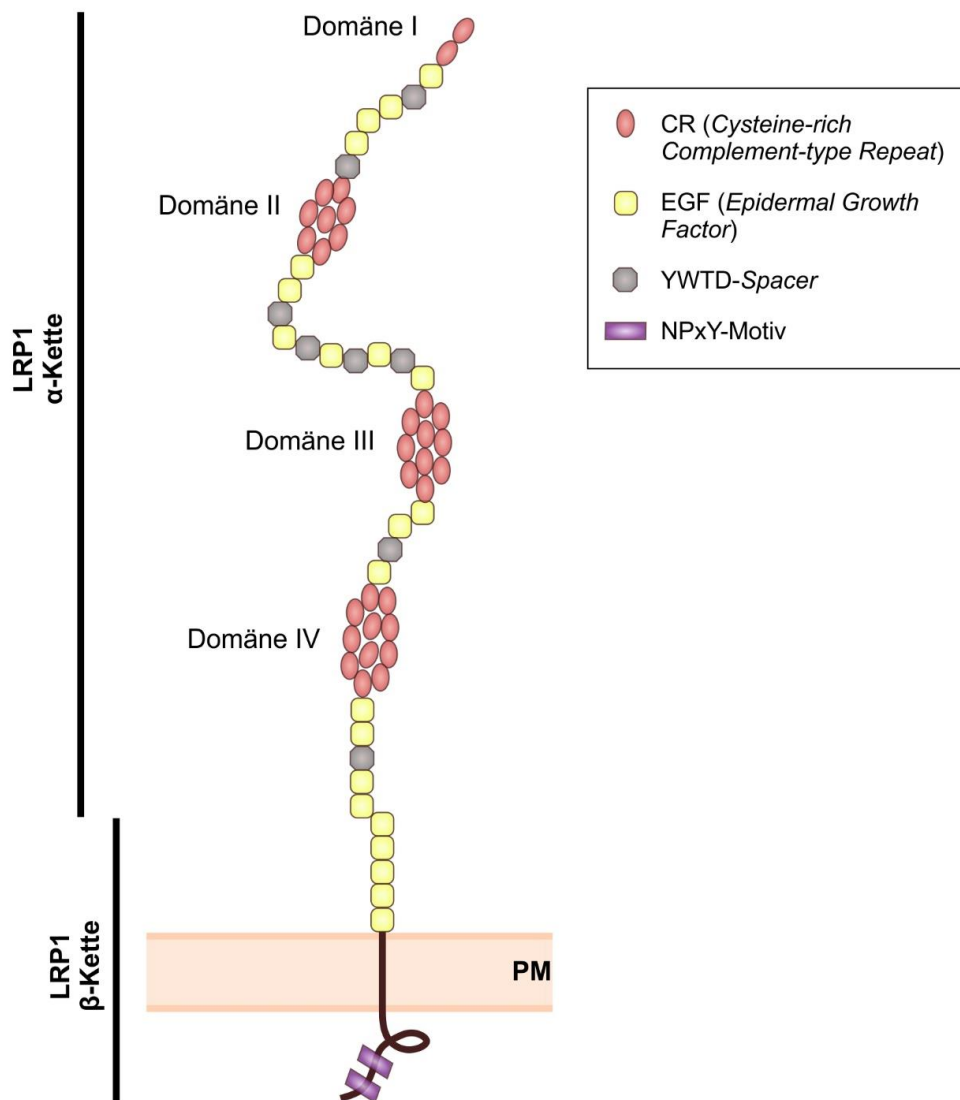
**Abbildung 4: APP-Dimerisierung.** Schematische Darstellung der APP-Dimerisierung über die E1-Domäne in *cis*- (links) oder *trans*-Orientierung (rechts).

Abgesehen von der E1-Domäne, die hauptsächlich an der Dimerisierung beteiligt ist (Baumkötter et al., 2014; Hoefgen et al., 2014; Kaden et al., 2008; Soba et al., 2005; Wang et al., 2009), können auch die E2-Domäne (Lee et al., 2011; Wang et al., 2005; Wang and Ha, 2004; Xue et al., 2011) sowie die Transmembrandomäne (Decock et al., 2016; Munter et al., 2007; Nadezhdin et al., 2012; Song et al., 2013) zu diesem Prozess beitragen. *Trans*-Dimerisierung von APP beeinflusst vorwiegend die Organisation von Synapsen und fördert somit die synaptische Adhäsion (Baumkötter et al., 2014; Isbert et al., 2012; Klevanski et al., 2014; Soba et al., 2005; Stahl et al., 2014; Wang et al., 2005, 2009). Um Zell-Zell-Kontakte zu ermöglichen, erfolgt diese Variante der Oligomerisierung vermutlich an der Zelloberfläche (Baumkötter et al., 2014; Isbert et al., 2012). Hierbei sind v.a. die längeren APP-Isoformen, APP751 und APP770, involviert. Im Gegensatz dazu tritt die APP *cis*-Dimerisierung nur bei APP695 auf und findet bereits im ER statt (Isbert et al., 2012). Ihr wird eine Rolle in der Prozessierung von APP durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen zugesprochen (Eggert et al., 2009; Jung et al., 2014; Kaden et al., 2008; Libeu et al., 2012; Munter et al., 2007, 2010; Richter et al., 2010; Schmidt et al., 2012; So et al., 2012). So wird postuliert,

dass der Oligomerisierungszustand von APP einen kooperativen Effekt auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen hat und sich damit auf die Prozessivität dieser allosterischen Enzyme auswirkt (Schmidt et al., 2012). Hierbei wurde auch die Beteiligung von SORLA (*Sortilin-related Receptor with A-type Repeats*), einem neuronalen Rezeptor, der den intrazellulären Transport und die Prozessierung von APP kontrolliert (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006; Schmidt et al., 2007), nachgewiesen (Schmidt et al., 2012). Somit könnten auch andere derartige Rezeptoren, wie beispielsweise LRP1, Einfluss auf die Lokalisation und die Prozessierung von APP-Dimeren haben.

### **3.3 Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1)**

LRP1 gehört zur *Low Density Lipoprotein Receptor* (LDLR) –Familie und stellt mit einem Molekulargewicht von ca. 600 kDa einen der größten, bekannten Membranrezeptoren dar (Herz et al., 1988; Herz and Strickland, 2001; Krieger and Herz, 1994). Dieser Rezeptor wird als einzelne Polypeptidkette im ER synthetisiert und im TGN durch Furin in zwei Untereinheiten gespalten. Dabei entstehen eine schwere Kette (515 kDa,  $\alpha$ -Kette) und eine leichte Kette (85 kDa,  $\beta$ -Kette), die jedoch nicht-kovalent miteinander verbunden bleiben (Herz et al., 1990) (s. Abbildung 5). Die  $\alpha$ -Untereinheit enthält vier Liganden-Bindedomänen (Domäne I-IV; Herz et al., 1988) mit 2, 8, 10 bzw. 11 CRs (*cysteine-rich Complement-type Repeats*). Diese sind durch weitere extrazelluläre Wiederholungseinheiten von EGF (*Epidermal Growth Factor*) und die YWTD-*Spacer* voneinander getrennt. Die leichte Kette von LRP1 setzt sich dagegen aus der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen C-Terminus mit zwei NPXY-Motiven zusammen (Cam and Bu, 2006; Herz and Strickland, 2001) (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1).** Schematische Darstellung der extrazellulären  $\alpha$ -Kette mit den vier extrazellulären Protein-Bindedomänen (Domäne I-IV), die über EGF-Wiederholungseinheiten und YWTD-Spacer verbunden sind, und der die Plasmamembran (PM) durchspannenden  $\beta$ -Kette von LRP1 mit den intrazellulären NPxY-Motiven.

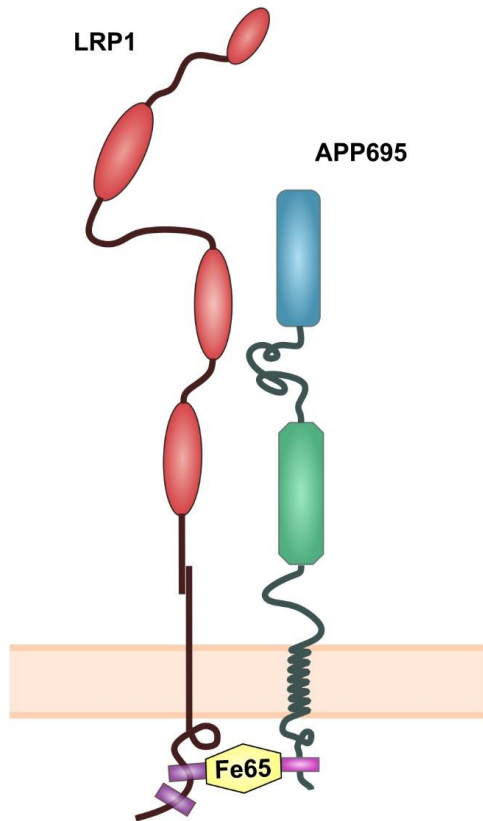
Das zweite NPxY-Motiv (NPxY2) im C-Terminus von LRP1 ist für dessen Internalisierung entscheidend (Gordts et al., 2012; Li et al., 2000; Reekmans et al., 2010; Roebroek et al., 2006). LRP1 gelangt bei diesem Prozess, ggf. zusammen mit seinem gebundenen Liganden, über durch *coated pits* entstandene Vesikel von der Zelloberfläche ins Endosom (Chen et al., 1990). Von dort wird es entweder in einem stetigen Zyklus recycled und zurück zur Plasmamembran transportiert oder aber im

Lysosom abgebaut (Brown and Goldstein, 1986). LRP1 bindet über 30 strukturell und funktionell unterschiedliche Liganden vorwiegend über die Domänen II und IV (Bu et al., 2006; Jäger and Pietrzik, 2008; Neels et al., 1999). Daher ist dieser Multiligandenrezeptor, der zudem in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird, an verschiedensten biologischen Abläufen beteiligt. Diese umfassen u.a. Signaltransduktion, Schutz von Blutgefäßen, Lipid-Metabolismus, axonalen Transport oder die Beseitigung von A $\beta$ -Peptiden aus dem Gehirn (Cam and Bu, 2006; Jäger and Pietrzik, 2008; Lillis et al., 2008; Storck et al., 2016). Zu den Liganden von LRP1 zählen auch einige, die im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit stehen, wie beispielsweise das Apolipoprotein E (apoE), A $\beta$ , aber auch dessen Vorläuferprotein APP selbst (Cam and Bu, 2006; Jäger and Pietrzik, 2008).

### **3.3.1 Interaktion von LRP1 und APP**

Schon früh wurde angenommen, dass LRP1 eine Rolle in der Pathogenese von Alzheimer spielt, indem es mit APP interagiert und dessen Abbau vermittelt (Knauer et al., 1996; Kounnas et al., 1995). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass LRP1 den zellulären Transport von APP und damit dessen Prozessierung verändert, in Richtung der vermehrten Spaltung durch BACE1 (Golde et al., 1992; Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Pietrzik et al., 2002, 2004; Ulery et al., 2000). Dieser Effekt beruht vermutlich auf der gemeinsamen Internalisierung von APP und LRP1. Dies wurde in LRP1-defizienten Zellen durch einen Anstieg der sAPP $\alpha$ -Produktion und durch die Akkumulation von APP an der Zelloberfläche aufgrund der Hemmung der LRP1-Endozytose bekräftigt (Cam et al., 2005; Pietrzik et al., 2002). LRP1 interagiert mit APP entweder direkt über die Bindung der KPI-Domäne (Herz and Strickland, 2001; Knauer et al., 1996) im extrazellulären N-Terminus der längeren APP-Isoformen oder, z.B. im Falle von APP695, indirekt über Adapterproteine, die an die zytoplasmatischen Termini beider Proteine binden. Hierbei ist das Adapterprotein Fe65 von Bedeutung (s. Abbildung 6), das mit Hilfe seiner proximalen Phosphotyrosin-Interaktionsdomäne (PID) mit LRP1 und über die distale PID mit APP interagiert. Kommt es zur Assemblierung des trimeren Komplexes, kann dieser im Folgenden über die Clathrin-vermittelte Endozytose von der Zelloberfläche internalisiert werden (Kinoshita et al., 2001; Pietrzik et al., 2002, 2004; Trommsdorff et al., 1998). APP kann so der amyloidogenen Prozessierung durch BACE1 in endosomalen

Zellkompartimenten zugeführt werden. Damit hat die LRP1-Expression einen direkten Einfluss auf die proteolytische Spaltung von APP.



**Abbildung 6: LRP1-APP-Interaktion.** Schematische Darstellung der Interaktion von LRP1 mit APP695 über die zytosolischen NPxY-Motive beider Proteine, bei der das Adapterprotein Fe65 eine entscheidende Rolle spielt.

Die Interaktion von LRP1 und APP findet nicht nur innerhalb des endozytotischen, sondern auch im frühen sekretorischen Weg statt. Bereits vor der Spaltung durch Furin im TGN konnte LRP1 durch Immunpräzipitation im Komplex mit APP nachgewiesen werden (Pietrzik et al., 2004). Zudem führte die Expression eines verkürzten LRP1-Konstruktes (LRP1-CT; Pietrzik et al., 2002), das zwar mit APP interagieren, aber aufgrund des Retentionsmotivs KKAA das ER nicht verlassen konnte, zu einer Abnahme von APP sowie von APP-CTFs an der Zelloberfläche und damit einhergehend zur verringerten A $\beta$ -Sekretion (Waldron et al., 2008). Somit spielt LRP1 nicht nur für die Prozessierung, sondern auch für den Transport von APP eine wichtige Rolle und ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Studien.

## 4 Zielsetzung der Arbeit

APP und LRP1 stellen seit Jahrzehnten die Grundlage unzähliger Studien zur Entstehung der Alzheimer Krankheit dar. Trotz der vielseitig diskutierten Beteiligung dieser beiden Proteine an der Generierung von A $\beta$ -Peptiden ist deren genaue Rolle in der Pathogenese von Alzheimer bislang nicht vollständig geklärt. Neuere Studien, die belegen, dass die Homodimerisierung von APP Einfluss auf die A $\beta$ -Produktion haben kann (Eggert et al., 2009; Munter et al., 2007; Scheuermann et al., 2001), eröffnen einen weiteren Gesichtspunkt für die Komplexität dieses Themas. Da APP-Dimere interessanterweise *in vivo* in den Gehirnen von Mäusen nachgewiesen wurden (Schmidt et al., 2012), sollte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, ob diese tatsächlich in Neuronen gebildet und dort eventuell sogar prozessiert werden. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände sowie die Lysate von mit APP695 transfizierten kortikalen Primärneuronen aus C57BL/6-Mäusen auf die Dimer-Expression untersucht.

Weiterhin lag das Augenmerk dieser Studie insbesondere auf der Analyse der proteolytischen Spaltung von APP-Dimeren. Da LRP1 bereits mehrfach eine Rolle in der Prozessierung und dem Transport von monomeren APP-Proteinen zugeschrieben wurde (Cam et al., 2005; Knauer et al., 1996; Pietrzik et al., 2002, 2004; Ulery et al., 2000; Waldron et al., 2008), sollte hier der Einfluss von LRP1 auf dimeres APP in diesem Zusammenhang untersucht werden. Hierfür wurden CHO K1- und LRP1-defiziente CHO 13-5-1-Zellen (*Chinese Hamster Ovary cells*) verwendet, die transient oder stabil mit einem APP-Dimer-Konstrukt transfiziert waren. Dieses APP695 K587C-Expressionskonstrukt führt aufgrund einer Mutation in der E2-Domäne von APP zu einer gesteigerten Dimerisierung zweier mutanter APP-Moleküle (s. Abbildung 8). Zudem wurden kortikale Primärneurone aus Mäusen mit 5xFAD-Hintergrund und mit einem von loxP-Stellen flankierten *Lrp1*-Gen genutzt, in denen durch Zugabe einer Cre-Rekombinase die Exzision von *Lrp1* induziert wurde. In diesen Zellkulturmodellen wurden mittels Western Blot- und *Pulse-Chase*-Analysen die Auswirkungen des Fehlens von LRP1 auf die Expression, den Transport und die Prozessierung von APP-Dimeren eruiert.

Zudem sollten die an der proteolytischen Spaltung von APP-Dimeren beteiligten Proteasen analysiert werden. Neben den das APP-Dimer-Konstrukt stabil

exprimierenden CHO-Zellen wurden dafür auch transient mit diesem Plasmid transfizierte HEK293T-Zellen (*Human Embryonic Kidney cells*) verwendet. Mit Hilfe eines ADAM10-Inhibitors und der Überexpression von Meprin  $\beta$  wurde die Bedeutung dieser Sekretasen auf die Bildung von dimerisierten sAPP-Fragmenten ermittelt.

Zuletzt sollte festgestellt werden, ob die Effekte, die im Zellkulturmodell nachgewiesen wurden, auch *in vivo* relevant sind. Hierfür wurde die Menge an sAPP-Dimeren in der Zerebrospinalflüssigkeit von 5xFAD-Mäusen, die LRP1 exprimierten, mit der von Tieren mit induziertem *Lrp1-Knockout* verglichen.



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Chemikalien

|  |   |
|--|---|
| 1 kb DNA-Ladder                                  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA   |
| 6 x DNA-Ladepuffer                               | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland             |
| 10 x Key Buffer (Genotypisierungs-PCR)           | VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA            |
| 30 % Acrylamid 37,5:1 Bis-Acrylamid              | National Diagnostics, Patton, Atlanta, USA              |
| 40 % Acrylamid 19:1 Bis-Acrylamid                | BioRad, München, Deutschland                            |
| 40 % Acrylamid 29:1 Bis-Acrylamid                | National Diagnostics, Patton, Atlanta, USA              |
| 100 bp DNA-Ladder                                | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA   |
| Agar   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Agarose  | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Alpha-Modified Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) | Lonza, Basel, Schweiz                                   |
| Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)             | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                 |
| Ammoniumpersulfat (APS)                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                 |
| $\beta$ -Glycerophosphat                         | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                 |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                         | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| B27-Supplement                                   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA   |
| Bicin  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Bis-Tris   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |

|   |  |
|---|--|
| Bovines Serum Albumin (BSA)                               | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland   |
| Borsäure  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Bromphenolblau  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )                       | Merck, Darmstadt, Deutschland  |
| Chloroquine   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland   |
| Chlorwasserstoff (HCl)                                    | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland   |
| Clal  | New England Biolabs, Frankfurt,<br>Deutschland   |
| CutSmart Puffer (10 x)                                    | New England Biolabs, Frankfurt,<br>Deutschland   |
| Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) -Mix                | New England Biolabs, Frankfurt,<br>Deutschland   |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland   |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)<br>DMEM -Cys/-Met | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland<br>Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| Dynabeads® M-280 Sheep Anti-Mouse IgG                     | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA                                       |
| EasyTag™ EXPRESS35S Protein Labeling<br>Mix               | PerkinElmer, Waltham,<br>Massachusetts, USA  |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                       | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Ethanol   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Ethanol (70 %)  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Ethidiumbromid (EtBr)                                     | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland   |
| Essigsäure  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Fötales Kälberserum (FCS)                                 | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland   |
| GlutaMAX™ Supplement                                      | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA                                       |
| Glycerin  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |

|   |  |
|---|--|
| Glycin  | Merck, Darmstadt, Deutschland                            |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)  | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Harnstoff   | Applichem, Darmstadt, Deutschland                        |
| Hefeextrakt   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| HEPES   | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                       |
| HindIII   | New England Biolabs, Frankfurt,<br>Deutschland           |
| Hydrochloric acid (HCl)   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Isofluran Forene®   | Abott, Wiesbaden, Deutschland                            |
| Isopropanol   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Kaliumchlorid (KCl)   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland               |
| Natriumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                                | Merck, Darmstadt, Deutschland                            |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )   | VWR International, Radnor,<br>Pennsylvania, USA          |
| MES-SDS Elektrophoresepuffer  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Methanol  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Milchpulver (fettfreie Milch)   | Kroger, Cincinnati, Ohio, USA                            |
| Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )   | Merck, Darmstadt, Deutschland                            |
| Natriumfluorid (NaF)  | Merck, Darmstadt, Deutschland                            |
| Natriumchlorid (NaCl)   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Natriumdeoxycholat  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)  | BioRad, München, Deutschland                             |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat<br>(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O) | Merck, Darmstadt, Deutschland                            |
| Natriumhydroxid (NaOH)  | Merck, Darmstadt, Deutschland                            |
| Natriumpyruvat  | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland               |
| Neurobasalmedium (NBS)  | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| NeutrAvidin Agarose Resin Beads   | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| Nonidet P40   | Roche, Mannheim, Deutschland                             |

|   |  |
|---|--|
| PCR-Marker                                      | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland                    |
| Phosphat-gepufferte Saline (PBS)                | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                          |
| Phusion® HF Reaction Buffer                     | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland                    |
| Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase           | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland                    |
| Polyethylenimin (PEI)                           | Polysciences Europe, Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland |
| Polybrene                                       | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                        |
| Poly-L-ornithin                                 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                        |
| cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten | Roche, Mannheim, Deutschland                                   |
| Protein G Agarose Beads                         | Roche, Mannheim, Deutschland                                   |
| RotiLoad® (4 x Protein-Ladepuffer)              | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              |
| Saccharose                                      | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                        |
| Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              |
| Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin                          | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA          |
| Synthetic A $\beta$ peptides                    | VCPBIO, China  |
| T4 DNA-Ligase                                   | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland                    |
| T4 DNA-Ligase Puffer (10 x)                     | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland                    |
| TEMED (N,N,N+,N+-Tetramethyldiamine)            | BioRad, München, Deutschland                                   |
| Tris-Acetat                                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              |
| Tris-Base (Tris-OH)                             | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              |
| Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)                    | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              |
| Triton X-100                                    | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                        |

|             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| Trypanblau  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Trypsin     | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Trypton     | BD, Heidelberg, Deutschland        |
| Tween-20    | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| X-tremeGENE | Roche, Mannheim, Deutschland       |

### 5.1.2 Antibiotika

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Ampicillin                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland               |
| Blasticidin                         | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland               |
| Hygromycin B                        | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |

### 5.1.3 Arzneimittel und andere Materialien

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 4-Hydroxytamoxifen                    | Sigma-Aldrich, Taufkirchen,<br>Deutschland               |
| Chromatographie Papier (Filterpapier) | GE Healthcare Life Sciences,<br>Freiburg, Deutschland    |
| GI254023X (ADAM10-Inhibitor)          | bereitgestellt von Dr. L., TU<br>Aachen, Deutschland     |
| Nitrozellulose-Membranen              | Hartenstein, Würzburg,<br>Deutschland                    |
| Nitrozellulose-Membranen              | GE Healthcare Life Sciences,<br>Freiburg, Deutschland    |
| NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gele    | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| PVDF-Membranen                        | Millipore, Schwalbach, Deutschland                       |
| Tamoxifen (CreActive TAM400)          | LASvendi, Soest, Deutschland                             |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Tat-Cre-Rekombinase             | bereitgestellt von Dr. R. E. V.; VIB,<br>Gent, Belgien   |
| Whatman™ Chromatographie Papier | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |

### 5.1.4 Puffer und Lösungen

#### Anoden-Puffer (pH 8,1)

200 mM Tris-Base  
50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### Blot-Puffer

1,92 M Glycin  
250 mM Tris-Base  
20 % (v/v) Methanol  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### Blot-Puffer A

210 mM Tris-Base  
30 % (v/v) Methanol  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### Blot-Puffer B

25 mM Tris-Base  
30 % (v/v) Methanol  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### Blot-Puffer C

25 mM Tris-Base  
5 mM Borsäure  
0,025 % SDS  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### 5 x IP-Puffer

750 mM NaCl  
250 mM HEPES/NaOH pH7,4  
1 x PI  
2,5 % (v/v) Nonidet P40  
0,25 % (w/v) SDS  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### Kathoden-Puffer (pH 8,2)

200 mM Bicin  
100 mM NaOH  
0,25 % (w/v) SDS  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

#### LB-Medium (pH 7,5)

1 % (w/v) Trypton  
1 % (w/v) NaCl  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

Lysepuffer (pH 12)

25 mM NaOH  
0,2 mM EDTA  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

Neutralisationspuffer

40 mM Tris-HCl  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

NP40-Lysepuffer

150 mM NaCl  
50 mM Tris-Base pH 8,0  
1 % (v/v) Nonidet P40  
0,02 % (v/v) NaN<sub>3</sub>  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

1 x PAP

360 mM Bis-Tris  
160 mM Bicin  
15 % (w/v) Saccharose  
1 % (w/v) SDS  
0,0075 % (w/v) Bromphenolblau  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

10 x PBS (pH 7,4)

1,37 M NaCl  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O  
27 mM KCl  
18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

RIPA-Lysepuffer

150 mM NaCl  
50 mM Tris-Base pH 8,0  
10 mM NaF  
1 mM β-Glycerophosphat  
1 % (v/v) Nonidet P40  
0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat  
0,1 % (w/v) SDS  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

4xSDS-Probenpuffer

200 mM Tris-HCl pH 6,8  
40 % (v/v) Glycerin  
8 % SDS  
0,08 % Bromphenolblau  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

TAE-Puffer

400 mM Tris-Base  
10 mM EDTA  
1 % Essigsäure  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

10 x TBS (pH 7,4)

1,37 M NaCl  
250 mM Tris-Base  
27 mM KCl  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

TBST

137 mM NaCl  
25 mM Tris-Base  
2,7 mM KCl  
0,05 % (v/v) Tween-20  
Gelöst in VE-H<sub>2</sub>O

### 5.1.5 Zellen

Tabelle 1: Verwendete, immortalisierte Zelllinien

| Zelllinie       | Zelltyp                                      | Referenz                  | Kulturmedium                                       |
|-----------------|--|---------------------------|--|
| HEK293T         | humane, embryonale Nierenzellen              | (Graham et al., 1977)     | DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1 % Natriumpyruvat  |
| CHO K1          | Ovarzellen des Chinesischen Streifenhamsters | (Puck et al., 1958)       | α-MEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1 % Natriumpyruvat |
| CHO 13-5-1      | Ovarzellen des Chinesischen Streifenhamsters | (FitzGerald et al., 1995) | α-MEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1 % Natriumpyruvat |
| CHO K1 K587C    | Ovarzellen des Chinesischen Streifenhamsters | neu hergestellt           | α-MEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1 % Natriumpyruvat |
| CHO 13-5- K587C | Ovarzellen des Chinesischen Streifenhamsters | neu hergestellt           | α-MEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1 % Natriumpyruvat |



## 5.1.6 Plasmide

Tabelle 2: Verwendete DNA-Konstrukte

| DNA-Konstrukte          | Beschreibung                                  |
|-------------------------|---|
| pLBCX                   | Leervektor pLBCX                              |
| pLBCX-Meprin $\beta$    | Vektor pLBCX mit Meprin $\beta$ -DNA          |
| pLHCX                   | Leervektor pLHCX                              |
| pLHCX-APP695wt          | Vektor pLHCX mit wildtypischem APP695         |
| pLHCX-APP695 K587C      | Vektor pLHCX mit Cys-Mutante von APP695       |
| pLHCX-APP695 K587C NGYE | Vektor pLHCX mit APP-Internalisierungsmutante |

## 5.1.7 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper (WB = Western Blot; IP = Immunpräzipitation)

| Antigen           | Name   | Spezies   | Typ        | Verdünnung                 | Anbieter / Referenz  |
|-------------------|--------|-----------|------------|----------------------------|--|
| APP N-Terminus    | 1G75A3 | Maus      | monoklonal | 1:3.000 (WB)<br>1:300 (IP) | bereitgestellt von Dr. K., <i>UC San Diego School of Medicine, USA</i> |
| LRP1 C-Terminus   | 1704   | Kaninchen | polyklonal | 1:10.000 (WB)              | Pietrzik 2002  |
| APP N-Terminus    | 22C11  | Maus      | monoklonal | 1:1.000 (WB)               | Millipore, Schwalbach, Deutschland                                     |
| $\beta$ -Aktin    | Aktin  | Kaninchen | polyklonal | 1:1.000 (WB)               | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland                                |
| A $\beta$ -Peptid | IC16   | Maus      | monoklonal | 1:500 (WB)<br>1:100 (IP)   | Jäger 2009   |

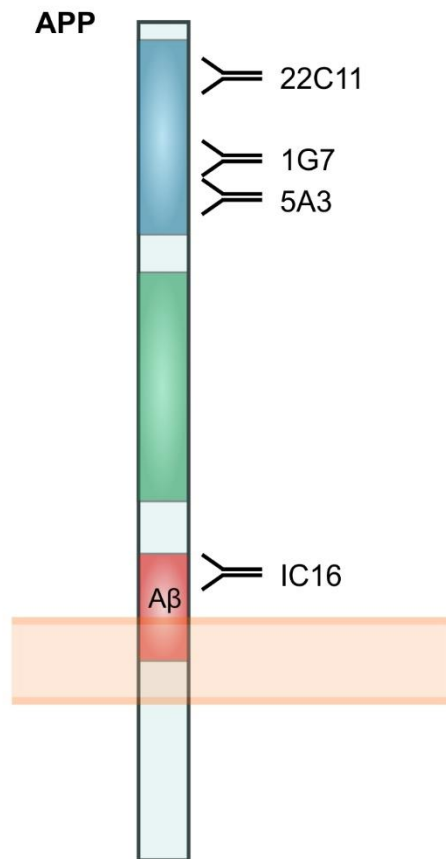


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Binder der Primär-Antikörper an APP.

