

**Untersuchungen zur Induktion von Filopodien durch das
Amyloid Precursor Like Protein 1 (APLP1),
ein Mitglied der APP-Genfamilie"**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades**

**"Doktor
der Naturwissenschaften"**

am Fachbereich 10 Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Andreas Langer
geb. am 1. Februar 1973 in Fulda

Mainz, den 01.08.2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimer Krankheit	2
1.1.1	Pathologie der Alzheimer Krankheit	2
1.1.2	Genetische Aspekte der Alzheimer Krankheit	3
1.1.3	Prozessierung des APP und die Amyloid-Kaskade-Hypothese	4
1.2	Die APP-Genfamilie	6
1.2.1	Struktur der APP/APLP-Proteine	6
1.2.2	Expression der APP/APLP-Proteine	8
1.2.3	Interaktionspartner und Struktur der APP-Familie	8
1.2.4	Physiologische Funktionen der APP-Familie	11
1.3	APLP1	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.1.1	Enzyme	18
2.1.1.2	Kits	18
2.1.1.3	Spezielle Verbrauchsmaterialien	18
2.1.1.4	Spezielle Geräte	19
2.1.1.5	Allgemeine Puffer und Lösungen	19
2.1.1.6	Spezielle Puffer und Lösungen	20
2.1.1.7	Puffer und Lösungen zur Plasmidpräparation aus Bakterienzellen	20
2.1.1.8	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blots	20
2.1.1.9	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenzmikroskopie	21
2.1.1.10	Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen	21
2.1.1.11	Nährmedien und Lösungen für eukaryotische Zellkulturen	21
2.1.1.11.1	Zellkulturlösungen	21
2.1.1.11.2	Transfektionsreagenzien	22
2.1.1.11.3	Inhibitoren und Kontrollsubstanzen	22
2.1.2	Nukleinsäuren	23
2.1.2.1	Plasmide	23
2.1.2.2	Oligonukleotide	26
2.1.2.3	Weitere Nukleinsäuren	29
2.1.3	Antikörper	30
2.1.3.1	Primäre Antikörper	30
2.1.3.2	Sekundäre Antikörper	31
2.1.4	Organismen	31
2.1.4.1	Bakterienstämme	31
2.1.4.2	Eukaryotische Zelllinien	32

2.2	Methoden	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	33
2.2.1.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen	33
2.2.1.3	Plasmidpräparation aus Bakterienzellen (Mini, Midi, Maxi)	33
2.2.1.4	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.2.1.5	Restriktionsfragmentanalyse	34
2.2.1.6	Agarosegelelektrophorese von DNA	34
2.2.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.2.1.8	Dephosphorilierung linearisierter DNA-Fragmente	34
2.2.1.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.9.1	Standard PCR zu analytischen Zwecken	35
2.2.1.9.2	PCR zur Subklonierung	35
2.2.1.9.3	PCR-Mutagenese	36
2.2.1.10	Subklonierung von PCR-Fragmenten	37
2.2.1.11	Ligation von DNA-Doppelsträngen durch T4-Ligase	37
2.2.1.12	Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten	37
2.2.2	Erzeugung von Plasmiden zur Überexpression N-terminal deletierter APLP1-Proteine	37
2.2.3	Erzeugung von Plasmiden zur Überexpression von APLP1/APLP2-Chimären	38
2.2.4	Biochemische Methoden	40
2.2.4.1	Herstellung von Zellhomogenaten	40
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.4.4	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	40
2.2.5	Zellbiologische Methoden	41
2.2.5.1	Kultivierung von Zelllinien	41
2.2.5.2	Erzeugung und Kultivierung kortikaler Neuronenkulturen	41
2.2.5.3	Transfektion von Zellkulturen	42
2.2.5.3.1	Transfektion von Zellen durch lipophilisierte DNA	42
2.2.5.3.2	Elektroporation von Zelllinien und kortikalen Neuronen	42
2.2.5.3.3	Transfektion von Zellen mittels CaPO ₄	42
2.2.6	Immunzytochemie	43
2.2.6.1	Beschichtung von Deckgläschen	43
2.2.6.2	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	43
2.2.6.3	Fluoreszenzmarkierung von Zellstrukturen mit Phalloidin	43
2.2.6.4	Fluoreszenzmarkierung des Zellkerns	43
2.2.6.5	Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern	44
2.2.6.6	Konservierung fixierter und fluoreszenzmarkierter Zellen	44

3.	Ergebnisse	45
3.1	Überexpression der APP-Genfamilie in PC12-Zellen	46
3.1.1	Morphologische Veränderungen APLP1-transfizierter PC12-Zellen	48
3.2	Überexpression der APP-Genfamilie in cortikalen Neuronen	55
3.3	Untersuchungen zur Effektor-domäne von APLP1	61
3.3.1	Deletion des intrazellulären C-Terminus von APLP1	62
3.3.2	N-terminale Deletionen der extrazellulären Domäne	64
3.3.3	Eingrenzung der Effektor-domäne anhand von Expressionsversuchen mit APLP1/APLP2-Chimären	66
3.4	Einfluss sezernierter APLP1-Fragmente auf die Induktion von Filopodien	68
3.5	Untersuchungen APLP1 induzierter Signalwege	72
4.	Diskussion	74
4.1	APLP1 induziert die Bildung von Filopodien in PC12-Zellen	75
4.2	APLP1 induziert die Bildung filopodiale Strukturen in cortikalen Neuronen	76
4.3	APLP1 induziert die Neuritogenese unabhängig vom zytoplasmatischen YENPTY-Bindemotiv und dessen Interaktionspartnern	78
4.4	Die Filopodien-induzierende Domäne des APLP1 liegt innerhalb der Ectodomäne	80
4.5	Sekretierung als Modulator der Induktion von Filopodien?	84
4.6	Mögliche Signalübertragungswege der APLP1-induzierten Filopodiengese	85
4.7	Ausblick	88
5.	Zusammenfassung	89
6.	Literaturverzeichnis	90
7.	Anhang	98
7.1	Abkürzungsverzeichnis	99
7.2	Erklärung	101

1. Einleitung

Etwa 1,6 Millionen Menschen leiden in der Bundesrepublik Deutschland an einer unaufhaltsamen und fortschreitenden Gehirnleistungsschwäche, davon 60-70% an der Demenz vom Alzheimer Typ, die "Alzheimer Krankheit" genannt wird (Cummins E. J. and Cole G., 2002). Diese Demenzkranken erleben in ihrer, sich durch die Krankheit verändernden Welt, ihr Umfeld anders und werden oft nicht oder falsch verstanden. Der Grafiker und Künstler Carolus Horn (1921-1992), der an Morbus Alzheimer erkrankte und letztendlich daran starb, zeigt in eindrucksvollen Bildern, wie seine Betrachtungs- und Ausdrucksweise sich im Verlauf seiner Erkrankung änderte.



Nur ungefähr 3% der Alzheimer-Patienten sind wie Carolus Horn jünger als 65 Jahre, 30% der Erkrankten sind 65-80 Jahre und der Großteil ist über 80 Jahre (Bickel H. 2000). Aufgrund dieser Korrelation wird die Zahl der Alzheimer-Kranken infolge der Altersstruktur und der immer höheren Lebenserwartung in unserer Gesellschaft in den nächsten Jahren weiterhin zunehmen. Um einem solchen drastischen Anstieg entgegenwirken zu können, sind daher dringend neue Therapieansätze zur Vorbeugung, Verlangsamung oder Heilung nötig.

1.1 Die Alzheimer Krankheit

1.1.1 Pathologie der Alzheimer Krankheit

Die Diagnose Alzheimer basiert zunächst auf dem Verlust bestimmter kognitiver Fähigkeiten. So treten bereits im Frühstadium der Erkrankung Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, eine Abnahme der Merkfähigkeit und Störungen der zeitlichen und räumlichen Orientierung auf. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zum Verlust der Sprache und emotionalen Störungen (Bickel H. 2000). Eine klare Abgrenzung der Alzheimer Krankheit gegenüber anderen Demenzerkrankungen gelingt meist erst post mortem anhand des Vorkommens von extrazellulären Amyloid-Ablagerungen (neuritischen Plaques) sowie intrazellulären neurofibrillären Bündeln (engl. neurofibrillary tangles) im Gehirn der Erkrankten. Diese pathologischen Veränderungen finden sich insbesondere innerhalb des Neocortex, des Hippocampus und der Amygdala. Zusätzlich tritt eine Reduktion der synaptischen Dichte sowie neuronale Degeneration innerhalb verschiedener Hirnstrukturen auf. Hiervon betroffen sind beispielsweise der cerebrale Cortex, der Hippocampus, die Amygdala, das basale Vorderhirn, der Locus coreoleus und die Raphne-Kerne im Hirnstamm (Price D. L. and Sisodia S. S. 1998; Lantos P. and Cairns N. 2000). Als Folge der Degeneration spezifischer Neuronen nimmt auch die Konzentration bestimmter Neurotransmitter wie Acetylcholin (basales Vorderhirn), Noradrenalin (*locus coreolus*) oder Serotonin (*Raphne-Kerne*) im Gehirn von Alzheimer-Kranken ab (Lantos P. et al. 2000; Selkoe D.J. 2001a).

Die oben erwähnten Neuritischen Plaques bestehen hauptsächlich aus β -Amyloid ($A\beta$), einem Spaltprodukt des Amyloid Vorläuferproteins (engl. amyloid precursor protein, APP) (Glennner G. G. and Wong C.W. 1984). Dieses Spaltprodukt besteht aus 39/40 oder 42/43 Aminosäuren (As). Bei diffusen Plaques, der Vorstufe der neuritischen Plaques, können bereits $A\beta$ -Aggregate, aber keine weiteren pathologischen Veränderungen detektiert werden. Bei neuritischen Plaques hingegen sind die unlöslichen $A\beta$ -Fibrillen von dystrophen Neuriten eingefasst. Zudem sind um die Amyloidherde vermehrt Mikroglia und reaktive Astroglia angesiedelt, die Entzündungsreaktionen hervorrufen können (Selkoe D.J. 2001a).

Unabhängig von den neuritischen Plaques treten als zweites charakteristisches Merkmal der Alzheimer Krankheit neurofibrilläre Bündel auf, deren Entstehung durch eine Hyperphosphorylierung des Proteins Tau ausgelöst wird. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches normalerweise neuronale Mikrotubuli in Axonen stabilisiert. Durch Hyperphosphorylierung dissoziiert Tau von den Mikrotubuli und aggregiert zu PHFs (engl. paired helical filaments). Die Folge ist ein Zusammenbruch der Mikrotubuli-Struktur, was mit einer Störung von intrazellulären Transportmechanismen einhergeht und zum Zelltod führen kann (Mandelkow E. M. and Mandelkow E. 1998).

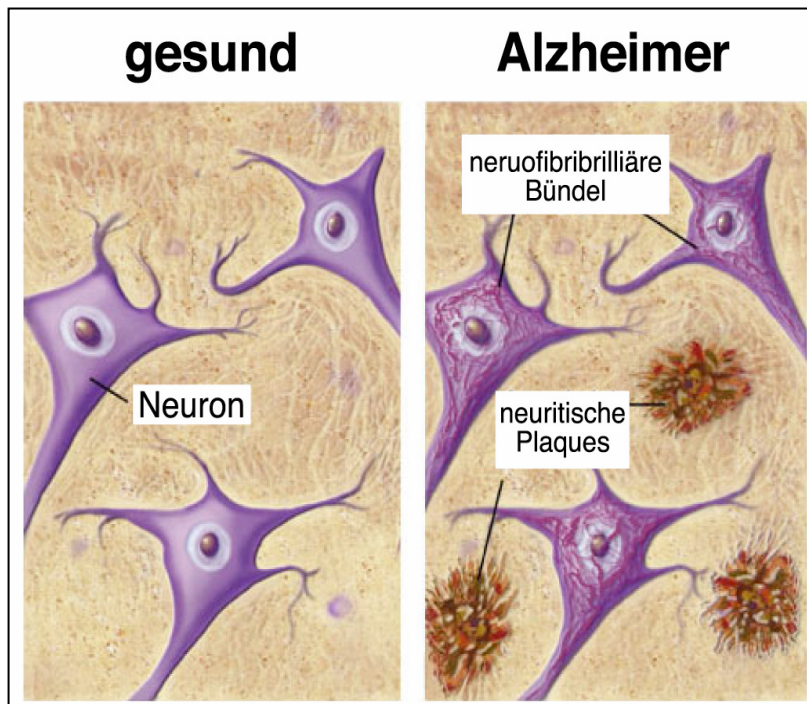


Abb1.2: Schematische Darstellung der neuropathologischen Veränderungen bei der Alzheimer Krankheit

Gezeigt sind die klassischen neuropathologischen Läsionen im Gehirn eines Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Situation im gesunden Menschen. Im an Alzheimer erkrankten Gewebe sind extrazelluläre **neuritische Plaques** aus unlöslichem β -Amyloid zu erkennen. Typisch für die Erkrankung sind auch die in den Neuronen vorhandenen **neurofibrillären Bündel** aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. (modifiziert nach American Health Assistance Foundation, www.ahaf.org)

1.1.2 Genetische Aspekte der Alzheimer Krankheit

Der Großteil der Alzheimer Erkrankungen ist der sporadisch auftretenden Form zuzuordnen. Jedoch sind 5-10% der Alzheimer-Erkrankungen auf genetische Prädispositionen zurückzuführen. Anhand dieser wenigen familiären Formen der Alzheimer Krankheit (engl. *familial alzheimer's disease*, FAD) konnten erste Erkenntnisse über die Etiopathogenese dieser Erkrankung gewonnen werden. Vergleichende Genomanalysen von Familien, deren Mitglieder die Alzheimer Krankheit besonders häufig oder zu sehr frühen Zeitpunkten bekamen, zeigten, dass unterschiedliche Mutationen bestimmter Loci vorlagen. Die meisten dieser von FAD betroffenen Familien besaßen Mutationen innerhalb der für die Preseniline 1 (Chromosom 14) oder Presenilin 2 (Chromosom 1) oder des APP-Gens (Chromosom 21) codierenden Gene. Auch wenn diese Mutationen in unterschiedlichen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen liegen, beeinflussen sie die gleichen biochemischen Prozesse, den APP-Stoffwechsel und somit auch die Entstehung des $A\beta$ -Peptids (siehe unten). Des Weiteren wurde das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E (ApoE4) als genetischer Risikofaktor identifiziert (Tanzi R. E. and Bertram L. 2001; Selkoe D.J. 2001a). Genetische Analysen zeigten, dass diese bisher identifizierten genetischen Loci nicht die einzigen sind, welche das Risiko einer Alzheimer-Erkrankung erhöhen (Tanzi R. E. et al. 2001; Bertram L. and Tanzi R. E. 2005).

Auffällig ist, dass sämtliche der bisher identifizierten FAD-assoziierten Mutationen und Risikofaktoren mit einer Erhöhung der $A\beta_{42}$ -Konzentration im Gehirn einhergehen. Während die Mutationen am N-Terminus der $A\beta$ -Region von APP in einer erhöhten Produktion von $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ resultieren, zeigen jene am C-Terminus, wie auch die Mutationen innerhalb der Preseniline, eine verstärkte Bildung des $A\beta_{42}$, welches sich durch eine höhere Tendenz zur Aggregation (im Vergleich zu $A\beta_{40}$) auszeichnet. Der Risikofaktor ApoE4 scheint für eine

Beschleunigung der Aggregation und/oder einen verminderten Abbau von A β verantwortlich zu sein, was ebenfalls zu einer erhöhten A β -Konzentration im Gehirn führt (Selkoe D.J. 2001b). Auch die potentiellen Risikofaktoren A2M, LRP1 und IDE sind wahrscheinlich beim Abbau und der Entfernung von A β beteiligt (Tanzi R. E. et al. 2005; Tanzi R. E. et al. 2001; Selkoe D.J. 2001b). Demzufolge führen so gut wie alle bisher beschriebenen FAD-Mutationen zu einer relativen Erhöhung der A β_{42} -Konzentration gegenüber der A β_{40} -Konzentration im Gehirn. Eine Erhöhung der A β -Menge durch veränderte Prozessierung oder verringerten Abbau muss aufgrund dieser Beobachtungen als Ursache für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit angenommen werden. Untermuert wird diese Hypothese durch die Analyse von Patienten, die am sogenannten *Down-Syndrom* erkranken. Die Ursache dieser Krankheit ist eine Trisomie des Chromosoms 21, auf dem das APP-Gen zu finden ist. Allein durch den Gen-Dosis-Effekt zeigen sich in den Gehirnen dieser Menschen erhöhte Mengen an A β (Selkoe D.J. 2001a).

Die oben beschriebenen Erkenntnisse implizieren eine zentrale Rolle des APP-Metabolismus bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit und begründen die Amyloid-Kaskade-Hypothese.

1.1.3 Prozessierung des APP und die Amyloid-Kaskade-Hypothese

Wie bereits oben erwähnt scheint die Prozessierung des APP-Proteins und die hiervon abhängige Konzentration an A β direkt für die Entstehung der Alzheimer Krankheit verantwortlich zu sein (Hardy J. 1996). Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese zeigt die möglichen Prozessierungen des APP und die Entstehung unterschiedlicher Spaltprodukte, zu denen auch das A β -Peptid gehört. APP ist ein integrales Membranprotein mit einer Transmembrandomäne, das auf zwei alternativen Wegen proteolytisch gespalten werden kann (siehe Abb1.3).

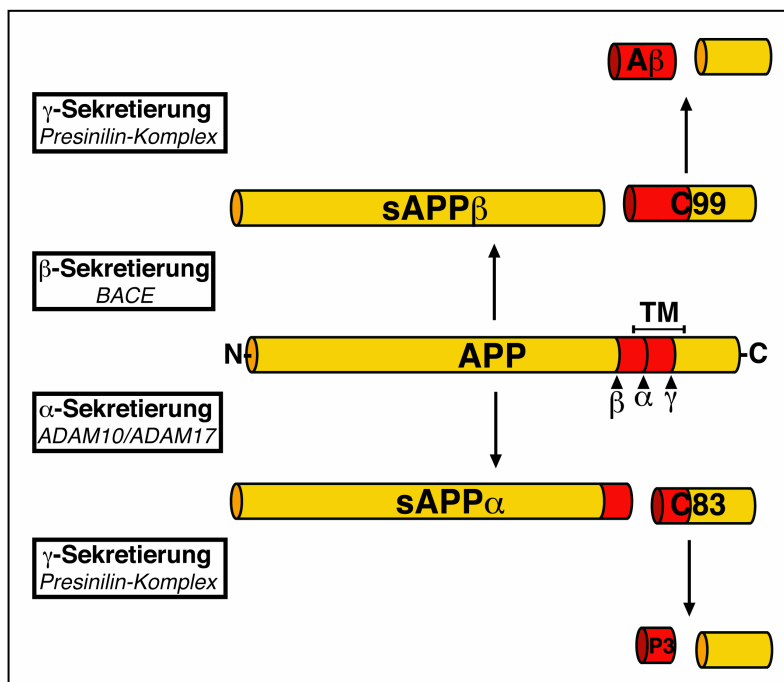


Abb1.3: Prozessierung des APP-Proteins

Das Amyloid Vorläuferprotein APP ist ein integrales Membranprotein mit einer N-terminalen Ektodomäne, einer singulären Transmembrandomäne (TM) und einem intrazellulären C-Terminus. Die A β -Sequenz (rot) liegt teilweise in der Transmembrandomäne. APP kann auf zwei alternativen Wegen proteolytisch gespalten werden.

Die β -Prozessierung, bei der das für die Pathogenese der Alzheimer Krankheit verantwortliche A β entsteht, beginnt mit der Abspaltung des N-Terminus durch die β -Sekretase (BACE) was zur Freisetzung des sAPP β führt. Das in der Membran verbleibende C99-Fragment wird durch die γ -Sekretase (Presenilin-Komplex) gespalten, wodurch das A β sezerniert werden kann.

Alternativ zu dieser sogenannten β -Sekretierung kann APP von der α -Sekretase (ADAM10/ADAM17) innerhalb der A β -Sequenz geschnitten werden. Aus dieser Prozessierung entsteht zunächst

sAPP α und das C83-Peptid. Wie das aus der β -Sekretierung resultierende C99-Fragment wird das C83-Fragment anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten. Hierdurch entsteht das für die Pathogenese der Alzheimer Krankheit unbedeutende Fragment P3. (modifiziert nach Selkoe D.J. 2001a)

Bei der α -Sekretierung spalten Metalloproteasen (ADAM10/ADAM17) APP innerhalb der A β -Region und setzen somit die extrazelluläre Domäne (sAPP α) frei (De Strooper B. and Annaert W. 2000; Elser W. P. and Wolfe M. S. 2001; Allison T. M. et al. 2003). Das in der Membran verbleibende 83 Aminosäuren große Peptid (C83) wird anschließend durch die γ -Sekretase, einen Multiproteinkomplex mit Presenilin 1 und Presenilin 2 als katalytisches Zentrum, weiter prozessiert (Steiner H. 2004; Brunkan A. L. and Goate A. M. 2005). Das hierbei entstehende Peptid P3 spielt bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit keine Rolle.

Alternativ zur α -Sekretierung kann APP von der β -Sekretase (engl. BACE1 beta-site APP-cleaving enzyme 1) am N-Terminus der A β -Region gespalten werden, wodurch eine im Vergleich zur α -Sekretierung leicht verkürzte Ektodomäne (sAPP β) freigesetzt wird (Vassar R. 2004; Vassar R. 2005). Das in der Membran verbleibende 99 Aminosäuren große Fragment (C99) wird, wie bereits für das aus der α -Sekretierung stammende C83-Fragment beschrieben, durch die γ -Sekretase weiter prozessiert. Nach dieser zweiten Prozessierung entsteht hier jedoch das in die Pathogenese der Alzheimer Krankheit involvierte A β -Peptid (Brunkan A. L. et al. 2005).

Trotz der überzeugenden genetischen Erkenntnisse, auf die sich die Amyloid-Kaskade-Hypothese stützt, lässt dieses Modell noch viele Fragen offen. Unklar sind beispielsweise die molekularen Mechanismen, wie eine Erhöhung der A β -Konzentration und eine verstärkte Ablagerung dieses Peptids die Ausbildung neurofibrillärer Bündel induziert. Auch gibt es bisher keine Erkenntnisse, auf welchem Weg die Entstehung dieser Bündel schließlich die Degeneration der Neuronen auslöst. Erste Untersuchungen zeigen, dass es sich bei dieser Degeneration um einen Prozess handelt, bei dem Entzündungsreaktionen, die Bildung von Radikalen und ein verstärkter neuronaler Ca²⁺-Ionen-Einstrom involviert sein könnten (Selkoe D.J. 2001a). Transgene Mäuse, welche FAD-mutiertes APP oder FAD-mutiertes Presenilin überexprimieren, zeigten Teilaspekte der Alzheimer Krankheit. So lassen sich im Gehirn dieser Mäuse A β -Ablagerungen in Form diffuser und neuritischer Plaques, Astroglia und Mikroglia detektieren. Neben diesen pathologischen Befunden zeigte sich, dass diese transgenen Mäuse Lerndefizite besaßen, die zeitlich vor dem Auftreten der A β -Ablagerung auftraten (Guenette S.Y. and Tanzi R. E. 1999). Auch konnte ein Verlust von Neuronen und Synapsen in der CA1-Region des Hippocampus bereits vor dem Auftreten der Plaques in einem der Tiermodelle festgestellt werden (Hsia A.Y. et al. 1999). Auffälligerweise konnten in keinem der Tiermodelle neurofibrilläre Bündel beobachtet werden, obwohl in einem Fall hyperphosphoryliertes Tau identifiziert werden konnte (Sturchler-Pierrat C. et al. 1997). Diese neurofibrillären Bündel konnten jedoch in transgenen Mäusen detektiert werden, welche mutiertes Tau (TauP301L) überexprimierten (Lewis J. et al. 2000; Götz J. et al. 2001a). Interessanterweise ließ sich die Entstehung neurofibrillärer Bündel durch eine Kombination dieser Mausmodelle (doppeltransgene Mäuse mit mutiertem Tau und FAD-mutiertem APP) sowie durch eine Injektion von fibrillärem A β 42 in den Hippocampus von Tau(P301L)-überexprimierenden Mäusen massiv verstärken (Lewis J. et al. 2001; Götz J. et al. 2001b). Diese Ergebnisse zeigen, dass A β die Ausbildung neurofibrillärer Bündel intensivieren und deren Entstehung beschleunigen kann. Gleichzeitig wurden hierbei Tiermodelle erzeugt, die das pathologische Gesamtbild der Alzheimer Krankheit umfassend repräsentieren, auch wenn in den Tau/APP-Mäusen gewisse pathologische Veränderungen wie z.B. neuritische Plaques, umgeben von dystrophen Tau-positiven Neuriten, nicht beobachtet werden (Lewis J. et al. 2001).

Aufgrund der bereits umfassend untersuchten Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist die Reduktion des A β bzw. der Abbau dieses Peptids ein Hauptziel therapeutischer Ansätze. Ein solches Eingreifen in den Metabolismus des APP verlangt jedoch zunächst nach einer genaueren Untersuchung der physiologischen Funktion dieses Proteins. Zudem konnten in Säugetieren zwei dem APP hoch-homologe Proteine identifiziert werden, die einer ähnlichen Prozessierung unterliegen. Die physiologische Bedeutung des APP kann deshalb nicht ungeachtet der Funktion der gesamten APP-Familie betrachtet werden.

1.2 Die APP-Genfamilie

APP ist das namensgebende Mitglied einer größeren Genfamilie, welche derzeit in Menschen APP, APLP1 und APLP2 (engl. amyloid precursor like protein) umfasst (Kang J. et al. 1987; Wasco W. et al. 1992; Sprecher C.A. et al. 1993; Wasco W. et al. 1993). Homologe Proteine dieser drei Familienmitglieder wurden in verschiedenen Wirbeltieren identifiziert (Coulson E.J. et al. 2000). Weitere Mitglieder der APP-Familie konnten in *Drosophila Melanogaster* (APPL) und in *Caenorhabditis elegans* (APL-1) charakterisiert werden (Rosen D.R. et al. 1989; Daigle I. and Li C. 1993).

1.2.1 Struktur der APP/APLP-Proteine

Die Mitglieder der APP-Familie sind integrale Membranproteine mit einer großen extrazellulären Domäne, einer singulären Transmembrandomäne und einem relativ kurzen zytoplasmatischen Bereich. (siehe Abb 1.4).

Die drei Familienmitglieder weisen insgesamt drei hoch konservierte Bereiche (DI und DII im extrazellulären Bereich, DIII im zytoplasmatischen C-Terminus) auf, welche 40-70% homolog sind. Im zytoplasmatischen Bereich aller APP-Familienmitglieder, innerhalb der Domäne DIII, ist eine G₀- und eine PAT-1-Bindestelle sowie das sogenannte YENPTY-Bindemotiv lokalisiert, an welches unter anderem Clathrin, Dab-1 und Fe65 binden können (Coulson E.J. et al. 2000). Die extrazellulären Domänen von APP wie auch APLP2 enthalten zwei Heparin-Bindedomänen, je eine Zink- und Kupfer-Bindedomäne, eine Protease-Inhibitor-domäne (engl. Kunitz type protease inhibitor domain, KPI) sowie eine Kollagen-Bindedomäne (siehe Abb1.4). In der extrazellulären Domäne von APLP1 ist die Zink-Bindedomäne und die C-terminal gelegene Heparin-Bindedomäne identifiziert worden (Coulson E.J. et al. 2000). Anhand einer Analyse der Kristallstruktur der N-terminalen Heparin-Bindedomäne von APP konnte eine strukturelle Ähnlichkeit dieses Bereiches mit Cystein-reichen Wachstumsfaktoren wie NGF (engl. nerve growth factor) festgestellt werden (Rossjohn J. et al. 1999). In der extrazellulären Domäne von APP ist zudem ein RERMS-Motiv zu finden, welches einen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum zeigt (Jin L.W. et al. 1994; Ninomiya H. et al. 1994). Das bereits erwähnte A β -Peptid wird von einer Region codiert, die im C-terminalen Bereich der Ektodomäne und teilweise in der Transmembrandomäne liegt. Diese in die Pathologie der Alzheimer Krankheit involvierte Domäne ist in den APLP-Proteinen nicht vorhanden (Reinhard C. et al. 2005).

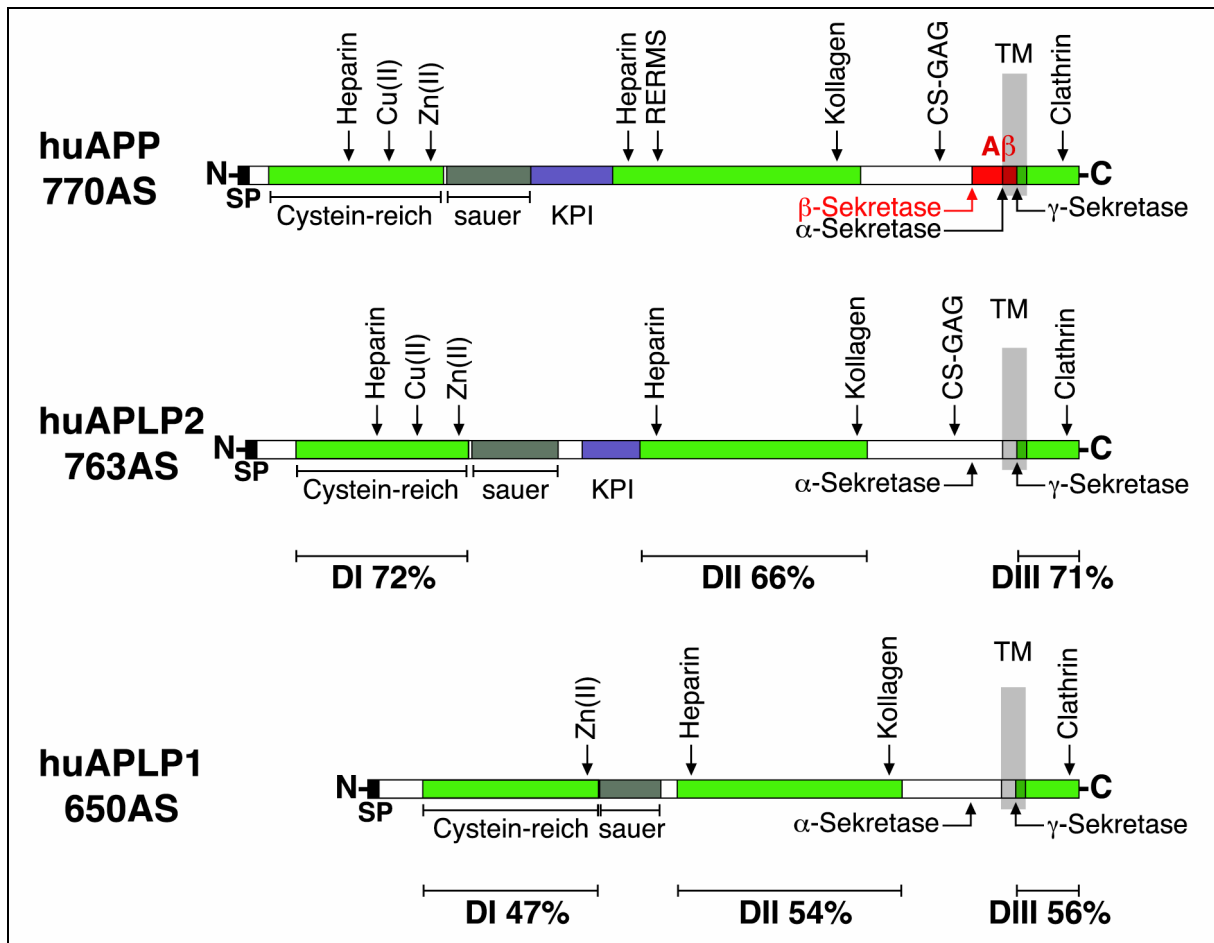


Abb1.4: Die APP-Familie

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der drei humanen (hu) Mitglieder der APP-Familie, wobei für APP und APLP2 die längsten Splicevarianten (APP 770, APLP2 763) abgebildet wurden. In grün sind drei Bereiche (DI bis DIII) mit hoher Homologie gekennzeichnet (die Identität der APLP-Proteine ist für diese Bereiche in Prozent angegeben). Für jedes Protein sind bereits identifizierte Domänen markiert. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: **SP**: Signalpeptid; **Cystein-reich**: Cystein-reiche Domäne; **sauer**: saure Domäne; **KPI**: Kunitz Protease Inhibitor-domäne; **Heparin**: Heparin-Bindestelle; **Cu(II)**: Kupfer-Bindestelle; **Zn(II)**: Zink-Bindestelle; **Kollagen**: Kollagen-Bindestelle; **CS-CAG**: Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan-Bindestelle; **Clathrin**: Clathrin-Bindestelle; **TM**: Transmembrandomäne; **Aβ**: βAmyloid codierender Bereich. Die CS-CAG-Bindestelle ist nur vorhanden, wenn Exon15 in APP bzw. Exon 14 in APLP2 durch alternatives Splicing deletiert sind. Alle Familienmitglieder unterliegen der Sekretierung durch α- und γ-Sekretasen. Wird APP von der β-Sekretase gespalten, so kann das Aβ-Peptid entstehen.

Bei APP und APLP2 konnten mehrere Splicevarianten identifiziert werden, was auf alternatives Splicing von Exon 7, 8 und 15 bei APP bzw. Exon 7 und 14 bei APLP2 zurückzuführen ist. Das Splicing des Exon 15 bei APP bzw. des Exon 14 bei APLP2 führt zur Entstehung einer Bindestelle für Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan (CS-CAG) (Coulson E.J. et al. 2000). Weitere posttranslationale Modifikationen umfassen N- und O-Glykosylierungen, Sulphorylierung und Phosphorylierung (Weidemann A. et al. 1989; Hung A.Y. and Selkoe D.J. 1994; Suzuki T. et al. 1994; Walter J. et al. 1997). Wie bereits unter 1.1.3 beschrieben kann APP durch α-, β- und γ-Sekretasen prozessiert werden. Eine ähnliche α-, β- und γ-Sekretase-vermittelte Prozessierung konnte auch bei den APLP-Proteinen nachgewiesen werden (Paliga K. et al. 1997; Naruse S. et al. 1998; Gu Y. et al. 2001; Eggert S. et al. 2004).

1.2.2 Expression der APP/APLP-Proteine

Die Expression von APP beginnt bei Mäusen bereits ab Embryonaltag E9.5 (Lorent K. et al. 1995). Während embryonaler Stadien kann APP sowohl im Nervensystem wie auch in praktisch allen peripheren Organen nachgewiesen werden. Bis zur Geburt nimmt die APP-Expression kontinuierlich zu. Ab der zweiten postnatalen Woche, einer Periode verstärkter Synaptogenese, findet wiederum ein markanter Anstieg der APP-Expression statt (Moya K.L. et al. 1994). Im adulten Tier bleibt eine ubiquitäre Expression bestehen, wobei diese im Nervensystem, in der Lunge und in der Niere besonders stark ist (Lorent K. et al. 1995). Je nach Gewebe werden unterschiedliche APP-Splicevarianten unterschiedlich stark exprimiert. In Neuronen wird vorwiegend die aus 695 Aminosäuren bestehende Isoform des APP exprimiert, bei der die KPI-Domäne fehlt (Kang J. et al. 1987; Neve R.L. et al. 1988; Tanaka S. et al. 1989; Sarasa M. et al. 2000).

Die Expression des APLP2 ist der Expression des APP ähnlich, mit dem Unterschied, dass in Neuronen in erster Linie die APLP2-Isoformen (APLP2 763 und APLP2 751) exprimiert werden, die eine KPI-Domäne enthalten (Sandbrink R. et al. 1994). APLP1 wird nicht wie die anderen APP-Familienmitglieder ubiquitär exprimiert, sondern fast ausschließlich im Nervensystem (Lorent K. et al. 1995).

1.2.3 Interaktionspartner und Struktur der APP-Familie

Die Struktur der Proteine der APP-Familie impliziert, dass diese als Transmembran-Rezeptoren fungieren könnten. Diese Hypothese wird durch eine ständig wachsende Anzahl von identifizierten Interaktionspartnern für APP/APLPs unterstützt. Die Charakterisierung von Proteinen, welche mit der extrazellulären oder der intrazellulären Domäne der APP/APLPs interagieren, könnte massgeblich zur Aufklärung der physiologischen Funktionen dieser Proteine beitragen.

Bisher ist bekannt, dass die extrazelluläre Domäne von APP mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin, Kollagen, Proteoglykanen und Heparinen interagieren kann (Mattson M.P. 1997). Fibulin-1, ein weiteres extrazelluläres Matrixprotein, interagiert mit dem N-Terminus der extrazellulären Domäne von APP und blockiert auf diese Weise APP-vermittelte mitogene Effekte auf neuronale Stammzellen (Ohsawa I. et al. 2001). Über ihre CAPP-Domäne kann APP auch mit F-Spondin interagieren (siehe S.10).

Eine Interaktion zwischen der Ektodomäne von APP und Hämoxygenase (HO) könnte einen direkten Effekt auf die Pathogenese bei der Alzheimer Krankheit haben. Die Bindung von APP an HO inhibiert die antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung von HO. Bei der Blockierung der HO-Aktivität erwies sich mutiertes humanes APP(FAD) wirkungsvoller als Wildtyp-APP. Somit könnte APP(FAD) die Neurotoxizität durch oxidativen Stress bei der Alzheimer Krankheit fördern (Takahashi Y. et al. 2000).

Die mögliche Funktion der APP/APLPs als Transmembran-Rezeptoren wird durch Untersuchungen mit α -APP Antikörpern unterstützt. Durch Bindung an Membran-gebundenes APP oder APLP2 lösen Antikörper, welche an den N-Terminus der Proteine binden, bestimmte Signale in der Zelle aus, die schließlich den Zelltod induzieren können (Rohn T.T. et al. 2000; Sudo H. et al. 2000; Mbebi C. et al. 2002). Bei dieser Antikörper-aktivierten Zellantwort sind offenbar heterotrimere G_o -Proteine beteiligt (Okamoto T. et al. 1995; Brouillet E. et al. 1999; Mbebi C. et al. 2002). Das GTP-bindende Protein G_o war

überdies das erste Protein, für welches eine Interaktion mit der intrazellulären Domäne von APP beschrieben wurde (Nishimoto I. et al. 1993).

Im Folgenden wurden weitere intrazelluläre Interaktionspartner, welche in Abbildung 1.4 aufgeführt sind, identifiziert. Die meisten dieser Interaktionspartner sind multimodulare Adaptorproteine mit einer Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB), welche an das YENPTY-Bindemotiv in der zytoplasmatischen Domäne der APP/APLP-Proteine binden (De Strooper B. et al. 2000, Reinhard C. et al, 2005).

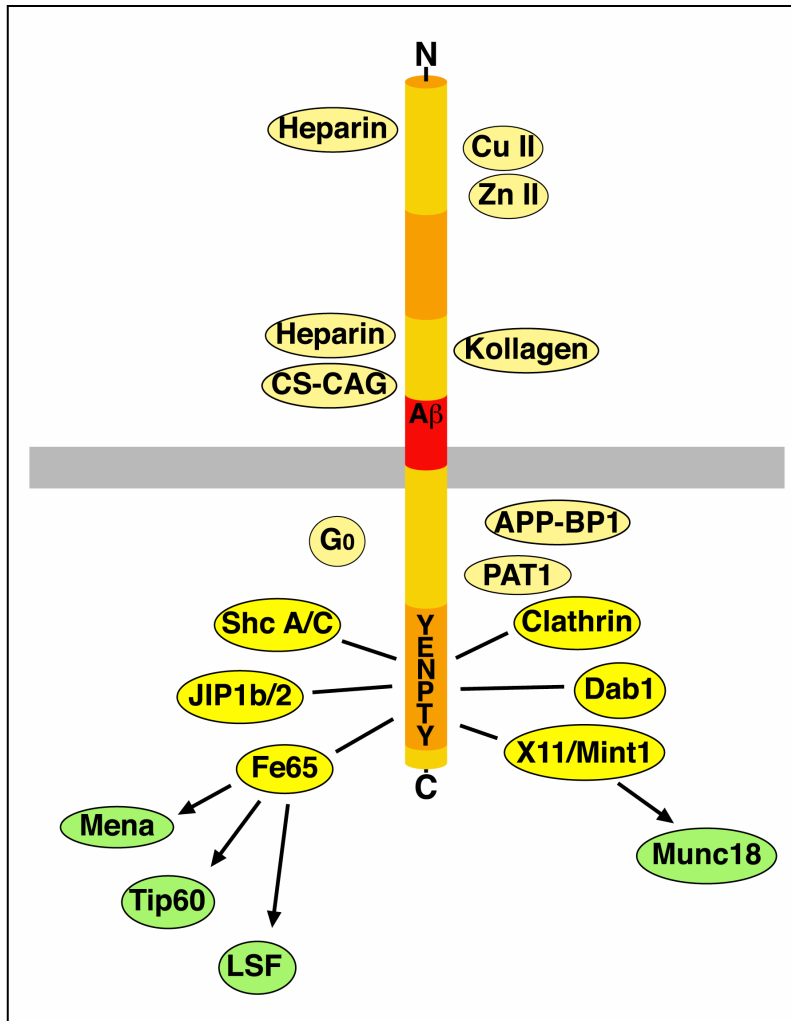


Abb1.5: Interaktionspartner der APP-Familie

Die Abbildung zeigt bisher identifizierte Interaktionspartner von APP, deren Interaktion zum Teil auch für die APLP-Proteine belegt werden konnte. Ein Großteil der intrazellulären Interaktionspartner bindet an die in allen APP-Familienmitgliedern konservierte YENPTY-Domäne. Weitere Interaktionspartner der mit APP bzw. APLP interagierenden Proteine sind angedeutet (grün).

Eine besonders interessante Stellung scheint das Adaptorprotein Fe65 einzunehmen. Dieses zeichnet sich durch drei Protein-Protein-Interaktionsdomänen (zwei PTB-Domänen und eine WW-Domäne) aus und scheint gleich mehrere Funktionen von APP/APLPs zu vermitteln. So könnte Fe65 die APP/APLP-Proteine durch seine Interaktion mit Mena (engl. mammalian enabled), einem Regulator des Aktinarchitektur, mit dem Aktinzytoskelett verknüpfen und auf diesem Weg eventuell eine Aktinreorganisation induzieren. Diese Hypothese wurde kürzlich durch die Beobachtung unterstützt, dass APP, Fe65 und Mena fähig sind, einen ternären Komplex auszubilden (Sabo S.L. et al. 2001). Des Weiteren vermittelt Fe65 eine Interaktion von APP und der Tyrosinkinase Abl, welche APP nachfolgend innerhalb des Bindemotivs an Tyr⁶⁸² (YENPTY) phosphorylieren kann (Zambrano N. et al. 2001). Dadurch ließen sich Interaktionen des YENPTY-Motivs mit anderen Proteinen beeinflussen. Schließlich besteht die Möglichkeit, dass Fe65 durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (z.B. CP2/LSF/LBP1) die Genregulation beeinflussen kann (Zambrano N. et al. 1998).

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre unterstützen einen APP-vermittelten Mechanismus zur Genregulation, der stark an den Notch-Mechanismus erinnert (Cao X. and Südhof T.C. 2001). Notch wird wie APP durch eine Presenilin-abhängige γ -Sekretase-Aktivität gespalten, wobei das zytoplasmatische Fragment (engl. Notch intracellular domain, NICD) in den Zellkern transloziert und die Transkription verschiedener Gene aktiviert (Chan Y.M. and Jan Y.N. 1999). Die Untersuchungen von Cao and Südhof (2001) zeigten, dass die durch γ -Sekretase freigesetzte intrazelluläre Domäne von APP (engl. APP intracellular domain, AICD) und Fe65 einen Komplex bilden. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit der Histon-Acetyltransferase Tip60. Dieser trimere Komplex führte schließlich in Abhängigkeit einer heterologen Gal4-DNA-Bindedomäne (eingesetzt wurde ein APP-Gal4- oder ein Gal4-Tip60-Fusionsprotein) zur Transkription Gal4-abhängiger Reportergene. Nachfolgende Studien belegten, dass die zytoplasmatische Domäne von APP (AICD) tatsächlich im Zellkern von primären Neuronen nachgewiesen werden kann, was die Hypothese von Cao und Südhof entscheidend unterstützt (Cupers P. et al. 2001; Kimberly W.T. et al. 2001).

Weitere Proteine, die eine Interaktion mit dem YENPTY-Bindemotiv der APP/APLPs eingehen können, sind mDab1 (engl. mammalian homologue of Disabled) X11/Mint-1 (engl. Munc18-interacting protein 1) (De Strooper B. et al. 2000). X11 kann mit APP und Alcadin einen Komplex bilden, der APP stabilisiert und die Bildung des β -Amyloid verringert (Araki et al., 2004) Diese Interaktionen könnten einen APP/APLP-vermittelten Effekt auf die Exozytose beziehungsweise die Zellmigration ermöglichen. In jüngster Zeit wurde die Interaktion weiterer Proteine mit diesem Bindemotiv beschrieben. Die Bindung von JIP1b (c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein 1b) und JIP2 an APP könnte durch Aktivierung der JNK-Kaskade die Phosphorylierung von APP regulieren oder aber durch Interaktion mit Kinesin den intrazellulären Transport beeinflussen (Matsuda S. et al. 2001; Taru H. et al. 2002a). Unabhängig von der JNK-Kaskade kann JIP1b zudem den Metabolismus von APP modifizieren, so dass die Prozessierung von APP reduziert wird (Taru H. et al. 2002b). Schließlich lässt die Interaktion zwischen dem phosphorylierten APP (pYENPTY) und den zytoplasmatischen Adaptorproteinen Shc A und Shc C vermuten, dass APP Tyrosinkinase-abhängige Signalkaskaden modulieren kann. Dadurch könnte APP einen Einfluss auf die Proliferation oder auf das Überleben von Zellen ausüben (Tarr P.E. et al. 2002).

Weitere Interaktionen (unabhängig vom YENPTY-Bindemotiv) bestehen mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein PAT1 (engl. protein interacting with the APP tail 1) und dem APP-BP1 (engl. amyloid precursor protein-binding protein 1). Dies könnte auf eine Funktion beim basolateralen Transport beziehungsweise bei der Kontrolle des Zellzyklus hindeuten (Chen Y. et al. 2000; De Strooper B. et al. 2000).

Die extrazelluläre Domäne von APP kann über ihre CAPP-Domäne mit F-Spondin interagieren. F-Spondin ist ein sekretiertes Protein, das in Neuronen gebildet wird und Zell-Zell-Interaktionen reguliert. Die Bindung dieses Proteins an APP inhibiert die β -Sekretierung und somit die Entstehung des β -Amyloid-Proteins (Ho A. and Südhof T.C., 2004). Aufgrund der hohen Homologie der CAPP-Domäne innerhalb der APP-Familie ist anzunehmen, dass F-Spondin auch mit APLP1 und APLP2 interagieren kann.