Tabelle 4: Verwendete Sekundär-Antikörper (WB = Western Blot)

| Antigen          | Name             | Spezies | Konjugat | Verdünnung   | Anbieter                                      |
|------------------|------------------|---------|----------|--------------|---|
| Maus IgG         | donkey<br>@mouse | Esel    | HRP      | 1:3.000 (WB) | Sigma-Aldrich,<br>Taufkirchen,<br>Deutschland |
| Kaninchen<br>IgG | goat<br>@rabbit  | Ziege   | HRP      | 1:5.000 (WB) | Sigma-Aldrich,<br>Taufkirchen,<br>Deutschland |

### 5.1.8 Kits

|  |   |
|--|---|
| <i>Immobilion™ Western HRP Substrate Reagents</i>            | Millipore, Schwalbach, Deutschland                    |
| <i>Endotoxin-free Plasmid DNA Purification</i>               | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland                    |
| <i>NucleoSpin Extract II-PCR clean-up and gel extraction</i> | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland           |
| <i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>                          | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

### 5.1.9 Laborgeräte

|   |   |
|---|---|
| Agarose-Gelelektrophorese-Kammer<br><i>Anthos plate reader 2010</i> | Biometra, Göttingen, Deutschland<br>Anthos Labtec, Salzburg, Österreich |
| Bakterieninkubator IncuCell   | Binder, Tuttlingen, Deutschland   |
| Bildanalyse-System LAS-3000 mini FujiFilm                           | Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland                                       |
| BioPhotometer plus UV/vis   | Eppendorf, Hamburg, Deutschland   |
| CO <sub>2</sub> Inkubator Excella Eco-170                           | New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland                        |
| CO <sub>2</sub> Inkubator HeraCell 240i                             | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA                   |
| Cyclone® Plus Storage Phosphor System                               | PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA                                |
| Falcon Cellstar   | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland                             |
| Gefrierschrank (-20°C)  | Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland                                     |
| Gefrierschrank (-80°C)  | Heraeus, Hanau, Deutschland   |
| Glasware  | Schott, Mainz, Deutschland  |
| Heizblock Thermomixer 5436  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland   |
| Kippschüttler Unitwist-RT-Schüttler                                 | Uniequip, Planegg, Deutschland  |
| Kryoröhrchen  | Nunc, Wiesbaden, Deutschland  |

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Kühlschrank (+4°C)                  | Liebherr, Ochsenhausen,<br>Deutschland           |
| Laminar-Flow Einheit HERasafe       | Heraeus, Hanau, Deutschland                      |
| Laminar-Flow Einheit BIOAIR         | EuroClone S.p.A., Mailand, Italien               |
| Lichtmikroskop                      | Olympus, Hamburg, Deutschland                    |
| Lichtmikroskop Axiovert 25          | Zeiss, Oberkochen, Deutschland                   |
| Magnetrührer MR 3000 D              | Heidolph, Schwabach, Deutschland                 |
| Mikrowelle Micromaxx MM 6460        | Micromaxx  |
| Model 583 Gel Dryer                 | BioRad, München, Deutschland                     |
| NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gekassetten | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland               |
| Pasteurpipetten                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                |
| pH-Meter                            | Mettler Toledo, Gießen,<br>Deutschland           |
| Pipetten (0,1 – 1000 µl)            | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                  |
| Pipetten (steril) Cellstar          | Greiner Bio-One, Frickenhausen,<br>Deutschland   |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml              | Hartenstein, Würzburg,<br>Deutschland            |
| T3 Thermocycler                     | Biometra, Göttingen, Deutschland                 |
| UV Photosystem                      | Intas Science Imaging, Göttingen,<br>Deutschland |
| Waage Mettler P1200                 | Mettler Toledo, Gießen,<br>Deutschland           |
| Wasserbad GFL1086                   | GFL, Burgwedel, Deutschland                      |
| Wecker                              | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                |
| Zellspachtel                        | TPP, Trasadingen, Schweiz                        |
| Zentrifuge Eppendorf 5415D          | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                  |
| Zentrifuge Hettich Mikro 200R       | Hettich, Tuttlingen, Deutschland                 |
| Zentrifuge Hettich Unuversal 32     | Hettich, Tuttlingen, Deutschland                 |
| Zentrifuge Heraeus Fresco           | Kendro, Langenselbold,<br>Deutschland            |
| Zentrifuge Sorvall RC5B             | Kendro, Langenselbold,<br>Deutschland            |

### 5.1.10 Software

ADAP

Adobe Photoshop CS3

CorelDRAW X6/7

Graph Pad Prism 4

ImageJ 1.44, NIH

Mendeley Desktop

Microsoft Office 2010

Multi Gauge V3.0

OptiQuant™

SECentral 7.0

SnapGene® Viewer 3.3.3

### 5.1.11 Tiere und Tierhaltung

Die verwendeten Mäuse (s. Tabelle 5) wurden in Gruppen aus bis zu fünf Tieren in Standard-Käfigen aus durchsichtigem Plastik in der Einrichtung für Versuchstiere in Mainz gehalten. Während des 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus hatten die Tiere *ad libitum* Zugang zu Wasser und Standardfutter für Labortiere. Alle Untersuchungen an Mäusen wurden entsprechend der europäischen und deutschen Richtlinien zu Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt.

**Tabelle 5: Verwendete Mauslinien**

| Bezeichnung                            | Herkunft                                       |
|--|--|
| 5xFAD/ <i>Lrp1<sup>flox/flox</sup></i> | hergestellt von Steffen Storck (Storck 2016)   |
| 5xFAD/ <i>Lrp1<sup>BE-/-</sup></i>     | hergestellt von Steffen Storck (Storck 2016)   |
| C57BL/6J                               | Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich |

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **5.2.1.1 Kultivierung immortalisierter Zellen**

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in einem S2-zertifizierten Labor unter sterilen Bedingungen. Die verwendeten Arbeitsmaterialien waren Einwegartikel aus sterilisiertem Kunststoff und autoklavierte Glasgegenstände. Alle Kulturmedien wurden vor Gebrauch mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Natriumpyruvat, 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Pen/Strep) versetzt und zusammen mit den übrigen Flüssigkeiten im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von mehr als 80 % bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops regelmäßig kontrolliert und die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und durch eine ein- bis fünfminütige Behandlung mit 0,05 % Trypsin von der Kulturschale gelöst. Anschließend wurden die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen und in entsprechenden Verdünnungen in neue 10 cm Kulturschalen mit frischem Medium überführt. Die in dieser Arbeit verwendeten immortalisierten Zelllinien und deren entsprechende Kulturmedien sind in Tabelle 1 (s. S 28) aufgelistet.

#### **5.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung immortalisierter Zelllinien**

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben von den Zellkulturschalen gelöst, mit Kulturmedium in Falcons überführt und für 4 min mit 1.200 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff gelagert.

Um kryokonservierte Zellen zu revitalisieren, wurden die Zellsuspensionen zügig bei 37°C aufgetaut und direkt in vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Das DMSO wurde durch Zentrifugation für 4 min mit 1.200 rpm entfernt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in neue Kulturschalen ausgesät.

### 5.2.1.3 Isolation und Kultivierung von primären, kortikalen Neuronen (PCN)

Zur Isolation von PCN wurden in Embryonalstadium 14 (E14) schwangere Mäuse (C57BL/6J oder 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*) zunächst mit Isofluran Forene® betäubt und mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurde der Uterus entnommen und die Embryonen im eiskalten 1 x PBS aus der Fruchtblase präpariert. Nach Abtrennen des Köpfchens wurde ebenfalls im eiskalten 1 x PBS das Gehirn entnommen, von Hirnhäuten befreit und der Kortex im eiskalten HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) gesammelt. Nach leichtem Andrücken des Gewebes mit einer Pinzette wurde dieses (möglichst ohne HBSS) in eine 0,05-prozentige Trypsin-Lösung (ca. 1,7 ml/Kortex) überführt und für 20 min auf einem Wipptisch bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Gewebsaufschluss wurde für 2 min mit 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in vorgewärmtes Neurobasalmedium, versetzt mit Pen/Strep, 1 x B27-Supplement und 1 x GlutaMax™ Supplement (NBS), aufgenommen. Durch zehnmaliges Resuspendieren wurde das Gewebe geschert und die Neuronen im Anschluss über eine zweilagige Gaze in dasselbe Volumen vorgewärmtes NBS aufgenommen. Mit Hilfe eines weiteren Zentrifugationsschrittes von 5 min mit 1.200 rpm wurden die Neuronen pelletiert und daraufhin im frischen NBS resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl lebender Neurone in einer 1:1-Verdünnung mit einer ein-prozentigen Trypanblaulösung bestimmt und davon ausgehend 1.000.000 Zellen auf Poly-L-Ornithin-beschichtete 6 cm Schalen in 5 ml frisches NBS ausgesät.

Die Beschichtung der Platten erfolgte am Vortag durch Zugabe von je 1,5 ml einer 1:100-Verdünnung an Poly-L-Ornithin in 1 x PBS pro 6 cm Kulturschale. Die Schalen inkubierten für 20 min bei RT auf einem Wipptisch, ehe die Polyornithin-Lösung entfernt und zweimal mit 1 x PBS gewaschen wurde. Daraufhin trockneten die Schalen für ein bis zwei Stunden bei RT und wurden schließlich über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Die primären Zellen wurden bei 37°C mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 80 % kultiviert. Nach dem dritten oder vierten Tag *in vitro* (DIV3 oder DIV4) erfolgte ein halber Mediumswechsel. Hierfür wurde das alte Kulturmedium abgenommen, mit demselben Volumen an frischem NBS versetzt und die Hälfte des Gemisches wieder zu den Zellen gegeben.

#### 5.2.1.4 Transfektion und Transduktion

Unter Transfektion versteht man in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA oder –RNA in eukaryotische Zellen. Diese kann transient erfolgen, wobei die Expression der über Plasmide eingebrachten Proteine im Laufe der Zellteilungen nach und nach verloren geht. Werden die cDNAs des Plasmids jedoch mit Hilfe von Viren in die Zellen transportiert, spricht man von einer Transduktion. Die genetischen Informationen können dabei entweder ebenfalls nur die vorübergehende Proteinexpression ermöglichen oder direkt ins Genom der Zellen integriert werden, wodurch die Expression der kodierten Proteine dauerhaft erhalten bleibt. Letztere wird auch als stabile Transfektion bezeichnet. Alle verwendeten DNA-Konstrukte sind in Tabelle 2 (s. S. 29) angegeben.

##### 5.2.1.4.1 Transiente Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

CHO- und HEK293T-Zellen wurden mit einer Dichte von 600.000 Zellen pro 6 cm Schale ausgesät. 24 Stunden danach erfolgte unter Verwendung von PEI, einem Polymer aus Ethyleniminen, die Transfektion der Zellen mit verschiedenen APP-Konstrukten bzw. der Meprin  $\beta$ -Plasmid-DNA oder den entsprechenden Leervektoren. Zunächst wurden hierfür 60  $\mu$ l serumfreies DMEM mit 8  $\mu$ l PEI gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 60  $\mu$ l serumfreiem DMEM mit 2  $\mu$ g Plasmid-DNA inkubierte das Gemisch für weitere 15 min bei RT. Schließlich wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. PEI fördert durch die starke Kondensierung und Komplexierung der Plasmid-DNA deren Aufnahme in die Zelle. Durch eine pH-abhängige Strukturänderung von PEI werden die endosomal-lysosomalen Zellkompartimente destabilisiert und die Plasmid-DNA folglich ins Zytoplasma freigesetzt (Behr, 1997). 4 Stunden nach Zugabe des Transfektionsgemisches wurde der Zellkulturüberstand durch 2 ml frisches  $\alpha$ -MEM bzw. frisches DMEM ersetzt und die Zellen 24 Stunden später lysiert.

##### 5.2.1.4.2 Stabile Transfektion

CHO-Zellen, die das APP-Dimer-Konstrukt APP695 K587C stabil exprimieren, wurden mittels lentiviraler Transduktion generiert. Da Lentiviren in der Lage sind, Fremd-DNA in das Genom der befallenen Zelle zu integrieren, enthielt der hier verwendete Vektor pVSV-G nicht alle für die Replikation nötigen Informationen, sondern kodierte ausschließlich für das Glykoprotein (G) der Hülle des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV). Um vollständige Viruspartikel zu erzeugen, wurde eine spezielle Zelllinie, die GP2-



HEK293T-Linie, verwendet. Diese Zellen enthalten die Gene *gag* und *pol*, die für das Kapsid und die reverse Transkriptase kodieren und somit für die Funktion des Virus essenziell sind.

Für die Virenherstellung wurden 10 cm Schalen mit Poly-L-Ornithin beschichtet (Vorgehen s.o. mit je 4 ml einer 1:2.000-Lösung). GP2-HEK293T-Zellen wurden so auf diese Platten ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Dichte von 60-80 % aufwiesen und mittels der Kalziumphosphat-Methode mit pVSV-G und dem APP-Dimer-Konstrukt transfiziert. Diese Methode beruht auf der von Graham und van der Eb entwickelten Kalzium-Phosphat-Präzipitation (Graham and van der Eb, 1973). Dabei bindet die zu übertragende DNA an im Transfektionsansatz ausfallendes Calciumphosphat und wird durch Endozytose dieser Kristalle von den Zellen aufgenommen (Kingston et al., 2003). Um die Transfektionsrate zu erhöhen, wurden die Zellen 2 Stunden zuvor mit 25 µM Chloroquine behandelt. Für den Transfektionsansatz wurden 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> mit 450 µl VE-H<sub>2</sub>O und je 10 µg der beiden Plasmid-DNAs gemischt. Nach Zugabe von 500 µl 2 x HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) unter Blasenbildung inkubierte das Gemisch für 30 min bei RT. Die Zellen wurden 4 Stunden mit dem Transfektionsgemisch bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Kulturüberstand wurde anschließend, aufgrund der nun vorhandenen Virenpartikel unter S<sub>2</sub>-Bedingungen, durch 10 ml frisches DMEM ersetzt und 24 Stunden später auf 5 ml frisches DMEM reduziert, um den Virentiter zu steigern. Dieses Medium wurde am nächsten Tag gesammelt und durch Zentrifugation für 4 min mit 1.200 rpm von toten Zellen befreit. Für die Transduktion wurden je 2 ml Virenüberstand zusammen mit 500 µl α-MEM und 25 µg/ml Polybrene zu den zu 50 % dichten CHO-Zellen in 6-Well-Platten gegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Viren entfernt und den Zellen frisches α-MEM zugegeben. Um nur stabil transfizierte Zellen weiter zu kultivieren, erfolgte die Selektion mit Hilfe der auf dem APP-Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz, deren Gen bei erfolgreicher Transduktion ebenfalls in der Genom-DNA der Zelle integriert sein muss. In dieser Arbeit wurde mit 350 µg/ml Hygromycin B selektiert, da die Resistenz gegen dieses Antibiotikum durch den pLHCX-Vektor des APP695 K587C-Konstruktes auf die infizierten CHO-Zellen übertragen wurde. Die Herstellung der für das APP-Dimer-Konstrukt stabilen CHO-Zellen wurde von V. R. (AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Mainz) durchgeführt.

#### 5.2.1.4.3 Transduktion mittels adenoviralem Vektor

Da Adenoviren die transferierte cDNA nicht ins Genom der Zellen integrieren können, führt diese Transduktion nur zu einer vorübergehenden Expression des kodierten Proteins. PCN aus C57BL/6J Mäusen wurden in DIV7 mit einem adenoviralem Vektor, der die kodierende Sequenz für humanes, wildtypisches APP695 enthält, behandelt. Hierfür wurde 1 ml Kulturüberstand von den Zellen abgenommen und bei 37°C aufbewahrt. Anschließend wurden 100 Plaque-formende Einheiten/Neuron des Virusstocks in 1 ml NBS mit 1 x GlutaMax™ *Supplement* für 6 Stunden auf die Zellen gegeben. Danach wurde der Virus entfernt und durch das aufbewahrte Medium und 200 µl frisches NBS komplett ersetzt. Die Transduktion wurde von C. S. (AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Mainz) durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Neurone lysiert.

## 5.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

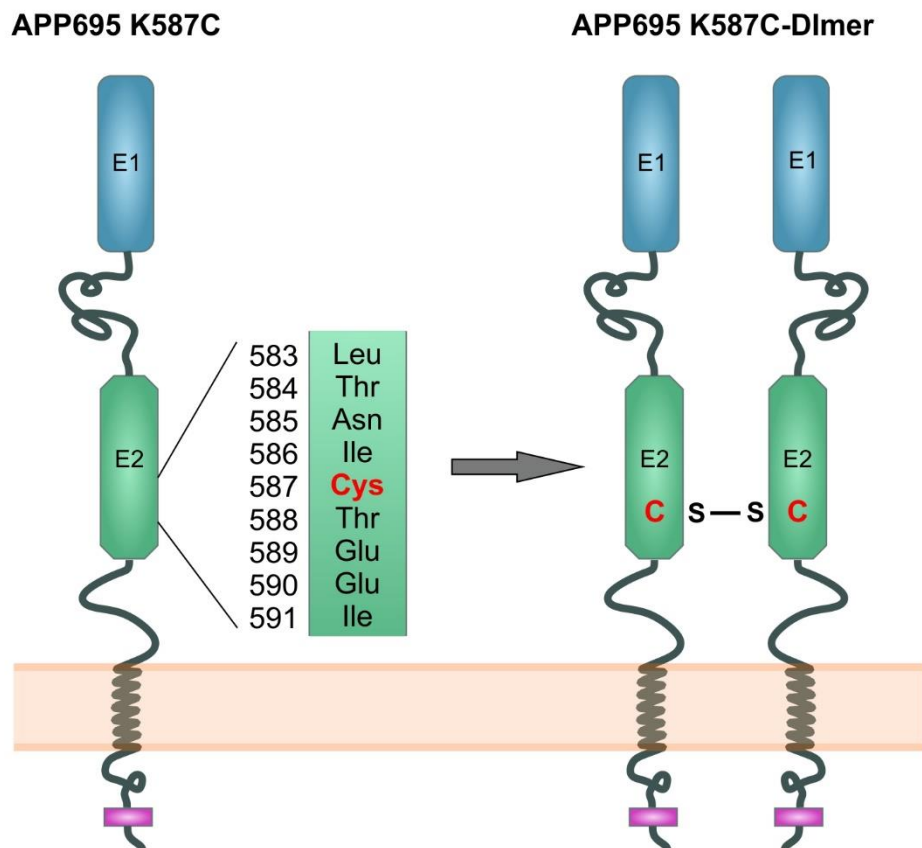
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, bei dem unter Verwendung von zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primern) und einer DNA-Polymerase spezifische DNA-Sequenzen angereichert werden können. Dabei erfolgt eine zyklische Wiederholung von Erhitzen (Denaturierungsphase), Abkühlen (Hybridisierungsphase) und Inkubation bei gleichbleibender Temperatur (Elongationsphase) (Mullis et al., 1986). Zudem kann diese Methode genutzt werden, um Modifikationen wie das Einfügen von Mutationen oder Restriktionsschnittstellen in Protein-kodierende Sequenzen zu erreichen. In dieser Arbeit wurde die PCR sowohl für die Erstellung einer genetisch veränderten APP695-Sequenz, als auch für die Genotypisierung von Embryonen genutzt. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Primer (fwd = *forward*; rev = *reverse*; Schnittstellen für HindIII in *forward*- sowie für Clal in *reverse*-Primern sind in Blau und fett, Mutationen der APP-Sequenz in Orange und fett markiert)**

| Bezeichnung          | 5' → 3'-Sequenz  |
|----------------------|--|
| APP universal fwd    | CCC <b>AAGCTT</b> ATGCTGCCCGGTTTG  |
| APP universal rev    | CC <b>ATCGAT</b> TTAATGGTGATGGTGATGATGACCGGTAT<br>GCATATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCG<br>AAGGGCCCTCTAGAGTTCTGCATC |
| APP <b>K587C</b> fwd | CTGGGTTGACAAATATCT <b>TGT</b> ACGGAGGAGATCTCT  |
| APP <b>K587C</b> rev | AGAGATCTCCTCCGT <b>ACA</b> GATATTTGTCAACCCAG   |
| <b>NGYE</b> rev      | CC <b>ATCGAT</b> GGTTACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTT<br>TGTTCTGCTCAAGAACTT <b>TTCGTAGCC</b><br><b>GTTTT</b> CGTAG         |
| 5xFAD fwd            | GTAGCAGAGGAGGAAGAAGTG  |
| 5xFAD rev            | CATGACCTGGGACATTCTC  |

#### 5.2.2.1.1 Generieren der APP695 K587C-Sequenz

Zur besseren Analyse der Eigenschaften von APP-Dimeren, wurde mittels einer *Overlap-Extension-PCR* (Lee et al., 2010) eine DNA-Sequenz amplifiziert, die für APP-Proteine mit erhöhter Tendenz zur Homodimerisierung über Disulfidbrücken kodiert. Ein Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Cystein (C) in der E2-Domäne an Position 587 von APP695 sollte dies bewirken (s. Abbildung 8).



**Abbildung 8: APP695 K587C-Konstrukt.** Schematische Darstellung der APP Cys-Mutante mit dem Aminosäureaustausch zu Cystein (C) an Position 587 des APP695 (links). Dieser führt zur favorisierten *cis*-Dimerisierung zweier mutanter APP-Moleküle über Disulfidbrückenbindung (S – S) zwischen den eingebrachten Cysteinresten (rechts).

Um eine DNA-Sequenz mit der entsprechenden Mutation zu erzeugen, wurden zwei Sätze an Oligonukleotiden und als Matrize der Vektor pLHCX-APP695 (Jäger et al., 2009) verwendet. Ein zum N-Terminus von APP695 komplementärer Primer, der u.a. auch die Restriktionsschnittstelle für HindIII enthält, bildete zusammen mit einem Primer, der sich gegen den C-Terminus von APP695 richtet und zudem einen Myc-tag und die Schnittstelle für ClaI beinhaltet, das äußere Paar (s. Tabelle 6, APP universal fwd/rev). Das innere Primer-Paar setzte sich aus zwei vollständig zueinander komplementären Oligonukleotiden zusammen, die den Basenaustausch von AAG zu TGT enthielten (s. Tabelle 6, APP K587C fwd und APP K587C rev). Wichtig hierbei war eine Länge von mindestens 15 mit der APP-Sequenz übereinstimmenden Basenpaaren (bp) beiderseits der Mutation. In unabhängigen Standard-PCR-Verfahren mit je einem inneren und einem äußeren Primer wurden

zunächst zwei APP-Fragmente amplifiziert. Diese beiden PCR-Produkte wurden anschließend gemeinsam als DNA-Matrize für eine dritte PCR nur mit dem äußeren Satz an Primern eingesetzt. Durch die Hybridisierung der beiden DNA-Fragmente aufgrund ihrer teilweisen Komplementarität nahe der Mutationsposition können diese durch die Polymerase verlängert werden. Somit wurden letztlich vollständige Sequenzen amplifiziert, die neben der Mutation auch den *Myc-tag* und die Restriktionsschnittstellen besitzen. Letztere wurden später für die Klonierung in die Vektoren pLBCX und pLHCX genutzt. Dieses PCR-Verfahren wurde von S. I. (AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Mainz) durchgeführt. Die Bedingungen aller PCRs sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst.

**Tabelle 7: PCR-Ansatz für APP695 K587C**

| <b>Komponente</b>                | <b>Volumen</b> |
|----------------------------------|----------------|
| 5 x Phusion® HF Reaction Buffer  | 10 µl          |
| <i>forward</i> -Primer (10 µM)   | 1 µl           |
| <i>reverse</i> -Primer (10 µM)   | 1 µl           |
| dNTP-Mix (je 10 mM)              | 1,5 µl         |
| Matrizen-DNA (50 - 200 ng)       | 1 µl           |
| Phusion® DNA-Polymerase          | 0,5 µl         |
| Nuklease-freies H <sub>2</sub> O | 35 µl          |
| <b>Endvolumen</b>                | <b>50 µl</b>   |

**Tabelle 8: PCR-Programm für APP695 K587C**

| PCR-Phase               | Temperatur | Dauer   |        |
|-------------------------|------------|---------|--------|
| Initiale Denaturierung  | 98°C       | 30 s    |        |
| Zyklische Denaturierung | 98°C       | 5-10 s  |        |
| Hybridisierung          | 60°C       | 30 s    | x25-35 |
| Zyklische Elongation    | 72°C       | 30 s/kb |        |
| Finale Elongation       | 72°C       | 10 min  |        |
|                         | 4°C        | ∞       |        |

#### 5.2.2.1.2 Generieren der APP695 K587C NGYE-Sequenz

Um ein Konstrukt zu erzeugen, das die Expression der APP695 Cys-Mutante mit einem veränderten Internalisierungsmotiv bewirkt, wurde zunächst eine Standard-PCR durchgeführt. Hierbei enthielt der *reverse*-Primer neben der Mutation, die in der Proteinsequenz zum Austausch von NPTY zu NGYE führt, auch einen *Myc-tag* sowie eine Restriktionsschnittstelle für *Clal* (s. Tabelle 6, NGYE rev). Als *forward*-Primer diente der universale APP-Primer (s. Tabelle 6, APP universal fwd), als Matrize für den PCR-Ansatz (s. Tabelle 9) das Plasmid pLHCX-APP695 K587C. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 9: PCR-Ansatz für APP695 K587C NGYE**

| Komponente                      | Volumen      |
|---------------------------------|--------------|
| 5 x Phusion® HF Reaction Buffer | 10 µl        |
| NGYE_fwd (10 µM)                | 2,5 µl       |
| NGYE_rev (10 µM)                | 2,5 µl       |
| dNTP-Mix (je 10 mM)             | 1,5 µl       |
| Matrizen-DNA (500 ng)           | 1 µl         |
| Phusion® DNA-Polymerase         | 0,5 µl       |
| VE-H <sub>2</sub> O             | 32 µl        |
| <b>Endvolumen</b>               | <b>50 µl</b> |

Tabelle 10: PCR-Programm für APP695 K587C NGYE

| PCR-Phase               | Temperatur | Dauer |     |
|-------------------------|------------|-------|-----|
| Initiale Denaturierung  | 95°C       | 30 s  |     |
| Zyklische Denaturierung | 95°C       | 15 s  |     |
| Hybridisierung          | 64°C       | 45 s  | x32 |
| Zyklische Elongation    | 72°C       | 90 s  |     |
| Finale Elongation       | 72°C       | 5 min |     |
|                         | 16°C       | ∞     |     |

#### 5.2.2.1.3 Genotypisierung von 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*-Embryonen

Da die für die Verpaarung verwendeten 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*-Mäuse heterozygot für die 5xFAD Mutationen waren, musste nach der Präparation der PCN anhand von Gewebestückchen der jeweiligen Embryonen deren Genotyp bestimmt werden. Hierfür wurde das Embryonengewebe zunächst für 1 Stunde bei 96°C in 70 µl Lysepuffer gekocht (wie beschrieben bei Truett et al., 2000). Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 70 µl Neutralisationspuffer. Für die Genotypisierungs-PCR wurde 1 µl des Lysats mit den Primern für die Amplifikation der humanen APP695-Sequenz (s. Tabelle 6, 5xFAD fwd/rev) entsprechend den Tabellen 11 und 12 verwendet.

**Tabelle 11: PCR-Ansatz für die Genotypisierung von 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Embryonen**

| Komponente                | Volumen   |
|---------------------------|-----------|
| 10 x Puffer               | 2,25 µl   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | 0,538 µl  |
| 5xFAD_fwd (10 µM)         | 0,25 µl   |
| 5xFAD_rev (10 µM)         | 0,25 µl   |
| dNTP-Mix (je 10 mM)       | 0,3125 µl |
| Matrizen-DNA (500 ng)     | 1 µl      |
| DNA-Polymerase            | 0,125 µl  |
| VE-H <sub>2</sub> O       | 16,54 µl  |

**Tabelle 12: PCR-Programm für die Genotypisierung von 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Embryonen**

| PCR-Phase               | Temperatur | Dauer    |
|-------------------------|------------|----------|
| Initiale Denaturierung  | 94°C       | 3 min    |
| Zyklische Denaturierung | 94°C       | 10 s     |
| Hybridisierung          | 65°C       | 15 s x35 |
| Zyklische Elongation    | 72°C       | 30 s     |
| Finale Elongation       | 72°C       | 5 min    |
|                         | 4°C        | ∞        |

### 5.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe auftrennen, wobei sie durch das negativ geladene Phosphatrückgrat umgekehrt proportional zum jeweiligen Molekulargewicht durch die Agarosemaschen in Richtung der Anode wandern. Höher prozentige Agarosegele fördern durch die



Bildung engerer Maschen die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle und umgekehrt. In dieser Arbeit wurden ein- bis zweiprozentige Agarosegele zur Auftrennung der PCR-Fragmente verwendet, um den Erfolg der jeweiligen Amplifikation zu überprüfen bzw. um den Genotyp der 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*-Embryonen zu bestimmen. Die Agarose wurde hierfür durch Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und in horizontale Laufkammern gegossen. Nach Auftragen der mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzten PCR-Ansätze wurde für ca. 90 min eine Spannung von 110 V angelegt. Der Ladepuffer sorgt aufgrund des enthaltenen Glycerins für das Absinken der DNA in die Taschen des Gels und dient durch den Farbstoff Bromphenolblau als Farbmarker zum Abschätzen der Laufweite. Die DNA wurde mit Hilfe des Ethidiumbromids, welches zwischen die Basen interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Bildanalyse-System LAS-3000 mini von FujiFilm aufgenommen. Anhand der verwendeten Molekulargewichtsstandards (1 kb DNA-Ladder, 100 bp DNA-Ladder, PCR-Marker) konnte das Molekulargewicht der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt werden. Die gewünschten Fragmente wurden ggf. aus dem Gel ausgestochen und mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II-PCR clean-up and gel extraction* Kits aufgereinigt.

### **5.2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Als Klonierung werden in der Molekularbiologie alle Methoden zur Gewinnung und identischen Vervielfältigung von DNA bezeichnet. Dieses Verfahren wurde hier zur Generierung der verschiedenen APP-Konstrukte angewendet.

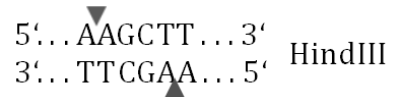
#### **5.2.2.3.1 Restriktionsverdau und Aufreinigung von DNA-Molekülen**

Nach der Gel-Extraktion der gewünschten PCR-Fragmente wurden diese, ebenso wie die späteren Zielvektoren pLBCX und pLHCX mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und ClaI enzymatisch verdaut. Bei beiden Enzymen handelt es sich um TypII-Endonukleasen, denen palindromische Basenabfolgen aus 6 Basenpaaren als Erkennungssequenz für den Schnitt innerhalb des DNA-Moleküls dienen. Abbildung 9 zeigt die spezifischen Schnittstellen von HindIII und ClaI, Tabelle 13 den entsprechenden Restriktionsansatz. Aufgrund des versetzten Verdau innerhalb des Palindroms entstehen 5'-Überhänge, sog. *sticky ends*, die die spätere Ligation der APP-Moleküle in pLBCX bzw. pLHCX ermöglichen. Nach der Restriktion wurden die

großen DNA-Fragmente mittels des *NucleoSpin Extract II-PCR clean-up and gel extraction* Kit von den Enzymen sowie den kleinen DNA-Resten gereinigt.