Die Mitglieder der APP-Familie können zudem miteinander interagieren. Über die innerhalb der APP-Familie hoch konservierte Domäne DII (siehe Abb. 1.4) kann APP antiparallele Dimere bilden, woraus eine stärkere Bindungsaffinität für Heparin resultiert. An dieser Dimerisierung nehmen zwei Aminosäurereste des RERMS-Motivs teil, wodurch dessen

wachstumsfördernde Wirkung inhibiert wird. Ob endogenes APP in erster Linie jedoch als Dimer oder Monomer vorliegt, wird derzeit noch diskutiert (Scheuermann S. et al. 2001; Gralle M. et al. 2002; Bothelo M.G. et al. 2003; Wang Y. and Ha Y. 2004; Reinhard C. et al. 2005). Auch konnte *in vivo* gezeigt werden, dass APP bereits im ER dimerisieren kann und so über Disulfidbrücken verbundenes APP die Bildung von A β reduziert (Scheuermann S. et al. 2001). Neben der Bildung von APP-Homooligomeren sind auch die APLP-Proteine in der Lage, derartige Homooligomere zu bilden. Zudem scheinen die APP-Familienmitglieder auch in der Lage zu sein, untereinander zu dimerisieren. Diese Bildung von Homo- und Heterooligomeren wird im Gegensatz zur oben beschriebenen Dimerisierung von APP jedoch hauptsächlich über die DI-Domänen vollzogen (Soba P. et al. 2005). Die Möglichkeit zur Bildung verschiedener Komplexe unter Verwendung aller APP-Familienmitglieder scheint erste Erklärungen für die hohe Anzahl an beobachteten APP/APLP-Funktionen zu liefern (Reinhard C. et al. 2005).

Trotz dieser wachsenden Anzahl an Interaktionspartnern der APP-Familie und den umfangreichen Untersuchungen zur Funktion von APP (siehe 1.2.3) bleibt die physiologische Funktion von APP *in vivo* immer noch weitgehend ungeklärt.

1.2.4 Physiologische Funktionen der APP-Familie

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Rolle des APP bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit. Über die Funktion, die APP und seiner Homologen APLP1 und APLP2 im gesunden Organismus übernehmen, wurde hingegen bisher nur wenig geforscht. Erste Untersuchungen liefern Indizien für eine mögliche Beteiligung von APP bei verschiedenen Zellprozessen. Beispielsweise wurde eine Rolle des APP bei der Zelladhäsion, beim Wachstum von Neuriten, bei der Bildung und Aufrechterhaltung synaptischer Strukturen, bei der Hyperpolarisierung von Neuronen und bei Lern- und Gedächtnisprozessen gezeigt. Aufgrund von Struktur- und Bindungsanalysen gibt es Hinweise, die für eine Funktion des APP als extrazellulärer Proteaseinhibitor, als Wachstumsfaktor bei neuronalen Zellen und als neuroprotektiver, an der Calcium(II)-Homöostase beteiligter Faktor sprechen (zur Übersicht siehe: Mattson M.P. 1997; De Strooper B. et al. 2000). Neueste Untersuchungen zeigen zudem, dass die sekretierte Form des APP (sAPP) die Proliferation von neuronalen Stammzellen in der Subventrikularzone des adulten Gehirns anregen kann (Caille I. et al. 2004). Auch scheint APP die Kupfer(II)-Homöostase zu beeinflussen (Multhaup G. et al. 1996; White A.R. et al. 1999a; White A.R. et al. 1999b; White A.R. et al. 2002). Im Gegensatz zu den antiapoptotischen bzw. neuroprotektiven APP-Funktionen konnte jedoch auch eine proapoptotische Wirkung beobachtet werden, welche nicht auf die Bildung von A β zurückzuführen war. In einem solchen Versuch konnte durch die Bindung eines Antikörpers an die Cystein-reiche Domäne im extrazellulären N-Terminus neuronaler Zelltod ausgelöst werden (Rohn T.T. et al. 2000; Sudo H. et al. 2000; Mbebi C. et al. 2002). Ein vergleichbar neurotoxischer Effekt ließ sich auch anhand der Bindung von Kupfer(II) an die Kupfer-Bindedomäne und anschließender Reduktion zu Kupfer(I) erzielen (White A.R. et al. 1999a; White A.R. et al. 2002).

Ob APP mit Kinesin-1 interagieren kann und als Kinesin-abhängiger Rezeptor von Vesikeln fungiert, ist gegenwärtig umstritten (Kamal A. et al. 2000, Lazarov O. et al., 2005). Möglicherweise beeinflusst APP den Kinesin-1-vermittelten axonalen Transport bestimmter Proteine wie BACE, Presenili1, GAP43, Synapsin-1 und TrkA (Gunawardena S. and

Goldstein L.S.B. 2001; Kamal A. et al. 2001; Müller U. and Kins S. 2002). Über eine Funktion des APP außerhalb des Nervensystems ist bisher nur wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass sekretiertes APP (sAPP) die Proliferation und Migration von Thyroidzellen und Keratinozyten fördert (Schmitz A. et al. 2002, Siemes et al., 2006). Dieser Effekt des sAPP auf Keratinozyten deutet auf eine Beschleunigung der Wundheilung hin. Unterstützt wird diese These durch Versuche, die zeigen, dass die Zellmigration und die Wundheilung von MDCK-Zellen (engl. Madine-Darby canine kidney) durch APP moduliert wird (Sabo S.L. et al. 2001).

Die oben beschriebenen Beobachtungen beziehen sich in erster Linie auf die Funktion des APP. Aufgrund der hohen Homologie, der ähnlichen Expressionsprofile und zum Teil identischer Bindedomänen (siehe 1.2.1) ist jedoch davon auszugehen, dass die beiden APLP-Proteine zumindest teilweise APP identische Funktionen übernehmen können. So konnte für APLP2 gezeigt werden, dass dieses Protein wie APP einen Effekt auf die Zelladhäsion hat und auch die Kupfer(II)-Homöostase beeinflusst (Li Z.W. et al. 1999; Coulson E.J. et al. 2000). Zudem fördert APLP2 in vitro die Migration von CHO-Zellen (engl. chinese hamster ovary) auf Fibronectin- oder Typ-IV-Kollagen-Substrat (Li Z.W. et al. 1999). Diese Beobachtungen lassen eine Stimulation der epithelialen Wundheilung auch durch APLP2 vermuten. Untermuert wird diese Annahme durch Expressionsanalysen, welche zeigen, dass APLP2 während der Wundheilung stärker exprimiert wird (Guo J. et al. 1998). APLP2 scheint wie APP auch eine Rolle beim Wachstum von Neuriten zu spielen. In vitro-Experimente zeigen, dass rekombinantes, substratgebundenes sAPLP2 wie sAPP die Anzahl und die Länge von Neuriten erhöht (Cappai R. et al. 1999). Ein weiterer Effekt, den APP und APLP2 gemeinsam haben, ist die apoptotische Wirkung anhand der Bindung eines Antikörpers im Cystein-reichen C-Terminus (Mbebi C. et al. 2002).

Zum besseren Verständnis der physiologischen Funktion der APP-Familie im lebenden Organismus wurden mehrere Mauslinien erzeugt, die für eines oder mehrere Familienmitglieder defizient waren. Die erste Linie (APP^{ΔΔ}) zeigte lediglich eine minimale Restexpression des APP (~5% der endogenen Expression) eines leicht verkürzten APP-Proteins (APP^Δ) (Müller U. et al. 1994). Trotz der Restexpression von APP^Δ war der Phänotyp dieser Mäuse nicht von jenem der nachfolgend erzeugten APP-Nullmutanten zu unterscheiden (Zheng H. et al. 1995; Li Z.W. et al. 1996). Der Phänotyp der APP^{-/-}-Mäuse umfasst eine Reduktion des Körpergewichts um 15-20%, eine Reduktion der Muskelzugkraft und der lokomotorischen Aktivität (Müller U. et al. 1994; Zheng H. et al. 1995; Li Z.W. et al. 1996). Zusätzlich zeigte die APP^{ΔΔ}-Mauslinie ein vermindertes Erkundungsverhalten, ein verschlechtertes räumliches Lernvermögen und eine zeitlich verzögerte postnatale sensomotorische Entwicklung (Müller U. et al. 1994; Tremml P. et al. 1998). APP^{ΔΔ}- und APP^{-/-}-Mäuse zeigten zudem eine Hypersensitivität gegenüber Kainat-induzierten Krämpfen (Steinbach J.P. et al. 1998). Bei beiden Mauslinien konnte eine Agenesie des Corpus callosum, welche jedoch nur in Kombination mit einem reinen 129SvEv genetischen Hintergrund auftrat, beobachtet werden (Magara F. et al. 1999). Unabhängig vom genetischen Hintergrund konnte aber eine Reduktion der Größe von Kommissuren im Vorderhirn und eine Reduktion des Gehirngewichtes um 10% beobachtet werden (Magara F. et al. 1999).

Trotz dieser vielseitigen Effekte fiel der Phänotyp der APP^{-/-}-Mäuse geringer aus, als es aufgrund vorangegangener Studien zur Funktion des APP zu erwarten war. Die Ursache für den relativ milden Phänotyp ist auf eine Komplementation des APP-Verlustes durch die APLP-Proteine zurückzuführen (von Koch C.S. et al. 1997; Heber S. et al. 2000). Diese These wurde untermuert anhand der Generierung von APLP1^{-/-}-Mäusen bzw. von APLP2^{-/-}-

Mäusen. Wie bei den APP^{-/-}-Mäusen zeigten diese Einzelknockout-Mäuse keinen oder nur einen geringen Phänotyp. Die anschließende Generierung von Doppelknockout-Mäusen der APP-Familie offenbarte jedoch, dass zwei der möglichen Kombinationen einen postnatal lethalen Phänotyp zeigten. APP/APLP2- und APLP1/APLP2-Doppelknockout-Mäuse wurden zwar in der zu erwartenden Häufigkeit geboren, verstarben aber kurz nach der Geburt (von Koch C.S. et al. 1997; Heber S. et al. 2000). Hingegen zeigten die APLP1/APP-Doppelknockout-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp. Dieses Ergebnis lässt auf eine Schlüsselrolle des APLP2 innerhalb der APP-Familie schließen, da lediglich das Vorhandensein von APLP2 in Abwesenheit der anderen APP-Familienmitglieder (APP^{+/+}; APLP1^{+/+}) ausreicht um lebensfähigen Nachwuchs zu erhalten (Heber S. et al. 2000). Durch detaillierte anatomische und morphologische Untersuchungen konnten bislang keinerlei Anomalien im Gehirn nachgewiesen werden, so dass die Ursache der postnatalen Letalität gegenwärtig ungeklärt bleibt (Heber S. et al. 2000). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die APP/APLP2-Doppelknockout-Mäuse Anomalien der neuromuskulären Endplatte aufweisen. Die beobachtete Verminderung an postsynaptischen Vesikeln und die erhöhte Verzweigung der Dendriten belegen eine physiologische Rolle von APP und APLP2 bei der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte (Wang P. et al., 2005).

Die Generierung von Knockout-Mäusen, denen alle drei APP-Familienmitglieder fehlen, führte ebenfalls zu einem postnatal lethalen Phänotyp. Anatomische Untersuchungen des Gehirns dieser Mäuse zeigten, dass in 81% der Tiere craniale Abnormitäten auftraten. In 68% der Embryonen ließen sich cortikale Dysplasien beobachten, bei denen ektope Neuronen die basale Lamina durchwandert hatten. Auch war in den Triple-Knockout-Mäusen während des Embryonalstadiums E18.5 eine verminderte Anzahl an Cajal Retzius-Zellen zu beobachten, was indiziert, dass die Proteine der APP-Familie eine wichtige Rolle beim Überleben von Cajal Retzius-Zellen und bei der neuronalen Zell-Adhäsion spielen (Herms J. et al. 2004). Zusammengefasst zeigen die Versuche mit Knockout-Mäusen, dass die APP-Familie essentiell für eine normale Entwicklung des Gehirns und das Überleben von Neugeborenen ist.

Wenngleich viele der bisherigen Analysen und insbesondere die Versuche mit den defizienten Mauslinien für physiologische Funktionen der APP-Familie sprechen, die von allen Mitgliedern redundant übernommen werden können, deuten einige Ergebnisse auch auf Funktionen hin, die nur von einem, nicht aber von den übrigen APP-Familienmitgliedern erfüllt werden können. Gestützt wird diese These durch die zum Teil hoch heterologen Proteinbereiche innerhalb der APP-Familie (siehe 1.2.1). Insbesondere APLP1, über dessen Funktion bisher kaum Daten vorliegen, scheint innerhalb der APP-Familie eine besondere Rolle einzunehmen.

1.3 APLP1

APLP1 ist das einzige APP-Familienmitglied, von dem es nur eine Splicevariante gibt. Während APP und APLP2 über unterschiedlich lange Isoformen verfügen, denen zum Teil ganze funktionelle Domänen fehlen, codiert das humane APLP1-Gen nur für ein einziges 650AS großes APLP1-Protein. (Paliga K. et al. 1997; Lenkkeri U. et al. 1998; Strausberg R.L. et al. 2002). Zur Untersuchung der physiologischen Funktion dieses Proteins liegen zur Zeit kaum Ergebnisse vor. APLP1 lagert sich in der Membran von Postsynapsen ein, was eine Involvierung in die Synaptogenese und die Entwicklung synaptischer Strukturen impliziert

(Kim T.W. et al. 1995). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch Retinsäure (engl. *retinoic acid*, RA) zur Neuritogenese angeregte SH-SY5Y die Expression von APP und APLP2 erhöhen und das Spliceverhalten des APP-Proteins zur 695AS-großen Isoform hin verschieben. Eine weitere Besonderheit des APLP1 ist die Tatsache, dass im Unterschied zur Expression von APP und APLP2 die APLP1-Expression durch Curcumin verringert werden kann. Die Expression des APLP1 unterliegt somit einem eigenen Regulationsmechanismus der unabhängig von APP und APLP2 ist (Adlerz L. et al. 2003).

Auffällig ist, dass dem APLP1-Protein die in den beiden anderen Familienmitgliedern vorhandene KPI-Domäne fehlt (siehe Abb1.6) Wie für APP und APLP2 konnte auch innerhalb der extrazellulären Domäne des APLP1 eine Zink(II)-, eine Heparin- und eine Kollagen-Bindedomäne identifiziert werden. Andere in der APP-Familie hoch konservierte Domänen wie das RERMS-Motiv, die CS-GAG-Domäne, die zweite N-terminal gelegene Heparin-Bindestelle und eine funktionelle Kupferdomäne sind jedoch beim APLP1-Protein nicht vorhanden (siehe Abb1.6) (Coulson E.J. et al. 2000). Aufgrund von Homologievergleichen der primären Aminosäuresequenz scheint APLP1 zwar in der Lage, Kupfer(II) zu binden, eine Reduktion des gebundenen Kupfer(II) zu Kupfer(I) konnte jedoch bei APLP1 nicht nachgewiesen werden (Multhaup G. et al. 1996).

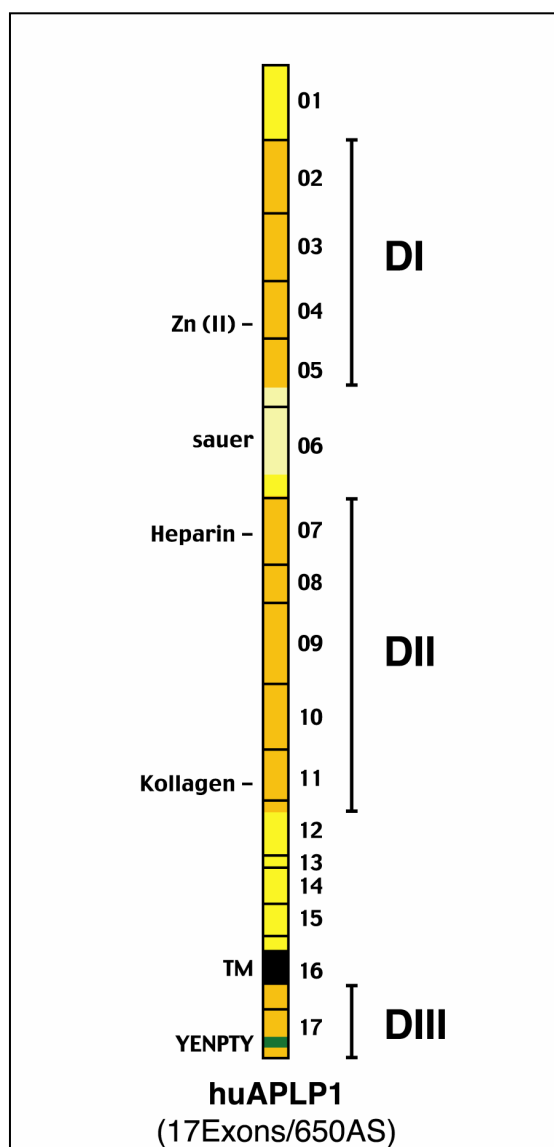


Abb1.6: Schematische Darstellung des humanen APLP1.

Die Abbildung zeigt das humane APLP1 und die Lage bereits identifizierter Domänen. Die innerhalb der APP-Familie hoch konservierten Domänen (**DI** bis **DIII**) besitzen zum Teil den APP- und APLP2-Proteinen analoge Bindestellen für Zink, Kollagen und Heparin. Eine zweite N-terminal gelegene Heparin-Bindestelle fehlt dem APLP1. Auch sind eine KPI-Domäne, eine funktionelle Kupfer-Bindestelle und eine CS-GAG-Domäne nicht vorhanden. C-terminal von DI befindet sich ein Bereich mit vielen sauren Aminosäureresten (sauer), dessen primäre Aminosäuresequenz innerhalb der APP-Familie jedoch stark variiert. Die für viele intrazelluläre Interaktionen nötige YENPTY-Domäne ist jedoch in allen drei Familienmitgliedern identisch.

Wie APP und APLP2 kann auch APLP1 durch die α - und γ -Sekretasen in eine große extrazelluläre Domäne (sAPLP1), einen membranständigen Teil und eine kurze intrazelluläre Domäne zerlegt werden (Elser W.P. and Wolfe M.S. 2001). Der intrazelluläre C-Terminus zeigt weitestgehend ähnliche Bindungs- und Interaktionseigenschaften wie die C-Termini der anderen APP-Familienmitgliedern (siehe Abb. 1.5) (Scheinfeld M.H. et al. 2002; Walsh D.M. et al. 2003).

Eine Sonderstellung innerhalb der APP-Familie übernimmt APLP1 auch bezüglich seiner Expression, die nicht ubiquitär, sondern fast ausschließlich im Gehirn und insbesondere während der Entwicklung von Nervenzellen zu finden ist. Eine solche räumlich klar begrenzte Expression deutet auf eine Funktion des APLP1 im Gehirn hin (Lorent K. et al. 1995).

Nach der Identifizierung des humanen APP wurde neben den beiden humanen APLP-Proteinen eine Reihe homologer Proteine in anderen Spezies identifiziert. Interessanterweise verfügt nur das Genom von Säugetieren, wie z.B. des Menschen und der Maus, über alle drei Familienmitglieder APP, APLP1 und APLP2. In dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* existiert sogar nur ein APP-homologes Protein (APL-1 bzw. APPL) (Rosen D.R. et al. 1989; Daigle I. et al. 1993).

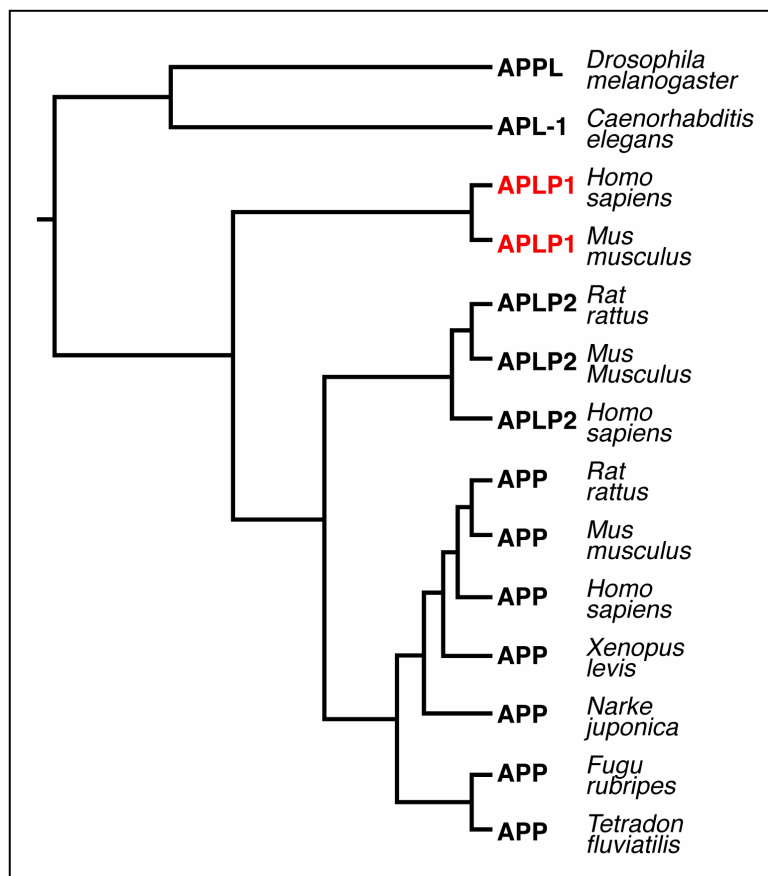


Abb1.7: Phylogenetischer Stammbaum der APP-Familie

Der phylogenetische Stammbaum stellt die anhand der drei konservierten Domänen DI- bis DIII errechneten Verwandtschaftsverhältnisse dar. Die Länge des Weges zwischen zwei Familienmitgliedern repräsentiert ihre evolutive Nähe. Humanes und murines APLP1 sowie das in *C.elegans* und *D.melanogaster* vorkommenden Proteinen APL-1 und APPL entsprechen am ehesten dem Ursprungprotein der APP-Familie (adaptiert nach (Coulson E.J. et al. 2000).

Unterzieht man alle Mitglieder der APP-Familie einer phylogenetischen Analyse aufgrund der drei hoch konservierten Domänen DI bis DIII (siehe ABB1.7), so zeigt sich, dass die murinen und humanen APLP1-Proteine gemeinsam mit dem APPL der Fruchtfliege und dem APLP-1 des Nematoden *C.elegans* evolutiv am höchsten konserviert sind. Das Expressionsverhalten des APPL ist zudem der APLP1-Expression vergleichbar. APLP1 scheint das funktionelle Homolog der Proteine API-1 und APPL und somit des "Ur-APP" zu sein (Coulson E.J. et al. 2000). Aus einem solchen gemeinsamen Vorläuferprotein scheint sich die APP-Familie in Menschen und Mäusen entwickelt zu haben, deren Proteine aufgrund unterschiedlicher Expression und Struktur nun unterschiedliche Aufgaben im Organismus übernehmen können (Oltersorf T. et al. 1989).

Eine Sonderrolle des APLP1 wird auch offensichtlich bei Betrachtung der unterschiedlichen Splicevarianten des APP und APLP2, denen die KPI-Domäne fehlt. So wird z.B. eine aus nur 695AS aufgebaute Splicevariante des APP-Proteins wie APLP1 fast ausschließlich im Gehirn während der Neurogenese und der Differenzierung von Neuronen exprimiert (Coulson E.J. et al. 2000).