**Tabelle 13: Restriktionsansatz**

| Komponente           | Volumen              |
|----------------------|----------------------|
| DNA                  | 1-7 µl               |
| HindIII              | 1 µl                 |
| ClaI                 | 1 µl                 |
| 10 x CutSmart Puffer | 3 µl                 |
| VE-H <sub>2</sub> O  | aufgefüllt auf 30 µl |
| Inkubationszeit      | 2 Stunden            |
| Temperatur           | 37°C                 |



**Abbildung 9: Restriktions-schnittstellen.** Darstellung der palindromischen Erkennungssequenzen von HindIII (oben) und ClaI (unten) mit der jeweiligen Schnittposition (graue Dreiecke).

#### 5.2.2.3.2 Ligation von DNA-Molekülen

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, einem Enzym, das vom Enterobakteriophagen T4 gebildet wird, wurden die restringierten PCR-Fragmente in die geschnittenen Vektoren integriert (Ansatz s. Tabelle 14). Die Ligase katalysiert dabei eine Esterbindung zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-OH-Resten. Im Zuge dieser Arbeit wurde so die APP695 K587C-DNA in den pLBCX- bzw. den pLHCX-Vektor eingebaut und das APP695 K587 NGYE-Fragment in pLHCX.

**Tabelle 14: Ligationsansatz**

| Komponente                      | Volumen              |
|---------------------------------|----------------------|
| Vektor-DNA : <i>Insert</i> -DNA | 1 : 3                |
| T4-DNA-Ligase                   | 1 µl                 |
| 10 x T4-DNA-Ligase Puffer       | 3 µl                 |
| VE-H <sub>2</sub> O             | aufgefüllt auf 30 µl |
| Inkubationszeit                 | 12-16 Stunden        |
| Temperatur                      | RT                   |

#### 5.2.2.3.3 Vervielfältigung der APP-Konstrukte

Zur Vervielfältigung der APP-Konstrukte wurden 50 µl-Aliquots kompetenter *E.coli*-Zellen des Stamms DH5α mit 5-7 µl des Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Mittels Hitzeschock durch Inkubation bei 42°C für 1 min, wurden die Bakterien zur Aufnahme der Plasmid-DNA angeregt und danach nochmals für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie in 500 µl vorgewärmtes LB-Medium aufgenommen und unter Schütteln für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde auf LB-Agar-Platten versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Anreicherung einzelner Klone für 6 Stunden in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin unter Schütteln bei 37°C. Eine 1:1.000-Verdünnung dieser Vorkultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin diente nach bakterieller Vermehrung über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler als Grundlage für die Plasmid-Isolierung via Midi-Präparation. Hierfür wurde das *Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Kit* verwendet.

#### 5.2.2.4 **Bestimmung der DNA-Konzentration und Sequenzierung**

Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde mit einem Photometer anhand der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm durch die DNA ermittelt. Hierbei gilt:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = A/(e \cdot l)$$

c = Konzentration

A = Extinktion

e = Extinktionskoeffizient

l = Weite der Küvette

Zur Überprüfung der Korrektheit der hergestellten APP-Konstrukte, wurden diese durch die Firma SEQ.IT GmbH & Co. KG (Kaiserslautern) sequenziert und die Ergebnisse mit Hilfe von SnapGene Viewer und SECentral analysiert.

### 5.2.3 **Proteinbiochemische Methoden**

#### 5.2.3.1 **Zellyse und Proteinextraktion**

18 bis 48 Stunden nach Transfektion oder Behandlung der Zellen wurden diese lysiert. Hierfür wurde für die Proteinextraktion aus HEK293T- und CHO-Zellen der NP-40-Lysepuffer verwendet, bei Neuronen der RIPA-Lysepuffer. Da auch lösliche Proteine

nachgewiesen werden sollten, wurde je 1 ml des abgenommenen Zellkulturüberstands gesammelt, die Zellen anschließend mit 1 x PBS gewaschen, in 1 ml 1 x PBS von den Kulturschalen abgekratzt und in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C mit 6.000 rpm für 4 min, erfolgte die Lyse der Pellets im jeweiligen Lysepuffer versetzt mit 1 x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (PI) für 20 min auf Eis. Durch erneute Zentrifugation mit 14.000 rpm für 20 min bei 4°C wurden die Proteine von den Zellresten befreit und in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

### 5.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Probenvorbereitung

Um die Konzentration der isolierten Proteine in den Zellysaten zu bestimmen, wurde eine BCA-Analyse (*Bicinchoninic Acid Assay*) durchgeführt. Hierbei reduzieren die Peptidbindungen der Proteine in einer alkalischen Umgebung zunächst  $\text{Cu}^{2+}$  von Kupfer(II)-sulfat zu  $\text{Cu}^+$ , mit dem anschließend je zwei Moleküle der bicinchoninischen Säure einen violetten Komplex bilden. Da die Bildung dieses Chelats proportional zur Menge an Protein ist, kann anhand der Messung dieses Farbkomplexes, der Licht einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert, die Proteinkonzentration bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür das *Pierce BCA Protein Assay Kit* verwendet. Zunächst wurde ein 50:1-Gemisch aus Lösung A, die u. a. Natriumhydroxid sowie die bicinchoninische Säure enthält, und Lösung B, einer vierprozentigen Kupfersulfat-Lösung, hergestellt. Im Anschluss wurde je 1 ml dieses Gemisches zu 50  $\mu\text{l}$  der 1:10 verdünnten Lysatproben sowie einer Standardreihe mit verschiedenen BSA (Bovines Serumalbumin) -Konzentrationen (0  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$  und 500  $\mu\text{g/ml}$ ) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 60°C wurden die Proben und der Standard mit Hilfe eines Platten-Photometers gemessen und die Proteinkonzentration durch die ADAP Software (Version 1.6, Anthos Labtec Instruments) berechnet.

Gleiche Proteinmengen der Lysate und auf deren Proteinkonzentration normalisierte Zellkulturüberstände wurden anschließend mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für dieses Verfahren wurden die Proben mit 4 x Ladepuffer (Endkonzentration 1 x) gekocht. Hier wurde entweder 4 x RotiLoad®, der  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta\text{ME}$ ) enthält, oder 4 x SDS-Probenpuffer ohne  $\beta\text{ME}$  und Temperaturen von 95°C bzw. 80°C verwendet. Das Erhitzen der Proben führt zur Denaturierung von Sekundär-, Tertiär und Quartärstrukturen der Proteine, die durch

nicht-kovalente Wechselwirkungen zustande kommen.  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert zudem Disulfidbrückenbindungen. Das im Probenpuffer enthaltene SDS trägt ebenfalls zur Denaturierung der Proteine bei und überlagert zudem deren Eigenladung (abhängig von den enthaltenen Aminosäureresten), sodass eine gleichmäßig negative Ladungsverteilung entsteht.

### **5.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist ein biochemisches Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen nach Molekülmasse in einem elektrischen Feld. In der vorliegenden Arbeit wurde die Natriumdodecylsulfat (SDS) –PAGE (Laemmli, 1970) als Variante für die Trennung der Proteine in Zellkulturüberständen und –lysaten angewendet. Hierbei enthielten die diskontinuierlichen Gele auf Polyacrylamid-Basis auch das anionische Tensid SDS. Aufgrund der durch dieses Detergens gleichmäßig negativen Ladung der Proteine wandern diese unabhängig von ihrer eigentlichen Ladung nur umgekehrt proportional zum jeweiligen Molekulargewicht in Richtung der Anode. Zur besseren Auftrennung von Proteinen mit lediglich geringfügigen Masseunterschieden, wie der A $\beta$ -Peptide, wurde hier eine spezifische Form der SDS-PAGE unter Zugabe von Harnstoff durchgeführt (Klafki et al., 1996).

#### **5.2.3.3.1 SDS-PAGE**

Für die Standard SDS-PAGE wurden diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel entsprechend den Rezepten in Tabelle 15 hergestellt oder vorgegossene Gradienten-Gele (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Protein Gele, Invitrogen) genutzt. Die Elektrophorese wurde in einem *XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresis System* (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung von 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) –Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurden die Proben bei einer Spannung von 80-120 V für etwa 90 min aufgetrennt.

**Tabelle 15: Rezepte der Polyacrylamid-Gele für die Standard SDS-PAGE**

| Komponente                             | Trenngel (7 %) | Trenngel (6 %) | Sammelgel (4 %) |
|--|----------------|----------------|-----------------|
| VE-H <sub>2</sub> O                    | 3,36 ml        | 3,58 ml        | 1,23 ml         |
| 1,6 M Bis-Tris-Puffer                  | 1,65 ml        | 1,65 ml        | 0,5 ml          |
| 30 % Acrylamid 37,5:1<br>Bis-Acrylamid | 1,54 ml        | 1,32 ml        | 0,26 ml         |
| 10 % APS                               | 0,033 ml       | 0,033 ml       | 0,020 ml        |
| TEMED                                  | 0,011 ml       | 0,011 ml       | 0,005 ml        |

#### 5.2.3.3.2 Harnstoff SDS-PAGE

Für die Trennung von A $\beta$ -Peptiden wurde die von Klafki und Kollegen 1996 beschriebene SDS-PAGE unter Zugabe von 8 M Harnstoff angewendet. Dieser Zusatz ermöglicht nicht nur die Trennung von Proteinen mit einem Längenunterschied von nur einer Aminosäure, sondern verändert auch das Bindungsverhältnis von SDS. Statt proportional zur Länge des Proteins bindet SDS in diesem System in Abhängigkeit zur Hydrophobizität (Kawooya et al., 2003), wodurch sich die Peptide nicht nur entsprechend ihrer Größe, sondern auch bezüglich ihrer Hydrophobizität im Gel trennen. Daher wandert beispielsweise das längere Peptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> schneller als A $\beta$ <sub>1-40</sub>, da letzterem die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Alanin fehlen.

Das hier verwendete diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel, bestehend aus Kamm-, Sammel- und Trenngel, wurde wie in den Tabellen 16 - 18 dargestellt in Bio-Rad Mini-PROTEAN® Elektrophorese Glasplatten gegossen. Die elektrophoretische Trennung der A $\beta$ -Peptide erfolgte in einem Mini-PROTEAN® Elektrophorese System (Bio-Rad) mit voneinander getrennten Anoden- und Kathodenpuffern. Dabei blieb die Stromstärke konstant bei 25 mA pro Gel bis die Lauffront aus dem Gel verschwunden war.

**Tabelle 16: Rezept des Trenngels für die Harnstoff SDS-PAGE**

| <b>Komponente</b>                 | <b>Menge/Volumen</b> |
|-----------------------------------|----------------------|
| Harnstoff                         | 4,8 g                |
| Trenngel-Puffer                   | 2,5 ml               |
| 40 % Acrylamid 19:1 Bis-Acrylamid | 2,5 ml               |
| VE-H <sub>2</sub> O               | 1,01 ml              |
| 10 % SDS                          | 0,25 ml              |
| 10 % APS                          | 0,08 ml              |
| TEMED                             | 0,01 ml              |

**Tabelle 17: Rezept des Sammelgels für die Harnstoff SDS-PAGE**

| <b>Komponente</b>                 | <b>Volumen</b> |
|-----------------------------------|----------------|
| Sammelgel-Puffer                  | 500 µl         |
| 1 % SDS                           | 250 µl         |
| 40 % Acrylamid 29:1 Bis-Acrylamid | 150 µl         |
| VE-H <sub>2</sub> O               | 100 µl         |
| 10 % APS                          | 5,25 µl        |
| TEMED                             | 1,75 µl        |

**Tabelle 18: Rezept des Kammgels für die Harnstoff SDS-PAGE**

| Komponente                        | Volumen  |
|-----------------------------------|----------|
| Kammgel-Puffer                    | 1 ml     |
| 1 % SDS                           | 0,5 ml   |
| 40 % Acrylamid 29:1 Bis-Acrylamid | 0,3 ml   |
| VE-H <sub>2</sub> O               | 0,2 ml   |
| 10 % APS                          | 0,012 ml |
| TEMED                             | 0,004 ml |

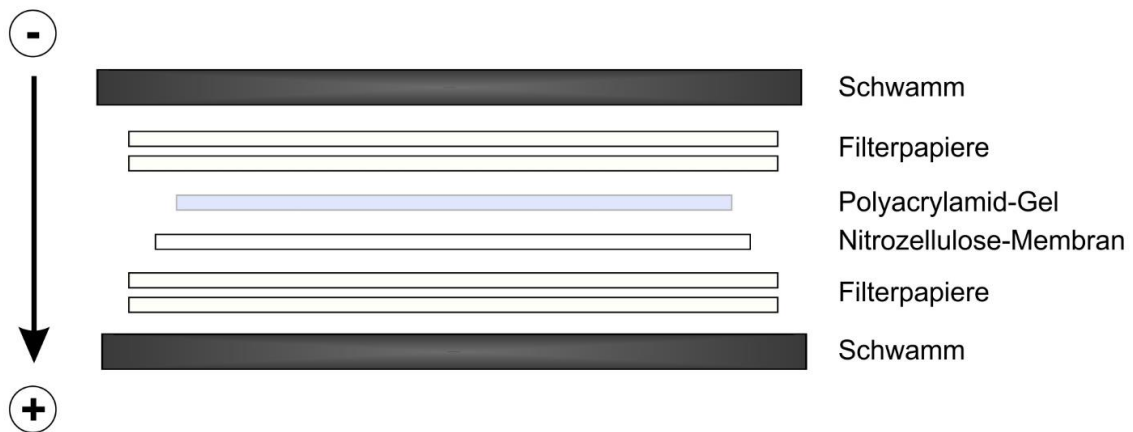
#### 5.2.3.4 Western Blot-Verfahren

Als Western Blot wird die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet. Diese Methode wurde genutzt, um die in der SDS-PAGE getrennten Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachzuweisen. Hier wurden Nitrozellulose-Membranen oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) –Membranen für den elektrophoretischen Proteintransfer mittels Nass-Blot- bzw. *Semi-Dry-Blot-System* verwendet. Die Membranen wurden nach der Übertragung für 0,5-1 Stunde in 5 % Trockenmilch gelöst in 1 x TBST blockiert, um die unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern. Daraufhin inkubierte diese erst über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper und nach drei zehnmütigen Waschschrinen mit TBST für 1 Stunde bei RT mit dem dazugehörigen HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Dieser ermöglichte die spätere Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz.

##### 5.2.3.4.1 Nass-Blot-Verfahren

Beim Nass-Blot-System werden alle Komponenten in Blot-Puffer getränkt und entsprechend der Abbildung 10 unter Blot-Puffer übereinandergeschichtet. Hierbei wurden Gel und Membran zwischen Filterpapieren und Schwämmen in einer Kassette zusammengehalten. Die Proteinübertragung auf die Nitrozellulose-Membran fand in einer mit Blot-Puffer gefüllten Kammer (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, Bio-Rad) durch Anlegen einer Spannung von 70 V für 2 Stunden statt.

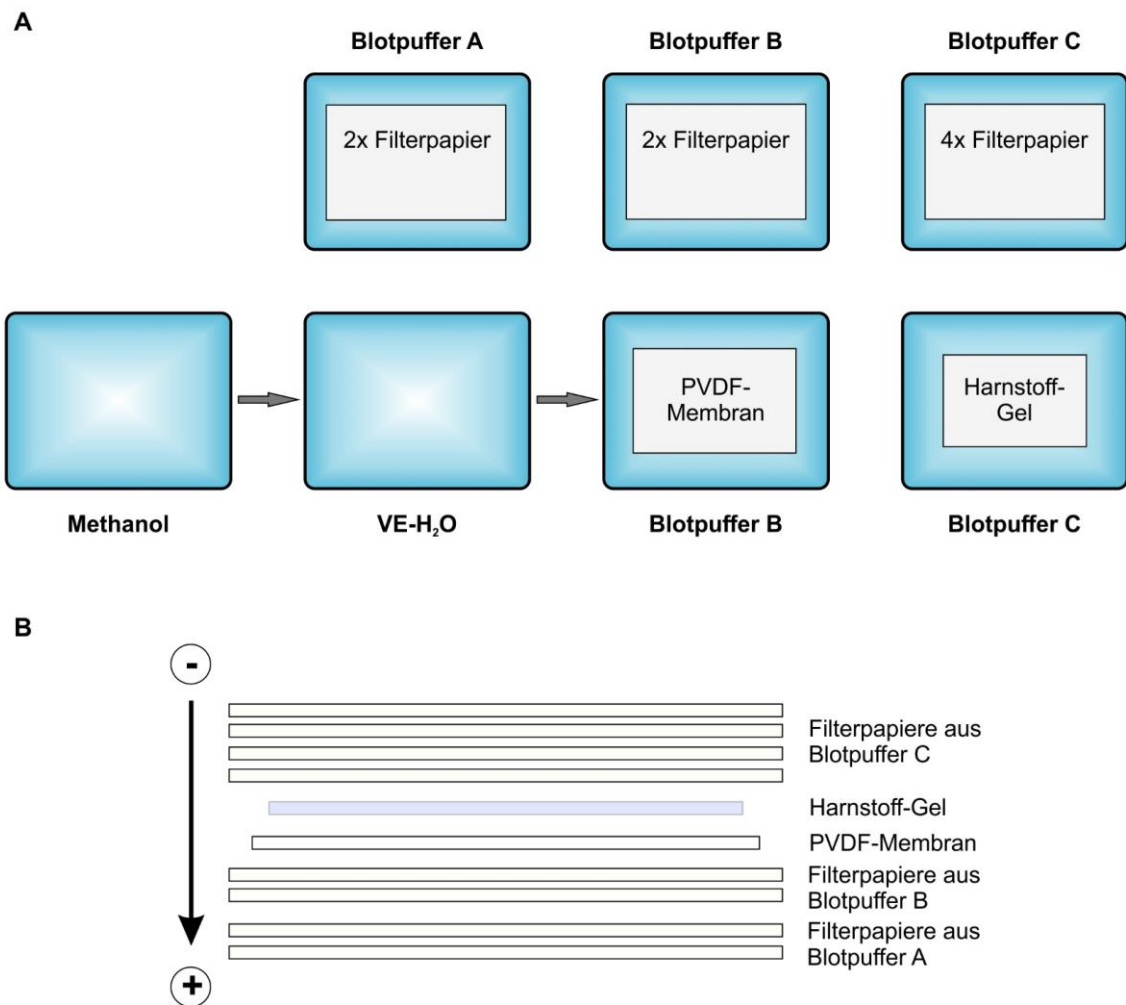




**Abbildung 10: Aufbau des Nass-Blots.** Der Pfeil neben dem Blot-Aufbau stellt die Laufrichtung der Proteine von der Kathode (-) zur Anode (+) dar.

#### 5.2.3.4.2 Semi-Dry-Western Blot

Dieses System wurde für die Übertragung von A $\beta$ -Peptiden auf PVDF-Membranen genutzt. Hierfür wurden die Filterpapiere für 15 min mit verschiedenen Blot-Puffern (A, B bzw. C; s. Abbildung 11 A) getränkt. Die PVDF-Membranen wurden zunächst für 5 min in Methanol aktiviert, da sie aufgrund ihrer Hydrophobizität sonst nicht vollständig mit dem Blot-Puffer B benetzt werden könnten, in dem sie nach Abwaschen des Methanols in VE-H<sub>2</sub>O einige Minuten inkubierten. Nach Equilibrierung des Gels in Blot-Puffer C wurde der Blot wie in Abbildung 11 B dargestellt in den *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) geschichtet. Durch Anlegen einer Stromstärke von 47 mA pro Gel für 45 min wurden die Peptide auf die PVDF-Membran übertragen. Für die bessere Detektion der A $\beta$ -Peptide wurde die Membran im Anschluss für 5 min in 1 x PBS gekocht, ehe sie zum Blockieren für 30 min in der Milchpulver-Lösung inkubierte.



**Abbildung 11: Semi-Dry-Blot-System.** (A) Tränken und Equilibrierung der verschiedenen Komponenten für den (B) Blot-Aufbau im *Semi-Dry*-Verfahren. Der Pfeil neben dem Blot-Aufbau stellt die Laufrichtung der Proteine von der Kathode (-) zur Anode (+) dar.

### 5.2.3.5 Chemilumineszenz-Detektion

Der Proteinnachweis auf den Membranen erfolgte mittels Detektion von Chemilumineszenz. Hierfür wurde das Immobilon Western HRP Substrat verwendet, von dem ein 1:1-Gemisch aus der Luminol- und der Wasserstoffperoxid-Lösung gleichmäßig auf den Membranen verteilt wurde. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) katalysierte daraufhin die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalsäurehydrazid) mit Hilfe von Wasserstoffperoxid. Über ein angeregtes Intermediat, das beim Rückfall auf das niedrigere Energielevel zur Lichtemission führt, entsteht bei dieser Reaktion letztlich

3-Aminophtalat. Das durch die chemische Reaktion freigesetzte Licht wurde anhand des LAS-3000mini *Imaging System* (FujiFilm, Düsseldorf) aufgenommen.

#### 5.2.3.6 Tat-Cre-Behandlung von PCN aus 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Embryonen

Die Induktion des *Lrp1-Knockouts* in kortikalen Primärneuronen (PCN) von 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Embryonen erfolgte mit Hilfe des Cre/loxP-Systems, das auf einer ortsspezifischen Rekombination beruht (Sauer, 1987; Sauer and Henderson, 1988). In dieser Arbeit wurde eine Cre-Rekombinase (Cre = *Causes recombination*) verwendet, die an das basische Translokationspeptid Tat (*Transactivator of transcription*) von HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) gekoppelt ist (bereitgestellt von Dr. R. E. V.; VIB Inflammation Research Center, Universität Gent, Belgien; Abteilung für biomedizinische Molekularbiologie, Universität Gent, Belgien). Diese Rekombinase, die aus dem Bakteriophagen P1 stammt, katalysiert die spezifische Rekombination zweier DNA-Erkennungssequenzen, der sog. loxP (*locus of X-over P1*) -Stellen. Die Tiere der verwendeten Mauslinie besitzen ein von diesen loxP-Stellen flankiertes *Lrp1*-Gen und somit die Voraussetzungen für die ortsspezifische Rekombination. Wird diese von der Cre-Rekombinase katalysiert, kommt es zur Exzision von *Lrp1* aus der DNA und folglich zum Verlust dieses Gens. Um den *Knockout* zu induzieren, wurde von den isolierten Primärneuronen aus 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Embryonen in DIV4 das Zellkulturmedium abgenommen, 1 ml davon mit 1 ml frischen NBS und 200 nM (Endkonzentration) Tat-Cre versetzt und für 48 Stunden wieder zu den Neuronen gegeben. Im Anschluss wurden die Kulturüberstände und die Zelllysate mittels Western Blot auf die Expression von APP und LRP1 hin untersucht.

#### 5.2.3.7 Pulse-Chase-Analyse

Für die genauere Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Synthese und Prozessierung von APP-Homodimeren wurde eine *Pulse-Chase*-Analyse mit CHO-Zellen, die stabil APP695 K587C exprimierten, durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach dem Aussäen auf 6 cm Schalen für eine Stunde in 3 ml DMEM, das frei von den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein war (*Starve-Medium*), ausgehungert. Anschließend wurde das *Starve-Medium* durch 1 ml desselben Mediums jedoch versetzt mit 150 µCi <sup>35</sup>S/ml (*Label-Medium*) ersetzt, in dem die Zellen für 15 min bei 37°C inkubierten (=Pulse). Durch das vorherige Aushungern

der CHO-Zellen wird der radioaktiv markierte Schwefel direkt von den Zellen aufgenommen und für die Synthese von Methionin und Cystein genutzt. Der Einbau dieser Aminosäuren in die Proteine führt somit zu deren radioaktiver Markierung, die im Laufe der Zeit immer weniger wird und später in den Zellkulturüberständen und den Lysaten verfolgt werden kann (=Chase). Nach Abnahme des *Label-Mediums* wurden die Zellen in  $\alpha$ -MEM mit 40 mM HEPES (*Chase-Medium*) aufgenommen. Dieses wurde für unterschiedliche Zeitspannen (0; 0,5; 1; 2 bzw. 4 Stunden) auf den Zellen belassen ehe diese wie oben beschrieben in 200  $\mu$ l NP-40-Puffer lysiert wurden und die radioaktive Markierung der Proteine verfolgt wurde (=Chase). Um gezielt radioaktiv-markiertes APP nachzuweisen, wurde dieses Protein mittels des Antikörper-Gemisches 1G75A3 aus den Zellüberständen und –lysaten konzentriert (s. 5.2.3.8.1 Immunpräzipitation) und anschließend über eine SDS-PAGE (s. 5.2.3.3.1) aufgetrennt. Das verwendete NuPAGE Gradienten-Gel (4-12 %, Invitrogen) inkubierte daraufhin erst 15 min in Fixierlösung (10 % Essigsäure, 20 % Ethanol in VE-H<sub>2</sub>O), und im Anschluss 60 min in VE-H<sub>2</sub>O, wobei dieses alle 20 min gewechselt wurde. Zur Trocknung auf Chromatographie Papier (Whatman™) wurde das Gel für 2 Stunden bei 65°C in einen Vakuumtrockner (*Model 583 Gel Dryer*, BioRad) gelegt. Die Exposition des Films erfolgte über Nacht bei RT in einer Expositionskassette. Mit Hilfe eines Phosphor Bildgerätes (*Cyclone Plus Storage Phosphor System*, PerkinElmer) wurde am nächsten Tag die Radioaktivität gemessen und über die OptiQuant Software sowie Adobe Photoshop CS3 sichtbar gemacht.

### **5.2.3.8 Immunpräzipitation (IP)**

Die Immunpräzipitation stellt ein Verfahren zur Anreicherung eines Antigens mittels eines Antikörpers aus einer Lösung dar. In dieser Arbeit wurden verschiedene Formen dieser biochemischen Methode genutzt.

#### **5.2.3.8.1 Immunpräzipitation von APP**

Für den gezielten Nachweis von radioaktiv markiertem APP im Zuge der *Pulse-Chase*-Analyse wurden je 200  $\mu$ l der Zellüberstände und –lysate mit 300  $\mu$ l IP-Mix (20  $\mu$ l Protein G Agarose *Beads* und 1:300 (Endkonzentration) 1G75A3) in NP-40-Puffer mit 1 x PI über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *Beads* dreimal mit 500  $\mu$ l NP-40-Puffer gewaschen, wobei sich folgende Schritte wiederholten: Zentrifugation für 2 min mit 2.300 rpm, Verwerfen des

Überstandes, Lösen der *Beads* durch Invertieren in 500 µl frischem NP-40-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand möglichst restlos abgenommen und die *Beads* in 20 µl 4 x SDS-Pobenpuffer aufgenommen. Durch Inkubation für 5 min bei 80°C wurden die Proteine von den *Beads* eluiert und nach Zentrifugation für 1 min mit maximaler Geschwindigkeit über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

#### 5.2.3.8.2 Immunpräzipitation von Aβ-Peptiden

Der Nachweis von Aβ-Peptide mittels Immunpräzipitation (IP) wurde in Zellkulturüberständen von HEK293T-Zellen, die nur mit APP oder mit APP und Meprin β transfiziert waren, durchgeführt. Hierfür wurde das Medium nach der Transfektion auf 2 ml pro 6 cm Schale reduziert und 24 Stunden später gesammelt. Die Überstände wurden entsprechend des Proteingehalts der Lysate normalisiert. 800 µl dieses konditionierten Mediums (CM), ggf. mit VE-H<sub>2</sub>O auf dieses Volumen aufgefüllt, wurden mit 200 µl 5 x Aβ-IP-Puffer und 25 µl *Beads* versetzt. Für die IP von Aβ-Peptiden wurden die magnetischen Dynabeads M-280 verwendet, an deren Oberfläche das Schaf-anti-Maus IgG gekoppelt ist. Diese wurden entsprechend den Angaben des Herstellers am Vortag vorbereitet und dafür über Nacht mit dem IC16-Antikörper (1:100), der die ersten 16 Aminosäuren des Aβ-Peptids erkennt, aktiviert. Um die Präzipitation der Peptide zu erreichen, wurden die Proben für 15 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden sie dreimal für 5 min mit 1 x PBS mit 0,1 % BSA und einmal für 3 min mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Hierfür rotierten die Proben für die angegebenen Zeiten auf dem Überkopfschüttler und wurden zwischen den Waschsritten mit Hilfe eines magnetischen Gestells je 2 min vom Waschpuffer getrennt, sodass dieser gewechselt werden konnte. Nach dem letzten Waschschrift wurden die *Beads* in 25 µl PAP-Probenpuffer aufgenommen, die Aβ-Peptide durch Kochen für 5 min bei 95°C eluiert und schließlich via Harnstoff SDS-PAGE in 8 M Harnstoff-Gelen aufgetrennt (s. 5.2.3.3.2).

#### 5.2.3.9 Inhibitor-Behandlung von CHO-Zellen

Um die Prozessierung von APP-Dimeren an der Zelloberfläche genauer zu analysieren, wurden CHO-Zellen, die die APP Cys-Mutante stabil exprimierten, mit einem Inhibitor für ADAM10 (GI254023X bereitgestellt von Dr. L., TU Aachen) behandelt. Hierfür wurde das Zellkulturmedium 24 Stunden nach dem Aussäen der

Zellen auf 6 cm Schalen gegen 2 ml frisches  $\alpha$ -MEM mit 10  $\mu$ M GI254023X ersetzt. Die Zellen inkubierten mit dem ADAM10-Inhibitor für weitere 24 Stunden bevor eine Oberflächenbiotinylierung und deren Lyse durchgeführt wurde. Da der Inhibitor in DMSO gelöst war, wurden als Kontrolle für dessen Wirksamkeit auch Zellen mit demselben Volumen reiner Trägerflüssigkeit behandelt.