APLP1 stellt somit das Protein der APP-Familie dar, dessen Untersuchung am ehesten Einblick in die generellen physiologischen Funktionen der APP-Familie liefern kann.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Um die Alzheimer Krankheit wirksam bekämpfen zu können, müssen Verfahren angewandt werden, die den Metabolismus des APP und seiner Familienmitglieder APLP1 und APLP2 direkt oder indirekt beeinflussen. Bevor jedoch in die Pathogenese der Krankheit eingegriffen werden kann, müssen die Folgen eines solchen therapeutischen Ansatzes auf die physiologischen Funktionen der APP/APLP-Proteine erforscht werden. Die Frage nach diesen natürlichen Funktionen der APP-Familie rückt also immer mehr in den Vordergrund der Alzheimer Forschung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Versuche, bei denen einzelne APP-Familienmitglieder überexprimiert wurden, weitere Einblicke in die physiologische Funktion dieser Proteine liefern. Aufgrund von Veröffentlichungen zur APP/APLP-vermittelten Neuritogenese und dem APP/APLP-Expressionsverhalten wurden hierfür insbesondere neuronale Zelllinien und primäre Kulturen cortikaler Neuronen verwendet. Die je ein Familienmitglied überexprimierenden Zellen sollten auf morphologische Veränderungen untersucht werden, die durch APP-Familienmitglieder hervorgerufen werden. Besonderes Interesse galt hierbei der Identifizierung spezifischer funktioneller Domänen sowie dem Einfluss der komplexen proteolytischen Prozessierung und der Generierung der APP/APLP-Spaltprodukte.

Entsprechende Studien können nicht nur neue Kenntnisse über die Funktion der APP-Familie liefern, sondern auch Anhaltspunkte für Therapieansätze und weitere Untersuchungen liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien (höchster Reinheitsgrad, pro analysis) wurden, sofern im Text nicht anders angegeben, von den Firmen *Amersham Pharmacia Biotech (APB)*, *Biomol*, *Bio-Rad*, *Roche Diagnostics*, *Calbiochem*, *Difco*, *Fluka*, *Hoechst*, *Gibco-BRL*, *Merck*, *New England Biolabs (NEB)*, *Serva*, *Sigma*, *Riedel de Haen*, *Roth* und *USB* bezogen. Spezielle Verbrauchsmaterialien wurden von *APB*, *Becton Dickinson*, *Eppendorf*, *Falcon*, *Costar*, *Greiner*, *Sarstedt* sowie *Schleicher und Schüll* erworben.

2.1.1.1 Enzyme

Restriktionsenzyme	<i>Roche, NEB</i>
T4 DNA-Ligase	<i>Roche</i>
Taq DNA-Polymerase	<i>Gibco-BRL</i>
Vent DNA-Polymerase	<i>NEB</i>

2.1.1.2 Kits

Advantage GC cDNA PCR Kit	<i>Roche</i>
Plasmid Kits (Mini, Midi, Maxi)	<i>Qiagen</i>
DC Protein Assay Kit	<i>Bio Rad</i>
Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit	<i>Stratagene</i>
QIAEX II Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen</i>
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	<i>Pierce</i>
Topo TA Cloning Kit	<i>Invitrogen</i>
Nucleofector Kit	<i>Amaxa</i>

2.1.1.3 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Fibronektin	<i>Roche</i>
Instant-Magermilchpulver	<i>Frema</i>
LipofectAMINE Plus Transfektionsreagenz	<i>Invitrogen</i>
Aquamount	<i>MoBiTec</i>
Poly-Ornithin	<i>Sigma</i>
Protease-Inhibitor Cocktail Complete	<i>Roche</i>
Proteinstandard SeeBlue Plus II	<i>Invitrogen</i>
CO ₂	<i>Messer Griesheim</i>
Flüssigstickstoff	<i>Messer Griesheim</i>
Nitrozellulosemembran (Western Blotting)	<i>Schleicher und Schüll</i>
Photomaterialien	<i>Agfa und Kodak</i>
PhalloidinAlexa488	<i>MoBiTec</i>
DAPI-Lösung	<i>MoBiTec</i>

2.1.1.4. Spezielle Geräte

Applied Biosystems 373 A DNA Sequenzierer	<i>PE Applied Biosystems</i>
Axiophot-Fluoreszenzmikroskop	<i>Zeiss</i>
Blotting Apparatur Hoefer TE 22 Mighty Small	<i>Amersham</i>
Digitales Kamerasystem	<i>Visitron Systems</i>
Entwicklermaschine Kodak X-OMAT 2000	<i>Kodak</i>
Fluorimeter FLUOstar Galaxy	<i>BMG</i>
Geldokumentationssystem Gel Doc 2000	<i>Bio Rad</i>
GeneAmp PCR System 9700	<i>PE Applied Biosystems</i>
PAGE-Gelapparatur Mini-PROTEAN II-System	<i>Bio Rad</i>
Spektralphotometer DU Serie 500	<i>Beckman</i>

2.1.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

6x DNA-Gelladungspuffer:	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA, pH 8,0	50 mM
	SDS	1%
	Glycerin	30%
	Bromphenolblau	0,1 mg/ml
	Xylencyanol FF	0,1 mg/ml
10x Gitschier-Puffer:	Ammoniumsulfat	166 mM
	Tris/HCl, pH 8,8	670 mM
	MgCl ₂	67 mM
	β-Mercaptoethanol	50 mM
	EDTA	67 μM
PBS:	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
20x SSC:	NaCl	3 mM
	Na-Citrat	0,3 mM
50x TAE:	Tris-Base	2 M
	EDTA	50 mM
	Eisessig	17,5% (v/v)
1x TE:	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM

2.1.1.6 Spezielle Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen zur Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Bakterien

T1-Puffer:	MOPS, pH 6,5	10 mM
Lagerung bei -20°C	KCl	100 mM
	MnCl ₂	45 mM
	CaCl ₂	10 mM
	K-Acetat	10 mM
T2-Puffer:	MOPS, pH 6,5	10 mM
Lagerung bei -20°C	KCl	100 mM
	MnCl ₂	45 mM
	CaCl ₂	10 mM
	K-Acetat	10 mM
	Glycerol	10%
Transformationspuffer:	CaCl ₂	100 mM
Lagerung bei 4°C	MgCl ₂	50 mM

2.1.1.7 Puffer und Lösungen zur Plasmidpräparation aus Bakterienzellen (nach Qiagen)

P1:	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA, pH 8,0	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
P2:	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
P3:	K-Acetat, pH 5,5	3 M

2.1.1.8 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blots

4x SDS-Gelladungspuffer:	Tris/HCl, pH 6,8	200 mM
Lagerung bei -20°C	DTT	400 mM
	SDS	8% (w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	Bromphenolblau	0,3% (w/v)
10x Laemmli-Puffer:	Tris	0,25 M
	Glycin	2,0 M
	SDS	1% (w/v)
Lysispuffer:	Tris/HCl pH 6,8	50 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	0,5%
	Complete	1x

Ponceau S-Lösung:	Ponceau S Trichloressigsäure	2% (w/v) 3% (w/v)
Sammelgelpuffer:	Tris/HCl, pH6,8 SDS	0,5 M 0,4%
Trenngelpuffer:	Tris/HCl, pH 8,0 SDS	1,5 M 0,4%
Transferpuffer:	Laemmli-Puffer Methanol	1x 20% (v/v)

2.1.1.9 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenzmikroskopie

Fixierlösung:	Paraformaldehyd PBS, pH 7,4	4% (w/v) 1x
PBST:	BSA Fraktion V Tween 20	5% (w/v) 1%

2.1.1.10 Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen

Ampizilin-Lösung:	Ampizilin sterilfiltriert in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin-Lösung:	Kanamycinsulfat sterilfiltriert in H ₂ O	50 µg/ml
LB-Flüssigmedium:	Bacto-Tryton Bacto-Hefeextrakt NaCl in H ₂ O, pH 7,5 für 20 min bei 121°C autoklaviert	10 g/l 5 g/l 10 g/l
LB-Agar:	Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium für 20 min bei 121°C autoklaviert	20 g/l

2.1.1.11 Nährmedien und Lösungen für eukaryotische Zellkulturen

2.1.1.11.1 Zellkulturlösungen

ZK-PBS:	NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	137 mM 10 mM 3 mM
Standard-Medium: (HEK293T-, HeLa-, COS-, 3T3-Zellen)	DMEM (Dulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium) (GIBCO) ergänzt mit: FCS (fötales Kälberserum L-Glutamin Penizillin Streptomycin	10% (v/v) 2 mM 25 Units/ml 25 µg/ml

PC12-Medium:	DMEM (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium) (<i>GIBCO</i>) ergänzt mit:	
	FCS (fötales Kälberserum)	10% (v/v)
	HS (Pferdeserum)	5% (v/v)
	L-Glutamin	2 mM
	Penizillin	25 Units/ml
	Streptomycin	25 µg/ml
Neuronen-Medium:	Neurobasalmedium (<i>GIBCO</i>)	
	L-Glutamin	2 mM
	Penizillin	25 Units/ml
	Streptomycin	25 µg/ml
	Na-Pyruvat	0,23 mM
	B27	2% (v/v)

2.1.1.11.2 Transfektionsreagenzien

2xBBS:	NaCl	280 mM
	BES	50 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,26 g/l
	pH 6,95	

CaCl₂-Lösung:	CaCl ₂	1M
---------------------------------	-------------------	----

2.1.1.11.3 Inhibitoren und Kontrollsubstanzen

100x TAPI-2	TAPI-2 (<i>Calbiochem</i>)	2mM
100x GM6001	GM6001 (<i>Calbiochem</i>)	250µM
100x c6001	c6001 (<i>Calbiochem</i>)	250µM

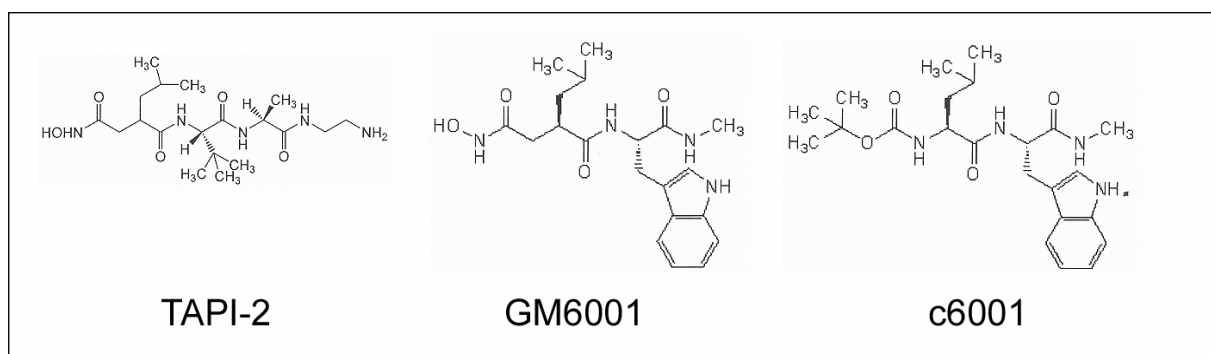


Abb2.1 Inhibitoren und Kontrollsubstanzen

Um den Einfluss der α -Sekretierung auf die Bildung von Filopodien zu untersuchen wurden die Metalloprotease-Inhibitoren **TAPI-2** und **GM6001** eingesetzt, deren Strukturformeln hier aufgezeigt sind. Als Negativkontrolle diente das KLösungsmittel DMSO (im Vergleich zu TAPI-2) und **c6001** (im Vergleich zu GM6001).

2.1.2 Nukleinsäuren

2.1.2.1 Plasmide

Tab2.1: Verwendete eukaryotische Expressionsvektoren

Bezeichnung	Charakteristika	Anwendung	Bezugsquelle
muAPPvsv	7,5kb, Insert cDNA murines APP (695AS), Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)
muAPLP1vsv	7,4kb, Insert cDNA murines APLP1 (653AS), Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)
muAPLP2vsv	7,7kb, Insert cDNA murines APLP2 (763AS), Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)
huAPPmyc	8454bp, Insert cDNA humanes APP (770AS), APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Peter Soba (Ausgangsplasmid pcDNA3.1 Neo, Invitrogen)
huAPLP1myc	7643bp, Insert cDNA humanes APLP1 (650AS), APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Peter Soba (Ausgangsplasmid pcDNA3.1 Neo, Invitrogen)
huAPLP2myc	8443bp, Insert cDNA humanes APLP2 (763AS), APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Peter Soba (Ausgangsplasmid pcDNA3.1 Neo, Invitrogen)
D607vsv	7,2kb, Insert cDNA murines APLP1 bis incl. AS607, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-C-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)

Bezeichnung	Charakteristika	Anwendung	Bezugsquelle
D622vsv	7,3kb, Insert cDNA murines APLP1 bis incl. AS622, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-C-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)
D639vsv	7,4kb, Insert cDNA murines APLP1 bis incl. AS639, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-C-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)
D646vsv	7,4kb, Insert cDNA murines APLP1 bis incl. AS646, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-C-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Brigitte Anliker (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)
APLP1ΔEx01	7496bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon2-17, APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)
APLP1ΔEx02	7358bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon3-17, APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)
APLP1ΔEx03	7226bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon4-17, APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)
APLP1ΔEx04	7111bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon5-17, APP-Signalpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)

Bezeichnung	Charakteristika	Anwendung	Bezugsquelle
APLP1ΔEx05	6977bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon6-17, APP-Siganlpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)
APLP1ΔEx06	6797bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon7-17, APP-Siganlpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)
APLP1ΔEx07	6665bp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon8-17, APP-Siganlpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit deletiertem APLP1-N-Terminus für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc (siehe 2.2.2)
APLP1/2 Ex1-5/Ex6-18 myc	8,4 kbp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon1-5 und cDNA humanes APLP2 Exon6-18, APP-Siganlpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit APLP1/APLP2 Chimärproteinen für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc und huAPLP2myc (siehe 2.2.3)
APLP1/2 Ex1-5/Ex8-18 myc	8,2 kbp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon1-5 und cDNA humanes APLP2 Exon8-18, APP-Siganlpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit APLP1/APLP2 Chimärproteinen für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc und huAPLP2myc (siehe 2.2.3)
APLP1/2 Ex1-6/Ex8-18 myc	8,2 kbp, Insert cDNA humanes APLP1 Exon1-6 und cDNA humanes APLP2 Exon8-18, APP-Siganlpeptid vor myc-Sequenz, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , N-terminaler MYC-TAG	Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte mit APLP1/APLP2 Chimärproteinen für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Ausgangsplasmid huAPLP1myc und huAPLP2myc (siehe 2.2.3)
14-3-3ζvsv	7,3 kbp, Insert murines cDNA 14-3-3ζ, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Kontrollplasmid zur Erzeugung C-terminaler vsv-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Jörg Birkenfeld (Ausgangsplasmid pcDNA3, Invitrogen)

Bezeichnung	Charakteristika	Anwendung	Bezugsquelle
dNTPase6myc	7,3 kbp, Insert cDNA murine dNTPDase6, , Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler MYC-TAG	Kontrollplasmid zur Erzeugung N-terminaler myc-Fusionskonstrukte für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	AG Zimmermann (Ausgangsplasmid pcDNA 3.1, Invitrogen)
peGFP	4.731 bp, Kan ^R , PCMV	Kontrollplasmid für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	Dr. G. O'Sullivan, MPI für Hirnforschung, Frankfurt
pcDNA3.1 Neo	5,3kb, ohne Insert, Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Kontrollplasmid für die Expression und immunzytochemische Untersuchung in eukaryotischen Zellen	pcDNA3.1(+) Neo, Invitrogen
APP-SPmyc	5,5kb, Insert cDNA für APP-Signalpeptid mit 3' gelegnem MYC-Epitop , Amp ^R , PCMV, Neo ^R , C-terminaler VSV-TAG	Ausgangsplasmid zur Erzeugung N-terminal deltierter APLP1-Proteine (siehe 2.2.2)	Peter Soba (Ausgangsplasmid pcDNA3.1 Neo, Invitrogen)

2.1.2.2 Oligonukleotide

Tab2.2: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Anwendung
Delphi APP-start	CGC GGA TCC ATG CTG CCC AGC TTG GCA CT	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit BamHI-Schnittstelle 5' des APP-Startcodons, sense, (verwendet mit : <i>Delphi APPex-as/Delphi APPβ-as</i>)
Delphi APPex-as	TGC TCT AGA TTT GTT CGA ACC CAC ATC TT	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 3' des für die letzte extrazellulär gelegene AS codierenden APP- Codons, antisense (verwendet mit: <i>Delphi APP-start</i>)
Delphi APPβ-as	TGC TCT AGA CAT CTT CAC TTC CGA GAT CT	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 3' des für die letzte AS codierenden APP- Codons vor der β-Sekretase-Schnittstelle, antisense, (verwendet mit: <i>Delphi APP-start</i>)
Delphi APLP1-start	CGC GGA TCC ATG GGG CCC ACC AGC CCC GC	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des APLP1-Startcodons, sense, (verwendet mit: <i>Delphi APLP1ex-as</i>)

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Anwendung
Delphi APLP1ex-as	TGC TCT AGA TCG GGA CAC TCC AGT CCC GG	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 3' des für die letzte extrazellulär gelegene AS codierenden APLP1- Codons, antisense, (verwendet mit : <i>Delphi APLP1-start</i>)
Delphi APLP2-start	CGC GGA TCC ATG GCG GCC ACC GGG ACC GC	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit BamHI-Schnittstelle 5' des APLP2-Startcodons, sense, (verwendet mit: <i>Delphi APLP2ex-as</i>)
Delphi APLP2ex-as	TGC TCT AGA GCT GCT CAA ACT GAA ATC CT	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 3' des für die letzte extrazellulär gelegene AS codierenden APLP2- Codons, antisense, (verwendet mit: <i>Delphi APP-start</i>)
AL019	GAG TCT AGA CCG GGG TCG GCT CAA GTG GC	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon2 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>); (für Plasmid APLP1ΔEx01 siehe 2.1.2.1)
AL020	GAG TCT AGA GAC TTG CGC ACC GGC CGC TG	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon3 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmid APLP1ΔEx02 siehe 2.1.2.1)
AL021	GAG TCT AGA GCA CGC GTG GAG CAG GCT GC	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon4 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmid APLP1ΔEx03 siehe 2.1.2.1)
AL022	GAG TCT AGA CTG CTA GTG CCC GAA GGC TG	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon5 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmid APLP1ΔEx04 siehe 2.1.2.1)
AL023	GAG TCT AGA GCA ACT CCC AAC CCA TCT GG	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon6 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmid APLP1ΔEx05 siehe 2.1.2.1)

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Anwendung
AL024	GAG TCT AGA TTC GTA GAG CCC CCT CAG GC	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon7 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmid APLP1ΔEx06 siehe 2.1.2.1)
AL025	GAG TCT AGA CCT GTC ATG GTT AGC AGA GT	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon8 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmid APLP1ΔEx07 siehe 2.1.2.1)
AL026	GAG TCT AGA AAT GGG CCA TGG CTG ACA GC	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon9 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>)
AL027	GAG TCT AGA GAG ACC CAC GCC ACC AGA GT	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon10 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>)
AL028	GAG TCT AGA CGA CTT CTG ATG GCC CTG AG	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit XbaI-Schnittstelle 5' des ersten Codons von Exon11 (sense), (verwendet mit: <i>AL030</i>)
AL030	GAG GTT TAA ACA GGT CGT TCT TCC AGG AAG C	Oligonukleotid zur Herstellung eines PCR-Fragmentes mit PmeI-Schnittstelle 3' des letzten APLP1-Codons (antisense), (verwendet mit: <i>AL030</i>) (für Plasmide APLP1ΔEx01 bis APLP1ΔEx07 siehe 2.1.2.1)
AL031	CCC AAG CTG GCT AGC GGT TAA ACT TAA GC	Oligonukleotid zur Deletion der 5' der MCS gelegenen PmeI-Schnittstelle der pcDNA3.1 Vektoren, (sense)
AL032	GCT TAA GTT TAA CCG CTA GCC AGC TTG GG	Oligonukleotid zur Deletion der 5' der MCS gelegenen PmeI-Schnittstelle der pcDNA3.1 Vektoren, (antisense)
LP1/LP2 cAPPD-s	CAC TTG CAG TGG TCG GCA AAG TTA ACG TCA CTC CCA CCC CGA GG	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 3' von Exon 6 der APLP1 cDNA; (sense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-6/Ex8-18 siehe 2.1.2.1)

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Anwendung
LP1/LP2 cAPPD-as	CCT CGG GGT GGG AGT GAC GTT AAC TTT GCC GAC CAC TGC AAG TG	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 3' von Exon 6 der APLP1 cDNA; (antisense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-6/Ex8-18 siehe 2.1.2.1)
LP1/LP2 Hpa-s	CCC ATC TGG GAC AGC AGT TAA CGG TGA CCC CTC CAC CCG GTC C	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 3' von Exon 5 der APLP1 cDNA; (sense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-5/Ex8-18 bzw. APLP1/2Ex1-5/Ex6-18 siehe 2.1.2.1)
LP1/LP2 Hpa-as	GGA CCG GGT GGA GGG GTC ACC GTT AAC TGC TGT CCC AGA TGG G	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 3' von Exon 5 der APLP1 cDNA; (antisense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-5/Ex8-18 bzw. APLP1/2Ex1-5/Ex6-18 siehe 2.1.2.1)
LP2/LP1 Hpa-s	CTA TGA TGT TTA TAA AAG TGT TTA ACG AAT TTC CTA CTG AAG CAG A	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 5' von Exon 6 der APLP2 cDNA; (sense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-6/Ex6-18 siehe 2.1.2.1)
LP2/LP1 Hpa-as	CCA GAT CTG CTT CAG TAG GAA ATT CGT TAA CAC TTT TAT AAA CAT	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 5' von Exon 6 der APLP2 cDNA; (antisense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-5/Ex6-18 siehe 2.1.2.1)
LP2/LP1 Hpa-KPI-s	GGC TGG GTG TAA AGC GAT GGT TAA CAT TCC TCC AAC TCC TCT GCC	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 5' von Exon 8 der APLP2 cDNA; (sense); (für Plasmid APLP1/2Ex1-5/Ex8-18 siehe 2.1.2.1)
LP2/LP1 Hpa-KPI-as	GGT TGG CAG AGG AGT TGG AGG AAT GTT AAC CAT CGT TTA CAC AC	Mutagenese-Oligonukleotid zur Erzeugung einer HpaI-Schnittstelle 5' von Exon 8 der APLP2 cDNA; (antisense); (Plasmid APLP1/2Ex1-5/Ex8-18 siehe 2.1.2.1)

2.1.2.3 Weitere Nukleinsäuren

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)
DNA-Längenstandards

Sigma
Eurogentec

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Tab2.3: Verwendete primäre Antikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Anwendung	Bezugsquelle
αAPP	Mouse Anti-Alzheimer Precursor Protein A4, monoklonaler Antikörper	Western 1:1000	<i>Chemicon</i> Cat.No.: MAB348
αAPLP1	Anti- β -Amyloid Precursor-Like Protein 1, C-terminal (AS 643-653), (Rabbit), Anti-APLP1	Western 1:1000	<i>Calbiochem</i> Cat.No.: 171615
αAPLP2	Anti- β -Amyloid Precursor-Like Protein 2, C-terminal (AS 752-763), (Rabbit), Anti-APLP2; AntiCT12	Western 1:2.500	<i>Calbiochem</i> Cat.No.: 171616
αmyc	Anti-Myc tag polyklonal gegen Myc-Epitop (Rabbit)	Western 1:10.000	<i>abcam</i> Cat.No.: ab9106
αmyc	Anti c-myc, monoklonal, Ratte Klon JAC6	Immunfluoreszenz 1:1.000	Serotec Cat.No.: MCA1929
αvsv	Anti-vsv monoklonal, Maus, Klon P5D4	Immunfluoreszenz 1:500	<i>Roche</i> Cat.No.: 1667351
$\alpha\beta$3tubulin	monoklonal Maus, Anti- β 3-tubulin Klon 2G10 (AS 436-450),	Immunfluoreszenz 1:1000	<i>upstate</i> Cat.No.: 05-559