#### **5.2.3.10 Oberflächenbiotinylierung**

Die Menge an APP-Dimeren an der Zelloberfläche wurde 24 Stunden nach Behandlung mit dem ADAM10-Inhibitor durch Oberflächenbiotinylierung untersucht. Hierfür wurde das Medium der Zellen gesammelt und diese anschließend zunächst dreimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 40 min mit 2 ml einer Biotin-Lösung bestehend aus 0,25 mg/ml Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin in 1 x PBS bei 4°C auf einem Wipptisch inkubiert, wobei die Biotin-Lösung nach 20 min erneuert wurde. Um das nicht an die Oberflächenproteine gebundene Biotin zu entfernen, erfolgten im Anschluss vier Waschschrte mit 50 mM Ammoniumchlorid gelöst in 1 x PBS. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben in NP-40-Lysepuffer aufgeschlossen und die Proteine isoliert. Zum Nachweis der biotinylierten Oberflächenproteine wurde eine Präzipitation durchgeführt. Hierfür wurden gleiche Proteinmengen 15-16 Stunden mit 20  $\mu$ l NeutrAvidin Agarose Resin *Beads* in NP-40-Puffer mit 1 x PI auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Durch die spezifische, starke Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin können so die biotinylierten Proteine aus dem Lysat an die *Beads* gekoppelt werden. Nach drei Waschschrten mit je 500  $\mu$ l NP-40-Puffer und je 2 min Zentrifugation mit 500 rpm, wurden die *Beads* in 20  $\mu$ l 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die biotinylierten Proteine durch Kochen bei 80°C für 5 min eluiert. Diese wurden dann in sechsprozentigen Polyacrylamid-Gelen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert.

### **5.2.4 In vivo-Methoden**

#### **5.2.4.1 Induktion der Cre-vermittelten Rekombination**

Um die Cre-vermittelte Rekombination und damit die Exzision des geflochtenen *Lrp1* zu induzieren, wurde 12 Wochen alten 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Mäusen, die das *Slco1c1-CreER<sup>T2</sup>*-Allel trugen, intraperitoneal 2 mg Tamoxifen, gelöst in Erdnussöl, injiziert.

Hierfür wurden zunächst 100 mg Tamoxifen durch Inkubation in einem 37°C warmen Ultraschallbad in 500 µl Ethanol gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9,5 ml Erdnussöl, das ebenfalls im 37°C warmen Ultraschallbad gründlich mit der Tamoxifen-Lösung gemischt wurde. Die Mäuse erhielten letztlich an sieben aufeinander folgenden Tagen eine intraperitoneale Injektion von je 200 µl dieses Gemisches. Tamoxifen wird *in vivo* zum hydroxylierten OH-Tamoxifen metabolisiert. Dieses bindet mit hoher Affinität an die mutierte Liganden-Bindedomäne des humanen Östrogen-Rezeptors (ER<sup>T2</sup>), die an die Cre-Rekombinase gekoppelt ist, und induziert so deren Aktivität (Feil et al., 2009; Ridder et al., 2011). Die *CreER<sup>T2</sup>*-Genkassette wird im verwendeten Mausmodell nur zusammen mit *Slco1c1* (*Solute carrier organic anion transporter 1c1*), dessen Synthese spezifisch in Endothelzellen des Gehirns und in Epithelzellen des Plexus choroideus stattfindet (Roberts et al., 2008), exprimiert. Somit kann durch Tamoxifen die ortsspezifische Rekombination der loxP-Stellen des *Lrp1* und folglich dessen *Knockout* gezielt in diesen Zellen induziert werden. Zur Kontrolle wurden 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*-Tiere, die *Slco1c1-CreER<sup>T2</sup>*-Genkassette nicht besaßen, ebenfalls der beschriebenen Tamoxifen-Behandlung unterzogen. Diese Methode wurde von S. E. S. (AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Mainz) durchgeführt.

#### 5.2.4.2 Isolierung von Zerebrospinalflüssigkeit (CSF)

Um den Einfluss von LRP1 auf die Prozessierung von dimerisiertem APP auch *in vivo* zu analysieren, wurde die Menge an APP-Dimeren in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von vier Monate alten Mäusen untersucht. Hierfür wurde die Cisterna magna sowohl von Tieren, die LRP1 exprimierten (5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*), als auch von denen mit induziertem *Knockout* von *Lrp1* (5xFAD/*Lrp1<sup>BE-/-</sup>*) punktiert (genau beschrieben in Vandenbroucke et al., 2012). Die isolierte CSF wurde durch Zentrifugation mit 3.000 rpm bei 4°C für 10 min von Zellresten befreit und je 2 µl mit einem 2 x Probenpuffer (Endkonzentration 1 x) versetzt. Nach Denaturierung der Proteine für 5 min bei 70°C wurden die Proben über siebenprozentige Polyacrylamid-Gele in einer SDS-PAGE (s. 5.2.3.3.1) aufgetrennt. Dieses Verfahren wurde von S. E. S. (AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Mainz) durchgeführt.

### **5.2.5 Densitometrische Analyse und statistische Auswertung**

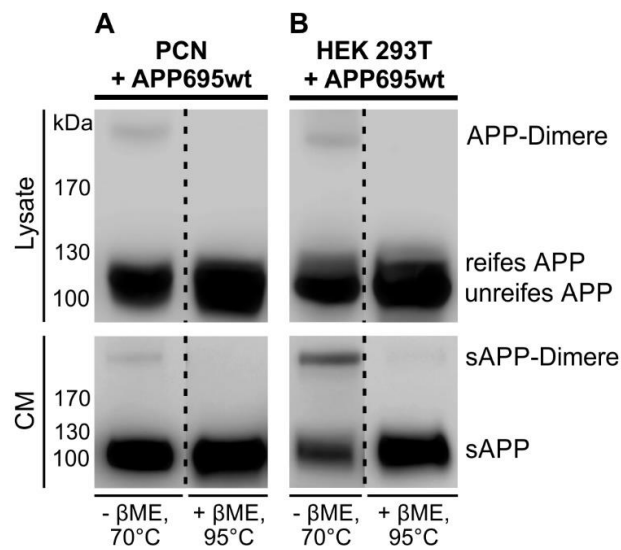
Die Ergebnisse des Western Blot-Verfahrens sowie der *Pulse-Chase*-Analyse wurden mit Hilfe der Programme ImageJ 1.44 oder Multi Gauge V3.0 densitometrisch ausgewertet. Die statistische Analyse der Messwerte und die Erstellung der in dieser Arbeit gezeigten Graphen erfolgte mit der Graph Pad Prism 4 Software (Graphpad Software, La Jolla, USA).



## 6 Ergebnisse

### 6.1 APP-Dimere in Primärneuronen und HEK293T-Zellen

Da vermutlich 30-50 % aller APP-Moleküle eines Organismus in dimerisierter Form vorliegen und diese Dimere sogar *in vivo* nachgewiesen werden konnten (Munter et al., 2007; Schmidt et al., 2012), sollte in dieser Arbeit festgestellt werden, ob die Bildung von APP-Dimeren in Neuronen stattfindet. Hierfür wurden primäre, kortikale Neurone (PCN) aus C57BL/6-Embryonen isoliert und in DIV7 mit einem viralen Konstrukt, das humanes APP695wt enthält, transfiziert. 24 Stunden später wurde die Expression von APP sowohl in Zelllysaten, als auch in den neuronalen Kulturüberständen analysiert. Als Kontrolle dienten HEK293T-Zellen, die ebenfalls mit humanem APP695wt transfiziert waren. Durch die Western Blot-Analyse mittels des 1G75A3-Antikörper-Gemisches konnte in Neuronen eine, zu in HEK-Zellen vergleichbare Menge an monomeren und dimeren APP nachgewiesen werden (s. Abbildung 12A und B). Zudem zeigte die Untersuchung des Zellkulturüberstandes, dass neben löslichen APP-Monomeren (sAPP) ebenfalls dimerisierte, sekretierte APP Fragmente (sAPP-Dimere) nicht nur im konditionierten Medium (CM) von HEK293T-Zellen, sondern auch in dem von Primärneuronen enthalten waren (s. Abbildung 12A und B). In den Proben, die mit einem  $\beta$ ME-haltigen Probenpuffer aufgekocht wurden, ist kein Signal für dimeres APP zu erkennen, wobei jedoch eine verstärkte Monomer-Bande sichtbar ist (s. Abbildung 12A und B). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass APP in primären, kortikalen Neuronen, ebenso wie im HEK293T-Zellkulturmodell, Dimere bildet und diese auch prozessiert werden.



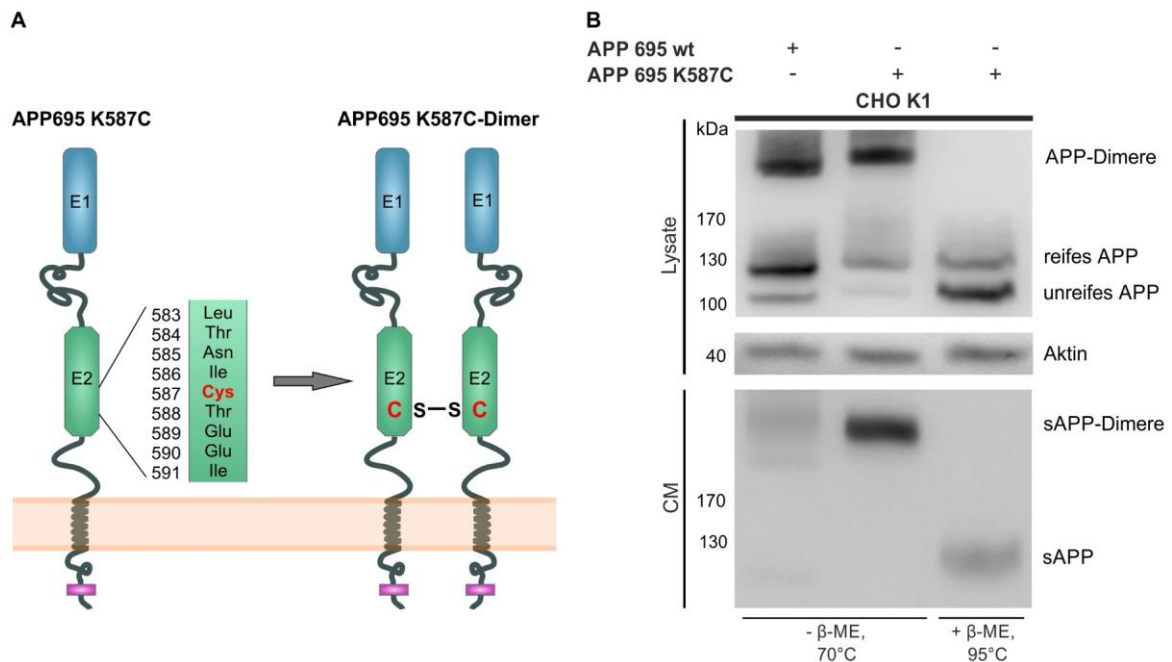
**Abbildung 12: APP-Dimer-Expression und –Prozessierung in Primärneuronen und HEK293T-Zellen.** Western Blot-Analyse der APP-Expression in konditionierten Medien (CM) und Zelllysaten von **(A)** primären, kortikalen Neuronen (PCN) und **(B)** HEK293T-Zellen nach Transfektion mit humanem APP695wt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des 1G75A3-Antikörper-Gemisches. Als Kontrolle für die Detektion des dimerisierten APP wurden die Proben neben Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $-\beta$ ME,  $70^\circ\text{C}$ ) je auch in einem mit  $\beta$ ME ( $+\beta$ ME,  $95^\circ\text{C}$ ) gekocht.

## 6.2 Generierung und Expression des APP695 K587C-Konstruktes

Da dimeres APP sowohl im Lysat, als auch im Kulturüberstand von Neuronen nachgewiesen werden konnte, sollte in dieser Arbeit die Prozessierung von APP-Dimeren genauer analysiert werden. Hierfür wurde ein DNA-Konstrukt generiert, das die cDNA von APP695 mit einer Triplett-Mutation enthält, sodass die Expression dieses Konstruktes zu einem Protein mit einem Aminosäureaustausch von Lysin zu Cystein an Position 587 führt. Mit Hilfe dieser Mutation sollten bevorzugt APP *cis*-Dimere über Bildung von Disulfidbrücken der Cysteinreste (s. Abbildung 13A) in mit APP695 K587C transfizierten Zellen entstehen.

Die Western Blot-Analyse von transient transfizierten CHO K1-Zellen (s. Abbildung 13B) ergab eine verstärkte APP-Dimerisierung in Zellen die das APP695 K587C-Konstrukt exprimierten im Vergleich zu denen, die wildtypisches APP695 bildeten.

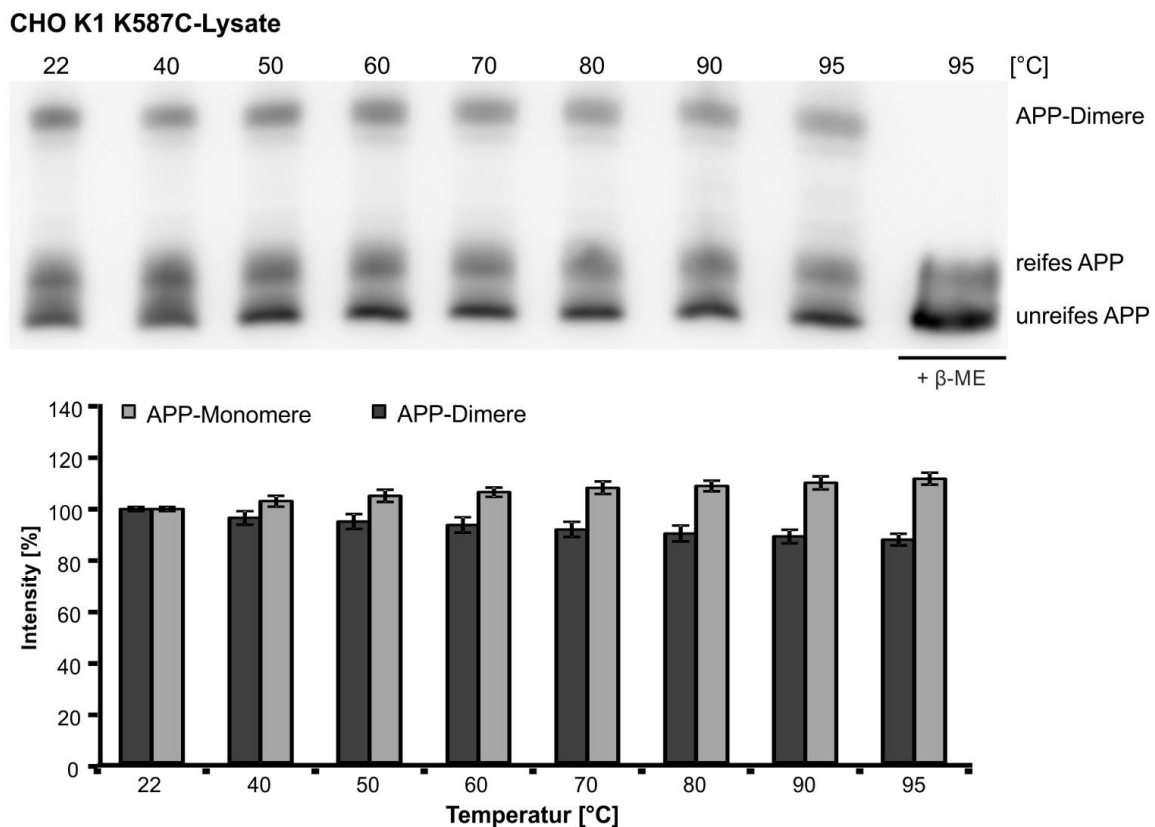
Zwar konnte im Lysat nur eine annähernd gleiche Intensität der APP-Dimer-Banden bei Transfektion mit APP695wt und APP695 K587C beobachtet werden, was jedoch gemessen an der Expression vom monomeren APP und der Aktin-Kontrolle auf die unterschiedliche Transfektionseffizienz der beiden Konstrukte zurückzuführen ist. Der geringfügige Größenunterschied kommt dadurch zustande, dass das APP695 K587C einen zusätzlichen Myc-tag am C-Terminus enthält, der APP695wt fehlt. Im Gegensatz zum Lysat weisen Zellen, die die APP Cys-Mutante exprimierten, verglichen mit den APP695wt transfizierten CHO K1 eine deutlich gesteigerte Menge an sAPP-Dimeren im konditionierten Medium auf (s. Abbildung 13B).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung und Expression des APP695 K587C-Konstruktes.** (A) Das Schema zeigt die APP Cys-Mutante sowie die folgende Dimerisierung zweier dieser APP-Moleküle über Disulfidbrückenbindung. (B) Western Blot-Analyse der Expression von APP-Dimeren und –Monomeren in den Lysaten und konditionierten Medien (CM) von transient transfizierten CHO K1-Zellen, die entweder APP695wt oder APP695 K587C exprimierten, mit Hilfe des 1G75A3-Antikörper-Gemisches. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen. Die Reduktion der APP-Dimere wurde durch Verwendung eines  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Probenpuffers (+ $\beta$ ME) und Erhitzen der Proben auf 95°C erreicht.

In Folge des Nachweises der Funktionalität des hergestellten APP-Dimer-Konstruktes wurden CHO K1-Zellen stabil mit APP695 K587C transfiziert. Die Expression der APP-

Dimere und deren Stabilität wurde mit Hilfe einer Temperaturreihe via Western Blot überprüft. Hierfür wurden die Zellysate mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Die Detektion von APP mittels des 1G75A3-Antikörper-Gemisches zeigt nur eine geringfügige Abnahme am dimerisierten APP mit steigender Inkubationstemperatur. Diese Abnahme am APP-Dimer-Signal wird von einer vergleichbaren Zunahme am monomeren APP begleitet. Lediglich in Proben, die mit einem  $\beta$ ME-haltigen Probenpuffer bei 95°C gekocht wurden, sind keine APP-Dimer Banden, jedoch sehr starke Banden für monomeres APP zu erkennen (s. Abbildung 14). Somit scheint die Expression des APP695 K587C-Konstruktes zur Bildung hitzestabiler APP *cis*-Dimere zu führen.



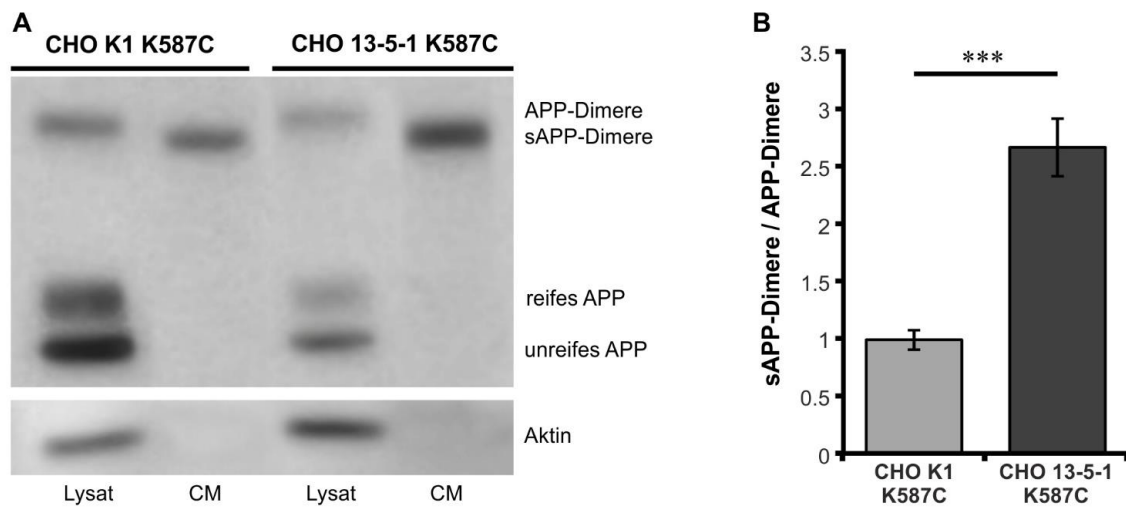
**Abbildung 14: Nachweis hitzestabiler APP-Dimere im Lysat stabil transfizierter CHO K1-Zellen.** Sowohl die Western Blot-Analyse mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch, als auch die Quantifizierung zeigen nur eine geringfügige Abnahme an APP-Dimeren mit einer vergleichbaren Zunahme an APP-Monomeren bei steigender Inkubationstemperatur. Nur bei Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ ME) konnte dimerisiertes APP zu monomerem APP reduziert werden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE; n = 4.

## 6.3 Einfluss von LRP1 auf die Prozessierung von APP-Dimeren

Für monomeres APP konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass LRP1 in dessen Prozessierung eine entscheidende Rolle spielt (Cam et al., 2005; Knauer et al., 1996; Pietrzik et al., 2002, 2004; Ulery et al., 2000). Daher sollte in diesem Zusammenhang der Einfluss von LRP1 auf die enzymatische Spaltung von APP *cis*-Dimeren untersucht werden. Hierfür wurden LRP1-defiziente CHO 13-5-1-Zellen und Primärneurone mit induzierbarem *Lrp1-Knockout* in die Analysen integriert.

### 6.3.1 APP-Dimer-Prozessierung in CHO-Zellen

Um die Unterschiede in der Bildung löslicher APP-Dimere zwischen LRP1-exprimierenden CHO K1- und LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen zu ermitteln, wurden diese Zelllinien stabil mit APP695 K587C transfiziert. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zelllysate sowie das konditionierte Medium der Zellen mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Die Detektion mit 1G75A3 zeigt intensivere Banden für monomeres und dimeres APP im Lysat von CHO K1- verglichen mit dem von CHO 13-5-1-Zellen (s. Abbildung 15A, Spur 1 und 3). Im Gegensatz dazu ist das Signal für lösliche APP-Dimere im Zellkulturüberstand von CHO K1-Zellen schwächer als das der LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen (s. Abbildung 15A, Spur 2 und 4). Der Nachweis des Zytoskelettproteins Aktin mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers diente als Kontrolle für das Laden vergleichbarer Proteinmengen und wurde zur Normalisierung der APP-Dimer-Werte im Lysat genutzt. Um die Divergenzen von CHO K1- und CHO 13-5-1-Zellen bezüglich der Expression von APP-Dimeren und deren Prozessierung zu quantifizieren, wurden schließlich die Verhältnisse von sAPP-Dimeren zum dimeren APP im Zelllysate der beiden Zelllinien miteinander verglichen. Dieses Dimer-Verhältnis ist in CHO 13-5-1-Zellen gegenüber CHO K1-Zellen um mehr als das 2,5-Fache erhöht (s. Abbildung 15B), was auf eine deutlich gesteigerte APP-Dimer-Prozessierung in den LRP1-defizienten Zellen hindeutet.

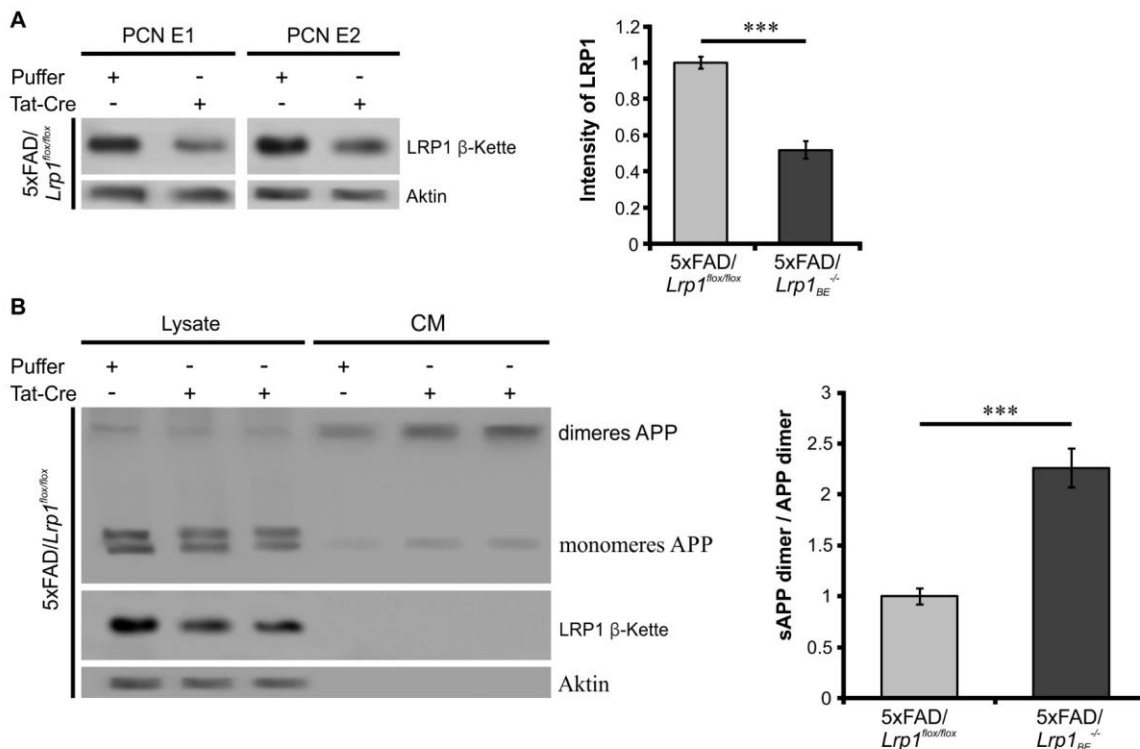


**Abbildung 15: Einfluss der LRP1-Defizienz auf die Bildung von sAPP-Dimeren in CHO-Zellen mit stabiler APP695 K587C-Expression. (A)** Die Western Blot-Analyse mit Hilfe des 1G75A3-Antikörper-Gemisches zeigt eine verminderte Expression von APP-Dimeren in Lysaten und eine gesteigerte Bildung von löslichen APP-Dimeren im konditionierten Medium (CM) von LRP1-defizienten CHO 13-5-1- gegenüber CHO K1-Zellen. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen. **(B)** Die entsprechende Quantifizierung ergab eine mehr als 2,5-fache Zunahme des APP-Dimer-Verhältnisses bei fehlender LRP1-Expression in CHO-Zellen, die das APP695 K587C-Konstrukt stabil exprimierten. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE; n = 5; t-Test; p < 0,001 (\*\*\*).

### 6.3.2 APP-Dimer-Prozessierung in Primärneuronen

Da lösliche APP-Dimere in primären Neuronen von Mäusen nachgewiesen werden konnten, die mit APP695wt transfiziert waren (s. Abbildung 12), wurde der Einfluss von LRP1 auf die APP-Prozessierung auch in diesen Zellen untersucht. Hierfür wurden Primärneurone aus Mausembryonen isoliert, deren Genom neben den 5xFAD Mutationen ein von loxP-Stellen flankiertes *Lrp1*-Gen enthielt. Mit Hilfe des Enzyms Tat-Cre wurde die ortsspezifische Rekombination dieser Erkennungssequenzen und folglich die Exzision von *Lrp1* aus der DNA induziert. Nach einer Behandlung für 48 Stunden mit der Rekombinase wurden die Zellkulturüberstände und die Lysate der Primärneuronen via Western Blot analysiert. Zunächst konnte mit dem Antikörper 1704, der gegen den C-Terminus von LRP1 gerichtet ist, eine um etwa 50 % reduzierte Expression von LRP1 in mit Tat-Cre-behandelten gegenüber unbehandelten

Neuronen festgestellt werden (s. Abbildung 16A). Der Nachweis von APP mittels des 1G75A3-Antikörper-Gemisches ergab für Zellen mit induziertem *Lrp1-Knockout*, im Vergleich zu denen mit unverändertem LRP1-Level, eine etwas verringerte Expression im Lysat. Im Kulturmedium sind dagegen deutlich stärkere Signale für die löslichen APP-Fragmente sichtbar (s. Abbildung 16B). Auch hier wurde der Unterschied in der APP-Dimer-Prozessierung zwischen den Kontroll-Neuronen, die nur mit dem Puffer der Rekombinase, und den PCN, die mit Tat-Cre behandelt waren, anhand des Dimer-Verhältnisses quantifiziert. Hierfür wurden die densitometrischen Werte der sAPP-Dimere durch die auf Aktin normalisierten Werte für APP-Dimere im Lysat geteilt. Dieses Dimer-Verhältnis ist in Neuronen mit induziertem *Lrp1-Knockout* um mehr als das doppelte erhöht verglichen mit Puffer-behandelten Zellen (s. Abbildung 16B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CHO-Zellen führt eine reduzierte LRP1-Expression vermeintlich zur vermehrten Prozessierung der exprimierten APP *cis*-Dimere.



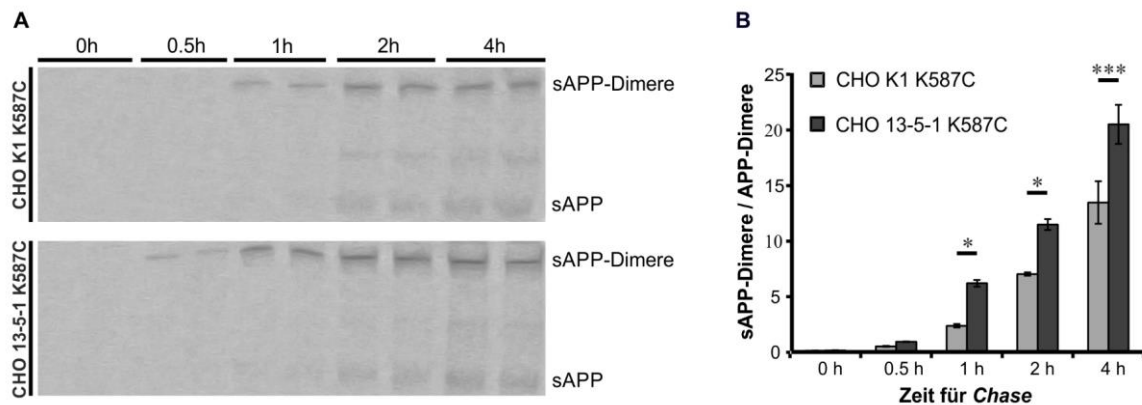
**Abbildung 16: Einfluss des *Lrp1*-Knockouts auf die Bildung von sAPP-Dimeren in kortikalen Primärneuronen. (A)** Repräsentative Western Blot-Analyse (links) der LRP1-Expression in primären, kortikalen Neuronen (PCN) zweier Embryonen (E1 und E2) der Mauslinie 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>*. Die Detektion mit dem 1704-Antikörper ergab ein um etwa die Hälfte (rechts) vermindertes LRP1-Signal bei Neuronen, die für 48 h mit der Tat-Cre-Rekombinase behandelt waren gegenüber den mit Puffer-behandelten Kontroll-Neuronen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; t-Test;  $p < 0,001$  (\*\*\*). **(B)** Die Reduktion der LRP1-Expression geht mit einer Steigerung des APP-Dimer-Verhältnisses um mehr als das Doppelte (rechts) einher, welches anhand der APP-Dimer-Detektion mit Hilfe des 1G75A3-Antikörper-Gemisches bestimmt wurde. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen (links). Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n = 5$ ; t-Test;  $p < 0,001$  (\*\*\*).