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Tab2.4: Verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Anwendung	Bezugsquelle
αmAlexa488	α Maus IgG mit Alexa Fluor 488 gekoppelt	Immunfluoreszenz 1:500	<i>Molecular Probes</i>
αrAlexa488	α Kaninchen IgG mit Alexa Fluor 488 gekoppelt	Immunfluoreszenz 1:500	<i>Molecular Probes</i>
αmAlexa594	α Maus IgG mit Alexa Fluor 594 gekoppelt	Immunfluoreszenz 1:500	<i>Molecular Probes</i>
αrAlexa594	α Kaninchen IgG mit Alexa Fluor 594 gekoppelt	Immunfluoreszenz 1:500	<i>Molecular Probes</i>
αmHRP	α Maus IgG mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Western 1:10.000	<i>Promega</i>
αrHRP	α Kaninchen IgG mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Western 1:10.000	<i>Promega</i>

2.1.4 Organismen

2.1.4.1 Bakterienstämme

Tab2.5: Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Anwendung	Referenz
DH5α	DH5 α :F ⁻ , endA1, hsdR17 (rk ⁻ ,mk ⁺), suE44 thi-1, rec-, gyrA96, relA1, ϕ 80, lacZ Δ M15	Amplifikation rekombinanter Plasmide	Hanahan, 1983
XL-1 Blue	supE44, hsdR17 hsdR17 (rk ⁻ ,mk ⁺), recA1, lac-F ⁻ , [proAB+, lacI ^q , lacZDM15, Tn10 (Tet ^R)]	Amplifikation rekombinanter Plasmide	<i>Stratagene</i>

2.1.4.2 Eukaryotische Zelllinien

Tab2.6 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung:	Organismus:	Spezifikation/Anwendung
PC12	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	Pheochromocytoma-Zelllinie; <i>ATCC-Nr.: CRL-1721</i> Untersuchung zu APLP1-vermittelten Effekten auf die Induktion von Filopodien
HEK 293T	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	embryonale NierenZelllinie (human embryonic kidney) Derivat der HEK 293 Zelllinie; <i>ATCC-Nr.: CRL-11268</i> Untersuchung zu APLP1-vermittelten Effekten auf die Induktion von Filopodien
COS	<i>Cercopithecus aethiops</i> (Meerkatze)	NierenZelllinie; <i>ATCC-Nr.: CRL-1651</i> Untersuchung zu APLP1-vermittelten Effekten auf die Induktion von Filopodien
3T3	<i>Mus musculus</i> (Maus)	embryonale Fibroblasten-Zelllinie; <i>ATCC-Nr.: CRL-163.2</i> Untersuchung zu APLP1-vermittelten Effekten auf die Induktion von Filopodien
HeLa	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Gebärmutterhals-Zelllinie <i>ATCC-Nr.: CCL-2</i> Untersuchung zu APLP1-vermittelten Effekten auf die Induktion von Filopodien

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Von einer frischen Platte wurde eine Bakterienkolonie in 2 ml LB-Medium überführt und über Nacht unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden anschließend 500µl in 50 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD600 zwischen 0,5 und 0,7 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min auf Eis inkubiert, für 10 min bei 4°C mit 3500 rpm (*Sorvall-Zentrifuge*, GSA-Rotor) sedimentiert und nach Absaugen des Mediums in 20 ml T1-Puffer aufgenommen. Nachdem die Bakterien erneut 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wieder wie oben beschrieben sedimentiert wurden, erfolgte eine Resuspension des erhaltenen Pellets in 4ml T2-Puffer. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Chemisch kompetente Bakterienzellen wurden nach dem Hitzeschock-Verfahren transformiert. Hierzu wurde ein Aliquot mit 100µl chemisch kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10µl Ligationsansatz oder 5ng Plasmid-DNA der Zellsuspension zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Suspension 10min auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock bei 42°C für 60sec ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock, welcher zur Aufnahme der Vektor-DNA in die Bakterienzellen führte, wurden die Bakterienzellen für weitere 5-10min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 700µl LB-Medium wurden die Zellen 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Bakterienzellen auf LB-Agar-Platten mit selektionierendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Plasmidpräparation aus Bakterienzellen (Mini, Midi, Maxi)

Zur Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurden Plasmid-Aufreinigungskits der Firma *Qiagen* verwendet. Das Isolierungsprinzip beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Anionenaustauschchromatographie. Die Plasmidpräparation erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Zu analytischen Zwecken, beispielsweise zur Überprüfung von Insertorientierungen, wurde eine alternative Methode zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA durchgeführt. Bei dieser Isolation schloss sich der alkalischen Lyse eine Isopropanol-Fällung an.

Hierfür wurden 2-5ml einer Übernacht-Bakterienkultur sediirt. Das Zellpellet wurde in 300µl P1 resuspendiert und mit 300µl P2 vermischt, was die alkalische Lyse einleitete. Nach 5min wurde die Lysisreaktion durch die Zugabe von 300µl P3 gestoppt. Anhand einer Zentrifugation bei 13000rpm (*Sorvall Tischzentrifuge*) für 10min wurden die Zelltrümmer inklusive der genomischen DNA pelletiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit 800µl eiskaltem Isopropanol vermischt und anschließend bei 4°C und 13000rpm für 15min zentrifugiert. Die so pelletierte Plasmid-DNA wurde abschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50µl sterilem H₂O gelöst.

2.2.1.4 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion der entsprechenden Probe bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarzglasküvette im Spektralphotometer gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA. Des Weiteren lässt der Quotient $OD_{260/280}$ auf die Reinheit der DNA-Lösung schließen. Beträgt dieser Quotient weniger als 1,8 muss von einer Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen ausgegangen werden.

2.2.1.5 Restriktionsfragmentanalyse

Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurden entsprechend der Angaben des Vertreibers in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. In der Regel wurde für die Klonierung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor je 1 μ g der Vektor- bzw. der zu inserierenden DNA mit 10U Restriktionsenzym während 1-4h bei der vom Vertreiber angegebene Temperatur inkubiert.

2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde nach Standardprotokoll (Ausubel K., 1992) durchgeführt.

2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgtem Restriktionsverdau und der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden diese nach der "Squeeze"-Methode isoliert. Hierfür wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten. Die Agarosestücke wurden in 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, welche zu etwa einem Drittel mit Glaswolle gefüllt und jeweils oben und unten mit einem Loch versehen waren. Das so präparierte Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Mittels Zentrifugation bei 13000rpm für 10min wurde die DNA aus dem Agarosegel durch die Glaswolle in das 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 13000rpm für 15min konnte die DNA nun präzipitiert werden. Nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol und anschließender Lufttrocknung wurde die DNA in sterilem H_2O gelöst.

2.2.1.8 Dephosphorilierung linearisierter DNA-Fragmente

Um eine Religation eines monoenzymatisch geschnittenen Vektors zu verhindern wurde dieser mit "Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP) behandelt, bevor er dem Ligationsansatz zugeführt wurde. Die Alkalisch Phosphatase entfernt dabei das für die Religation erforderliche 5'-Phosphat der Vektor-DNA. Diese Dephosphorilierung erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Verknüpfung von Insert-DNA mit dem 5'-dephosphoriliertem, linearisiertem Vektor im Ligationsansatz.

Zur Dephosphorilierung wurde der entsprechende Restriktionsverdau mit sterilem H_2O auf 45 μ l aufgefüllt, mit 5 μ l 10xDephosphorilierungspuffer und 1U SAP versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase-Reaktion wurde durch Inaktivierung des Enzyms (10min bei 72°C) gestoppt und der Reaktionsansatz mit dem *QIAquick-PCR-Purification Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente wurden je nach Anwendung hitzestabile DNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden nach den Angaben der Hersteller unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.2 oder Text) durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt wurden zur Amplifikation eines definierten DNA-Fragmentes 50-100ng Template-DNA eingesetzt. Nachfolgend sind die einzelnen PCR-Anwendungen und deren Reaktionsparameter aufgeführt.

2.2.1.9.1 Standard PCR zu analytischen Zwecken

Zu analytischen Zwecken, zum Beispiel zur Überprüfung von Insertorientierungen nach einer Klonierung, wurde eine Standard-PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase (*Gibco-BRL*) durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde in Gegenwart von 1xPCR-Puffer (*Gibco-BRL*), 0,2mM dNTPs, 2mM MgCl₂, je 12,5pmol spezifischer Sense- und Antisense-Oligonukleotide sowie 1U Taq-Polymerase in einem Endvolumen von 25µl durchgeführt. Die physikalischen Bedingungen der PCR-Reaktion wurden dabei wie folgt gewählt:

Dauer	Temperatur	Reaktion	Anzahl Zyklen
5 min	94°C	Denaturierung	1
45 sec	94°C	Denaturierung] 35x
45sec	X°C	Hybridisierung	
90 sec	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Elongation	1

Die Hybridisierungstemperatur X errechnet sich aus den Schmelztemperaturen T_m der jeweils verwendeten Oligonukleotide nach folgender Formel:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Die Schmelztemperatur T_m ist gleich der maximalen Hybridisierungstemperatur X.

2.2.1.9.2 PCR zur Subklonierung

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, welche in einem späteren Schritt in einen Vektor subkloniert werden sollten, wurde anstelle der Taq-Polymerase die Vent-Polymerase (*NEB*) verwendet. Diese Vent-Polymerase besitzt eine "Proof-Reading"-Funktion, die den Einbau eines falschen Nukleotids korrigieren kann. Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 50µl und in Gegenwart von 1x PCR-Puffer (*NEB*), 0,3 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 2% Formamid, je 25 pmol Sense- und Antisense-Oligonukleotiden und 1,5 U Vent-Polymerase durchgeführt. Die Polymerase wurde dem Ansatz erst zugegeben nachdem dieser 5 min bei 94°C denaturiert wurde. Die Parameter der nachfolgenden PCR-Reaktion sind angegeben.

Dauer	Temperatur	Reaktion	Anzahl Zyklen
45 sec	X°C	Hybridisierung] 30x
Y sec	72°C	Elongation	
1 min	94°C	Denaturierung	
7 min	72°C	Elongation	1

Die Elongationsdauer Y errechnet sich anhand der Größe L des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes nach der Formel:

$$Y = 1,25 \text{ min} \times L \text{ (kb)}$$

Die Hybridisierungstemperatur errechnet sich wie unter 2.2.1.9.1 beschrieben.

2.2.1.9.3 PCR-Mutagenese

Zur Einführung von Mutationen in eine bestehende Sequenz wurde das "Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit" (*Stratagene*) und die darin enthaltene Pfu-Turbo-Polymerase verwendet. Diese Polymerase besitzt wie die Vent-Polymerase (siehe 2.2.1.9.4) eine "Proof-Reading"-Funktion und verhindert somit den Einbau falscher Nukleotide. Das Kit ermöglicht gezielt eine Insertion, Deletion oder den Austausch einzelner bzw. mehrerer Basen.

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Im Nachfolgenden ist das Prinzip dieser Methode kurz erläutert.

Spezifische komplementäre Sense- und Antisense-Oligonukleotide werden so ausgewählt, dass diese für die einzuführende Mutation kodieren. Eine PCR-Reaktion wird in einem Endvolumen von 50 µl und in Gegenwart von 25ng Plasmid-DNA, 1x PCR-Puffer, je 125ng der Sense- und Antisense-Oligonukleotide, 1 µl dNTPs sowie 2,5 U Pfu-Turbo-Polymerase unter den folgenden PCR-Parametern durchgeführt:

Dauer	Temperatur	Reaktion	Anzahl Zyklen
30 sec	95°C	Denaturierung	1
30 sec	95°C	Denaturierung] 12-18x
1 min	55°C	Hybridisierung	
Z min	68°C	Elongation	

Die Elongationsdauer Z errechnet sich anhand der Größe L des zu amplifizierenden Plasmids:

$$Z = 2 \text{ min} \times L \text{ (kb)}$$

Die Anzahl der Zyklen richtet sich nach der Art der einzuführenden Mutation:

Punktmutation	12 Zyklen
einzelner AS-Austausch	16 Zyklen
Deletion oder Insertion mehrerer AS	18 Zyklen

Nach Ablauf der Reaktion wird dem Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym DpnI zugegeben, und der Ansatz während 1h bei 37°C inkubiert. DpnI verdaut das methylierte und nicht mutierte Ausgangsplasmid. Im letzten Schritt werden 1-4 µl des Verdau in kompetente Bakterienzellen transformiert.

2.2.1.10 Subklonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Reaktionsprodukte wurden mittels des "PCR-Purification Kit" (*Qiagen*) aufgereinigt und mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt, das interessierende Fragment wie unter 2.2.1.7 beschrieben aus dem Gel isoliert und dem Ligationsansatz zugeführt.

Teilweise wurden PCR-Reaktionsprodukte in einem Zwischenschritt in einen "TOPO-Vektor" unter Verwendung des "TOPO Cloning Kit" (*Stratagene*) nach Angaben des Herstellers subkloniert.

2.2.1.11 Ligation von DNA-Doppelsträngen durch T4-Ligase

DNA-Moleküle mit glatten oder komplementären, kohäsiven Enden können durch die Ligation zusammengefügt werden. Die in einer Ligationsreaktion eingesetzten DNA-Fragmente wurden hierfür nach erfolgtem Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach der "Squeeze-Methode" isoliert. Die Ligationsreaktion wurde in 30 µl Ansätzen durchgeführt, wobei die Reaktion in Gegenwart von 1U T4-Ligase in 1x Ligase-Puffer ablief. Das nachfolgende Schema zeigt exemplarisch einen Ligationsansatz:

Komponente	eingesetzte Menge
Vektor-DNA (25 ng/µl)	2µl
Insert-DNA (10 ng/l)	2µl
10x Ligase-Puffer	3µl
T4-Ligase (1U/µl)	1µl
H2O	ad 30µl

2.2.1.12 Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten

Sowohl die Sequenzierreaktion (DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, *PE*) wie auch die automatische Sequenzanalyse (*Applied Biosystems 373 A DNA Sequencer*) wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2 Erzeugung von Plasmiden zur Überexpression N-terminal deletierter APLP1-Proteine

Zur Überexpression von N-terminal deletierten APLP1-Proteinen wurden Vektoren konstruiert die unterschiedlich große Bereiche der APLP1-cDNA enthielten. Hierzu wurde zunächst der Vektor APP-SPmyc (siehe 2.1.2.1) einer Mutagenese unterzogen, durch die die 5' gelegene PmeI-Schnittstelle deltiert, die 3'gelegene PmeI-Schnittstelle jedoch erhalten wurde (Oligonukleotide: AL032/AL031). Der hieraus resultierende Vektor enthielt somit eine über HindIII und XbaI einklonierte Sequenz für das APP-Signalpeptid und ein MYC-Epitop sowie nur noch eine 3' dieser Sequenz gelegene PmeI-Schnittstelle.

Parallel hierzu wurden ausgehend vom Plasmid huAPLP1myc (siehe 2.1.2.1) die zu inserierende Bereiche des APLP1 via PCR amplifiziert und 3' der zu deletierenden Sequenz mit einer XbaI-Schnittstelle versehen (Oligonukleotide AL30 mit AL019-AL025).

Der mutierte APP-SPmyc-Vektor und die PCR-Fragmente wurden im Folgenden einer XbaI/PmeI-Doppelrestriktion unterzogen. Nach Isolierung des restringierten Vektors vom bisherigen Insert wurde dieser mit den restringierten PCR-Fragmenten legiert und wie oben beschrieben in *E.Coli* transformiert und vermehrt. Die gewonnenen Vektoren (APLP1ΔEx01

bis APLP1 Δ Ex07; siehe 2.1.2.1) exprimierten N-terminal MYC-Epitop markierte APLP1-Proteine, denen von einem oder mehreren Exonen codierte Bereiche fehlten.

2.2.3 Erzeugung von Plasmiden zur Überexpression von APLP1/APLP2-Chimären

Um APLP1/APLP2-Chimärproteine zu exprimieren wurden Plasmide generiert, die unterschiedlich große Bereiche der APLP1-cDNA und der APLP2-cDNA enthielten. Hierzu wurden die Plasmide huAPLP1myc und huAPLP2myc (siehe 2.1.2.1) einer Mutagenese-PCR unterzogen, die innerhalb der jeweiligen cDNAs eine HpaI-Schnittstelle generierten. Die Lage der HpaI-Schnittstelle, die für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sowie die Namen der erzeugten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgezeigt.

Tab2.6 Ausgangsplasmide, verwendete Oligonukleotide und Lage der HpaI-Schnittstellen zur Erzeugung von Expressionsvektoren der APLP1/APLP2-Chimärproteine.

erzeugtes Plasmid	Ausgangsplasmide	verwendete Oligonukleotide	Lage der erzeugten HpaI-Schnittstelle
APLP1/2 Ex1-5/Ex6-18 myc	huAPLP1myc	LP1/LP2 Hpa-s/as	3' des letzten für Exon 5 codierenden Triplets der APLP1-cDNA
	huAPLP2myc	LP2/LP1 Hpa-s/as	5' des ersten für Exon 6 codierenden Triplets der APLP2-cDNA
APLP1/2 Ex1-5/Ex8-18 myc	huAPLP1myc	LP1/LP2 Hpa-s/as	3' des letzten für Exon 5 codierenden Triplets der APLP1-cDNA
	huAPLP2myc	LP2/LP1 Hpa-KPI-s/as	5' des ersten für Exon 8 codierenden Triplets der APLP2-cDNA
APLP1/2 Ex1-6/Ex8-18 myc	huAPLP1myc	LP1/LP2 cAPPD-s/as	3' des letzten für Exon 6 codierenden Triplets der APLP1-cDNA
	huAPLP2myc	LP2/LP1 Hpa-KPI-a/as	5' des ersten für Exon 8 codierenden Triplets der APLP2-cDNA

Die nach der Mutagenese-PCR mit einer HpaI-Schnittstelle versehenen Plasmide wurden sodann einer Doppelrestriktion mit den Enzymen HpaI und NheI unterzogen. Sowohl das mutierte huAPLP1myc- als auch das mutierte huAPLP2myc-Plasmid enthielten 5' der MCS eine NheI-Schnittstelle. Nach dem Verdau wurden die Restriktionsfragmente elektrophoretisch getrennt. Das kleinere Restriktionsfragment (Insert) des mutierten APLP1-Plasmids und das größere Restriktionsfragment des mutierten APLP2-Plasmids wurden aus dem Gel eluiert, und miteinander ligiert. Die hieraus resultierenden Plasmide (APLP1/2 Ex1-5/Ex6-18myc, APLP1/2 Ex1-5/8-18myc und APLP1/2 Ex1-6/8-18myc) enthielten somit die für die Exons 1-5 bzw 1-6 codierenden APLP1-cDNAs fusioniert mit der für die Exons 6-18 bzw 8-18 codierenden APLP2-cDNAs.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zellhomogenaten

Transfizierte Zellen wurden mit PBS gewaschen und in Lysispuffer aufgenommen. Zur Extraktion von Proteinen wurden die suspendierten Zellen mittels eines Polytrons homogenisiert und 30 min bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die so behandelten Proben wurden anschließend in einer Tischzentrifuge bei 4°C 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem "Bio-Rad DC Protein Assay Kit" nach Angaben des Herstellers.

2.2.4.3. SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in Polyacrylamidgelen im diskontinuierlichen Gelsystem nach Standardprotokoll {Ausubel K., 1992; Laemmli U.K., 1970}. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Gellösungen für diskontinuierliche PA-Gele:

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Sammelgel-Puffer	1,7ml	-
Trenngelpuffer	-	0,8ml
30% AA/0,8%BisAA	je nach gewünschter Konzentration	0,5ml
H ₂ O	auf 6,6ml auffüllen	2,0ml
10% APS	33µl	33µl
TEMED	3,3µl	3,3µl

Die Proteinextrakte wurden vor dem Auftragen auf das PA-Gel mit SDS-Gelladungspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert. Zur Größenbestimmung wurden 10µl Proteinstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laemmli-Puffer bei 25mA (Minigel, 7x10 cm).

2.2.4.4 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Zur immunologischen Detektion wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine in einer Feuchtblotchkammer mit Transferpuffer gelelektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1mA/cm² Gel für 45-60 min. Nach erfolgtem Transfer konnten die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mittels einer 10-minütigen Inkubation in Ponceau-S-Lösung und anschließender Entfärbung in Wasser nachgewiesen werden. Der Nachweis einzelner spezifischer Proteine erfolgte anschließend durch Inkubation mit entsprechenden Antikörpern. Zunächst wurden dafür unspezifische Bindsstellen durch Inkubation der Membran in 5% Milchpulver in PBS abgesättigt. Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern erfolgte

anschließend über Nacht bei 4°C. Hierfür wurden die Antikörper in 5% Milchpulver in PBST verdünnt (siehe 2.1.3.1). Um die Antigen-Antikörper-Bindung zu verbessern und unspezifische Bindungen zu unterbinden wurde nach der Inkubation wiederholt mit PBST gewaschen (3 x 5min). Sodann folgte ein weiterer Inkubationsschritt mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern. Diese binden spezifisch an eine IgG-Domäne des primären Antikörpers. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper erfolgte in entsprechender Verdünnung in 5% Milchpulver in PBST für eine Dauer von 1h bei Raumtemperatur. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBST erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch eine Meerrettich-Peroxidase-vermittelten Chemilumineszenz Reaktion unter Verwendung des "Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate" (Pierce). Die Detektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Standardmäßig wurde eine interne Ladekontrolle durch Detektion von Tubulin unter der Verwendung eines monoklonalen Antikörpers durchgeführt, um die geladenen Proteinmengen miteinander vergleichen zu können.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Kultivierung von Zelllinien

PC12-, HEK293T-, 3T3-, COS- und HeLa-Zellen wurden in 10ml ihres spezifischen Kulturmediums (siehe 2.1.1.11) in 10cm-Schalen bei 37°C und 5% CO₂/Luftgemisch kultiviert. Zur Passage wurden die adhärenenten, konfluenten Kulturen 1x mit PBS gewaschen und während 4 min mit 2 ml Trypsin-Lösung bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10ml Medium wurde die Trypsinierung gestoppt. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert, durch Trituierung vereinzelt und in entsprechender Verdünnung neu ausplattiert.

Alternativ können Zellen bei -70°C gelagert werden. Hierzu wurde die Zellsuspension für 3min bei 80g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in Kulturmedium, welches mit 10% DMSO versetzt war, resuspendiert und bei -70°C gelagert. Zur Wiederinkulturnahme wurden die Aliquots möglichst schnell aufgetaut, bei 80g zentrifugiert und die Zellen nach Resuspension in Kulturmedium wieder unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert.

2.2.5.2 Erzeugung und Kultivierung kortikaler Neuronenkulturen

Zur Erzeugung primärer Neuronen aus dem Cortex embryonaler Ratten wurden Rattenembryonen im Stadium E14.5 decapiert und die Gehirne präpariert. Nach Entfernen der Hirnhäute wurden die Corticeshälften in PBS bei 4°C gelagert. Zum Vereinzeln der Zellen wurde das PBS entfernt und die Cortices mit Trypsin überschichtet und anschließend 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Cortices 3x mit PBS gewaschen und mit 1ml DMEM+FCS überschichtet. Die Cortices wurden sodann mit einer herkömmlichen Pasteurpipette 15x trituiert und anschließend 5x mit einer modifizierten Pasteurpipette trituiert, deren Auslass auf einen Durchmesser von ca. 0.5ml eingeschmolzen wurde. Nach einer mikroskopischen Analyse, die Aufschluss über die ausreichende Vereinzelnung der Zellen gab, wurden die Zellen ausgezählt und in gewünschter Dichte in DMEM-FCS angezogen. Nach ca. 12h wurde das Medium gegen Neurobasalmedium ausgetauscht. Alle Kultivierungsschritte der Neuronen fanden bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturinkubator statt.

2.2.5.3 Transfektion von Zellkulturen

Je nach Art der transfizierten Zellen und der erwünschten Transfektionseffizienz kamen unterschiedliche Transfektionsmethoden zum Einsatz.

2.2.5.3.1 Transfektion von Zellen durch lipophilisierte DNA

Zur heterologen Expression rekombinanter Proteine wurden die unter 2.2.5.1 beschriebenen Zelllinien mit Plasmid-DNA unter Verwendung des "LipofectAMINE PLUS" Transfektionsreagenz (*Invitrogen*) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die im Ergebnisteil beschriebenen Versuche mit PC12-Zellen wurde die vom Hersteller empfohlene Variante der Serum-freien Transfektion gewählt, bei der sowohl die Komplexierung als auch die Transfektion und anfängliche Kultivierung der PC12-Zellen in Serum-freien Medium stattfindet.

2.2.5.3.2 Elektroporation von Zelllinien und cortikalen Neuronen

PC12-Zellen und embryonale, cortikale Neuronen der Ratte wurden mit der *Nucleofector*TM-Apparatur der Firma *amaxa biosystems* entsprechend den Angaben des Herstellers elektroporiert. PC12-Zellen wurden unter Verwendung der „Cell Line NucleofectorTM Solution V“ transfiziert. Bei den Versuchsreihen mit cortikalen Neuronen kam der „Rat Neuron Nucleofector Kit“ zum Einsatz.

2.2.5.3.3 Transfektion von Zellen mittels CaPO₄

Embryonale, cortikale Neuronen der Ratte wurden in 24-well-Kulturgefäßen in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Well ausgebracht und über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ in DMEM+FCS kultiviert.

Am nächsten Morgen wurden 0,8µg der zu transfizierenden DNA mit 4µl 1M CaCl₂ vermischt und die Lösung auf 10µl mit dest. Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 10µl 2xBBS wurde das Gemisch 10 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 200µl auf 37°C vorgewärmtem Neurobasalmedium überschichtet. Nach Ablauf der 10minütigen Inkubation wurde die DNA-Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Zellen für 4-8h bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert, bevor das Medium gegen frisches Neurobasalmedium ausgetauscht wurde. Die so transfizierten Zellen zeigten nach frühestens 24h nachweisbare Mengen der von den Plasmiden exprimierten Proteine.

2.2.6 Immunzytochemie

Die oben beschriebenen Zelllinien und die embryonalen kortikalen Neuronen der Ratte wurden immunzytochemischen Untersuchungen unterzogen. Hierzu wurden die Zellen in gewünschter Dichte auf beschichteten Deckgläschen angezogen, später fixiert und bestimmte Proteine mit Antikörpern bzw. fluoreszenzmarkierten Zellgiften angefärbt und zuletzt im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.6.1 Beschichtung von Deckgläschen

Fettfreie Deckgläschen wurden in 24-well-Platten unter sterilen Bedingungen ausgebracht. Bei allen Versuchen kamen 2 unterschiedliche Substrate als Beschichtung zum Einsatz.

Fibronektin: 50µg Fibronektin wurden in 1ml gelöst. Die Deckgläschen wurden mit ca. 200µl Fibronektinlösung überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach 45 min wurden die Plättchen 3x mit sterilem dest. Wasser gewaschen und anschließend bis zur Verwendung mit DMEM-Medium überschichtet und im Inkubator gelagert.

poly-Ornithin 150µg poly-Ornithin wurden in 20ml dest. Wasser gelöst. Die Deckgläschen wurden mit ca. 200µl poly-Ornithin-Lösung überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach 12h wurden die Plättchen 3x mit PBS gewaschen und anschließend bis zur Verwendung mit DMEM-Medium überschichtet und im Inkubator gelagert.

2.2.6.2 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Auf beschichteten Deckgläschen kultivierte Zellen wurden 3x mit PBST gewaschen und anschliessend mit 4% PFA in PBST überschichtet. Nach einer Inkubation von 10min bei Raumtemperatur wurde das PFA entfernt und 3x mit PBST gewaschen. Derart behandelte Zellen wurden im Folgenden für Immunzytochemische Analysen eingesetzt.

2.2.6.3 Fluoreszenzmarkierung von Zellstrukturen mit Phalloidin

Das Aktinzytoskelett fixierter Zellen wurden mittels Phalloidin angefärbt, an das der Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 gekoppelt war. Entsprechend den Konzentrationen des Herstellers (*MoBiTec*) wurden die Zellen 1h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x mit PBST gewaschen.

2.2.6.4 Fluoreszenzmarkierung des Zellkerns

Die im Kern enthaltene DNA fixierterer Zellen wurde mittels des Farbstoffes DAPI entsprechend der Konzentration des Herstellers (*MoBiTec*) nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur angefärbt.

2.2.6.5 Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern

Die Markierung bestimmter Proteine erfolgte mittels primärer, spezifischer Antikörper und gegen diese gerichtete, Fluoreszenz-gekoppelter, sekundärer Antikörper. Die primären Antikörper wurden in der jeweiligen Konzentration in PBST/5%BSA verdünnt (siehe 2.1.3.1) und auf die fixierten und permeabilisierten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3x mit PBST gewaschen. Gegen die primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper wurden im Folgenden entsprechend in PBST/5%BSA verdünnt (siehe 2.1.3.2) und die Zellen damit überschichtet. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3x mit PBST gewaschen.

2.2.6.6 Konservierung fixierter und fluoreszenzmarkierter Zellen

Fixierte und fluoreszenzmarkierte Zellen wurden unter Verwendung der „Aquamount“-Lösung (MoBiTech) entsprechend den Angaben des Herstellers konserviert.

3. ERGEBNISSE

Während eine ganze Reihe von Untersuchungen sich mit der physiologischen Funktion des APP beschäftigen (zur Übersicht siehe Mattson M.P. 1997; De Strooper B. and Annaert W. 2000; Reinhard C. et al. 2005), ist über die Prozesse, bei denen APLP1 bzw. APLP2 eine Rolle spielen, kaum etwas bekannt.

Untersuchungen an Mäusen, denen eines oder mehrere APP-Familienmitglieder fehlen, zeigen, dass bei Abwesenheit von APP die beiden Familienmitglieder APLP1 als auch APLP2 die physiologische Funktion des APP-Proteins übernehmen können. Sowohl APLP1 als auch APLP2 sind über das zytosolische Protein Fe65 an der Regulation der Transkription (Scheinfeld M.H. et al. 2002; Walsh D.M. et al. 2003) beteiligt und werden wie APP durch mehrere Sekretasen prozessiert (Eggert S. et al. 2004).

Über eine spezifische physiologische Funktion der Proteine APLP1 oder APLP2 finden sich in der Literatur nur wenige Untersuchungen. Für APLP2 konnte gezeigt werden, dass das Protein einen Einfluss auf die Zellmigration und das Auswachsen sympathischer Neuronen hat (Cappai et al., 1999; Li et al., 1999).

Diese ersten Beobachtungen sowie Homologievergleiche innerhalb der APP-Familie und die zeitlich und räumlich unterschiedlichen Expressionen einzelner Familienmitglieder legen die Frage nach spezifischen Funktionen einzelner Familienmitglieder nahe.

Die folgenden *in vitro*-Versuche befassen sich mit Effekten des APP-Genfamilienmitglieds APLP1 auf die Zellmorphologie von PC12-Zellen und kortikalen Neuronen. Weiterführende Untersuchungen geben Aufschluss über eine APLP1-spezifische Effektoromäne, den Einfluss der α -Sekretierung und erste Hinweise auf mögliche angesteuerte Signalwege.

3.1 Überexpression der APP-Genfamilie in PC12-Zellen

In den folgenden Versuchen sollten mögliche Funktionen der APP-Familienmitglieder auf die Zellmorphologie anhand von transienten Überexpressionen in PC12-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden ca.70% konfluent gewachsene PC12-Zellen entweder elektroporiert oder mittels lipophilisierter DNA transfiziert. Durch die so in die Zellen eingebrachten Plasmide kam es je nach Ansatz in den Zellen zur Expression der folgenden Proteine:

Bezeichnung:	Protein:	Herkunft:	Splicevariante:	Epitop:
huAPP	APP	human	770 Aminosäuren	myc, N-terminal
muAPP	APP	murin	695 Aminosäuren	vsv, C-terminal
huAPLP1	APLP1	human	650 Aminosäuren	myc, N-terminal
muAPLP1	APLP1	murin	650 Aminosäuren	vsv, C-terminal
huAPLP2	APLP2	human	763 Aminosäuren	myc, N-terminal
muAPLP2	APLP2	murin	763 Aminosäuren	vsv, C-terminal

Tab3.1: Verwendete APP/APLP-Konstrukte

Für die folgenden Expressionsstudien wurden sechs Plasmide verwendet, die für verschiedene Mitglieder der APP-Familie codieren. Neben den humanen Proteinen (huAPP, huAPLP1, huAPLP2) wurden drei murine Proteine (muAPP, muAPLP1, muAPLP2) zur Expression gebracht. Zu Detektionszwecken waren die exprimierten Proteine am N-Terminus bzw. C-Terminus mit Epitopen versehen.

Für jedes APP-Familienmitglied kamen zwei unterschiedliche Konstrukte zum Einsatz, die zu Detektionszwecken mit Epitopen fusioniert waren (siehe Tab3.1). Die jeweiligen cDNAs der Familienmitglieder wurden in pcDNA3- bzw. pcDNA3.1-Vektoren inseriert, die aufgrund ihres CMV-Promotors eine starke Überexpression des jeweiligen Proteins garantierten. Drei der verwendeten Vektoren enthielten die für die humanen Proteine huAPP, huAPLP1 bzw. huAPLP2 codierenden cDNAs. Die murinen Formen muAPP, muAPLP1 und muAPLP2 dieser Proteine wurden von drei weiteren Plasmiden zur Expression gebracht. Eine Besonderheit innerhalb der verwendeten Konstrukte ist das Plasmid mit dem murinen APP (muAPP), da es sich bei dem exprimierten Protein um eine kürzere Splicevariante des APP handelt, der die sogenannte KPI-Domäne fehlt. Um einen Einfluss der jeweils verwendeten Epitope zu erfassen, befand sich das myc-Epitope der humanen Konstrukte am N-Terminus, wogegen das vsv-Epitop der murinen Proteine am C-Terminus angebracht war. Als Negativkontrolle wurden in weiteren Versuchen PC12-Zellen mit Vektoren ohne Insert, mit GFP, 14-3-3 ζ bzw. dNTPDase6 transfiziert, um einen Einfluss der Transfektion auf die Zellmorphologie ausschließen zu können. Besonderes Augenmerk galt hierbei der Kontrolle, bei der das Protein dNTPDase6 zur Expression kam. Dieses Protein ist wie die Proteine der APP-Familie mittels einer Transmembrandomäne in die Membran der Zelle eingelagert und besitzt einen kurzen intrazellulären C-Terminus und eine im Vergleich relativ große Ektodomäne. (Braun N. et al., 2000; Ravi R.G. et al., 2002; Braun N. et al., 2004). Anhand dieser Kontrolle konnte somit ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte generell durch die Überexpression eines Membranproteins hervorgerufen werden.

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen weitere 24 bis 48 Stunden kultiviert.

Nach Elektroporation mittels *Nucleofector* (AMAXA) zeigten 50-70% der Zellen eine Expression des verwendeten Konstruktes. Eine deutlich geringere Transfektionseffizienz von 5-10% konnte bei der Lipofektion mit lipofectAMINE (*Invitrogen*) beobachtet werden. Zur Bestimmung der Expressionsstärken wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Durch einen Western-Blot wurden die Proteine auf eine Membran übertragen und anhand spezifischer und gegen die Epitope gerichteter Antikörper nachgewiesen (siehe Abb3.1).

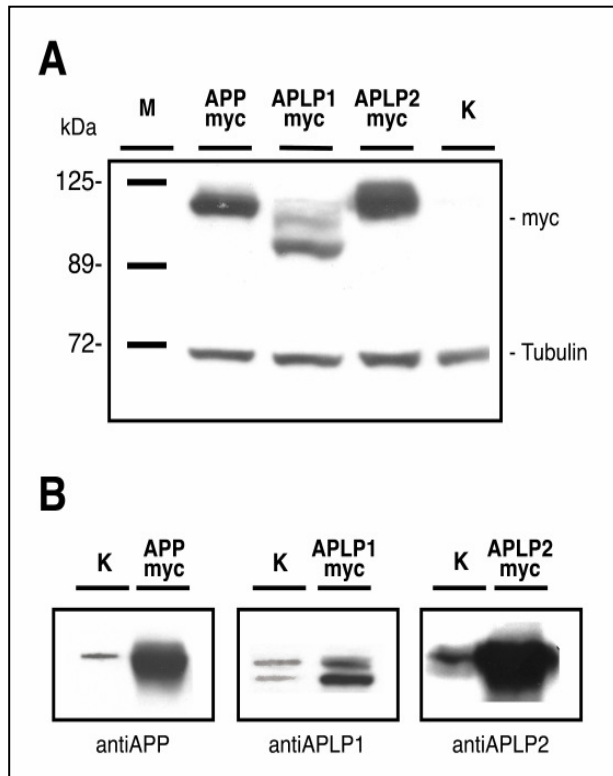


Abb3.1: Überexpression der APP-Familie in PC12-Zellen.

Mittels Elektroporation wurden PC12-Zellen mit **huAPPmyc**, **huAPLP1myc** und **huAPLP2myc** exprimierenden Plasmiden transient transfiziert und 2 Tage kultiviert. Zur Analyse der Expression wurden 60µg Gesamtprotein aus lysierten Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

(A) Unter Verwendung eines gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörpers (AB9106) wurden die Expressionsstärken der Konstrukte erfasst und unter Beachtung der Tubulinmengen miteinander verglichen.

(B) Anhand spezifischer Antikörper **antiAPP** (MAB348), **antiAPLP1** (CT11) und **antiAPLP2** (CT12) wurde die Expressionsstärke der Konstrukte mit kontrolltransfizierten Zellen (K) verglichen, die mit leerem pcDNA3.1-Vektor transfiziert wurden.

Während mit dem myc-spezifischen Antikörper in der Kontrolle kein Signal detektierbar ist, indizieren die für die einzelnen Familienmitglieder spezifischen Antikörper eine geringe endogene Expression aller Familienmitglieder in PC12-Zellen.

Die Western-Blot Analyse in Abb3.1A zeigt anhand der Tubulin-Mengen, dass von den Lysaten aller 4 Ansätze gleiche Mengen Gesamtprotein geladen wurden. Im Gegensatz zur Kontrolltransfektion (K) beinhalten die drei mit APP, APLP1 und APLP2 transfizierten Lysate vergleichbare Mengen eines mit dem myc-Epitop versehenen Proteins. Die Größe der jeweiligen Proteine entsprechen mit ~130kDa für APP, ~85kDa für APLP1 und ~130kDa für APLP2 den für die Proteine der APP-Familienmitglieder zu erwartenden Größen, wobei die Detektion des APLP1 klar zwischen unmodifiziertem (~90kDa) und modifiziertem Protein (~80kDa) unterscheiden ließ. Anhand der Signalintensität konnte eine annähernd gleich starke Expression der APP-Familienmitglieder nach 48h gezeigt werden.

Die Verwendung spezifischer Antikörper in Abb3.1B belegt, dass die transfizierten PC12 - Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine stark erhöhte Expression des jeweiligen Familienmitgliedes aufweisen. Zudem zeigte sich, dass PC12-Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen alle drei APP-Familienmitglieder endogen exprimieren.

3.1.1 Morphologische Veränderungen APLP1-transfizierter PC12-Zellen

In den folgenden Versuchen sollten mögliche Auswirkungen einer transienten Überexpression einzelner APP-Familienmitglieder auf das Wachstum und die Morphologie von PC12-Zellen analysiert werden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transfektion der einzelnen Konstrukte zur Bildung vergleichbarer Mengen an rekombinantem Protein führt (siehe 3.1.1), wurden PC12-Zellen auf Glasplättchen kultiviert, die mit Fibronectin beschichtet waren. Um einen möglichen Einfluss der Beschichtung ausschließen zu können, wurden alternativ auch mit poly-L-Ornithin beschichtete Glasplättchen für die Versuche verwendet. Es zeigte sich, dass die Art der Beschichtung keine Auswirkung auf die im Folgenden beschriebenen Versuche hatte.

Nach erfolgter Transfektion mit murinen und humanen APP-Familienmitgliedern wurden die Zellen 48h kultiviert, mittels 0,1% Tween20 permeabilisiert und anschließend fixiert. Transfizierte Zellen wurden durch vsv- bzw. myc-Epitop-spezifische Erstantikörper detektiert, gegen die ein mit Alexa546 gekoppelter Zweitantikörper gerichtet war. Parallel durchgeführte Färbungen gegen Aktin mit Phalloidin-Alexa488 und gegen den Zellkern mit DAPI gaben Aufschluss über die Struktur des Zytoskeletts und die Vitalität der Zelle. Mögliche apoptotische Zellen mit reduzierter Kerngröße und beschädigte Zellen wurden in den folgenden Analysen nicht berücksichtigt.

Die Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop auf mögliche Morphologieänderungen untersucht. Die folgenden Aufnahmen zeigen PC12-Zellen, in denen sowohl murine als auch humane APP-Familienmitglieder überexprimiert wurden. Um die Lokalisation der in den PC12-Zellen gebildeten rekombinanten Proteine bestimmen zu können, wurden die Präparate zusätzlich in konfokalen Ebenen analysiert. Beim Betrachten einer konfokalen Ebene unterhalb der Zelloberfläche können Bereiche von PC12-Zellen analysiert werden, die die Unterscheidung von Zellmembran und Soma möglich machen. Somit können aufgrund der Signalintensität Rückschlüsse über die Lokalisation des rekombinanten Proteins gezogen werden. Zur Kontrolle dienten in erster Linie dNTPDase6-exprimierende Zellen, da es sich bei diesem Protein wie bei den Proteinen der APP-Familie um ein Polypeptid handelt, welches in die Membran der Zelle eingelagert wird. Anhand weiterer Kontrollen mit GFP bzw. 14-3-3 ζ sollte der generelle Einfluss einer Überexpression auf PC12-Zellen erfasst werden.

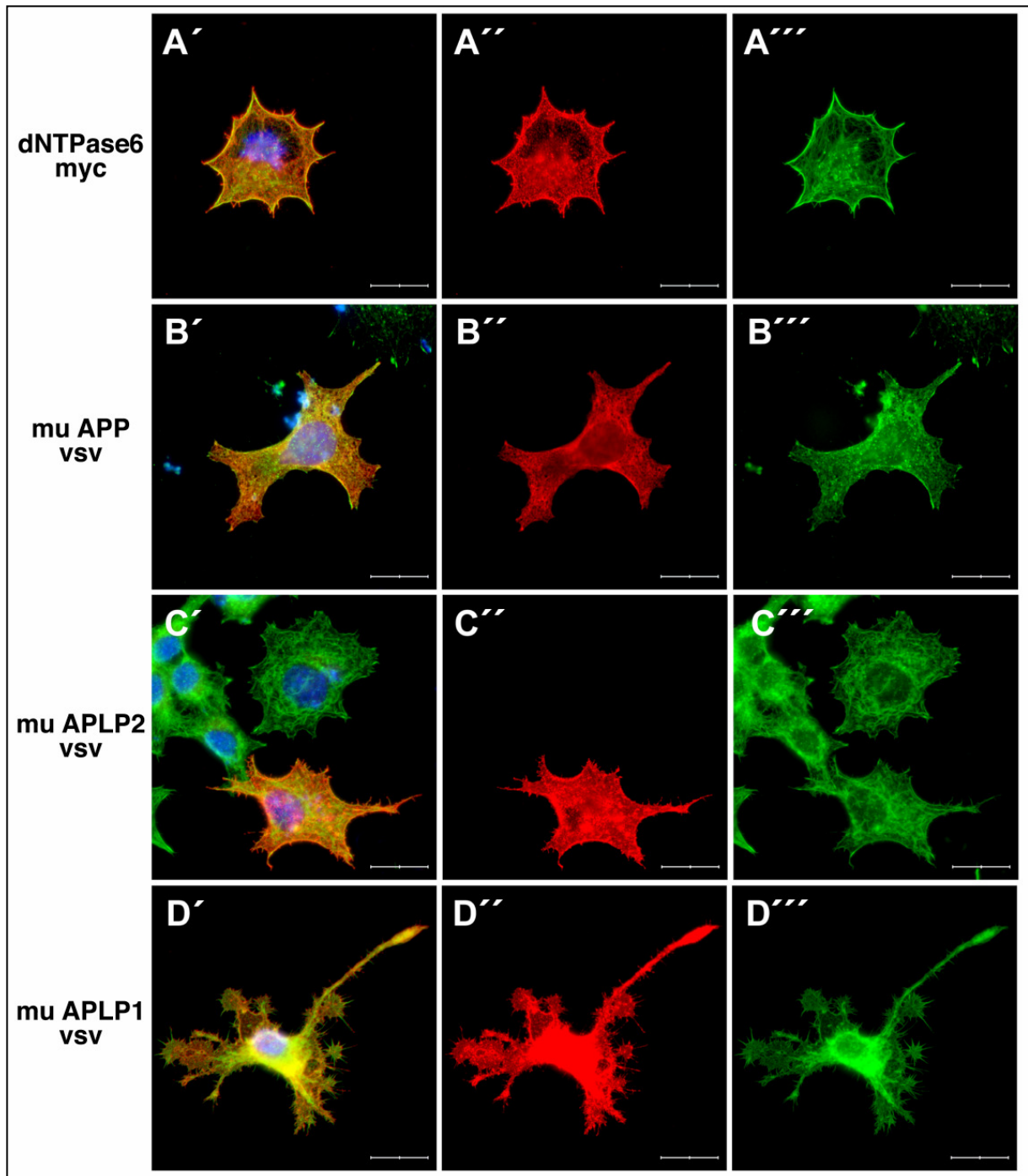


Abb3.2: Transfektion von PC12-Zellen mit Konstrukten der murinen APP-Familie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter PC12-Zellen nach 48h Kultur. Exemplarisch ist je eine der mit dNTPase6myc (**A**), muAPPvsv (**B**), muAPLP2vsv (**C**) bzw. APLP1vsv (**D**) transfizierten Zellen abgebildet. Zur Detektion der Epitope wurden spezifische Erstantikörper gegen das myc- bzw. das vsv-Epitop sowie ein Fluorochrom-Alexa564-konjugierter Zweitantikörper eingesetzt (**A'-D'**). Anhand eines Fluorochrom-Alexa488-konjugierten Phalloidin konnte das Aktin-Zytoskelett visualisiert werden (**A''-D''**). In der Überlagerung der beiden Kanäle ist zusätzlich das blaue Signal des Zellkernfarbstoffes DAPI sichtbar. Die abgebildeten Längenstandards entsprechen 20µm.