## 6.4 Zeitlicher Verlauf der Bildung von sAPP-Dimeren

Um den Einfluss von LRP1 auf die Generierung von sAPP-Dimeren weiter zu untersuchen, wurde die zeitliche Entstehung dieser dimerisierten Fragmente mittels einer *Pulse-Chase*-Analyse genauer betrachtet. Hierfür wurden CHO K1- und CHO 13-5-1-Zellen kurzzeitig mit  $^{35}\text{S}$  kultiviert, sodass dieses Isotop in die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin eingebaut wurde und damit der



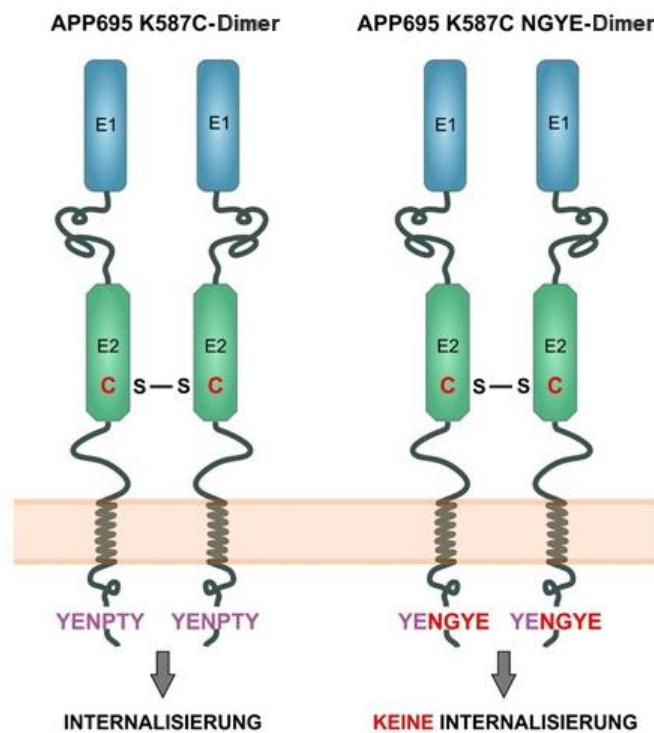
vorübergehenden, radioaktiven Markierung der synthetisierten Proteine diene. Für die Verfolgung der Markierung wurden die Zellen nach 0, 0,5, 1, 2 oder 4 Stunden lysiert und deren Überstände gesammelt. Durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper-Gemisch 1G75A3 wurde APP aus den Zelllysaten und Kulturüberständen isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität mit Hilfe einer Expositionsfolie detektiert. Die Analyse ergab für beide Zelllinien ein ähnliches Bild der APP-Dimere im Lysat (s. Abbildung 24, Anhang S. 116), wohingegen sich der Nachweis löslicher APP-Dimere in den Zellüberständen zwischen CHO K1- und CHO 13-5-1-Zellen deutlich unterschied. So konnte in den LRP1-defizienten Zellen bereits nach einem 30-minütigen *Chase* ein deutliches Signal für sAPP-Dimere detektiert werden (s. Abbildung 17A unten). In CHO K1 Zellen ist eine entsprechend intensive Bande erst bei einstündiger Verfolgung der radioaktiven Markierung sichtbar (s. Abbildung 17A oben). Um die ermittelten Unterschiede zu quantifizieren, wurde das APP-Dimer-Verhältnis beider Zelllinien zu jedem Zeitpunkt des *Chase* miteinander verglichen. Dabei zeigt sich ein signifikant erhöhtes APP-Dimer-Verhältnis für Zellen mit fehlender LRP1-Expression im Vergleich zu denen, die LRP1 normal exprimierten (s. Abbildung 17B). Somit deuten die Ergebnisse sowohl auf eine frühere, als auch erneut auf eine gesteigerte Prozessierung vom dimerisierten APP in LRP1-defizienten CHO 13-5-1-verglichen mit CHO K1-Zellen hin.



**Abbildung 17: Pulse-Chase-Analyse von APP-Dimeren in CHO-Zellen mit stabiler APP695 K587C-Expression.** (A) Nachweis radioaktiv-markierter löslicher APP-Fragmente in den Kulturüberständen von CHO-Zellen mit stabiler APP695 K587C-Expression nach deren Immunpräzipitation mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch. Neben der früheren Detektion von sekretierten APP-Dimeren (sAPP-Dimere) zeigt (B) die Quantifizierung zudem ein gesteigertes APP-Dimer-Verhältnis in LRP1-defizienten CHO 13-5-1- im Vergleich zu CHO K1-Zellen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n = 3$ ; t-Test;  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

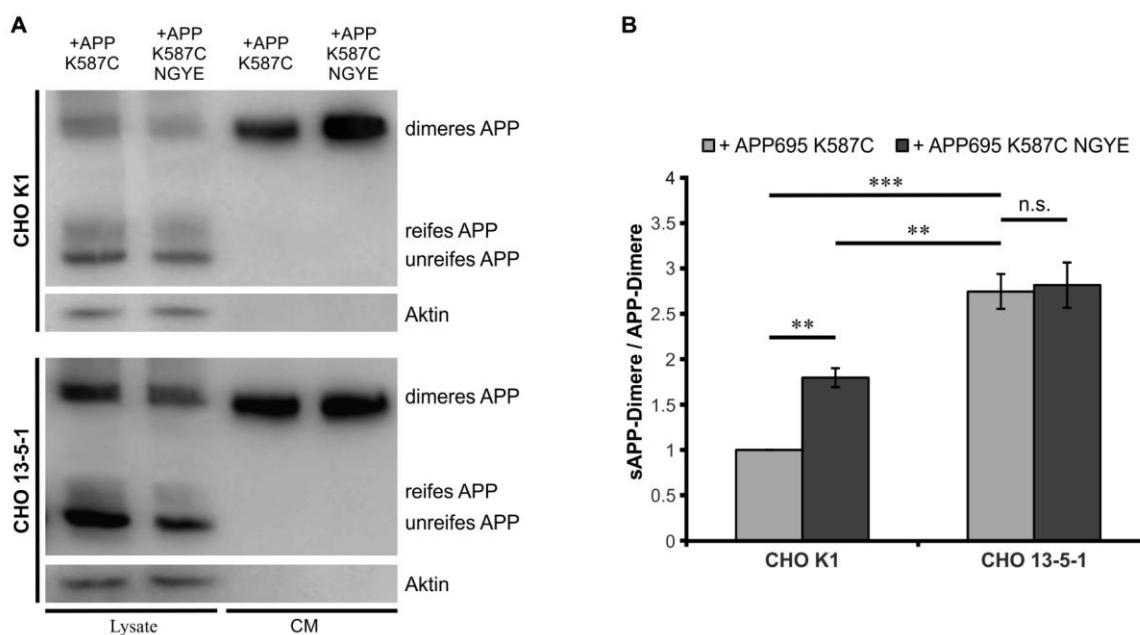
## 6.5 Internalisierung von APP-Dimeren

Da in Zellen mit fehlender oder verringerter LRP1-Expression ein Anstieg an löslichen APP-Dimeren im Zellkulturmedium zu sehen war, sollte untersucht werden, ob eine Veränderung in der Internalisierung damit in Zusammenhang steht. Für monomeres APP wurde bereits gezeigt, dass dieses in Interaktion mit LRP1 von der Zelloberfläche endozytiert und somit die Art der APP-Prozessierung beeinflusst wird (Cam et al., 2005; Pietrzik et al., 2002). Um die Bedeutung der Internalisierung für die Bildung von sAPP-Dimeren zu ermitteln, wurden CHO-Zellen transient mit einem speziellen APP-Dimer-Konstrukt transfiziert. Dieses Plasmid (APP695 K587C NGYE) kodiert für die APP Cys-Mutante mit einem veränderten C-Terminus, sodass im exprimierten Protein das NPTY-Motiv von APP durch NGYE ersetzt ist. Da diese Mutation in der für die Internalisierung entscheidenden YENPTY-Sequenz liegt (Lai et al., 1995; MarquezSterling et al., 1997), führt die Expression des beschriebenen Konstruktes zu APP-Molekülen, die nicht von der Zelloberfläche internalisiert werden können (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Schematische Darstellung von Dimeren der reinen APP Cys-Mutante (links) und der Internalisierungsmutante (rechts).**

Als Kontrolle wurden CHO-Zellen ebenfalls transient mit APP695 K587C transfiziert. Anschließend wurden über eine Western Blot-Analyse mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch die Zelllysate und Kulturmedien untersucht. In CHO K1-Zellen führte die Expression der Internalisierungsmutante im Vergleich zum bereits bekannten Dimer-Konstrukt zu einer deutlichen Zunahme an löslichen APP-Dimeren und damit einhergehend zu einem signifikanten Anstieg im APP-Dimer-Verhältnis (sAPP-Dimer im Medium/APP-Dimer im Lysat; s. Abbildung 19A oben und 19B). Im Gegensatz dazu konnte im Zellüberstand von LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen eine nahezu identische Menge an sAPP-Dimeren bei Expression der beiden Dimer-Konstrukte detektiert werden (s. Abbildung 19A unten). Das APP-Dimer-Verhältnis ist hier nur geringfügig erhöht (s. Abbildung 19B). Dies deutet darauf hin, dass die nachgewiesenen sAPP-Dimer-Fragmente in den konditionierten Medien der Zellen durch die Prozessierung von APP *cis*-Dimeren an der Zelloberfläche entstehen.



**Abbildung 19: Einfluss der Internalisierung von APP695 K587C auf dessen Prozessierung. (A)** Western Blot-Analyse der APP-Expression transient transfizierter CHO-Zellen mit Hilfe des 1G75A3-Antikörper-Gemisches. CHO K1-Zellen zeigen eine deutlich gesteigerte sAPP-Dimer-Produktion bei Expression der APP-Internalisierungsmutante verglichen zu denen, die die APP Cys-Mutante exprimierten (oben). Bei LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen ist keine signifikante Änderung in der sAPP-Dimer-Expression zu erkennen (unten). **(B)** Die Quantifizierung des APP-Dimer-Verhältnisses weist eine signifikante Erhöhung in CHO K1-Zellen, die APP695 K587C NGYE exprimierten, auf im Vergleich zu denen, die mit APP695 K587C transfiziert waren. Dies führt zu einer Annäherung an das APP-Dimer-Verhältnis von CHO 13-5-1-Zellen, das für beide exprimierten APP-Konstrukte annähernd gleich ist. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n = 4$ ; *one-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test; n.s. = nicht signifikant;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)

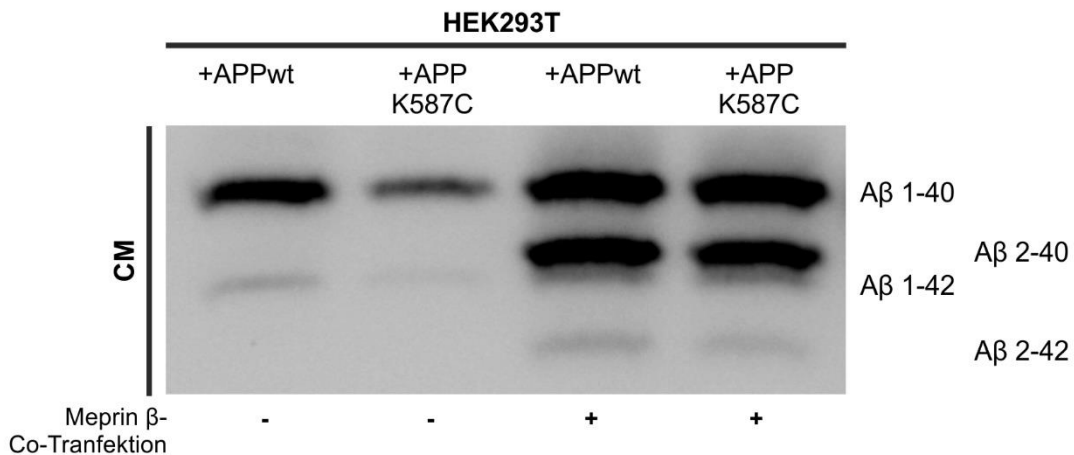
## 6.6 Prozessierung von APP-Dimeren durch ADAM10 und Meprin $\beta$

Da APP *cis*-Dimere wohl an der Zelloberfläche enzymatisch gespalten werden, wurde untersucht, ob bei diesem Prozess dieselben Sekretasen, die für die Prozessierung des monomeren APP verantwortlich sind, eine Rolle spielen. Daher wurde in dieser Arbeit die Aktivität von ADAM10, der wichtigsten  $\alpha$ -Sekretase von APP (Colciaghi et al., 2002; Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010; Lammich et al., 1999; Postina et al.,

2004; Tyler et al., 2002; Weidemann et al., 1989), sowie von Meprin  $\beta$ , die APP ebenfalls an der Zelloberfläche prozessiert (Bien et al., 2012; Jefferson et al., 2011; Schönherr et al., 2016), in Bezug auf APP *cis*-Dimere genauer betrachtet.

### 6.6.1 APP-Dimer-Prozessierung durch Meprin $\beta$

Zunächst sollte der Einfluss von Meprin  $\beta$  auf die Spaltung von APP *cis*-Dimeren ermittelt werden, da dieses Protein selbst in dimerisierter Form vorkommt (Bertenshaw et al., 2003; Kruse et al., 2004). Für diese Analyse erfolgte eine Co-Transfektion von HEK293T-Zellen mit APP695wt bzw. APP695 K587C und Meprin  $\beta$ . Als Kontrolle für die Meprin  $\beta$ -Expression dienten Zellen, die entweder nur mit APP695wt oder nur mit dem APP-Dimer-Konstrukt transfiziert waren. Die Spaltung von APP durch Meprin  $\beta$  resultiert in der Bildung von trunkeierten A $\beta$ -Peptiden (Bien et al., 2012; Jefferson et al., 2011). Somit wurden diese Peptide 24 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe einer Immunpräzipitation aus den konditionierten Zellmedien isoliert und über eine Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von A $\beta$  erfolgte mit dem IC16-Antikörper durch Western Blot-Analyse. Dabei konnten in den HEK-Zellen, die mit Meprin  $\beta$  co-transfiziert waren, zusätzlich zu A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> die verkürzten Peptide A $\beta$ <sub>2-40</sub> und A $\beta$ <sub>2-42</sub> detektiert werden (s. Abbildung 20). Interessanterweise ist in diesen Zellen zudem eine vergleichbare Menge an A $\beta$ -Peptiden bei APP695wt- und APP695 K587C-exprimierenden HEKs zu erkennen, während ohne Meprin  $\beta$ -Überexpression in APP695wt-Kontrollzellen deutlich stärkere A $\beta$ -Signale sichtbar sind als in den mit der APP Cys-Mutante transfizierten Zellen (s. Abbildung 20). Dieser Effekt könnte durch eine bevorzugte Prozessierung von APP *cis*-Dimeren durch Meprin  $\beta$  zustande kommen.

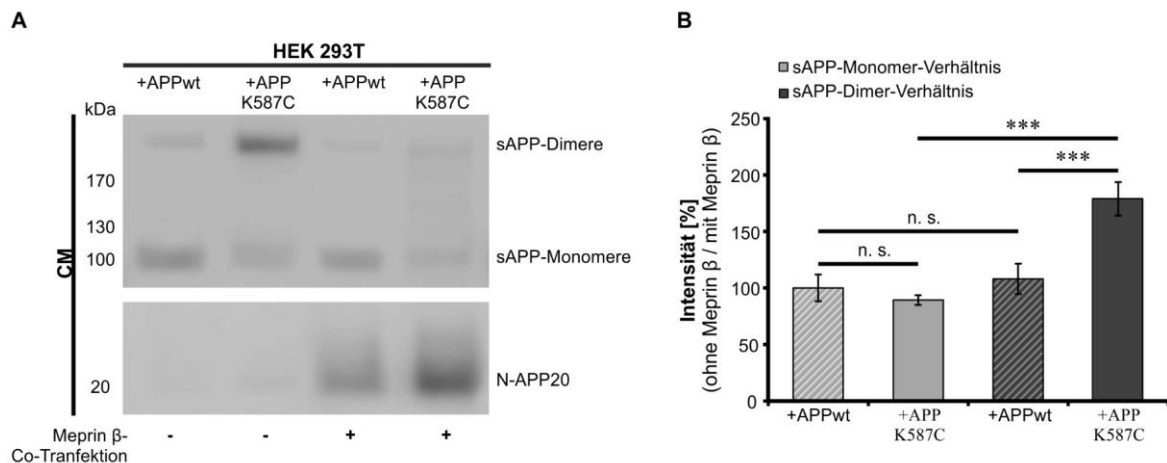


**Abbildung 20: Vergleich der Generierung von Aβ-Peptiden bei Expression von APP695wt bzw. APP695 K587C mit und ohne Meprin β-Überexpression.** Western Blot-Analyse von Aβ-Peptiden im konditionierten Medium (CM) von transient transfizierten HEK293T-Zellen nach der Protein-Auftrennung über eine Harnstoff-SDS-PAGE. Die Detektion mit dem IC16-Antikörper zeigt eine geringere Intensität von Aβ-Peptiden bei Expression von APP695 K587C verglichen mit APP695wt (Spur 1 und 2). Bei Überexpression von Meprin β ist die Menge an Aβ-Peptiden für beide transfizierte APP-Konstrukte nahezu gleich (Spur 3 und 4). Zudem sind hier Banden für weitere Aβ-Varianten (Aβ<sub>1-42</sub> und Aβ<sub>2-42</sub>) im Vergleich zu Zellen ohne Meprin β-Co-Expression zu erkennen.

Zur Bekräftigung dieser Hypothese wurde auch die Bildung löslicher APP-Fragmente mittels Western Blot analysiert. Die Detektion mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch zeigt überraschenderweise eine verringerte Menge an sAPP in HEK-Zellen mit Meprin β-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollen. Dabei fällt insbesondere die Reduktion von sAPP-Dimeren auf (s. Abbildung 21A oben). Der Nachweis von N-terminalen APP-Fragmenten mittels des 22C11-Antikörpers ergab dagegen deutlich stärkere Signale für N-APP20, ein etwa 20 kDa großes N-terminales APP-Fragment, bei HEK-Zellen, die mit Meprin β co-transfiziert waren, verglichen mit denen, die nur APP695wt bzw. nur APP695 K587C exprimierten (s. Abbildung 21A unten). Zudem führte die Expression der APP Cys-Mutante im Gegensatz zu APP695wt in Zellen mit Meprin β-Überexpression, zu einer immens gesteigerten Bildung dieses Fragments (s. Abbildung 21A unten). Die Western Blot-Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass Meprin β nicht nur APP, sondern auch das durch dessen Spaltung entstandene sAPP weiter prozessiert, wodurch kleinere NTFs von APP entstehen, und dass dabei bevorzugt dimerisiertes sAPP als Substrat dient. Um die beobachteten Effekte zu

quantifizieren, wurden die Verhältnisse von sAPP-Monomeren und –Dimeren berechnet. Hierfür wurde je der Wert des monomeren bzw. dimeren sAPP von Zellen, die nicht mit Meprin  $\beta$  transfiziert waren, durch den von HEKs mit Meprin  $\beta$ -Überexpression geteilt. Der Vergleich des sAPP-Monomer-Verhältnisses von Zellen, die APP695wt exprimierten, zum entsprechenden sAPP-Dimer-Verhältnis zeigt nur einen geringfügigen Unterschied (s. Abbildung 21B, hellgrau und schraffiert zu dunkelgrau und schraffiert). Im Gegensatz dazu weist der identische Vergleich bei HEK-Zellen, die mit APP695 K587C transfiziert waren, auf eine signifikant gesteigerte Prozessierung von sAPP-Dimeren gegenüber sAPP-Monomeren durch Meprin  $\beta$  hin (s. Abbildung 21B, hellgrau zu dunkelgrau). Die Favorisierung von APP *cis*-Dimeren als Substrat für Meprin  $\beta$  wird weiterhin dadurch angedeutet, dass das Dimer-Verhältnis von HEK-Zellen mit Expression der APP Cys-Mutante verglichen mit dem der APP695wt-exprimierenden Zellen ebenfalls signifikant erhöht ist (s. Abbildung 21B, dunkelgrau und schraffiert zu dunkelgrau).





### Abbildung 21: Bedeutung von Meprin $\beta$ für die Prozessierung von APP-Dimeren. (A)

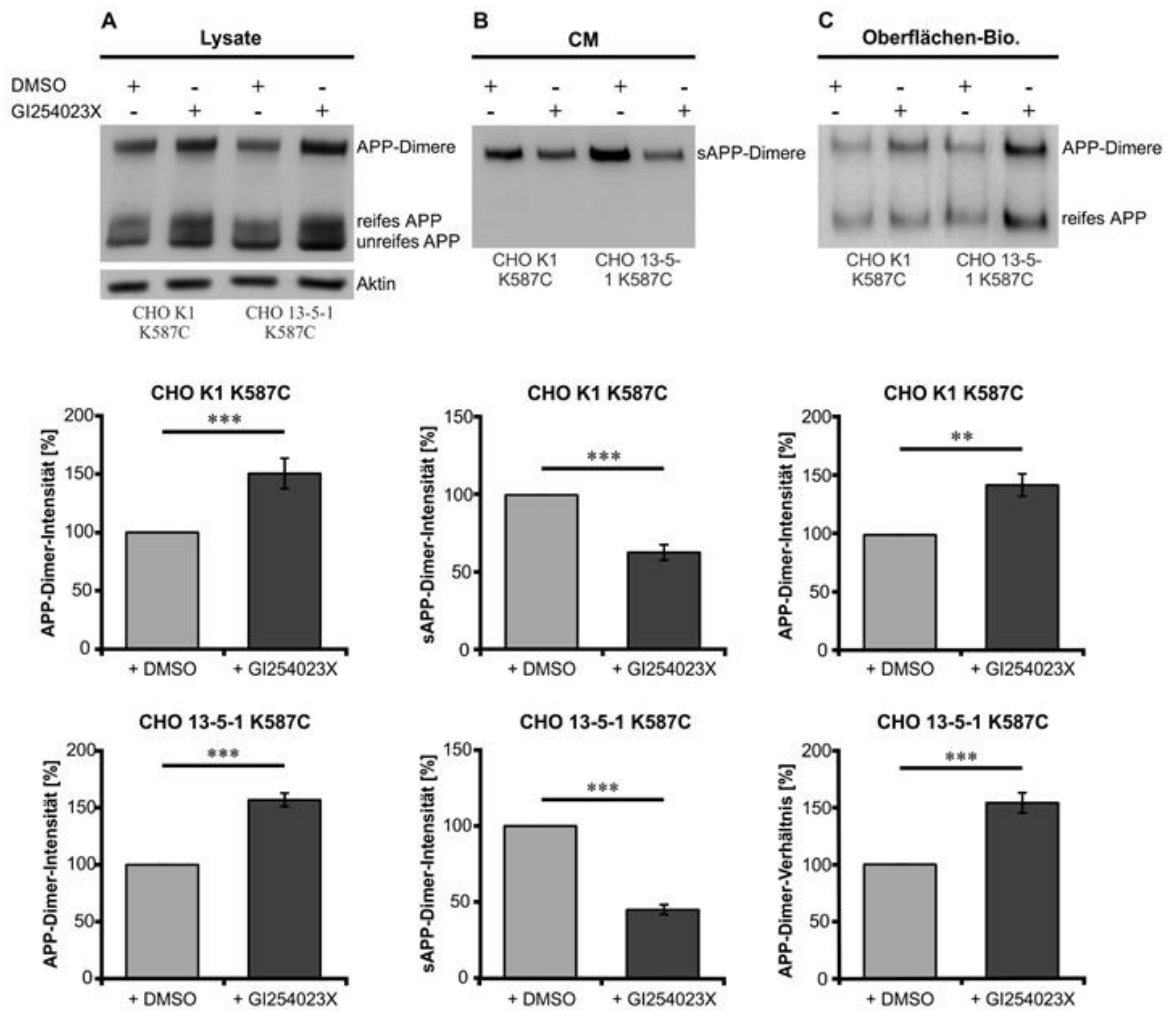
Western Blot-Analyse von löslichen APP-Fragmenten im konditionierten Medium (CM) von transient transfizierten HEK293T-Zellen mit entweder APP695wt oder APP695 K587C. Der Nachweis der größeren sAPP-Moleküle mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch (oben) zeigt eine Verringerung der monomeren und insbesondere der dimeren APP-Fragmente bei Co-Transfektion der Zellen mit Meprin  $\beta$ . Im Gegensatz dazu nimmt die Menge an N-APP20, das mit Hilfe des 22C11-Antikörpers nachgewiesen wurde (unten), zu, wenn die HEK-Zellen neben dem jeweiligen APP-Konstrukt auch Meprin  $\beta$  exprimierten, wobei der Effekt bei Transfektion mit der APP Cys-Mutante noch deutlicher erscheint. (B) Quantifizierung der sAPP-Monomer- bzw. sAPP-Dimer-Verhältnisse von Zellen ohne zu denen mit Meprin  $\beta$ -Co-Transfektion. Das Monomer- und Dimer-Verhältnis der löslichen APP-Fragmente von Zellen, die APP695wt exprimierten (hellgrau und schraffiert sowie dunkelgrau und schraffiert), war nahezu gleich und wies zudem keinen signifikanten Unterschied zum sAPP-Monomer-Verhältnis der HEKs mit APP695 K587C-Expression auf (hellgrau). Dagegen war das sAPP-Dimer-Verhältnis in letzteren (dunkelgrau) signifikant erhöht verglichen mit dem zugehörigen sAPP-Monomer-Verhältnis, aber auch mit dem sAPP-Dimer-Verhältnis von Zellen mit APP695wt-Expression. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n = 4$ ; *one-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test; n.s. = nicht signifikant;  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

### 6.6.2 Prozessierung von APP-Dimeren durch ADAM10

Um die Bedeutung der  $\alpha$ -Sekretase für die Spaltung des dimerisierten APP zu ermitteln, wurden CHO-Zellen, die die APP Cys-Mutante stabil exprimierten, mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X, gelöst in DMSO, behandelt. Die Kultivierung der Zellen mit der gleichen Menge an Lösungsmittel diente als Kontrolle. 24 Stunden nach der



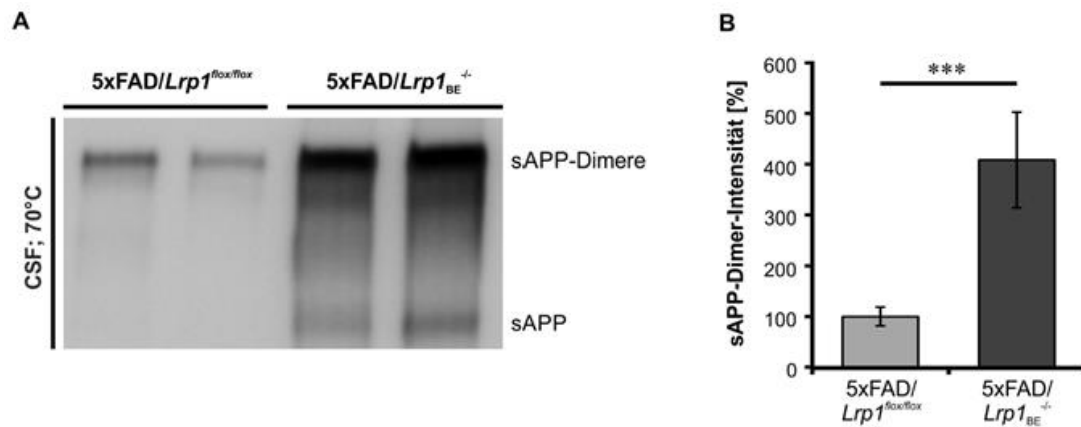
Behandlung wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und eine Biotinylierung der Oberflächenproteine durchgeführt. Die so markierten Proteine wurden später durch eine Präzipitation über NeutrAvidin *Beads* aus den Lysaten isoliert und ebenso wie die übrigen Zelllysate und konditionierten Medien über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western Blot-Analyse der Lysatproben mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch zeigt eine deutliche Zunahme von APP-Dimeren sowie von reifen APP-Monomeren bei Inhibition von ADAM10 verglichen mit den Kontrollen (s. Abbildung 22A). Die Quantifizierung über das Verhältnis des dimerisierten APP von GI254023X-behandelten Zellen zu der Menge in den Kontrollzellen ergab für CHO K1 einen Anstieg von etwa 50 %, für CHO 13-5-1 von ca. 56 % (s. Abbildung 22A). In den Zellkulturüberständen der beiden Zelllinien war ebenfalls ein Effekt der Inhibitor-Behandlung zu erkennen. Hier zeigt sich im Vergleich zu den ausschließlich mit DMSO-behandelten Zellen eine signifikante Abnahme an löslichen APP-Dimeren von 38 % bei CHO K1-Zellen und von 55 % bei CHO 13-5-1-Zellen (s. Abbildung 22B). Weiterhin konnte mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung eine Anreicherung des dimerisierten APP sowie des reifen, monomeren APP detektiert werden, wenn die Zellen mit dem ADAM10-Inhibitor behandelt waren (s. Abbildung 22C). Über den Vergleich der APP-Dimer-Level in diesen Zellen mit dem in CHOs, die nur mit DMSO inkubierten, wurde eine Zunahme von 43 % für CHO K1- und von 54 % für CHO 13-5-1-Zellen festgestellt (s. Abbildung 22C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur monomeres APP, sondern auch die exprimierten APP *cis*-Dimere durch ADAM10 an der Zelloberfläche gespalten werden. Zudem wird durch die etwas deutlicher ausgeprägten Effekte der ADAM10-Inhibierung in LRP1-defizienten CHO 13-5-1- Zellen erneut die Bedeutung von LRP1 für die Prozessierung von APP *cis*-Dimeren hervorgehoben.



**Abbildung 22: Bedeutung von ADAM10 für die Prozessierung von APP-Dimeren.** Western Blot-Analyse der APP-Expression in **(A)** Lysaten und **(B)** konditionierten Medien (CM) sowie **(C)** des biotinylierten APP der Zelloberfläche von CHO K1-Zellen und CHO 13-5-1-Zellen, die APP695 K587C stabil exprimierten, mit Hilfe des 1G75A3-Antikörper-Gemisches. Bei Zugabe des ADAM10-Inhibitors GI254023X fällt eine gesteigerte Intensität an APP in den Lysaten **(A)** sowie am biotinylierten APP **(C)** auf, wohingegen die Menge an löslichen APP-Dimeren abnimmt **(B)**. Unterhalb der Blots ist die jeweilige Intensität von APP-Dimeren bei Behandlung der Zellen mit DMSO bzw. mit GI254023X quantifiziert. Dabei ist zu beobachten, dass die Effekte der ADAM10-Inhibierung auf die APP-Dimer-Expression in den Lysaten **(A)** und an der Zelloberfläche **(C)** sowie auf die Bildung von sAPP-Dimeren **(B)** signifikant sind und für CHO 13-5-1-Zellen noch deutlicher ausfallen als für CHO K1-Zellen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n = 7$ ; t-Test;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)

## 6.7 Einfluss von LRP1 auf die Bildung von sAPP-Dimeren *in vivo*

Durch verschiedene Studien konnten bereits monomere sAPP-Fragmente in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Brinkmalm et al., 2013; Olsson et al., 2003; Sennvik et al., 2000; Van Nostrand et al., 1992). Da in dieser Arbeit auch dimerisiertes sAPP in den Zellüberständen von Primärneuronen detektiert wurde und der induzierte *Knockout* von *Lrp1* in diesen Zellen eine gesteigerte Produktion der sAPP-Dimer-Fragmente zur Folge hatte, sollte festgestellt werden, ob LRP1 auch *in vivo* die Bildung der löslichen APP-Dimere beeinflusst. Hierfür wurde in Mäusen mit 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Hintergrund, die zudem das *Slco1c1-CreER<sup>T2</sup>*-Allel besaßen mit Hilfe von Tamoxifen der *Knockout* von *Lrp1* in Endothelzellen des Gehirns sowie den CSF-sezernierenden Epithelzellen des Plexus choroideus induziert (Storck et al., 2016). Diesen 5xFAD/*Lrp1*<sup>BE<sup>-/-</sup></sup>-Mäusen und 5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen, die ebenfalls die Tamoxifen-Behandlung erhalten hatten, wurde CSF entnommen. Anschließend wurden die in diesem Liquor enthaltenen Proteine, die zum Großteil von den Epithelzellen des Plexus choroideus produziert und aktiv sezerniert werden (Brown et al., 2004), über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein von sAPP-Dimeren untersucht. Der Nachweis mit 1G75A3 zeigt eine starke Zunahme an löslichen APP-Fragmenten, insbesondere aber an sAPP-Dimeren in der CSF von Tieren mit induziertem *Lrp1-Knockout* (s. Abbildung 23A). Die densitometrische Analyse der Intensität löslicher APP-Dimere ergab etwa eine Vervierfachung dieser APP-Fragmente bei fehlender LRP1-Expression verglichen zur Menge in der CSF der Kontrollmäuse (s. Abbildung 23B). Somit scheint LRP1 auch *in vivo* eine entscheidende Rolle in der Prozessierung von APP-Dimeren zu spielen.



**Abbildung 23: Einfluss des *Lrp1*-Knockouts auf die Bildung von sAPP-Dimeren *in vivo*.** (A) Die Analyse der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von 5xFAD-Mäusen ohne (5xFAD/*Lrp1*<sup>flox/flox</sup>) bzw. mit (5xFAD/*Lrp1*<sup>BE-/-</sup>) induziertem *Lrp1*-Knockout über Western Blot mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch zeigt eine deutliche Zunahme an löslichen APP-Fragmenten und insbesondere an sekretierten APP-Dimeren (sAPP-Dimeren) bei Induktion der *Lrp1*-Exzision. (B) Die Quantifizierung ergab eine Steigerung der Intensität an sAPP-Dimeren um etwa das Vierfache, bei Mäusen mit induziertem *Lrp1*-Knockout verglichen zu denen, die LRP1 normal exprimierten. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SE; n = 5; p < 0,001 (\*\*\*).

## 7 Diskussion

In Bezug auf die Alzheimer Krankheit stellt APP seit Jahren ein bedeutendes Forschungsobjekt dar. Als Vorläuferprotein von A $\beta$ -Peptiden, die den Hauptbestandteil der senilen Plaques bilden, die in Gehirnen von Patienten gefundenen wurden, spielt APP eine Schlüsselrolle in der Klärung der Entstehung dieser Erkrankung. Dabei ist insbesondere das Verständnis der Prozessierung von APP von Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen wird das Protein sowohl auf dem nicht-amyloidogenen, als auch auf dem amyloidogenen Weg enzymatisch gespalten (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992, 1993; Pietrzik and Behl, 2005; Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992). Eine Verschiebung des Gleichgewichts dieser beiden Prozessierungswege in Richtung der vermehrten Sekretion von A $\beta$  wird mit der Pathogenese von Alzheimer in Verbindung gebracht. Die Art der sequentiellen Spaltung durch verschiedene Sekretasen ist von unterschiedlichen Faktoren und anderen Proteinen abhängig. So spielt u.a. LRP1 eine wichtige Rolle innerhalb dieses Prozesses. Mehrere Studien haben bereits die Interaktion von APP und LRP1 und den damit verbundenen Einfluss von LRP1 auf die Endozytose, den intrazellulären Transport und die Prozessierung von APP gezeigt (Cam et al., 2005; Golde et al., 1992; Knauer et al., 1996; Koo and Squazzo, 1994; Kounnas et al., 1995; Perez et al., 1999; Pietrzik et al., 2002, 2004; Ulery et al., 2000). Bislang beschränkten sich die Untersuchungen dabei auf monomere APP-Proteine. Jedoch wurde vor Kurzem festgestellt, dass ein großer Teil des gebildeten APP wohl in dimerisierter Form vorliegt und dass solche APP-Dimere sogar *in vivo* im Gehirn von Mäusen vorhanden sind (Munter et al., 2007, 2010; Schmidt et al., 2012). Daher wurde in dieser Arbeit die Prozessierung von APP-Dimeren sowie die Beteiligung von LRP1 an diesem Prozess genauer analysiert.

### 7.1 Die APP Cys-Mutante als geeignetes Modell für die Analyse von APP-Dimeren

Die Tatsache, dass APP-Homodimere nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* nachgewiesen wurden, eröffnete einen neuen Aspekt für die Untersuchung der komplexen Funktionen dieses Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass die E1- und E2-Domänen im extrazellulären Teil des Proteins sowie die Transmembrandomäne in

die Dimerisierung von APP involviert sein können (Baumkötter et al., 2014; Decock et al., 2016; Hoefgen et al., 2014; Kaden et al., 2008; Lee et al., 2011; Munter et al., 2007; Nadezhdin et al., 2012; Soba et al., 2005; Song et al., 2013; Wang et al., 2005, 2009; Wang and Ha, 2004; Xue et al., 2011). Dieser Prozess kann entweder zur Verknüpfung von APP-Proteinen in *trans*- oder *cis*-Orientierung führen (s. Abbildung 4). Während die *trans*-Dimerisierung v.a. mit Zell-Zell-Interaktionen und folglich der Adhäsion in Verbindung gebracht wird (Baumkötter et al., 2014; Isbert et al., 2012; Klevanski et al., 2014; Soba et al., 2005; Stahl et al., 2014; Wang et al., 2005, 2009), ist über die Funktion der Oligomerisierung in *cis*-Stellung bislang wenig bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass diese Form der APP-Dimerisierung Einfluss auf die Prozessierung des Proteins durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen hat (Eggert et al., 2009; Jung et al., 2014; Kaden et al., 2008; Libeu et al., 2012; Munter et al., 2007, 2010; Richter et al., 2010; Schmidt et al., 2012; So et al., 2012). Somit haben APP *cis*-Dimere möglicherweise eine Bedeutung im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung. Mehrere Studien haben sich daher besonders mit der A $\beta$ -Produktion in Abhängigkeit der Dimerisierung von APP befasst. Allerdings lieferten diese Untersuchungen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So wurde einerseits eine Verringerung der A $\beta$ -Level nachgewiesen, wenn APP in dimerisierter Form vorlag (Eggert et al., 2009; Kaden et al., 2008). Andererseits wurde dieser Effekt ebenfalls bei Inhibierung der APP-Dimerisierung beobachtet (Libeu et al., 2012; Schmidt et al., 2012; So et al., 2012). Zudem beschrieben andere Gruppen keine Veränderung der A $\beta$ -Level an sich, sondern lediglich eine Verschiebung des Verhältnisses verschiedener A $\beta$ -Varianten (Munter et al., 2007, 2010; Richter et al., 2010). Diese Diskrepanzen lassen sich eventuell auf die jeweiligen APP-Konstrukte zurückführen, die zur Expression von dimerisierten Proteinen generiert und verwendet wurden. Kompetitive und/oder allosterische Effekte sowie durch die eingebrachten Mutationen hervorgerufene Konformationsänderungen der exprimierten APP-Dimere werden als mögliche Gründe für eine Veränderung der APP-Prozessierung angenommen. Zudem kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass das Vorhandensein einer Mutation in oder nahe der Schnittstelle einer Sekretase, wie beispielsweise innerhalb der A $\beta$ -Sequenz, deren Aktivität nicht beeinflusst. Daher wurde im Zuge dieser Arbeit eine APP Cys-Mutante generiert, bei der die zum Aminosäureaustausch führende Mutation nicht in unmittelbarer Nähe einer Sekretase-Schnittstelle liegt. Die anfängliche Überprüfung der Funktionalität des generierten APP695 K587C-Konstruktes zeigte, dass die

eingefügte Mutation zu einer effektiven Dimerisierung der APP-Proteine führt (s. Abbildung 13B, S. 63). Zwar wiesen die Lysate von CHO K1-Zellen, die als Kontrolle mit dem APP695wt-Konstrukt transfiziert waren, eine vergleichbare Menge an dimerisierten APP auf wie Zellen, die das Dimer-Konstrukt exprimierten. Jedoch ist in Relation zur Expression von APP-Monomeren, die in den Kontrollzellen deutlich höher ist, eine vermehrte Bildung von APP-Dimeren bei Transfektion mit der APP Cys-Mutante anzunehmen. Zudem ist eine deutliche Zunahme in der Menge an löslichen APP-Dimer-Fragmenten in CHO-Zellen mit APP695 K587C-Expression zu erkennen, verglichen mit Zellen die mit dem wildtypischen APP-Konstrukt transfiziert waren (s. Abbildung 13B, S. 63). Trotz der Möglichkeit einer spontanen Dimerisierung löslicher APP-Proteine (Scheuermann et al., 2001), hervorgerufen durch die Cys-Mutation in der E2-Domäne, würde diese nicht den immensen Anstieg an sAPP-Dimeren erklären. Da nur reifes APP, also solches, das posttranslationale Modifikationen, wie die N- und O-Glykosylierung durchlaufen hat, enzymatisch gespalten wird, wäre aufgrund der geringen Menge an diesem gereiften APP in APP695 K587C-exprimierenden Zellen nur eine schwache Zunahme an sAPP-Dimeren durch spontane Dimerisierung zu erwarten. Somit deutet das starke Signal für sAPP-Dimere im Überstand der Zellen, die die APP Cys-Mutante exprimierten im Vergleich zu den mit APP695wt-transfizierten CHO K1-Zellen darauf hin, dass auch bereits dimerisiertes APP prozessiert wurde. Die Tatsache, dass die im Lysat nachweisbaren APP-Dimere selbst bei Aufkochen mit hohen Temperaturen nahezu vollständig erhalten bleiben und nur durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert werden können (s. Abbildung 14, S. 64), lässt vermuten, dass die Dimerisierung über die Ausbildung von Disulfidbrücken zustande gekommen ist. Da genau dieser Mechanismus durch die Expression eines Cysteins anstelle eines Lysins in APP695 K587C-Mutanten begünstigt wird (s. Abbildung 8, S. 40), ist die gesteigerte Expression der APP-Dimere in den stabil transfizierten CHO K1-Zellen wohl auf dieses Konstrukt zurückzuführen. Da die APP-Dimere nicht nur im Lysat, sondern auch als lösliche Fragmente in den Zellkulturüberständen zu finden waren, wurde in weiteren Verfahren die Bildung dieser sAPP-Dimere und die damit verbundenen Abläufe genauer analysiert. So konnte ermittelt werden, dass die an der Spaltung des monomeren APP beteiligten Proteasen ADAM10 und Meprin  $\beta$  ebenfalls eine Rolle in der Prozessierung von APP *cis*-Dimeren spielen. Zudem weisen Versuche mit einer Internalisierungsmutante von APP695 K587C darauf hin, dass die exprimierten APP-Dimere von der Zelloberfläche



endozytiert werden und so deren enzymatische Spaltung beeinflusst werden kann. Weiterhin scheint in diesem Zusammenhang auch LRP1 von Bedeutung zu sein. So konnte nur in LRP1-exprimierenden Zellen ein Effekt auf die Prozessierung von Internalisierungs-defizienten APP-Dimeren festgestellt werden (s. 6.5 Internalisierung von APP-Dimeren). Folglich scheint das Fehlen von LRP1 in CHO 13-5-1-Zellen die Endozytose des dimerisierten APP bereits zu beeinträchtigen und so die Proteine für die Prozessierung an der Zelloberfläche zu stabilisieren, wie bereits für monomeres APP beschrieben (Pietrzik et al., 2002, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf Analogien in der Prozessierung und der an dieser beteiligten Proteine zwischen den hier untersuchten APP-Dimeren und dem monomeren APP hin. Somit führt die Expression der hier generierten APP Cys-Mutante wohl zu APP *cis*-Dimeren, die die gleichen physiologischen Prozesse durchlaufen, die bereits für monomeres APP gezeigt wurden. Dieses APP695 K587C-Konstrukt könnte also ein geeignetes Modell für weitere Studien zur Ermittlung des Einflusses von APP *cis*-Dimeren auf physiologische und pathologische Funktionen von APP darstellen.

## **7.2 APP *cis*-Dimere werden von ADAM10 und Meprin $\beta$ prozessiert**

Die Prozessierung von APP stellt den entscheidenden Ansatzpunkt für Forschungen in Bezug auf die Pathogenese der Alzheimer Krankheit dar. Für monomeres APP sind besonders zwei Wege der enzymatischen Spaltung bekannt (s. Abbildung 3, S. 10). Dabei verhindert die nicht-amyloidogene Prozessierung, die vorwiegend von der Zink-Metalloproteinase ADAM10 an der Zelloberfläche ausgeführt wird, durch den Schnitt innerhalb der A $\beta$ -Sequenz die Entstehung dieser Peptide (Colciaghi et al., 2002; Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010; Postina et al., 2004; Tyler et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist der amyloidogene Weg durch die Bildung von A $\beta$ -Peptiden gekennzeichnet. Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 gilt als Hauptprotease für diese Form der APP-Spaltung, die intrazellulär in endosomalen Kompartimenten abläuft. Durch die anschließende Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase werden so v.a. A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> freigesetzt (Cai et al., 2001; Haass, 2004; Selkoe, 1999; Seubert et al., 1993; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Neben BACE1 wurde vor Kurzem Meprin  $\beta$  als APP-prozessierende Sekretase identifiziert, deren Spaltung ebenfalls zur Bildung von A $\beta$ -Peptiden führt. Diese Zink-Metalloproteinase kann ihre Aktivität unabhängig von



BACE1 auch an der Zelloberfläche ausüben und sorgt besonders für die Generierung der verkürzten A $\beta$ -Peptide A $\beta$ <sub>2-40</sub> und A $\beta$ <sub>2-42</sub> (Bien et al., 2012; Jefferson et al., 2011; Schönherr et al., 2016). In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob APP *cis*-Dimere auf die gleiche Art wie monomeres APP prozessiert werden und ob dabei die gleichen Proteasen eine Rolle spielen. Die Analysen konzentrierten sich auf die enzymatische Spaltung von APP *cis*-Dimeren an der Zelloberfläche und somit auf die Beteiligung von Meprin  $\beta$  und ADAM10.

### **7.2.1 Meprin $\beta$ spaltet vermutlich bevorzugt APP *cis*-Dimere**

Um den Einfluss von Meprin  $\beta$  auf die Prozessierung der APP *cis*-Dimere zu klären, wurden HEK293T-Zellen verwendet, die entweder nur mit APP695 K587C oder mit diesem Dimer-Konstrukt sowie Meprin  $\beta$  transient transfiziert wurden. Zum Vergleich erfolgte die Transfektion von HEK-Zellen mit APP695wt bzw. die Co-Transfektion mit APP695wt und Meprin  $\beta$ . Von all diesen Zellen wurden die Kulturüberstände auf die Bildung von A $\beta$ -Peptiden sowie von löslichen APP-Fragmenten hin untersucht (s. 6.6.1 APP-Dimer-Prozessierung durch Meprin  $\beta$ ). Nach der Präzipitation der generierten A $\beta$ -Peptide aus den Kulturüberständen der HEK-Zellen wurden diese über eine Harnstoff-SDS-PAGE aufgetrennt. Anhand der Detektion zusätzlicher A $\beta$ -Peptide in HEK293T-Zellen, die neben dem jeweiligen APP-Konstrukt auch Meprin  $\beta$  exprimierten, konnte die Aktivität dieser Sekretase gezeigt werden. So sind neben A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>, die auch in HEKs ohne Meprin  $\beta$ -Überexpression generiert wurden, in Zellen mit Meprin  $\beta$  Co-Expression besonders A $\beta$ <sub>2-40</sub> sowie ebenfalls A $\beta$ <sub>2-42</sub> sichtbar (s. Abbildung 20, S. 74). Da diese verkürzten A $\beta$ -Peptide nicht direkt durch die enzymatische Spaltung von APP durch BACE1 entstehen können (Citron et al., 1996; Vassar et al., 1999), deutet deren Auftreten in dieser Intensität auf die sequentielle Spaltung von APP erst durch Meprin  $\beta$  und anschließend durch die  $\gamma$ -Sekretase hin. Eine derartige Prozessierung findet vermutlich sowohl am wildtypischen APP wie auch an den APP Cys-Mutanten und damit vermutlich an dimerisierten APP-Proteinen statt. Dabei scheint Meprin  $\beta$  APP *cis*-Dimere für die Ausübung ihrer Aktivität zu favorisieren. Trotz einer offenbar geringeren A $\beta$ -Produktion in HEK-Zellen, die nur mit APP695 K587C transfiziert waren, im Vergleich zu denen, die das wildtypische APP695 exprimierten, ist die Menge an A $\beta$ -Peptiden bei Überexpression von Meprin  $\beta$  für beide APP-Konstrukte nahezu identisch (s. Abbildung 20, S. 74). In einer MALDI-MS-Analyse konnte gezeigt

---

werden, dass in APP- und Meprin  $\beta$ -überexprimierenden HEK-Zellen bei Inhibierung von BACE1 dennoch A $\beta$ <sub>1-40</sub> generiert wurde. Meprin  $\beta$  ist folglich wohl in der Lage die enzymatische Spaltung von APP durch BACE1 zu imitieren (Bien et al., 2012). Dadurch ist der generelle Anstieg aller nachgewiesenen A $\beta$ -Varianten in HEK293T-Zellen mit Meprin  $\beta$ -Überexpression zu erklären. Gerade in diesem Zusammenhang scheint die übermäßige Anwesenheit von Meprin  $\beta$  jedoch einen besonders großen Effekt auf die Prozessierung der exprimierten APP *cis*-Dimere zu haben. Um diese Beobachtung weiter zu analysieren, wurde die Bildung von sAPP-Fragmenten in den Zellkulturüberständen untersucht. Hierbei ist in APP695 K587C-exprimierenden Zellen wiederum ein deutlich stärkeres Signal für lösliche APP-Dimere zu erkennen als bei den HEK-Zellen, die mit APP695wt transfiziert waren (s. Abbildung 21A, S. 76). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen in CHO-Zellen (s. Abbildung 13B, S. 63). So deutet auch in den transient transfizierten HEKs der immense Anstieg an dimerisierten APP-Fragmenten bei Expression von APP695 K587C darauf hin, dass bereits als Dimer vorliegende APP-Moleküle prozessiert wurden. Die Co-Transfektion mit Meprin  $\beta$  ergab jedoch ein unerwartetes Ergebnis in Bezug auf die bisher betrachteten löslichen APP-Fragmente. Hier wiesen die HEK-Zellen mit Meprin  $\beta$ -Überexpression eine Abnahme an sAPP-Monomeren und -Dimeren auf. Interessanterweise zeigt die Western Blot-Analyse auch, dass diese Verringerung insbesondere für die dimerisierten APP-Fragmente sehr deutlich ist (s. Abbildung 21A, S. 76). Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivität von Meprin  $\beta$  an APP zur Bildung kleiner, N-terminaler sAPP-Metabolite, wie N-APP20 und N-APP11, führen kann (Jefferson et al., 2011), wurde deshalb die Generierung dieser Fragmente ebenfalls untersucht. Anhand des Western Blots mit dem 22C11-Antikörper, der gegen den N-Terminus von APP gerichtet ist (s. Abbildung 7, S. 30), ist ein starker Anstieg an N-APP20 in HEK-Zellen zu erkennen, die neben dem jeweiligen APP-Konstrukt auch Meprin  $\beta$  exprimierten. Dabei ist hervorzuheben, dass die Zunahme an diesem N-terminalen, löslichen APP-Fragment besonders in Zellen, die mit APP695 K587C transfiziert waren, zur Geltung kommt (s. Abbildung 21A, S. 76). Diese Ergebnisse weisen auf die Aktivität von Meprin  $\beta$  nicht nur am monomeren, sondern auch am dimeren APP hin und zeigen, dass die Überexpression dieser Sekretase zu N-terminalen APP-Metaboliten sowohl von APP695wt, als auch von APP695 K587C führt. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass Meprin  $\beta$  dimeres APP gegenüber monomerem APP bevorzugt spaltet, da die Folgen der Überexpression dieser

Sekretase in HEK-Zellen, die die APP Cys-Mutante exprimierten, deutlicher ausfallen als bei denen, die wildtypisches und somit vorwiegend monomeres APP695 synthetisierten. Die Quantifizierung (s. Abbildung 21B, S. 76) bekräftigt diese Annahme. Hierfür wurde je das Verhältnis von sAPP-Monomeren bzw. -Dimeren aus der Intensität des Signals in Zellen ohne zu der in HEKs mit Meprin  $\beta$ -Expression ermittelt. In APP695wt-exprimierenden Zellen konnte nur eine geringe Tendenz zur stärkeren Prozessierung von APP-Dimeren verglichen mit Monomeren festgestellt werden. Dies ist jedoch vermutlich durch die sehr geringe Expression dieser dimerisierten Fragmente zu erklären (s. Abbildung 21B, S. 76, schraffierte Balken). Im Gegensatz dazu ist in HEK-Zellen, die mit dem APP-Dimer-Konstrukt transfiziert waren und somit neben sAPP-Monomeren auch ein starkes sAPP-Dimer-Signal aufweisen, ein signifikanter Unterschied zwischen sAPP-Monomer- und sAPP-Dimer-Verhältnis zu erkennen (s. Abbildung 21B, S. 76). Diese Divergenz deutet darauf hin, dass in diesen Zellen mehr dimeres APP durch Meprin  $\beta$  prozessiert wird, als monomeres APP. Zudem wird die Vermutung einer Präferenz von Meprin  $\beta$  für APP-Dimere dadurch erhärtet, dass das sAPP-Dimer-Verhältnis von APP695 K587C-exprimierenden Zellen gegenüber dem von HEKs mit APP695wt-Expression ebenfalls signifikant erhöht ist. Die Bevorzugung dimerisierter APP-Proteine für die enzymatische Spaltung könnte im Zusammenhang mit allosterischen Effekten stehen. Eine Analyse der Enzymkinetik ergab eine Kooperativität in der enzymatischen Aktivität von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen, deren Grad mit einem Hill-Koeffizienten von 2 beschrieben wurde. Somit stellt die Dimerisierung der Sekretasen oder deren Substrate bzw. eventuell auch beider Komponenten den bestimmenden Faktor für die Enzymkinetik von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen dar (Schmidt et al., 2012). Dieser Effekt könnte auch bei Meprin  $\beta$  eine Rolle spielen und folglich zur effizienteren Spaltung von APP in dessen dimerisierter Form führen. Dadurch, dass Meprin  $\beta$  selbst vorwiegend als über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer an der Zelloberfläche vorliegt (Bertenshaw et al., 2003; Kruse et al., 2004), ist ein allosterischer Effekt von APP *cis*-Dimeren auf die enzymatische Aktivität der Sekretase durchaus denkbar. Weitere Analysen zur genauen Bestimmung der Enzymkinetik von Meprin  $\beta$  im Zusammenhang mit dimerisiertem APP könnten Aufschluss darüber geben, ob APP *cis*-Dimere die Effizienz dieser Sekretase und somit eventuell auch die Art ihrer Prozessierung beeinflussen.

### **7.2.2 APP *cis*-Dimere werden von ADAM10 an der Zelloberfläche gespalten**

Da ADAM10 als die Sekretase gilt, die APP hauptsächlich an der Zelloberfläche auf dem nicht-amyloidogenen Weg prozessiert, wurde ebenfalls deren Beteiligung an der Spaltung von APP *cis*-Dimeren analysiert. CHO-Zellen, die stabil mit dem APP695 K587C-Konstrukt transfiziert waren, dienten als Zellmodell zur Untersuchung der Sekretase-Aktivität auf dimerisiertes APP. Hierfür wurden die Auswirkungen der selektiven Inhibierung von ADAM10 mittels GI254023X auf die Expression der APP *cis*-Dimere in Zelllysaten, Kulturüberständen und an der Zelloberfläche ermittelt (s. 6.3.2 Prozessierung von APP-Dimeren durch ADAM10). Dabei konnte eine Zunahme am reifen APP in den Lysaten von Zellen, die mit dem Inhibitor behandelt waren, im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden (s. Abbildung 22A, S. 78). Diese Steigerung hängt vermutlich damit zusammen, dass durch die Inhibierung der ADAM10-Aktivität das reife APP weniger schnell umgesetzt wird und somit mehr Moleküle im Lysat nachweisbar bleiben. Interessanterweise ist ebenfalls ein Anstieg an APP *cis*-Dimeren zu beobachten, sodass anzunehmen ist, dass diese ebenfalls von ADAM10 prozessiert werden. Die Behandlung mit GI254023X führt somit, wie beim monomeren APP, wohl zu einer verringerten Umsetzung der APP-Dimere. Diese Hypothese wird durch die Analyse der Zelloberflächenproteine gestützt (s. Abbildung 22C, S. 78). Mit Hilfe der Biotinylierung wurden die an der Zelloberfläche exprimierten Proteine markiert und konnten so durch NeutrAvidin *Beads* aus dem Lysat präzipitiert werden. Die Detektion von APP weist nicht nur eine Zunahme am reifen, monomeren APP, sondern auch an APP *cis*-Dimeren bei Inhibitor-behandelten Zellen auf. Demzufolge zeigt die Western Blot-Analyse der Zellkulturüberstände, wie erwartet, eine deutliche Reduktion an löslichen APP-Dimeren, wenn der ADAM10-Inhibitor eingesetzt wurde (s. Abbildung 22B, S. 78). Der hier fehlende Nachweis an monomeren sAPP-Fragmenten kann durch mehrere Faktoren zustande kommen. So wurden beispielsweise CHO-Zellen verwendet, die aufgrund der stabilen Transfektion mit APP695 K587C vorwiegend APP *cis*-Dimere im Gegensatz zum reifen, monomeren APP bilden. Da sowohl APP-Monomere, wie auch APP-Dimere als Substrat von ADAM10 fungieren, könnte somit die Mehrzahl am dimerisierten APP zur gesteigerten Prozessierung dieser Moleküle im Vergleich zum monomeren APP führen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Dimerisierung von APP über allosterische Kooperativität zur bevorzugten Prozessierung durch ADAM10

gegenüber monomerem APP führt. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass lösliche Monomere nachträglich im Zellkulturmedium dimerisieren, wie es bereits von Scheuermann et al. (2001) beschrieben wurde. Durch all diese Faktoren könnte die Menge an monomeren sAPP so gering sein, dass das Signal zu schwach für einen Nachweis über die Western Blot-Analyse war. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse, dass ADAM10 eine Rolle in der Prozessierung von APP *cis*-Dimeren an der Zelloberfläche spielt. Da die ADAM10-abhängige Prozessierung des monomeren APP in Abhängigkeit von LRP1 abläuft, wurde dieser Prozess ebenfalls für dimeres APP untersucht. Die durch die ADAM10-Inhibierung hervorgerufenen Effekte in den LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen waren noch deutlicher ausgeprägt als in den LRP1-exprimierenden CHO K1-Zellen. Somit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Expression von LRP1 im Zusammenhang mit der Prozessierung von APP-Dimeren stehen könnte.