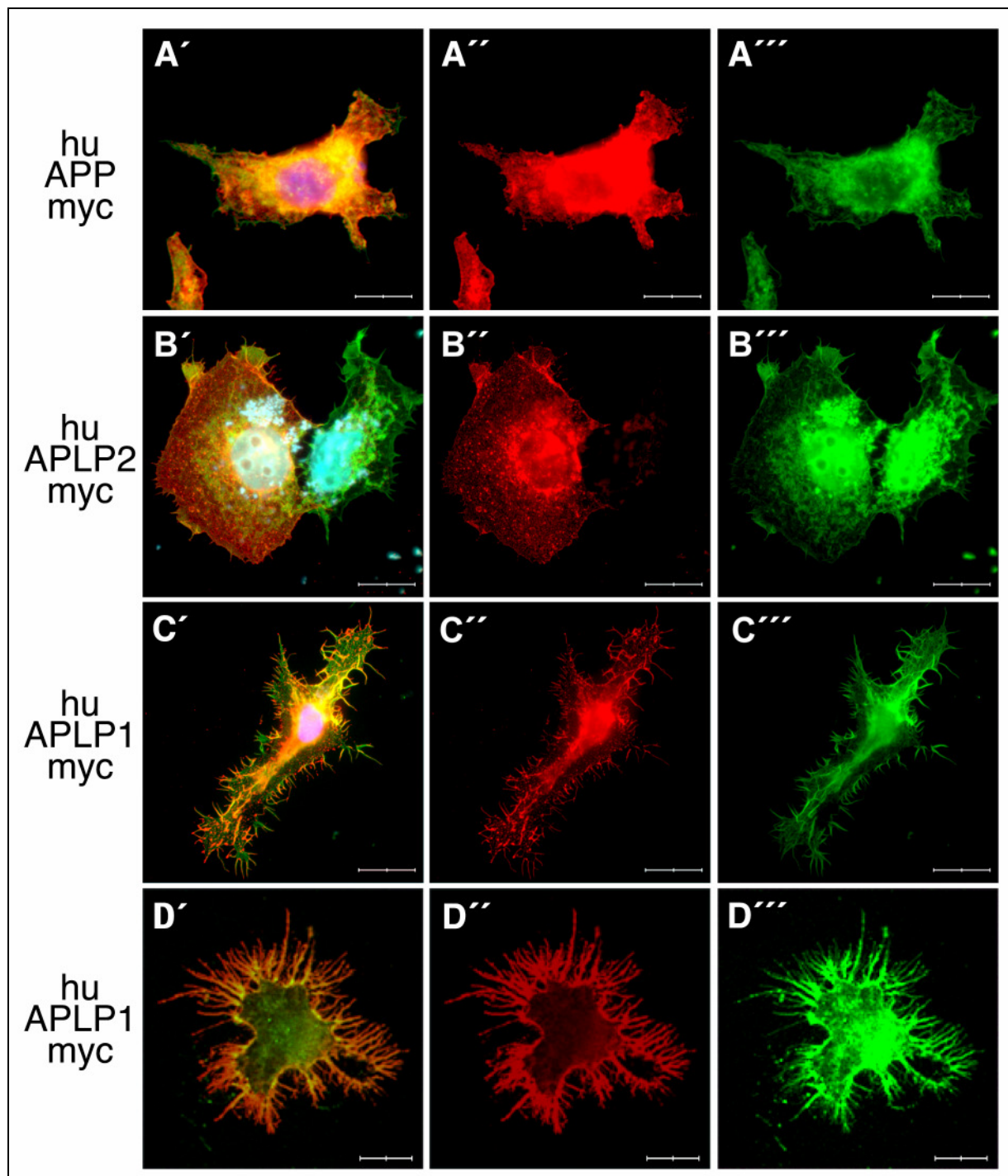


Abb3.3: Transfektion von PC12-Zellen mit Konstrukten der humanen APP-Familie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit huAPP (A), huAPLP2 (B) bzw. huAPLP1 (C+D) transfizierten PC12-Zellen nach 48h Kultur. Zur Detektion der Epitope wurden spezifische Erstantikörper gegen das myc-Epitop sowie ein Fluorochrom-Alexa564-konjugierter Zweitantikörper eingesetzt (A''-D''). Anhand eines Fluorochrom-Alexa488-konjugierten Phalloidins konnte das Aktin-Zytoskelett visualisiert werden (A'''-D'''). Die Aufnahmen D zeigen eine Konfokalmikroskopische Aufnahme mit einer optischen Ebene von ca. 400nm, die die Lokalisation des APLP1 in der Membran der PC12-Zelle erkennen lässt. Die abgebildeten Längenstandards entsprechen 20µm.

Die Aufnahmen in Abbildung 3.2 und 3.3 zeigen PC12-Zellen nach Überexpression von humanen bzw. murinen APP-Familienmitgliedern. Während die Expression von APP oder APLP2 keinen Einfluss auf die Morphologie hatte, bildeten mehr als 70% der mit humanem oder murinem APLP1 transfizierten Zellen auf ihrer Oberfläche zahlreiche Filopodien. Diese Fortsätze sind bis zu 35µm lang und haben an ihrer Basis einen Durchmesser von ca. 400nm. Diese morphologisch veränderten Zellen wurden im Folgenden als Kaktuszellen bezeichnet. Konfokale Aufnahmen dieser Kaktuszellen belegen, dass in der Membran dieser Fortsätze große Mengen des rekombinanten APLP1 eingelagert sind (Abb3.3D). Somit konnte gezeigt werden, dass die rekombinant gebildeten Proteine dem für die APP-Familienmitglieder beschriebenen subzellulären Transport vom ER zur Plasmamembran unterlagen.

In den Ansätzen mit den beiden übrigen Familienmitgliedern APP bzw. APLP2 konnten nur sehr wenige dieser Kaktuszellen beobachtet werden. Die Kontrollansätze mit dNTPDase6, peGFP und 14-3-3ζ und die Betrachtung untransfizierter PC12-Zellen belegen, dass einige wenige der kultivierten PC12-Zellen spontan Kaktuszellen bilden. Jedoch konnte eine derart drastische Erhöhung der Anzahl an Kaktuszellen nur nach Überexpression von APLP1 beobachtet werden. Dieser Effekt scheint Spezies-übergreifend, da sowohl die murine als auch die humane Form des APLP1 die Bildung von Kaktuszellen induzieren kann und weder die humanen noch die murinen APP- bzw. APLP2-Proteine eine vergleichbare Änderung der Morphologie hervorrufen.

Da die verwendeten rekombinanten APP-Proteine zwei unterschiedliche Splicevarianten mit (huAPP) bzw. ohne KPI-Domäne (muAPP) darstellen, konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Entstehung der Kaktuszellen auch nicht von unterschiedlichen Splicevarianten des APP induziert werden kann.

In allen Ansätzen konnte eine vergleichbare Anzahl abgerundeter Zellen und Zellen mit lamellipodialen Fortsätzen beobachtet werden. Die Expression der unterschiedlichen Proteine inklusive des APLP1 hatte keinen Einfluss auf die Entstehung der lamellipodialen Fortsätze.

Da sich, wie bereits beschrieben, in geringem Maße ein vergleichbarer Kaktus-Phänotyp in unbehandelten als auch in kontrolltransfizierten Zellen beobachten ließ, wurden pro verwendetem Konstrukt sechs Wiederholungen auf die Bildung von Filopodien ausgezählt. Hierzu wurden pro Wiederholung jeweils ca. 100 transfizierte PC12-Zellen im Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein des Kaktus-Phänotyps analysiert. In allen Ansätzen wurde darauf geachtet, dass das heterologe Expressionsniveau der transfizierten Zellen vergleichbar war (siehe Abb3.1). Die Quantifizierungen der ca. 600 Zellen pro Transfektionsansatz wurden gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt.

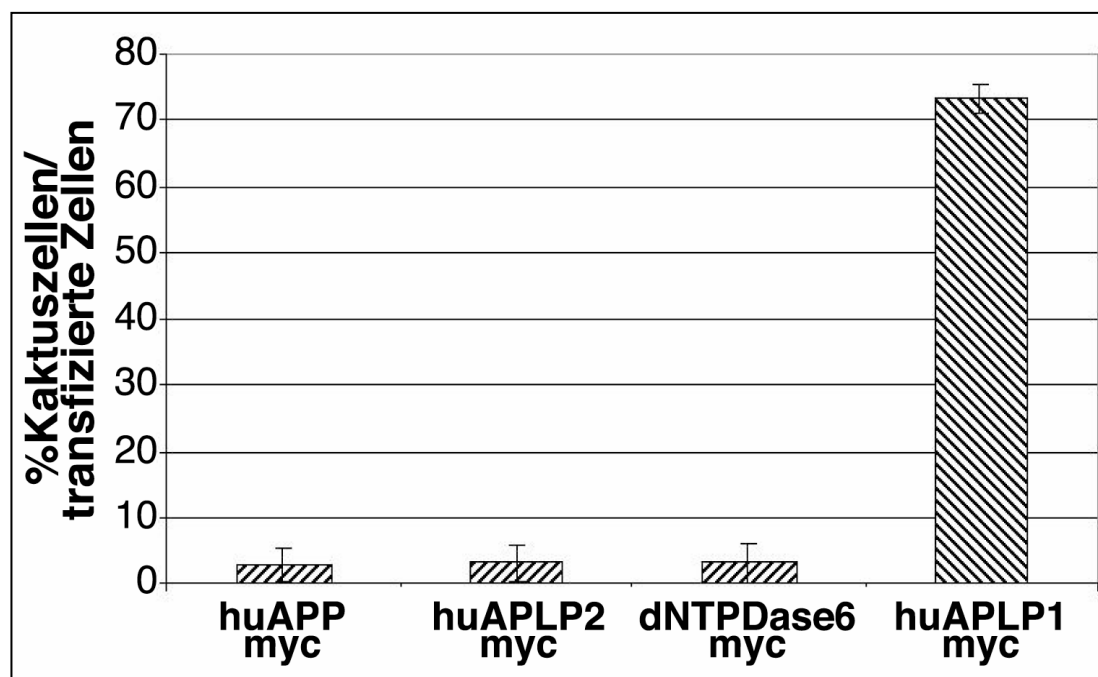


Abb3.4: Quantifizierung des APLP1- induzierten Phänotyps in PC12-Zellen.

PC12-Zellen wurden mit dNTPDase6myc, huAPPmyc, huAPLP2myc bzw. huAPLP1myc transfiziert, nach 48h fixiert und die transfizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (α -myc Erstantikörper, Alexa546 konjugierter Zweitantikörper) sichtbar gemacht.

Anschließend wurde der prozentuale Anteil von Zellen mit massiven filopodialen Strukturen bei jeweils 6x ca.100 transfizierten Zellen bestimmt. Der prozentuale Anteil an phänotypischen Zellen steigt signifikant nach APLP1-Überexpression (p -Werte < 0,001; $n=6$).

Die Quantifizierung (Abb 3.4) der einzelnen Ansätze ergab, dass ca. 3% aller APP-, APLP2- und dNTPDase6-transfizierten Zellen eine verstärkte Ausbildung von Filopodien erkennen ließ, während dieser Effekt bei 70% aller APLP1-transfizierten Zellen zu beobachten war. Um zu bestimmen, ob der beschriebene Effekt signifikant ist, wurden die Daten der Quantifizierung einem zweiseitigen, heteroskedastischen T-Test unterzogen.

p-Wert < :	für Ansatz:	gegen Ansatz:	Signifikanz:
0,00000000005	huAPLP1myc	huAPPmyc	**
0,00000000004	huAPLP1myc	huAPLP2myc	**
0,00000000002	huAPLP1myc	dNTPDase6myc	**
0,93	huAPPmyc	huAPLP2myc	-
0,93	huAPPmyc	dNTPDase6myc	-
0,99	huAPLP2myc	dNTPDase6myc	-

Tab3.2: Signifikante Zunahme an Kaktuszellen nach APLP1-Überexpression

Mittels eines zweiseitigen heteroskedastischen T-Tests wurden die p-Werte für die Quantifizierung des Kaktus-Phänotyps in PC12-Zellen ermittelt. Die Daten zeigen, dass der Unterschied zwischen der Menge an phänotypischen Kaktuszellen im Ansatz mit humanem APLP1 (**huAPLP1myc**) gegenüber den Kontrollansätzen mit humanem APP (**huAPPmyc**), humanem APLP2 (**huAPLP2myc**) und dNTPDase6 (**dNTPDase6myc**) hoch signifikant (**) ist.

Die errechneten p-Werte zeigten, dass der Unterschied zwischen dem Ansatz mit APLP1 und den übrigen Ansätzen hoch signifikant ist. Die Kontrollansätze mit humanem APP bzw. APLP2 und dNTPDase6 hingegen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Vergleichbar signifikante Verhältnisse wurden ebenfalls in den Ansätzen mit den murinen Konstrukten der APP-Genfamilie und weiteren Kontrollen (14-3-3 ζ sv , peGFP) beobachtet (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl humanes als auch murines APLP1 die Bildung von Filopodien in PC12-Zellen induziert. Diese Induktion kann nicht von den beiden anderen APP-Familienmitgliedern übernommen werden.

Um die APLP1-induzierte Bildung von Filopodien genauer zu erfassen, wurden transfizierte PC12-Zellen bezüglich der Anzahl an auftretenden Fortsätzen analysiert.

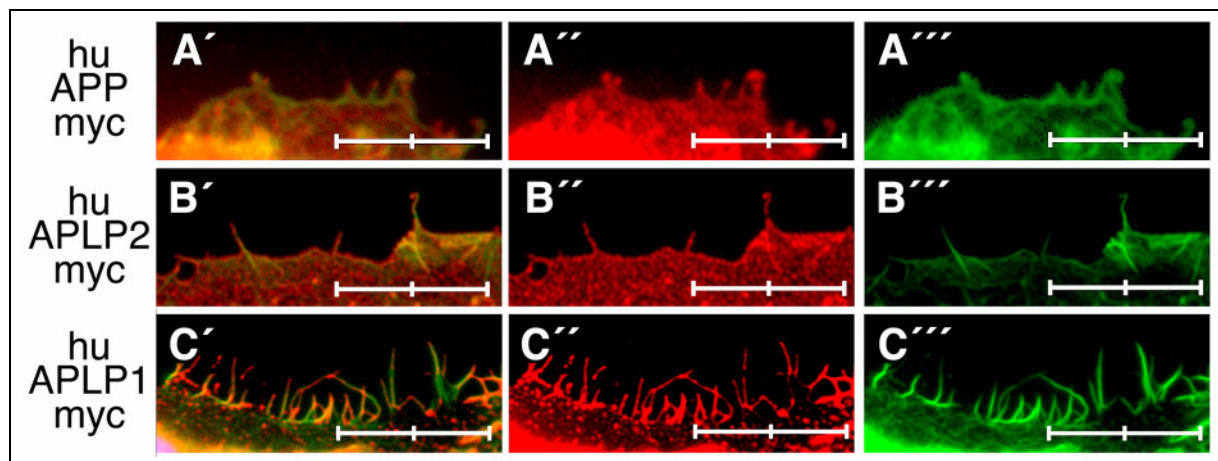


Abb3.5: APLP1-induzierte Bildung von Filopodien

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Membran von transfizierten PC12-Zellen. Während es nach der Transfektion mit huAPP (A) und huAPLP2 (B) kaum zur Bildung von filopodialen Fortsätzen kommt, zeigen die huAPLP1-transfizierten Zellen (C) die Bildung zahlreicher, bis zu 15µm langer Filopodien. Mittels eines myc-spezifischen Antikörpers und eines Alexa 546-gekoppelten Zweitantikörpers wurden die überexprimierten Proteine der APP-Genfamilie visualisiert (A''-C''). Die Färbung des Aktinzytoskeletts geschah mittels eines Alexa488-gekoppelten Phalloidin (A''''-C'''). Die eingezeichneten Längenstandards entsprechen 20µm.

Abbildung 3.5 zeigt Vergrößerungen der Zellmembran von PC12-Zellen, die mit humanem APP, APLP2 bzw. APLP1 transfiziert wurden. Während die Membran der APP bzw. APLP2 exprimierenden Zellen kaum filopodiale Fortsätze zeigt, induziert die Überexpression von APLP1 die Bildung zahlreicher Filopodien. Zur Quantifizierung dieses Effektes wurde die Filopodiendichte von jeweils 12 transfizierten PC12-Zellen pro Expressionskonstrukt bestimmt. Hierzu wurde die Menge an filopodialen Fortsätzen auf der Peripherie der Zellen bestimmt. Je nach Zellmorphologie geschah dies auf einer Länge von 40-100µm. Die erhaltenen Daten wurden auf einen Membranabschnitt von 100µm normalisiert und miteinander verglichen. Für die Quantifizierung der Filopodien in APLP1-exprimierenden PC12-Zellen wurden nur Zellen verwendet, die eindeutig dem Kaktus-Phänotyp zugeordnet werden konnten.

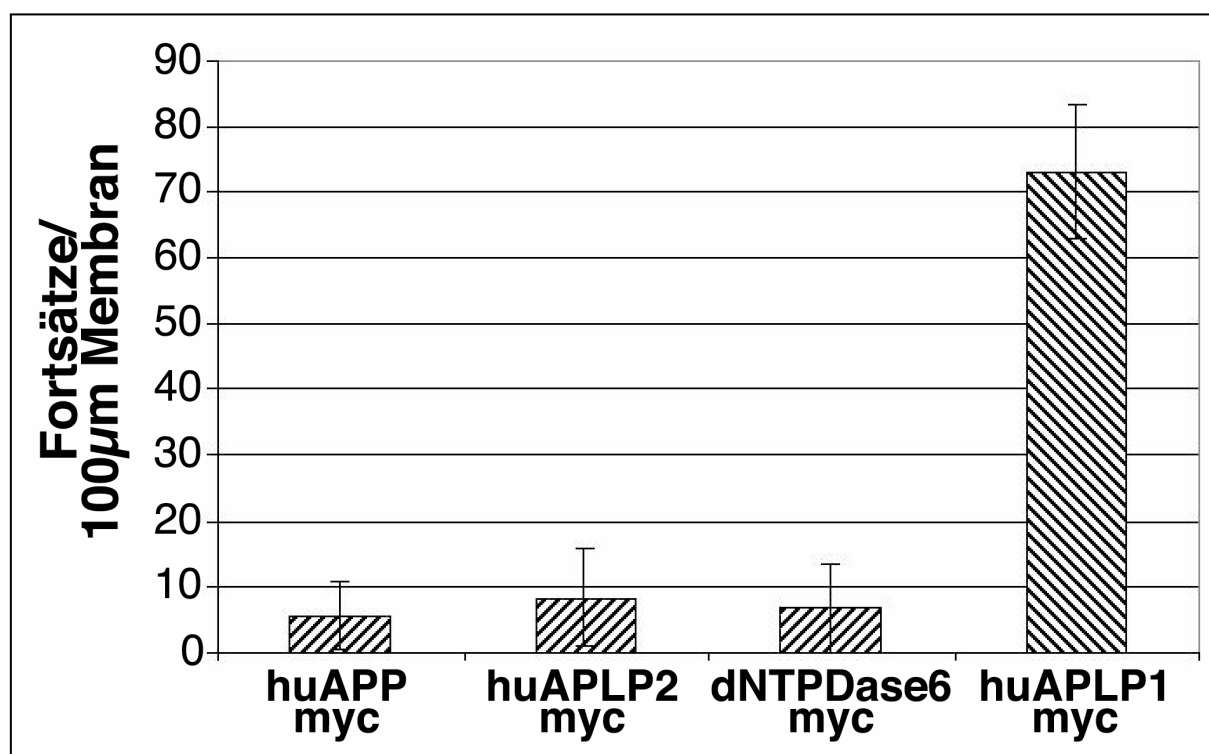


Abb 3.6: APLP1 induzierter Anstieg der Filopodienanzahl

PC12-Zellen wurden mit dNTPDase6myc, humanem APPmyc, APLP2myc bzw. APLP1myc transfiziert, nach 48h fixiert und die transfizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (α -myc Erstantikörper, Alexa546 konjugierter Zweitantikörper) sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Menge an filopodialen Fortsätzen pro 100 μ m Zelloberfläche quantifiziert (n=12).

Während die Kontrollansätze (**APPmyc**, **APLP2myc**, **dNTPDase6myc**) kaum Fortsätze zeigten, ist ein vermehrtes Auftreten der Fortsätze nach der Überexpression von humanem APLP1 (**APLP1myc**) zu beobachten.

Wie Abbildung 3.6 zeigt, konnten nach der Transfektion mit humanem APLP1 um die 70 filopodialen Fortsätze pro 100 μ m Zelloberfläche gezählt werden. In den mit APP, APLP2 bzw. dNTPDase6 kontrolltransfizierten Zellen kam es innerhalb der gleichen Distanz lediglich zu einer Ausbildung von weniger als 10 Fortsätzen, wobei eine Vielzahl dieser Zellen keinerlei Fortsätze erkennen ließ.

Um zu belegen, dass die durch APLP1-induzierte Zunahme an Filopodien signifikant ist, wurden die Ergebnisse einem zweiseitigen heteroskedastischen T-Test unterzogen.

p-Wert < :	für Ansatz:	gegen Ansatz:	Signifikanz:
0,00000000000004	huAPLP1myc	huAPPmyc	**
0,00000000000001	huAPLP1myc	huAPLP2myc	**
0,00000000000001	huAPLP1myc	dNTPDase6myc	**
0,30	huAPPmyc	huAPLP2myc	-
0,81	huAPPmyc	dNTPDase6myc	-
0,56	huAPLP2myc	dNTPDase6myc	-

Tab3.3: Signifikanter Anstieg der Anzahl an Filopodien nach APLP1-Überexpression

Mittels eines zweiseitigen heteroskedastischen T-Tests wurden die p-Werte für die Quantifizierung der Filopodienanzahl pro 100 μ m Zellmembran in PC12-Zellen ermittelt. Die Daten zeigen, dass der Unterschied zwischen der Menge an Filopodien im Ansatz mit humanem APLP1 (**huAPLP1myc**) gegenüber den Kontrollansätzen mit humanem APP (**huAPPmyc**), humanem APLP2 (**huAPLP2myc**) und dNTPDase6 (**dNTPDase6myc**) hoch signifikant (***) ist.

Die errechneten p-Werte zeigen (siehe Tab3.3), dass der Unterschied zwischen dem Ansatz mit APLP1-transfizierten Zellen und den übrigen Ansätzen hoch signifikant ist. Hingegen ließ sich in den Ansätzen mit APP, APLP2 und dNTPDase6 kein signifikanter Unterschied bezüglich der Menge an gebildeten filopodialen Fortsätzen ausmachen.

Die oben beschriebenen morphologischen Beobachtungen und die folgenden Quantifizierungen transfizierter PC12-Zellen belegen, dass APLP1 im Gegensatz zu den beiden anderen Familienmitgliedern APP und APLP2 die Ausbildung von Filopodien induziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser APLP1-spezifische Effekt nicht auf eine Spezies beschränkt ist, da sowohl das murine als auch das humane Konstrukt die Filopodiogenese in PC12-Zellen auszulösen vermochte.

Weitere Expressionsversuche in nicht neuronalen Zellen wie HEK293T-, 3T3-, COS- und HeLa-Zellen zeigten keine vergleichbaren Morphologieänderungen nach Transfektion mit APLP1 oder einem der beiden anderen APP-Familienmitglieder (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen sowie die im Folgenden beschriebenen Versuche mit kortikalen Neuronen lassen vermuten, dass die APLP1-induzierte Bildung von Filopodien ein auf neuronale Zellen und vergleichbare polarisierte Zelllinien beschränkter Prozess ist.