### **7.3 Die LRP1-Expression scheint die Prozessierung von APP *cis*-Dimeren entscheidend zu beeinflussen**

Dem Rezeptorprotein LRP1 wurde schon früh eine entscheidende Rolle in der Prozessierung von APP und damit in der Pathogenese von Alzheimer zugeschrieben (Knauer et al., 1996; Kounnas et al., 1995; Trommsdorff et al., 1998). In diesem Zusammenhang konnte mehrfach gezeigt werden, dass über direkte oder indirekte Interaktion mittels der extra- bzw. intrazellulären Domänen die LRP1-abhängige Endozytose von Oberflächen-exprimierten APP-Proteinen vermittelt wird (Knauer et al., 1996; Kounnas et al., 1995; Pietrzik et al., 2002, 2004; Trommsdorff et al., 1998; Ulery et al., 2000). Die damit einhergehende, gesteigerte Produktion von A $\beta$ -Peptiden führte zu der Annahme, dass das auf diese Weise endozytierte APP der Prozessierung durch die  $\beta$ -Sekretase zugeführt wird. Bekräftigt wurde dies in Zellen ohne LRP1-Expression, in denen neben der Reduktion der A $\beta$ -Level ein vergleichbarer Anstieg an sAPP $\alpha$  zu beobachten war (Knauer et al., 1996; Pietrzik et al., 2002, 2004; Ulery et al., 2000). Die Analysen zum Einfluss der LRP1-Expression auf die Prozessierung von APP über den amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Weg beschränkten sich dabei auf monomere APP-Proteine. Mittlerweile ist bekannt, dass APP in der Lage ist über verschiedene Bereiche in der Ektodomäne sowie über die Transmembrandomäne zu dimerisieren und, dass ein großer Teil der APP-Moleküle in diesem Dimer-Zustand

vorliegt (Munter et al., 2007, 2010; Schmidt et al., 2012). Neben dem Nachweis von APP-Dimeren *in vivo* im Gehirn von Mäusen konnte auch gezeigt werden, dass die *cis*-Dimerisierung die Prozessierung von APP beeinflusst. Dabei scheint der neuronale Rezeptor SORLA eine Rolle zu spielen. Dieser wird über die Interaktion mit APP sowohl mit dem Transport, als auch mit der enzymatischen Spaltung des Proteins in Verbindung gebracht (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006; Schmidt et al., 2007, 2012). Da es sich bei SORLA, wie bei LRP1, das ebenfalls mit APP interagiert, um ein Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie handelt, sollte in dieser Arbeit die Beteiligung von LRP1 an der Prozessierung von APP *cis*-Dimeren ermittelt werden. Die Analyse von LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen im Vergleich zu den LRP1-bildenden CHO K1-Zellen, die beide die APP Cys-Mutante stabil exprimierten, zeigte nahezu eine Verdreifachung des APP-Dimer-Verhältnisses bei fehlender LRP1-Expression (s. Abbildung 15, S. 66). Folglich scheint der Mangel an LRP1 in diesem Zellmodell zu einer deutlich gesteigerten Prozessierung der APP *cis*-Dimere zu führen. Da in kortikalen Primärneuronen, die mit APP695wt infiziert waren, nicht nur die Bildung von APP-Dimeren, sondern auch von löslichen APP-Dimer-Fragmenten nachweisbar war, sollte der Einfluss von LRP1 auf die Dimer-Prozessierung auch in diesen Zellen überprüft werden. Hierfür wurde mit Hilfe einer Cre-Rekombinase ein *Knockout* von *Lrp1* in kortikalen Primärneuronen der Mauslinie 5xFAD/*Lrp1<sup>flox/flox</sup>* induziert, was in einer um etwa 50 % reduzierten Expression des Rezeptors resultierte (s. Abbildung 16A, S. 68). Ein vollständiges Fehlen von LRP1 konnte nicht erreicht werden, da möglicherweise nicht an allen *Lrp1*-Allelen die Rekombination der Erkennungssequenzen zur Exzision des Gens führte. Somit könnten aufgrund der langen Halbwertszeit von LRP1 (Reekmans et al., 2010) zum Zeitpunkt der Zellyse noch funktionsfähige Rezeptoren exprimiert und daher nachweisbar gewesen sein. Trotz einer Reduktion der LRP1-Expression um lediglich die Hälfte wurde dennoch ein mehr als doppelt so hohes APP-Dimer-Verhältnis in den Neuronen mit induziertem *Lrp1-Knockout* quantifiziert, verglichen mit den Kontrollzellen (s. Abbildung 16B, S. 68). Die in dieser Analyse nachgewiesenen APP-Dimere sind dabei physiologisch und ohne die Expression einer Dimer-Mutante von APP entstanden. Folglich deutet das beobachtete Ergebnis darauf hin, dass die LRP1-Expression auch in Primärneuronen von Mäusen einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der APP-Dimer-Prozessierung hat.



In Bezug auf monomeres APP haben verschiedene Studien bereits gezeigt, dass ein Fehlen von LRP1 zu signifikant erhöhten Mengen an sAPP und APP-CTFs führt (Knauer et al., 1996; Pietrzik et al., 2002, 2004; Ulery et al., 2000). Dabei scheint insbesondere die fehlende Bildung des trimeren Komplexes aus LRP1, Fe65 und APP, der für die korrekte LRP1-vermittelte Endozytose von APP essentiell ist, eine Rolle zu spielen. Das Ausbleiben der Interaktion dieser drei Proteine führt wohl zur Stabilisierung von APP an der Zelloberfläche und folglich zu dessen stark reduzierter Internalisierung (Pietrzik et al., 2002, 2004). Um zu klären, ob eine verminderte Endozytose für die gesteigerte Prozessierung der APP *cis*-Dimere in LRP1-defizienten Zellen verantwortlich sein kann, wurde eine APP Cys-Mutante mit einem veränderten Internalisierungsmotiv generiert. Dieses Konstrukt bewirkt die vorwiegende Bildung von APP-Dimeren, die nach Reifung und Expression an der Zelloberfläche aufgrund der Mutation im NPTY-Motiv nicht wieder endozytiert werden können (Lai et al., 1995; MarquezSterling et al., 1997) (s. Abbildung 18, S. 71). CHO K1-Zellen, die transient mit der Internalisierungsmutante (APP695 K587C NGYE) transfiziert waren, zeigten, gemessen am APP-Dimer-Verhältnis, eine signifikant gesteigerte Prozessierung der dimerisierten APP-Moleküle im Vergleich zu Zellen, die APP695 K587C exprimierten (s. Abbildung 19B, S. 72). Dieses Ergebnis deutet stark darauf hin, dass die Endozytose von APP-Dimeren von der Zelloberfläche tatsächlich eine Rolle in der Prozessierung dieser dimerisierten Proteine spielt. Anhand der Analyse des Dimer-Verhältnisses in CHO 13-5-1-Zellen konnte zudem eine mögliche Beteiligung von LRP1 in diesem Zusammenhang festgestellt werden. Im Gegensatz zu CHO K1-Zellen wiesen die LRP1-defizienten CHO 13-5-1-Zellen ein nur kaum verändertes APP-Dimer-Verhältnis auf, wenn sie statt mit APP695 K587C mit der entsprechenden NGYE-Mutante transfiziert waren (s. Abbildung 19B, S. 72). In diesen Zellen scheint also durch das Fehlen von LRP1 die Endozytose der APP *cis*-Dimere von der Zelloberfläche bereits derart beeinträchtigt zu sein, dass die Mutation, die die Internalisierung verhindern soll, kaum noch einen Effekt auf diesen Prozess hat. Folglich ist die LRP1-vermittelte Endozytose wohl entscheidend an der Prozessierung von APP-Dimeren beteiligt. Wie vom monomeren APP bekannt, könnte die LRP1-Defizienz zur Stabilisierung der dimerisierten APP-Moleküle an der Zelloberfläche führen und somit die gesteigerte sAPP-Dimer-Bildung in CHO 13-5-1- gegenüber CHO K1-Zellen erklären. Inwiefern die Interaktion zwischen LRP1 und den APP *cis*-

Dimeren zustande kommt und ob dabei das Adapterprotein Fe65 eine Rolle spielt, bleibt jedoch noch zu ermitteln.

Dadurch, dass sich das APP-Dimer-Verhältnis durch die Expression der Internalisierungsmutante in CHO K1-Zellen nur an die Werte von CHO 13-5-1-Zellen annäherte, liegt die Vermutung nahe, dass die LRP1-Defizienz auch über andere Mechanismen in die APP-Dimer-Prozessierung involviert ist. Diese Annahme wird durch die *Pulse-Chase*-Analyse von CHO-Zellen, die die APP Cys-Mutante stabil exprimierten, gestützt (s. 6.4 Zeitlicher Verlauf der Bildung von sAPP-Dimeren). Neben der gesteigerten Prozessierung der APP *cis*-Dimere in CHO 13-5-1- verglichen mit CHO K1-Zellen konnte auch eine zeitliche Varianz in der Bildung löslicher APP-Dimere zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden. So konnte bereits nach einem 30-minütigen *Chase* der radioaktiv markierten APP-Fragmente ein deutliches Signal für sAPP-Dimere in LRP1-defizienten Zellen detektiert werden. Ein vergleichbares Signal ergab sich bei CHO K1-Zellen erst bei einer Verfolgung der Radioaktivität von einer Stunde (s. Abbildung 17A, S. 70). Da im Lysat beider Zelllinien kein Unterschied in der Expression der monomeren und dimeren APP-Proteine zu erkennen war, deuten die Ergebnisse dieser Analyse darauf hin, dass bei Abwesenheit von LRP1 APP-Dimere früher prozessiert werden. Diese Möglichkeit setzt voraus, dass dimerisiertes APP schneller an die Zelloberfläche gelangt, wo es von den dort aktiven Sekretasen enzymatisch gespalten wird. Somit scheint die Expression von LRP1 den Transport von APP *cis*-Dimeren entlang des sekretorischen Weges zu beeinflussen. Ein derartiger Zusammenhang konnte bereits für monomeres APP und LRP1 gezeigt werden, die vermutlich über das Adapterprotein Fe65 schon in frühen sekretorischen Kompartimenten miteinander interagieren (Pietrzik et al., 2004; Waldron et al., 2008). Zudem wurde festgestellt, dass die Interaktion mit LRP1 für den Transport sowie die Prozessierung von APP von Bedeutung ist. So bewirkte das Anfügen eines Dilysinmotivs (KKAA) an das LRP1-Fragment LRP-CT, das zum Verbleib von LRP1 im ER führt (Andersson et al., 1999; Itin et al., 1995), auch eine verminderte Expression von APP an der Zelloberfläche sowie eine geringere Produktion von APP-CTFs und A $\beta$ -Peptiden (Waldron et al., 2008). Da die Dimerisierung von APP ebenfalls in frühen sekretorischen Kompartimenten stattfindet (Isbert et al., 2012), ist eine Interaktion von LRP1 mit APP-Dimeren entlang des Weges zur Zelloberfläche denkbar. Durch die Wechselwirkung der beiden Proteine könnte es so zu einer Veränderung der Transportgeschwindigkeit vom dimerisierten APP kommen. Gestützt wird diese



Hypothese durch die kürzlich beschriebenen Ergebnisse einer *Live Cell*-Analyse zum vesikulären Transport von APP in Abhängigkeit von LRP1 entlang von Axonen. Dabei stellte sich heraus, dass monomeres und dimeres APP ähnliche Transporteigenschaften aufweisen und dass LRP1 vermutlich als Sortierungsrezeptor fungiert, der APP in gemeinsame Vesikel rekrutiert und so dessen intrazellulären Transport verlangsamt (Herr et al., 2017). Ein Fehlen der LRP1-Expression könnte die frühere Präsenz von APP, sowohl in monomerer, als auch in dimerisierter Form an der Zelloberfläche zur Folge haben. Dadurch stehen diese Proteine der Prozessierung durch die dort aktiven Sekretasen, wie u.a. ADAM10 und Mep $\beta$ , eher zur Verfügung, was das Ergebnis der *Pulse-Chase*-Analyse erklären würde. Die Abwesenheit von LRP1 scheint weiterhin zur verlängerten Substratverfügbarkeit für die Sekretasen beizutragen, indem die durch diesen Rezeptor vermittelte Endozytose nicht stattfindet. Dies wird durch die Beobachtungen zur Untersuchung der Internalisierung von APP *cis*-Dimeren bekräftigt. Somit ist die in LRP1-defizienten Zellen festgestellte Steigerung der APP-Dimer-Prozessierung vermutlich sowohl auf einen schnelleren Transport zur Zelloberfläche, als auch auf die dortige Stabilisierung zurückzuführen.

## **7.4 Die *cis*-Dimerisierung könnte physiologische und pathologische Funktionen von APP beeinflussen**

APP, das als Vorläuferprotein von A $\beta$ -Peptiden v.a. im Zusammenhang mit der Pathogenese von Alzheimer bekannt ist, spielt ebenfalls in einer Reihe von physiologischen Prozessen innerhalb des neuronalen Systems eine wichtige Rolle (Müller and Zheng, 2012). Auch dabei kommt der Prozessierung von APP eine gewisse Bedeutung zu. So kann beispielsweise die intrazelluläre Signaltransduktion nur ausgeübt werden, wenn die AICD durch die enzymatische Spaltung freigesetzt wird. Diese kann anschließend stabilisiert durch Fe65 in den Zellkern eindringen und dort durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene regulieren (Cao and Südhof, 2001; Cupers et al., 2001; Gao and Pimplikar, 2001; Kimberly et al., 2001). Weiterhin wurde sAPP $\alpha$ -Fragmenten, die durch die nicht-amyloidogene Prozessierung entstehen, u.a. eine Relevanz für die synaptische Dichte sowie für die Gedächtnisentwicklung nachgewiesen (Bell et al., 2008; Meziane et al., 1998; Roch et al., 1994; Taylor et al., 2008; Turner et al., 2003).

Im Gegensatz zu sAPP $\alpha$  mit diesen neuroprotektiven Funktionen weist das lösliche APP $\beta$  eine deutlich geringere Aktivität auf und wird zudem eher mit toxischen Effekten in Verbindung gebracht (Turner et al., 2003). Folglich deutet dies darauf hin, dass eine Verschiebung innerhalb der APP-Prozessierung in Richtung der vermehrten Bildung von A $\beta$ -Peptiden im Zusammenhang mit den pathologischen Funktionen von APP steht. In Anbetracht dieser Änderung der APP-Spaltung könnte auch der Oligomerisierungszustand des Proteins und damit verbundene allosterische Effekte eine Rolle spielen (Schmidt et al., 2012). Die bisherigen Studien, die sich mit der Generierung von A $\beta$ -Peptiden in Abhängigkeit des dimerisierten APP beschäftigt haben, lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse (Eggert et al., 2009; Kaden et al., 2008; Libeu et al., 2012; Munter et al., 2007, 2010; Richter et al., 2010; Schmidt et al., 2012; So et al., 2012). In diesen Untersuchungen wurden z.T. APP-Dimer-Konstrukte verwendet, die vermutlich durch mutationsbedingte Konformationsänderungen oder durch das Vorhandensein der Mutation nahe einer Schnittstelle die Aktivität der Sekretasen beeinträchtigten. Das im Zuge dieser Arbeit generierte APP-Dimer-Konstrukt APP695 K587C weist dieselben Eigenschaften wie monomeres APP in Bezug auf Transport, Internalisierung und Prozessierung auf. Somit könnte es sich hierbei um ein geeignetes Modell für weitere Analysen zum Einfluss der Dimerisierung auf die A $\beta$ -Produktion handeln. Bislang bleibt noch zu klären, inwiefern APP695 K587C-Dimere eine Prozessierung durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 erfahren und, ob mögliche allosterische Effekte dabei von Bedeutung sind. Hierfür wären zusätzliche Untersuchungen der Enzymkinetik erforderlich. Diese könnten neben dem Einfluss auf die Effizienz der enzymatischen Spaltung auch Aufschluss darüber geben, ob die Dimerisierung von APP die Art der Prozessierung bestimmt. So konnte in dieser Arbeit für Meprin  $\beta$  beispielsweise eine Präferenz vom dimerisierten gegenüber dem monomeren APP gezeigt werden. Die Spaltung von APP *cis*-Dimeren durch Meprin  $\beta$  führte sowohl zur Bildung verkürzter A $\beta$ -Peptide, die wohl schneller aggregieren als die A $\beta$ -Varianten, die durch die Prozessierung über BACE1 entstehen (Bien et al., 2012; Schönherr et al., 2016), als auch zu N-APP20-Fragmenten, die eher als neuroprotektiv eingestuft werden (Becker-Pauly and Pietrzik, 2017; Jefferson et al., 2011). Folglich könnte eine vermehrte Spaltung von APP durch Meprin  $\beta$  negative oder positive Effekte haben, die durch ein gesteigertes Vorkommen von APP-Dimeren gefördert werden könnten. Um die Bedeutung der *cis*-Dimerisierung zu ermitteln, sind

weitere Studien zur Entschlüsselung der physiologischen Funktionen dieser Dimere sowie deren löslicher Fragmente erforderlich.

In Verbindung mit der Prozessierung von APP-Dimeren bleibt auch die Rolle von Rezeptoren, die diesen Vorgang beeinflussen, zu klären. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LRP1 sowohl am Transport, als auch an der Internalisierung der APP *cis*-Dimere beteiligt ist und somit einen Einfluss auf die enzymatische Spaltung dieser Moleküle ausübt. Dieser konnte sogar *in vivo* durch die Anreicherung von sAPP-Dimeren in der CSF von 5xFAD/*Lrp1*<sup>BE<sup>-/-</sup></sup>-Mäusen festgestellt werden (s. Abbildung 23, S. 80). Da der Großteil der Flüssigkeit und der in der CSF enthaltenen Proteine aktiv von den Epithelzellen des Plexus choroideus sezerniert werden (Brown et al., 2004), weist das Ergebnis darauf hin, dass APP-Dimere in diesen Zellen *in vivo* gebildet und prozessiert werden, wie vom monomeren APP bekannt (Bergen et al., 2015; Kalaria et al., 1996). Der induzierte *Knockout* von *Lrp1* in den Endothelzellen des Gehirns und eben diesen Epithelzellen des Plexus choroideus in den verwendeten Mäusen ist vermutlich für den Anstieg der löslichen APP-Fragmente in der CSF verantwortlich. Durch das Fehlen von LRP1 in diesen Zellen könnte es zu einem beschleunigten Transport von APP zur Zelloberfläche und der Stabilisierung an dieser kommen, sodass eine gesteigerte Prozessierung, eventuell durch ADAM10, stattfinden kann. Interessanterweise fällt insbesondere der Anstieg an sAPP-Dimeren gegenüber sAPP-Monomeren auf. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass LRP1 nicht nur den Transport und die Internalisierung von APP-Dimeren beeinflusst, sondern eventuell auch die Dimerisierung an sich. LRP1 könnte durch seine Interaktion mit APP in frühen sekretorischen Kompartimenten dessen Dimer-Bildung beeinträchtigen, ähnlich wie von SORLA bekannt. Dieses Mitglied der LDLR-Familie, das ebenfalls mit APP interagiert und dessen Transport und Prozessierung beeinflusst (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006; Schmidt et al., 2007; Willnow and Andersen, 2013), behindert die Dimerisierung von APP und führt letztlich zu einer verminderten enzymatischen Spaltung des Proteins (Schmidt et al., 2012). Der immense Anstieg an sAPP-Dimeren in der CSF von Mäusen mit induziertem *Lrp1-Knockout* im Vergleich zu den Kontrollmäusen, könnte folglich durch eine gesteigerte Dimerisierung von APP aufgrund der Abwesenheit der LRP1-Expression erklärt werden. Die Rezeptoren LRP1 und SORLA scheinen folglich die APP-Dimer-Bildung und damit einhergehend die Prozessierung von APP zu kontrollieren. Weitere Analysen zur Ermittlung des Zusammenhangs von SORLA, LRP1 und APP auf die Bildung von A $\beta$ -Peptiden wären

daher ein interessanter Ansatzpunkt für mögliche Therapien in Bezug auf damit verbundene Krankheiten, wie z.B. Alzheimer.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass APP *cis*-Dimere den gleichen physiologischen Prozessen unterliegen, die von monomeren APP-Proteinen bekannt sind. Diese dimerisierten Proteine werden in neuronalen Zellen sowie *in vivo* im Gehirn von Mäusen gebildet und prozessiert, wobei die Anwesenheit von LRP1 eine wichtige Rolle spielt. Die Analyse von Zellmodellen mit stabiler Expression der APP-Dimer-Mutante APP659 K587C verweist auf eine Beteiligung von LRP1 sowohl am sekretorischen Transport, als auch an der Internalisierung der APP *cis*-Dimere von der Zelloberfläche. Damit einhergehend konnte eine gesteigerte Prozessierung des dimerisierten APP beobachtet werden, die ebenfalls in Primärneuronen mit induziertem *Lrp1-Knockout* zu finden war. Weiterhin führte ein *Knockout* dieses Gens in den Endothelzellen des Gehirns und den Epithelzellen des Plexus choroideus von Mäusen zu einer Zunahme an sAPP-Monomeren, besonders aber an sAPP-Dimeren in der CSF. Die gesteigerte Menge an löslichen APP-Dimer-Fragmenten bei Abwesenheit von LRP1 könnte einerseits durch eine ungehinderte Bildung der APP-Dimere durch fehlende Interaktion mit LRP1 zu erklären sein. Andererseits ist durch Mangel an LRP1 ein schnellerer Transport zur und die verlängerte Stabilisierung der APP-Dimere an der Zelloberfläche wahrscheinlich. Dadurch stünde mehr Substrat für die dortige enzymatische Spaltung durch ADAM10 und Meprin  $\beta$  zur Verfügung, die beide in die Prozessierung von APP *cis*-Dimeren involviert sind. Dabei ergaben die Untersuchungen zudem eine bevorzugte Spaltung vom dimerisierten gegenüber dem monomeren APP durch Meprin  $\beta$ . Folglich könnte die *cis*-Dimerisierung von APP sowohl Einfluss auf die Effizienz, als auch auf die Art der APP-Prozessierung haben. Daher sollte dimerisiertes APP in künftige Studien zur Untersuchung der physiologischen und pathologischen Funktionen von APP integriert und der Zusammenhang von LRP1 und anderen Rezeptoren, wie SORLA, mit dessen Prozessierung weiter analysiert werden.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases. *J. Neurosci. Res.* 74, 342–352. doi:10.1002/jnr.10737.
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., et al. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13461–6. doi:10.1073/pnas.0503689102.
- Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H. P. (1999). Protein targeting to endoplasmic reticulum by dilysine signals involves direct retention in addition to retrieval. *J. Biol. Chem.* 274, 15080–15084. doi:10.1074/jbc.274.21.15080.
- Atwood, C. S., Martins, R. N., Smith, M. A., and Perry, G. (2002). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* 23, 1343–50. doi:S0196978102000700 [pii].
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., et al. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated  $\tau$  precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 477, 90–99. doi:10.1016/0006-8993(89)91396-6.
- Baumkötter, F., Schmidt, N., Vargas, C., Schilling, S., Weber, R., Wagner, K., et al. (2014). Amyloid Precursor Protein Dimerization and Synaptogenic Function Depend on Copper Binding to the Growth Factor-Like Domain. *J. Neurosci.* 34, 11159–11172. doi:10.1523/JNEUROSCI.0180-14.2014.
- Baumkötter, F., Wagner, K., Eggert, S., Wild, K., and Kins, S. (2012). Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Exp. Brain Res.* 217, 389–395. doi:10.1007/s00221-011-2878-6.
- Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., auf dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., et al. (2011). Proteomic Analyses Reveal an Acidic Prime Side Specificity for the Astacin Metalloprotease Family Reflected by Physiological Substrates. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.009233-M111.009233. doi:10.1074/mcp.M111.009233.
- Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., et al. (2007). The  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of the Metalloprotease Meprin Are Expressed in Separate Layers of Human Epidermis, Revealing Different Functions in Keratinocyte Proliferation and Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1115–1125. doi:10.1038/sj.jid.5700675.
- Becker-Pauly, C., and Pietrzik, C. U. (2017). The Metalloprotease Meprin  $\beta$  Is an Alternative  $\beta$ -Secretase of APP. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 1–11. doi:10.3389/fnmol.2016.00159.
- Becker, A., Kohlmann, S., Alexandru, A., Jagla, W., Canneva, F., Bäuscher, C., et al. (2013). Glutaminyl cyclase-mediated toxicity of pyroglutamate-beta amyloid induces striatal neurodegeneration. *BMC Neurosci.* 14, 108. doi:10.1186/1471-2202-14-108.
- Behr, J.-P. (1997). The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not

- exploit. *Int. J. Chem.* 2, 34–36. doi:0009-4293.
- Bell, K. F. S., Zheng, L., Fahrenholz, F., and Cuello, A. C. (2008). ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol. Aging* 29, 554–565. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.004.
- Bergen, A. A., Kaing, S., ten Brink, J. B., Bank, T. N. B., Gorgels, T. G., and Janssen, S. F. (2015). Gene expression and functional annotation of human choroid plexus epithelium failure in Alzheimer's disease. *BMC Genomics* 16, 956. doi:10.1186/s12864-015-2159-z.
- Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T., and Bond, J. S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases: Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* 278, 2522–2532. doi:10.1074/jbc.M208808200.
- Bertenshaw, G. P., Turk, B. E., Hubbard, S. J., Matters, G. L., Bylander, J. E., Crisman, J. M., et al. (2001). Marked Differences between Metalloproteases Meprin A and B in Substrate and Peptide Bond Specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 13248–13255. doi:10.1074/jbc.M011414200.
- Beynon, R. J., Shannon, J. D., and Bond, J. S. (1981). Purification and characterization of metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem. J.* 199, 591–598.
- Beyreuther, K., Pollwein, P., Multhaup, G., Mönning, U., König, G., Dyrks, T., et al. (1993). Regulation and expression of the Alzheimer's  $\beta$ /A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 91–102. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb23035.x.
- Bibl, M., Gallus, M., Welge, V., Esselmann, H., Wolf, S., Rütger, E., et al. (2012). Cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  2-42 is decreased in Alzheimer's, but not in frontotemporal dementia. *J. Neural Transm.* 119, 805–813. doi:10.1007/s00702-012-0801-3.
- Bien, J., Jefferson, T., Čaušević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., et al. (2012). The metalloprotease meprin  $\beta$  generates amino terminal-truncated amyloid  $\beta$  peptide species. *J. Biol. Chem.* 287, 33304–33313. doi:10.1074/jbc.M112.395608.
- Blacker, M., Noe, M. C., Carty, T. J., Goodyer, C. G., and LeBlanc, A. C. (2002). Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons. *J. Neurochem.* 83, 1349–1357.
- Blennow, K., de Leon, M. J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's Disease. *Lancet* 368, 387–403. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7.
- Bouter, Y., Dietrich, K., Wittnam, J. L., Rezaei-Ghaleh, N., Pillot, T., Papot-Couturier, S., et al. (2013). N-truncated amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol.* 126, 189–205. doi:10.1007/s00401-013-1129-2.
- Braak, E., Griffing, K., Arai, K., Bohl, J., Bratzke, H., and Braak, H. (1999). Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249 Suppl, 14–22. doi:10.1007/PL00014168.



- 
- Brinkmalm, G., Brinkmalm, A., Bourgeois, P., Persson, R., Hansson, O., Portelius, E., et al. (2013). Soluble amyloid precursor protein  $\alpha$  and  $\beta$  in CSF in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1513, 117–126. doi:10.1016/j.brainres.2013.03.019.
- Brookmeyer, R., and Gray, S. (2000). Methods for projecting the incidence and prevalence of chronic diseases in ageing populations: application to Alzheimer's disease. *Stat. Med.* 19, 1481–1493. doi:10.1002/(SICI)1097-0258(20000615/30)19:11/12<1481::AID-SIM440>3.0.CO;2-U.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). M58 A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34–47. doi:10.1126/science.3513311.
- Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T., and Millar, I. D. (2004). Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience* 129, 957–970. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.07.003.
- Bu, G., Cam, J., and Zerbinatti, C. (2006). LRP in amyloid- $\beta$  production and metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086, 35–53. doi:10.1196/annals.1377.005.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., et al. (1992). Assembly and Aggregation Properties of Synthetic Alzheimers A4/ $\beta$  Amyloid Peptide Analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546–554. doi:1730616.
- Busciglio, J., Yeh, J., and Yankner, B. a (1993). beta-Amyloid neurotoxicity in human cortical culture is not mediated by excitotoxins. *J. Neurochem.* 61, 1565–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8377009>.
- Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., et al. (1990). Processing of Alzheimer  $\beta$ /A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6003–6006. doi:10.1073/pnas.87.15.6003.
- Buxbaum, J. D., Liu, K.-N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., et al. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765–27767.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., et al. (2001). BACE1 is the major  $\beta$ -secretase for generation of A $\beta$  peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 233–234. doi:10.1038/85064.
- Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., et al. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173–2181. doi:10.1242/dev.01103.
- Cam, J. A., and Bu, G. (2006). Modulation of  $\beta$ -amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. *Mol. Neurodegener.* 1. doi:10.1186/1750-1326-1-8.
- Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Li, Y., and Bu, G. (2005). Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 280, 15464–15470. doi:10.1074/jbc.M500613200.
- Cao, X., and Südhof, T. C. (2001). A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science (80- )*. 293, 115–120.
-

doi:10.1126/science.1058783.

- Chen, W.-J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated-pit mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 3116–3123. Available at: <http://www.jbc.org/content/265/6/3116.abstract>.
- Cheret, C., Willem, M., Fricker, F. R., Wende, H., Wulf-Goldenberg, A., Tahirovic, S., et al. (2013). Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *EMBO J.* 32, 2015–2028. doi:10.1038/emboj.2013.146.
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., and Gleichmann, M. (2010). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Biochem Biophys Res Commun* 12, 1–12. doi:10.1007/s12017-009-8104-z.An.
- Citron, M., Diehl, T. S., Capell, A., Haass, C., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1996). Inhibition of amyloid  $\beta$ -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron* 17, 171–179. doi:10.1016/S0896-6273(00)80290-1.
- Cleveland, D. W., Hwo, S.-Y., and Kirschner, M. W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116, 207–225. doi:10.1016/0022-2836(77)90213-3.
- Coburger, I., Dahms, S. O., and Than, M. E. (2013). The overall structure of the multi-domain amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 8, P55. doi:10.1371/journal.pone.0081926.
- Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., et al. (2002).  $\alpha$ -Secretase ADAM10 as well as  $\alpha$ APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol. Med.* 8, 67–74. doi:S1528365802200671 [pii].
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* 36, 175–184. doi:10.1016/S0197-0186(99)00125-4.
- Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by  $\gamma$ -secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J. Neurochem.* 78, 1168–1178. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00516.x.
- Das, U., Scott, D., Ganguly, A., Koo, E. H., Tang, Y., and Roy, S. (2014). Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. *Neuron* 79, 447–460. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.035.Activity-induced.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active  $\gamma$ -Secretase complex. *Neuron* 38, 9–12. doi:10.1016/S0896-6273(03)00205-8.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113, 1857–1870.
- De Strooper, B., 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, 387–90. doi:10.1038/34910.
- Decock, M., Stanga, S., Octave, J. N., Dewachter, I., Smith, S. O., Constantinescu, S. N., et al. (2016). Glycines from the APP GXXXG/GXXXA transmembrane motifs promote formation of pathogenic A $\beta$  oligomers in cells. *Front. Aging Neurosci.* 8. doi:10.3389/fnagi.2016.00107.
- 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, 949–57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=454420&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486–8. doi:10.1038/ncb960.
- Eggert, S., Midthune, B., Cottrell, B., and Koo, E. H. (2009). Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid- $\beta$  protein production. *J. Biol. Chem.* 284, 28943–28952. doi:10.1074/jbc.M109.038646.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., et al. (1990). Cleavage of amyloid  $\beta$  peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122–1124. doi:10.1126/science.2111583.
- Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible Cre Mice. *Methods Mol. Biol.* 530. doi:10.1007/978-1-59745-471-1.
- FitzGerald, D. J., Fryling, C. M., Zdanovsky, A., Saelinger, C. B., Kounnas, M., Winkles, J. A., et al. (1995). Pseudomonas exotoxin-mediated selection yields cells with altered expression of low-density lipoprotein receptor-related protein. *Mol Microbiol* 16, 1171–1181.
- Fleck, D., N. Garratt, A., Haass, C., and Willem, M. (2012). BACE1 Dependent Neuregulin Processing: Review. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 178–183. doi:10.2174/156720512799361637.
- Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M., and Mattson, M. P. (1996). Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted  $\beta$ -amyloid-precursor protein. *Nature* 379, 74–78. doi:10.1038/379074a0.
- Gao, Y., and Pimplikar, S. W. (2001). The  $\gamma$ -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14979–14984. doi:10.1073/pnas.261463298.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–6. doi:10.1038/349704a0.
- Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., and Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255, 728–730. doi:10.1126/science.1738847.
- Gong, C.-X., and Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr. Med. Chem.* 15, 2321–8. doi:10.2174/092986708785909111.

- Gordts, P. L. S. M., Bartelt, A., Nilsson, S. K., Annaert, W., Christoffersen, C., Nielsen, L. B., et al. (2012). Impaired LDL receptor-related protein 1 translocation correlates with improved dyslipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *PLoS One* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0038330.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467. doi:10.1016/0042-6822(73)90341-3.
- Gralle, M., and 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, 11–32. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.02.001.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.-C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein  $\tau$  (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 4913–4917. doi:10.1073/pnas.83.13.4913.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001). Distinct Intramembrane Cleavage of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Family Resembling  $\gamma$ -Secretase-like Cleavage of Notch. *J. Biol. Chem.* 276, 35235–35238. doi:10.1074/jbc.C100357200.
- Haass, C. (2004). Take five-BACE and the  $\gamma$ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation. *EMBO J.* 23, 483–8. doi:10.1038/sj.emboj.7600061.
- Haass, C., Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1991). Processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci.* 11, 3783–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1744690> [Accessed November 8, 2013].
- Haass, C., Hung, a Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993). Normal Cellular Processing of the Beta-Amyloid Precursor Protein Results in the Secretion of the Amyloid-Beta Peptide and Related Molecules. *Alzheimers Dis. Amyloid Precursor Proteins, Signal Transduction, Neuronal Transplant.* 695, 109–116. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb23037.x.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–25. doi:10.1101/cshperspect.a006270.
- Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, a Y., and Selkoe, D. J. (1992). Targeting of cell-surface  $\beta$ -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500–3. doi:10.1038/357500a0.
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112. doi:10.1038/nrm2101.
- Hahn, D., Pischitzis, A., Roesmann, S., Hansen, M. K., Leuenberger, B., Luginbuehl, U., et al. (2003). Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Ectodomain Shedding

- and Phosphorylation of the Human Meprin $\beta$  Metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 278, 42829–42839. doi:10.1074/jbc.M211169200.
- Herr, U.-M., Strecker, P., Storck, S. E., Thomas, C., Rabiej, V., Junker, A., et al. (2017). LRP1 Modulates APP Intraneuronal Transport and Processing in Its Monomeric and Dimeric State. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 118. doi:10.3389/fnmol.2017.00118.
- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K. K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119–4127.
- Herz, J., Kowal, R. C., Ho, Y. K., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1990). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 265.
- Herz, J., and Strickland, D. K. (2001). LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108, 779–784. doi:10.1172/JCI200113992.
- Hippius, H., and Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 5, 101–108. doi:10.1055/s-2008-1026558.
- Hoefgen, S., Coburger, I., Roeser, D., Schaub, Y., Dahms, S. O., and Than, M. E. (2014). Heparin induced dimerization of APP is primarily mediated by E1 and regulated by its acidic domain. *J. Struct. Biol.* 187, 30–37. doi:10.1016/j.jsb.2014.05.006.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., and Goate, A. (2011). Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Sci. Transl. Med.* 3, 1–35. doi:10.1126/scitranslmed.3002369.Alzheimer.
- Hu, K., Yang, J., Tanaka, S., Gonias, S. L., Mars, W. M., and Liu, Y. (2006). Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 2120–2127. doi:10.1074/jbc.M504988200.
- Iadecola, C. (2016). Vascular and Metabolic Factors in Alzheimer's Disease and Related Dementias: Introduction. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 151–154. doi:10.1007/s10571-015-0319-y.
- Isbert, S., Wagner, K., Eggert, S., Schweitzer, A., Multhaup, G., Weggen, S., et al. (2012). APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1353–1375. doi:10.1007/s00018-011-0882-4.
- Itin, C., Schindler, R., and Hauri, H.-P. (1995). Targeting of Protein ERGIC-53 to the ER / ERGIC / cis-Golffl Recycling Pathway. *J. Cell Biol.* 131, 57–67.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A $\beta$ 42(43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43). *Neuron* 13, 45–53. doi:10.1016/0896-6273(94)90458-8.
- Jäger, S., Leuchtenberger, S., Martin, A., Czirr, E., Wesselowski, J., Dieckmann, M., et al. (2009).  $\alpha$ -secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits A $\alpha\beta$  generation. *J. Neurochem.* 111,

1369–1382. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06420.x.

- Jäger, S., and Pietrzik, C. U. (2008). Functional Role of Lipoprotein Receptors in Alzheimers Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 15–25. doi:10.2174/156720508783884675.
- Jawhar, S., Wirths, O., and Bayer, T. A. (2011). Pyroglutamate Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ): A Hatchet Man in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 286, 38825–38832. doi:10.1074/jbc.R111.288308.
- Jefferson, T., Čaušević, M., Auf Dem Keller, U., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., et al. (2011). Metalloprotease meprin  $\beta$  generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J. Biol. Chem.* 286, 27741–27750. doi:10.1074/jbc.M111.252718.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., et al. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J. Neurosci.* 30, 4833–44. doi:10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010.
- Jung, J. I., Premraj, S., Cruz, P. E., Ladd, T. B., Kwak, Y., Koo, E. H., et al. (2014). Independent relationship between amyloid precursor protein (APP) dimerization and  $\gamma$ -secretase processivity. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0111553.
- 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, 7271–7279. doi:10.1074/jbc.M708046200.
- Kalaria, R. N., Premkumar, D. R. D., Pax, A. B., Cohen, D. L., and Lieberburg, I. (1996). Production and increased detection of amyloid  $\beta$  protein and amyloidogenic fragments in brain microvessels, meningeal vessels and choroid plexus in Alzheimer's disease. *Mol. Brain Res.* 35, 58–68. doi:10.1016/0169-328X(95)00180-Z.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. arl-H., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–6. doi:10.1038/325733a0.
- Kawooya, J. K., Emmons, T. L., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Camp, M. C., and D'Andrea, S. C. (2003). Electrophoretic mobility of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptides in urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 323, 103–113. doi:10.1016/j.ab.2003.08.027.
- Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guénette, S. Y., and Selkoe, D. J. (2001). The Intracellular Domain of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner. *J. Biol. Chem.* 276, 40288–40292. doi:10.1074/jbc.C100447200.
- King, G. D., and Turner, R. S. (2004). Adaptor protein interactions: Modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk? *Exp. Neurol.* 185, 208–219. doi:10.1016/j.expneurol.2003.10.011.
- Kingston, R. E., Chen, C. A., and Okayama, H. (2003). Calcium Phosphate Transfection. *Curr. Protoc. Cell Biol. Suppl.* 19.
- Kinoshita, A., Whelan, C. M., Smith, C. J., Mikhailenko, I., Rebeck, G. W., Strickland,

- D. K., et al. (2001). Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65. *J. Neurosci.* 21, 8354–8361.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530–532. doi:10.1038/331530a0.
- Klafki, H.-W., Wiltfang, J., and Staufenbiel, M. (1996). Electrophoretic separation of  $\beta$ A4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal. Biochem.* 237, 24–9. doi:10.1006/abio.1996.0195.
- Klevanski, M., Saar, M., Baumkötter, F., Weyer, S. W., Kins, S., and Müller, U. C. (2014). Differential role of APP and APLPs for neuromuscular synaptic morphology and function. *Mol. Cell. Neurosci.* 61, 201–210. doi:10.1016/j.mcn.2014.06.004.
- Knauer, M. F., Orlando, R. a., and Glabe, C. G. (1996). Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res.* 740, 6–14. doi:10.1016/S0006-8993(96)00711-1.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., et al. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an  $\alpha$ -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 343 Pt 2, 371–5. doi:10.1042/bj3430371.
- Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid  $\beta$ -protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 17386–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021238> [Accessed November 7, 2013].
- Kounnas, M. Z., Moir, R. D., Rebeck, G. W., Bush, A. I., Argraves, W. S., Tanzi, R. E., et al. (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82, 331–340. doi:10.1016/0092-8674(95)90320-8.
- Krieger, M., and Herz, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601–637. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.003125.
- Kronenberg, D., Bruns, B. C., Moali, C., Vadon-Le Goff, S., Sterchi, E. E., Traupe, H., et al. (2010). Processing of Procollagen III by Meprins: New Players in Extracellular Matrix Assembly? *J. Invest. Dermatol.* 130, 2727–2735. doi:10.1038/jid.2010.202.
- Kruse, M.-N., Becker, C., Lottaz, D., Köhler, D., Yiallourous, I., Krell, H.-W., et al. (2004). Human meprin  $\alpha$  and  $\beta$  homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem. J.* 378, 383–389. doi:10.1042/BJ20031163.
- Kuan, Y.-H., Gruebl, T., Soba, P., Eggert, S., Nestic, I., Back, S., et al. (2006). PAT1a modulates intracellular transport and processing of amyloid precursor protein (APP), APLP1, and APLP2. *J. Biol. Chem.* 281, 40114–40123.



- doi:10.1074/jbc.M605407200.
- 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, 3020–32. doi:10.1038/emboj.2010.167.
- Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., et al. (1996). Water-soluble A $\beta$  (N-40, N-42) Oligomers in Normal and Alzheimer Disease Brains. *J. Biol. Chem.* 271, 4077–4081. doi:10.1074/jbc.271.8.4077.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5. doi:10.1038/227680a0.
- Lai, A., Sisodia, S. S., and Trowbridge, I. S. (1995). Characterization of sorting signals in the  $\beta$ -amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 270, 3565–3573. doi:10.1074/jbc.270.8.3565.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., et al. (1999). Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3922–3927. doi:10.1073/pnas.96.7.3922.
- Lee, K. J., Moussa, C. E., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B. W., Turner, R. S., et al. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* 169, 344–356. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.078.Beta.
- Lee, S., Xue, Y., Hu, J., Wang, Y., Liu, X., Demeler, B., et al. (2011). The E2 domains of APP and APLP1 share a conserved mode of dimerization. *Biochemistry* 50, 5453–5464. doi:10.1021/bi101846x.
- Levy-lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., et al. (1995). Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus. *Science (80- )*. 269, 973–977.
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Bibl, M., Paul, S., Svitek, J., Miertschischk, J., et al. (2004a). Electrophoretic separation of amyloid  $\beta$  peptides in plasma. *Electrophoresis* 25, 3336–3343. doi:10.1002/elps.200406068.
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J. M., Henkel, A. W., Henkel, M. K., et al. (2004b). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A $\beta$ 42, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio and total tau. *Neurobiol. Aging* 25, 273–281. doi:10.1016/S0197-4580(03)00086-1.
- Li, Q., and Südhof, T. C. (2004). Cleavage of Amyloid- $\beta$  Precursor Protein and Amyloid- $\beta$  Precursor-like Protein by BACE 1. *J. Biol. Chem.* 279, 10542–10550. doi:10.1074/jbc.M310001200.
- Li, Y., Marzolo, M. P., Van Kerkhof, P., Strous, G. J., and Bu, G. (2000). The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 275, 17187–17194. doi:10.1074/jbc.M000490200.
- Libeu, C. A. P., Descamps, O., Zhang, Q., John, V., and Bredesen, D. E. (2012). Altering APP proteolysis: Increasing sAPP $\alpha$  production by targeting

- dimerization of the APP Ectodomain. *PLoS One* 7.  
doi:10.1371/journal.pone.0040027.
- Lichtenthaler, S. (2013). Proteomics in neurons and animals: Substrates and therapeutic potential of alpha-and beta-secretase. *Mol Neurodegener* 8.  
doi:10.1186/1750-1326-8-S1-O6.
- Lillis, A. P., Duyn, L. B. Van, Murphy-ullrich, J. E., and Dudley, K. (2008). The low density lipoprotein receptor-related protein 1: Unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.* 88, 887–918.  
doi:10.1152/physrev.00033.2007.The.
- Liu, F., Li, B., Tung, E.-J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2008). Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur.J.Neurosci.* 26, 3429–3436.  
doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.
- Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S. J., Creemers, J., Seidah, N., and Checler, F. (2001). Constitutive  $\alpha$ -secretase cleavage of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: Involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J. Neurochem.* 76, 1532–1539.  
doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00180.x.
- Maler, J. M., Klafki, H. W., Paul, S., Spitzer, P., Groemer, T. W., Henkel, A. W., et al. (2007). Urea-based two-dimensional electrophoresis of beta-amyloid peptides in human plasma: Evidence for novel A $\beta$  species. *Proteomics* 7, 3815–3820.  
doi:10.1002/pmic.200700311.
- MarquezSterling, N. R., Lo, A. C. Y., Sisodia, S. S., and Koo, E. H. (1997). Trafficking Of Cell-Surface  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein - Evidence That a Sorting Intermediate Participates In Synaptic Vesicle Recycling. *J. Neurosci.* 17, 140–151.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–9.  
doi:10.1073/pnas.82.12.4245.
- Mattson, M. P. (1997). Cellular action of  $\beta$ -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* 77, 1081–1132.
- Merlos-Suárez, A., Fernández-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., and Arribas, J. (1998). Pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  processing activity is tightly controlled by a component that does not affect Notch processing. *J. Biol. Chem.* 273, 24955–24962. doi:10.1074/jbc.273.38.24955.
- Merz, P. A., Wisniewski, H. M., Somerville, R. A., Bobin, S. A., Masters, C. L., and Iqbal, K. (1983). Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol.* 60, 113–124. doi:10.1007/BF00685355.
- Meziane, H., Dodart, J.-C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., et al. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12683–12688.  
doi:10.1073/pnas.95.21.12683.
- Müller, U. C., and Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins.

- Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a006288.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–73.
- 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 A $\beta$ 42. *EMBO J.* 26, 1702–1712. doi:10.1038/sj.emboj.7601616.
- Munter, L. M., Botev, A., Richter, L., Hildebrand, P. W., Althoff, V., Weise, C., et al. (2010). Aberrant amyloid precursor protein (APP) processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP familial Alzheimer disease mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif. *J. Biol. Chem.* 285, 21636–21643. doi:10.1074/jbc.M109.088005.
- Nadezhdin, K. D., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V., and Arseniev, A. S. (2012). Dimeric structure of transmembrane domain of amyloid precursor protein in micellar environment. *FEBS Lett.* 586, 1687–1692. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.062.
- Näslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., et al. (1994). Relative abundance of Alzheimer A $\beta$  amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8378–82. doi:10.1073/pnas.91.18.8378.
- Neels, J. G., Van Den Berg, B. M. M., Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoekt, H., and Van Zonneveld, A. J. (1999). The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J. Biol. Chem.* 274, 31305–31311. doi:10.1074/jbc.274.44.31305.
- Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Levey, A. I., and Lah, J. J. (2006). The Lipoprotein Receptor LR11Regulates Amyloid  $\beta$  Production and Amyloid Precursor Protein Traffic in Endosomal Compartments. *J. Neurosci.* 26, 1596–1603. doi:10.1523/JNEUROSCI.4946-05.2006.The.
- Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur.J.Neurosci.* 11, 1907–1913. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x.
- Olsson, A., Höglund, K., Sjögren, M., Andreasen, N., Minthon, L., Lannfelt, L., et al. (2003). Measurement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Exp. Neurol.* 183, 74–80. doi:10.1016/S0014-4886(03)00027-X.
- Oltersdorf, T., Ward, P. J., Henriksson, T., Beattie, E. C., Neve, R., Lieberburg, I., et al. (1990). The Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* 265, 4492–4497.
- Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., et al. (1999). Mutagenesis identifies new signals for  $\beta$ -amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A $\beta$ 42. *J. Biol. Chem.* 274, 18851–18856. doi:10.1074/jbc.274.27.18851.



- Pietrzik, C., and Behl, C. (2005). Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 173–85. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00435.x.
- Pietrzik, C. U., Busse, T., Merriam, D. E., Weggen, S., and Koo, E. H. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J.* 21, 5691–5700. doi:10.1093/emboj/cdf568.
- Pietrzik, C. U., Yoon, I.-S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., and Koo, E. H. (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 24, 4259–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.5451-03.2004.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., et al. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113, 1456–1464. doi:10.1172/JC120864.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* 9, 63–75. doi:10.1016/j.jalz.2012.11.007.
- Puck, T. T., Cieciora, S. J., and Robinson, A. (1958). Genetics of Somatic Mammalian Cells. *J. Exp. Med.* 108, 945–956. doi:10.1084/jem.108.6.945.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, 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, 436–45. doi:10.1523/JNEUROSCI.1575-04.2005.
- Reekmans, S. M., Pflanzner, T., Gordts, P. L. S. M., Isbert, S., Zimmermann, P., Annaert, W., et al. (2010). Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 135–45. doi:10.1007/s00018-009-0171-7.
- Reinhard, C., Hébert, S. S., and De Strooper, B. (2005). The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24, 3996–4006. doi:10.1038/sj.emboj.7600860.
- Richter, L., Munter, L.-M., Ness, J., Hildebrand, P. W., Dasari, M., Unterreitmeier, S., et al. (2010). Amyloid  $\beta$  42 peptide (A $\beta$ 42)-lowering compounds directly bind to A $\beta$  and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14597–14602. doi:10.1073/pnas.1003026107.
- Ridder, D. A., Lang, M.-F., Salinin, S., Röderer, J.-P., Struss, M., Maser-Gluth, C., et al. (2011). TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy. *J. Exp. Med.* 208, 2615–2623. doi:10.1084/jem.20110398.
- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., et al. (2007). The Secreted  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APP $\alpha$  Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J. Neurosci.* 27, 7817–7826. doi:10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007.
- Roberts, L. M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D. S., Haggerty, J. E., Tate, E. H., et

- al. (2008). Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149, 6251–6261. doi:10.1210/en.2008-0378.
- Roberts, S. B., Ripellino, J. A., Ingalls, K. M., Robakis, N. K., and Felsenstein, K. M. (1994). Non-amyloidogenic cleavage of the  $\beta$ -amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J. Biol. Chem.* 269, 3111–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300647>.
- Roch, J.-M., Masliah, E., Roch-Levecq, A.-C., Sundsmo, M. P., Otero, D. A. C., Veinbergs, I., et al. (1994). Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid  $\beta$ /A4 protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7450–4. doi:10.1073/pnas.91.16.7450.
- Roebroek, A. J. M., Reekmans, S., Lauwers, A., Feyaerts, N., Smeijers, L., and Hartmann, D. (2006). Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinase-mediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development. *Mol. Cell. Biol.* 26, 605–16. doi:10.1128/MCB.26.2.605-616.2006.
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E., et al. (1993).  $\beta$ -Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10836–10840. doi:10.1073/pnas.90.22.10836.
- Saito, K.-I., Elce, J. S., Hamos, J. E., and Nixon, R. A. (1993). Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2628–32. doi:10.1073/pnas.90.7.2628.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., et al. (2001). Presenilin-dependent  $\gamma$ -secretase processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835–841. doi:10.1093/embo-reports/kve180.
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2087–2096. doi:10.1128/MCB.7.6.2087.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5166–5170. doi:10.1073/pnas.85.14.5166.
- 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, 33923–33929. doi:10.1074/jbc.M105410200.
- Schmidt, V., Baum, K., Lao, A., Rateitschak, K., Schmitz, Y., Teichmann, A., et al. (2012). Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 31, 187–200. doi:10.1038/emboj.2011.352.
- Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O. M., et al. (2007). SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *J. Biol. Chem.* 282, 32956–32964.

doi:10.1074/jbc.M705073200.

- Schönherr, C., Bien, J., Isbert, S., Wichert, R., Prox, J., Altmeyen, H., et al. (2016). Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid  $\beta$  peptides by meprin  $\beta$  depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol. Neurodegener.* 11, 11–15. doi:10.1186/s13024-016-0084-5.
- Schütte, A., Lottaz, D., Sterchi, E. E., Stöcker, W., and Becker-Pauly, C. (2007). Two  $\alpha$  subunits and one  $\beta$  subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*. *Biol. Chem.* 388, 523–531. doi:10.1515/BC.2007.060.
- Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23–A31. doi:10.1038/399a023.
- Selkoe, D. J. (2000). Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease. Hypothesis: Alzheimer's Disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 924, 17–25. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05554.x.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease : Genes, Proteins and Therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L. O., Winblad, B., and Benedikz, E. (2000). Levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* 278, 169–172. doi:10.1016/S0304-3940(99)00929-5.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., et al. (1993). Secretion of  $\beta$ -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the  $\beta$ -amyloid peptide. *Nature* 361, 260–3. doi:10.1038/361260a0.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325–327. doi:10.1038/359325a0.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760. doi:10.1038/375754a0.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., et al. (1992). Production of the Alzheimer Amyloid  $\beta$  Protein by Normal Proteolytic Processing. *Science (80- )*. 258, 126–129. doi:10.1126/science.1439760.
- 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, 537–40. doi:10.1038/990114.
- Sisodia, S. S. (1992).  $\beta$ -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 6075–6079. doi:10.1073/pnas.89.13.6075.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., and Price, D. L. (1990). Evidence that  $\beta$ -Amyloid Protein in Alzheimer's Disease is not Derived by Normal Processing. *Science (80- )*. 248, 492–495. doi:10.1126/science.1691865.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Hoffman, P. N., Perry, G., and Price, D. L. (1993).

- Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 13, 3136–3142.
- Slack, B. E., Ma, L. K., and Seah, C. C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Biochem. J.* 357, 787–94. doi:10.1042/bj3570787.
- So, P. P. L., Zeldich, E., Seyb, K. I., Huang, M. M., Concannon, J. B., King, G. D., et al. (2012). Lowering of amyloid beta peptide production with a small molecule inhibitor of amyloid- $\beta$  precursor protein dimerization. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 1, 75–87.
- 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, 3624–3634. doi:10.1038/sj.emboj.7600956.
- Song, Y., Hustedt, E. J., Brandon, S., and Sanders, C. R. (2013). Competition between homodimerization and cholesterol binding to the C99 domain of the amyloid precursor protein. *Biochemistry* 52, 5051–5064. doi:10.1021/bi400735x.
- Stahl, R., Schilling, S., Soba, P., Rupp, C., Hartmann, T., Wagner, K., et al. (2014). Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 410. doi:10.3389/fncel.2014.00410.
- Sterchi, E. E., Stöcker, W., and Bond, J. S. (2008). Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. 29, 309–328. doi:10.1016/j.mam.2008.08.002.Meprins.
- Storck, S. E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J. N., Schubert, N., Di Spiezio, A., et al. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ 1-42 across the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 126, 123–136. doi:10.1172/JCI81108.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., et al. (2009).  $\gamma$ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of  $\beta$ -Carboxyl Terminal Fragment. *J. Neurosci.* 29, 13042–13052. doi:10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009.
- Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K., and Ishiura, S. (2006). ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP  $\alpha$ -secretase in A172 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 111–117. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.181.
- Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R., et al. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein- $\alpha$  regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol. Dis.* 31, 250–260. doi:10.1016/j.nbd.2008.04.011.
- Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 273, 33556–33560. doi:10.1074/jbc.273.50.33556.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., and Warman, M. L. (2000). preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29, 52–54.

- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., and Abraham, W. C. (2003). *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. doi:10.1016/S0301-0082(03)00089-3.
- Tyler, S. J., Dawbarn, D., Wilcock, G. K., and Allen, S. J. (2002).  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase: Profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 373–376. doi:10.1016/S0006-291X(02)02635-9.
- Ulery, P. G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R. E., Rebeck, G. W., Hyman, B. T., et al. (2000). Modulation of Amyloid Precursor Protein Processing by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP). *J. Biol. Chem.* 275, 7410–7415. doi:10.1074/jbc.275.10.7410.
- Van Nostrand, W. E., Wagner, S. L., Shankle, W. R., Farrow, J. S., Dick, M., Rozemuller, J. M., et al. (1992). Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2551–2555.
- Vandenbroucke, R. E., Dejonckheere, E., Van Lint, P., Demeestere, D., Van Wonterghem, E., Vanlaere, I., et al. (2012). Matrix metalloprotease 8-dependent extracellular matrix cleavage at the blood-CSF barrier contributes to lethality during systemic inflammatory diseases. *J Neurosci* 32, 9805–9816. doi:10.1523/JNEUROSCI.0967-12.2012.
- 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 (80- )*. 286, 735–41. doi:10.1126/science.286.5440.735.
- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., and 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, 12787–12794. doi:10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.The.
- Vassar, R., Kuhn, P. H., Haass, C., Kennedy, M. E., Rajendran, L., Wong, P. C., et al. (2014). Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: Current status and future prospects. *J. Neurochem.* 130, 4–28. doi:10.1111/jnc.12715.
- Vizcaíno, J. A., Côté, R., Reisinger, F., Foster, J. M., Mueller, M., Rameseder, J., et al. (2009). A guide to the Proteomics Identifications Database proteomics data repository. *Proteomics* 9, 4276–4283. doi:10.1002/pmic.200900402.
- Waldron, E., Heilig, C., Schweitzer, A., Nadella, N., Jaeger, S., Martin, A. M., et al. (2008). LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol. Dis.* 31, 188–197. doi:10.1016/j.nbd.2008.04.006.
- Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., et al. (2003).  $\gamma$ -secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* 42, 6664–6673. doi:10.1021/bi027375c.
- Wang, C., and Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* 66, 637–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908748>.

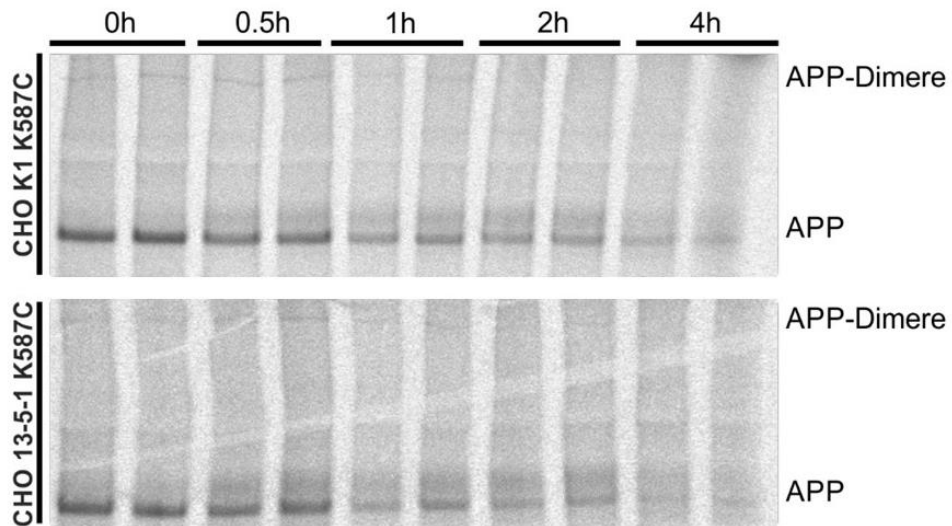


- 
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.-D., et al. (2005). Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2. *J. Neurosci.* 25, 1219–1225. doi:10.1523/JNEUROSCI.4660-04.2005.
- Wang, Y., and Ha, Y. (2004). The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol. Cell* 15, 343–353. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.037.
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., et al. (2009). Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J. Neurosci.* 29, 10788–801. doi:10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., and Solomon, F. (1992). Identification of a Mouse Brain cDNA that Encodes a Protein Related to the Alzheimer Disease-Associated Amyloid  $\beta$  Protein Precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10758–10762. doi:10.1073/pnas.89.22.10758.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., et al. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid  $\beta$  protein precursor. *Nat. Genet.* 5, 95–100. doi:10.1038/ng0993-95.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B. M., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., et al. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825–2835. doi:bi015794o [pii].
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., et al. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649245> [Accessed November 8, 2013].
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S.-Y., and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–62. doi:10.1073/pnas.72.5.1858.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., et al. (2006). Control of Peripheral Nerve Myelination by the  $\beta$ -Secretase BACE1. *Science* (80-. ). 314, 664–666. doi:10.1126/science.1132341.
- Willnow, T. E., and Andersen, O. M. (2013). Sorting receptor SORLA - a trafficking path to avoid Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* 126, 2751–2760. doi:10.1242/jcs.125393.
- Wiltfang, J., Esselmann, H., Cupers, P., Neumann, M., Kretschmar, H., Beyermann, M., et al. (2001). Elevation of  $\beta$ -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 42645–42657. doi:10.1074/jbc.M102790200.
- Wirhth, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeier, A., Jawhar, S., Lucassen, P. J., et al. (2010). Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J. Neural Transm.* 117, 85–96. doi:10.1007/s00702-009-0314-x.
-

- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *398*, 513–517.
- Xue, Y., Lee, S., and Ha, Y. (2011). Crystal structure of amyloid precursor-like protein 1 and heparin complex suggests a dual role of heparin in E2 dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 16229–16234. doi:10.1073/pnas.1103407108.
- 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*, 533–7. doi:10.1038/990107.
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* *4*. doi:10.1186/1756-6606-4-3.
- Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.-Z., Kim, S.-H., et al. (2004). Identification of a New Presenilin-dependent  $\zeta$ -Cleavage Site within the Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 50647–50650. doi:10.1074/jbc.C400473200.

## 9 Anhang

### 9.1 Ergänzende Abbildung



**Abbildung 24: Pulse-Chase-Analyse von APP in Lysaten von CHO-Zellen mit stabiler APP695 K587C-Expression.** Nachweis radioaktiv-markierter APP-Dimere und -Monomere nach deren Immunpräzipitation mit dem 1G75A3-Antikörper-Gemisch.



## 9.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und hierfür keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

---

(Ort, Datum)

---

(Uta-Mareike Herr)

## **9.3 Danksagung**

## **9.4 Lebenslauf**