3.2 Überexpression der APP-Genfamilie in kortikalen Neuronen

PC12-Zellen dienen aufgrund ihres polaren Charakters in der Neurobiologie häufig als geeignetes Zellsystem zur Untersuchung des Wachstum und der Entwicklung von Neuronen. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse belegen, führt die Überexpression von APLP1 in diesen Zellen zu einer Veränderung der Morphologie. Um einen möglichen Einfluss von APLP1 auch auf das Wachstum von Neuronen analysieren zu können, sollten in den folgenden Versuchen kortikale Neuronen von Rattenembryonen mit den bereits in den PC12-Transfektionsversuchen verwendeten Expressionskonstrukten der APP-Familie transfiziert werden (siehe Tab3.1).

Hierzu wurden die Cortices embryonaler Ratten im Stadium E18.5 isoliert, durch Trypsinierung vereinzelt und auf poly-Ornithin bzw. Fibronectin beschichteten Glasplättchen in Kultur genommen. Nachdem die Mischkulturen aus Gliazellen und Neuronen 24h angewachsen waren, gelang es mittels Calciumphosphat-Transfektion sowohl die murinen als auch die humanen Konstrukte der APP-Familie zur Expression zu bringen. Zur Kontrolle wurden in weiteren Ansätzen für dNTPDase6 und 14-3-3vsv codierende Expressionskonstrukte verwendet. Die exprimierten Proteine waren mit spezifischen myc- bzw. vsv-Epitopen versehen, um nur Neuronen anzufärben, die die eingesetzten Proteine überexprimierten. Eine Detektion endogen vorkommender Proteine konnte somit ausgeschlossen werden.

Nach einer Kultivierung von 1 bis 4 Tagen wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Es zeigte sich, dass zwischen 0,5% und 3% der Zellen im Fluoreszenzmikroskop eine Detektion der verwendeten Epitope erkennen ließ.

Ähnlich wie in den Versuchen mit transfizierten PC12-Zellen zeigten lediglich die mit APLP1 transfizierten Neuronen morphologische Auffälligkeiten. Wie bereits für PC12-Zellen beschrieben hatte die Verwendung unterschiedlicher Adhäsionssubstrate (s.o.) keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

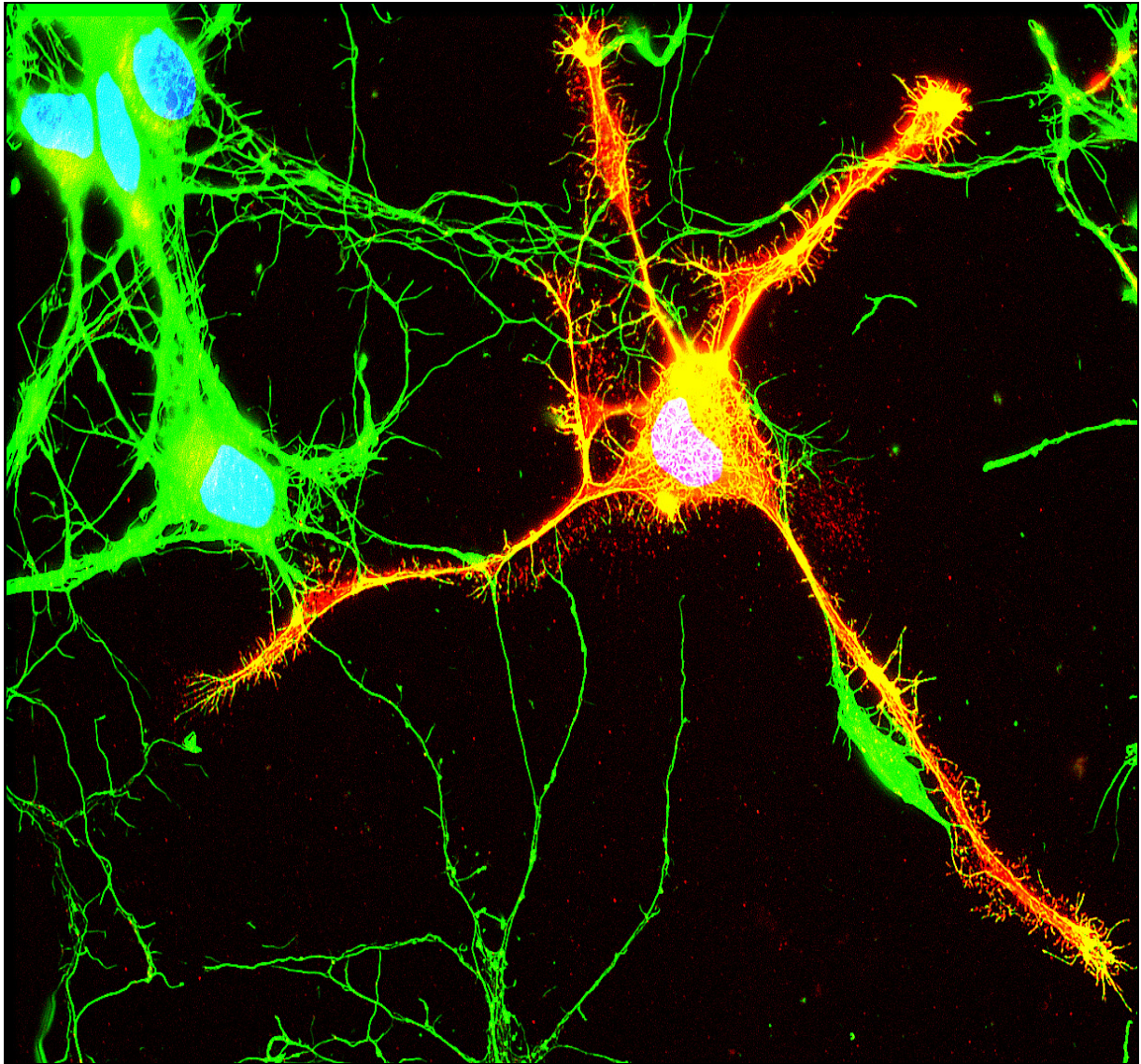


Abb3.7: APLP1-induzierte Bildung von Fortsätzen in corticalen Neuronen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines APLP1-exprimierenden corticalen Neurons. Die Neuronen wurden 72h (DIV4) nach Transfektion fixiert und mit Epitop-spezifischen Antikörpern (α -myc) und Alexa546-gekoppelten Zweitantikörpern gefärbt (rot). Das Aktinzytoskelett wurde mit Alexa488-gekoppelten Phalloidin (grün), der Zellkern mit DAPI (blau) markiert. Im Vergleich zu den untransfizierten Neuronen, die kein Signal im roten Kanal erkennen lassen, haben sich auf der Zelloberfläche des Somas und der Neuriten zahlreiche kurze Fortsätze gebildet.

Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch den in mit APLP1-transfizierten Neuronen beobachteten Kaktus-Phänotyp. Wie in der Aufnahme zu erkennen ist, kam es sowohl bei den mit humanem als auch bei mit murinem APLP1 transfizierten Zellen zu einem Auswachsen zahlreicher feiner, bis zu 10 μ m langer Fortsätze. Diese Fortsätze entsprangen sowohl aus der Membran des Zellkörpers als auch aus den Neuriten. Ähnlich wie bei PC12-Zellen zeigten 70% der APLP1-überexprimierenden Neuronen eine Induktion der Filopodienbildung, während untransfizierte Neuronen nur zu einem geringen Teil eine ähnliche Morphologie aufwiesen.

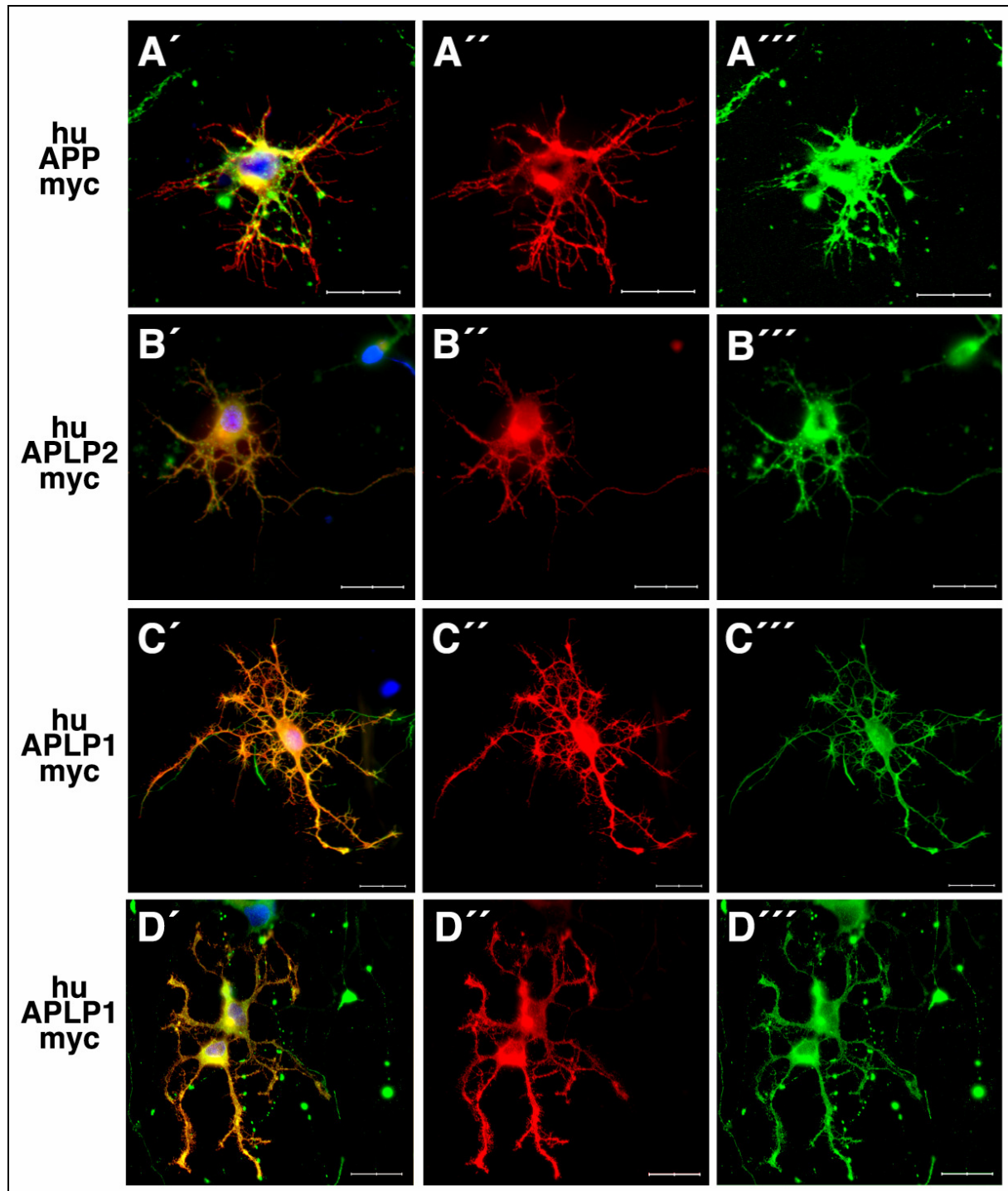


Abb3.8: huAPLP1-induzierte Bildung von Fortsätzen in corticalen Neuronen (E18.5)

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen corticaler Neuronen nach erfolgter Transfektion mit huAPP (A), huAPLP2 (B) und huAPLP1 (C). Die Neuronen wurden 72h nach Transfektion fixiert und mit Epitop-spezifischen Antikörpern (α -myc) und Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern (Alexa546, A''-D'') gefärbt. Das Aktinzytoskelett wurde mit Alexa488-gekoppeltem Phalloidin (A'''-C''') , der Zellkern mit DAPI (blau) markiert. Während die Überexpression von APLP1 zur Bildung zahlreicher feiner Fortsätze führt, entspricht die Morphologie der mit APP bzw. APLP2 transfizierten Neuronen der Morphologie untransfizierter Neuronen.

Aufnahme D zeigt ein für die Überexpression von APLP1 phänotypisches Neuron, welches mit einem Primärantikörper gegen das Neuronen-spezifische Protein β 3tubulin und einem Alexa488-gekoppelten Zweitantikörper (grün)(D''') angefärbt wurde.

Die Überexpression der APP- bzw. APLP2-Proteine führte wie die Kontrolltransfektion mit dNTPDase6 oder leerem pcDNA3.1-Vektor nicht zum Entstehen des Kaktus-Phänotyps (siehe Abb3.8A/B). Da es sich bei den fixierten Zellen um ein Gemisch aus vereinzelt Neuronen und Gliazellen handelt, sollte ein weiterer Versuch Aufschluss über die Natur der transfizierten Zellen geben. Unter Verwendung eines gegen das Neuronen-spezifische Protein β 3-tubulin gerichteten Antikörpers konnte gezeigt werden, dass es sich bei den für die weiteren Analysen verwendeten Zellen um Neuronen und nicht um Gliazellen handelte (siehe Abb3.8D).

Um den zeitlichen Verlauf der Filopodieninduktion zu untersuchen wurden mit APLP1-transfizierte Kulturen nach unterschiedlicher Kulturdauer fixiert und auf morphologische Veränderungen analysiert.

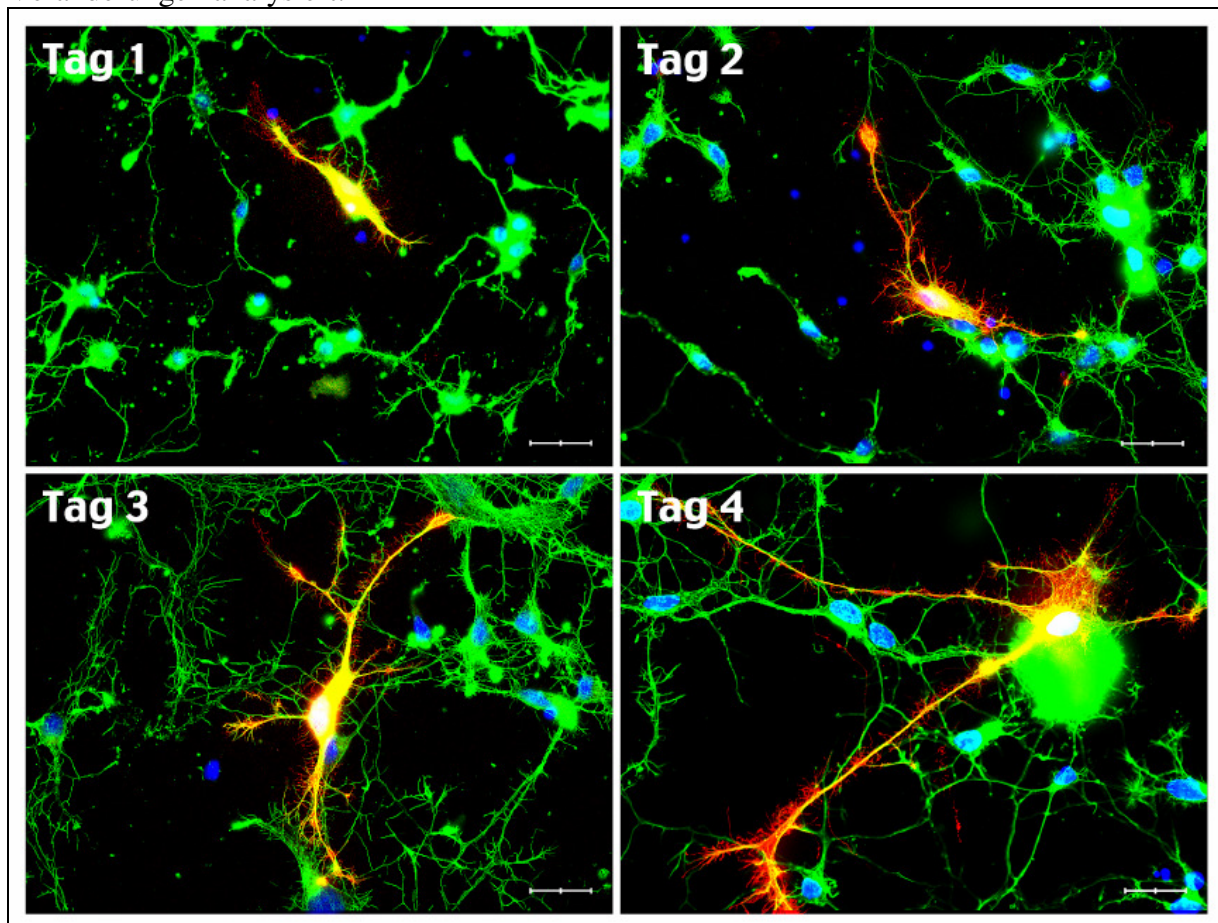


Abb3.9: huAPLP1-induzierte Bildung von Fortsätzen in kortikalen Neuronen (E18.5)

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen kortikaler Neuronen nach erfolgter Transfektion mit humanem APLP1. Die Neuronen wurden 24h (**Tag1**), 48h (**Tag2**), 72h (**Tag3**) und 96h (**Tag4**) nach Transfektion fixiert und mit Epitop-spezifischen Antikörpern (α -myc) und Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern (Alexa546, rot) gefärbt. Das Aktinzytoskelett wurde mit Alexa488-gekoppeltem Phalloidin (grün), der Zellkern mit DAPI (blau) markiert. Während nach 24h kaum Fortsätze auf der Membran erkennbar sind, zeigen die transfizierten Neuronen nach spätestens 72h den beschriebenen Kaktus-Phänotyp. Die eingezeichneten Längsstandards entsprechen einer Größe von 20 μ m.

Bereits 24h nach den Transfektionen konnten die ersten Neuronen fixiert werden, die das Auswachsen filopodialer Fortsätze zeigten. Deutlich erkennbar wurde die APLP1-induzierte Morphologieveränderung zu den drei späteren Zeitpunkten 48, 72 oder 96 Stunden nach der Transfektion (siehe Abb3.9).

Um diesen APLP1-vermittelten Effekt genauer zu beschreiben, wurde in den Ansätzen mit humanem APP, humanem APLP1 und humanem APLP2 die Menge an Zellen quantifiziert, die den beschriebenen Kaktus-Phänotyp zeigten. Hierzu wurden pro Ansatz auf 4 Glasplättchen alle transfizierten Neuronen ausgezählt und die Anzahl phänotypischer Zellen bestimmt (siehe Abb3.11A).

In einem weiteren Ansatz wurden die Fortsätze auf der Zellmembran der Neuriten ausgezählt. In einem Bereich von 50 μ m beginnend 10 μ m nach dem Verlassen des Soma wurde die Anzahl an Fortsätzen für je 6 Wiederholungen pro Ansatz bestimmt (siehe Abb 3.11B). In der Vergrößerung der Neuriten ist deutlich zu erkennen, dass nur die mit APLP1-transfizierten Neuronen zahlreiche bis zu 10 μ m lange Fortsätze gebildet hatten (Abb 3.10).

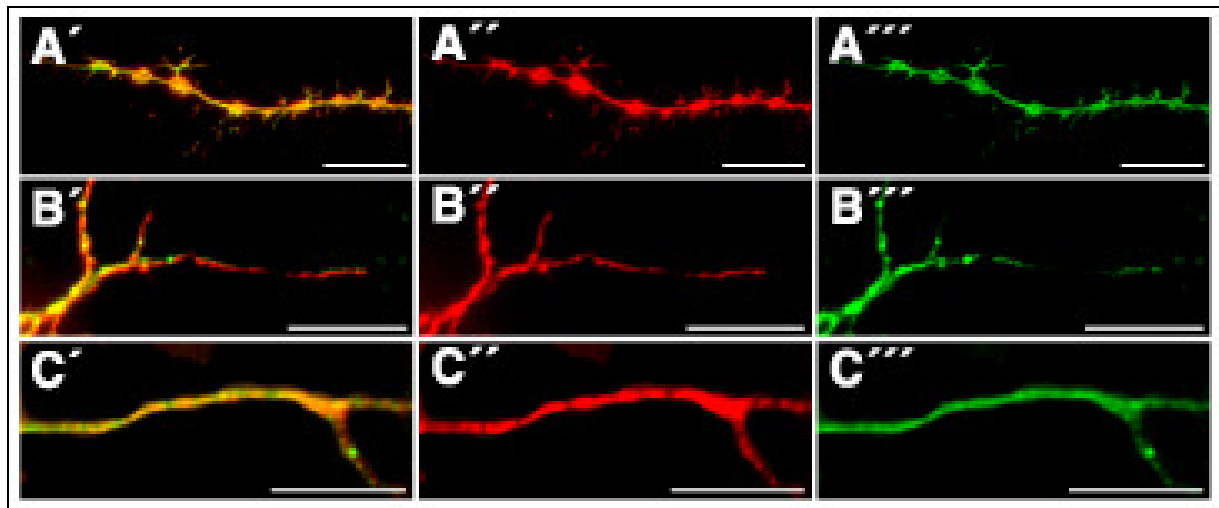


Abb3.10: huAPLP1-induzierte Bildung von Fortsätzen auf Neuriten transfizierter Neuronen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Neuriten kortikaler Neuronen nach erfolgter Transfektion mit huAPLP1 (A), huAPLP2 (B) und huAPP (C). Die Neuronen wurden 72h nach Transfektion fixiert und mit Epitop-spezifischen Antikörpern (α -myc) und Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern (Alexa546, A''-C'') gefärbt. Das Aktinzytoskelett wurde mit Alexa488-gekoppelten Phalloidin (A'''-C''') markiert.

Die Ergebnisse beider Auszählungen wurden gemittelt und gegeneinander aufgetragen.

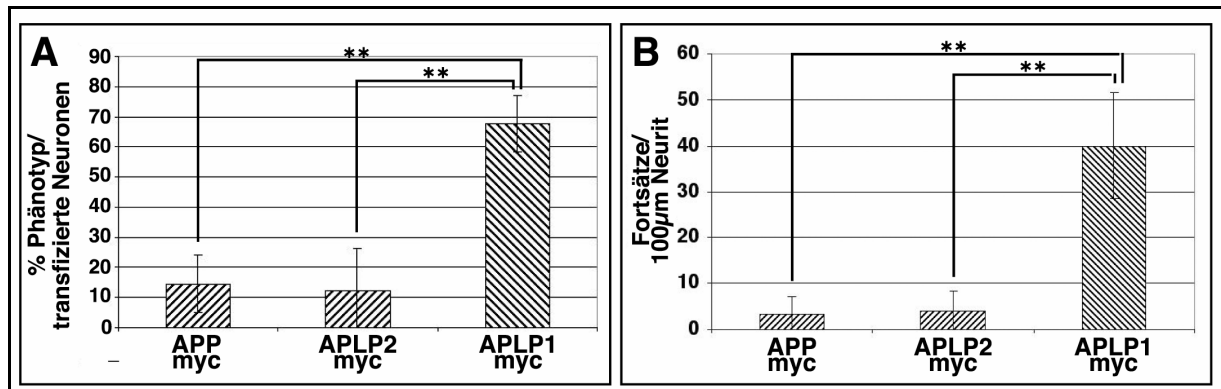


Abb3.11: APLP1-induzierte Morphologieänderungen in Neuronen

Cortikale Neuronen der Ratte (E18.5) wurden 24h nach Inkulturnahme mit humanem **APPmyc**, **APLP2myc** bzw. **APLP1myc** transfiziert. Nach 72 h Kultur wurden die Neuronen fixiert und mit einem myc-Epitop-spezifischen Antikörper fluoreszenzmarkiert. Im Mikroskop wurden die Neuronen auf Morphologieänderungen untersucht.

(A) Die Expression von humanem APLP1 führt gegenüber den übrigen Ansätzen zu einer signifikanten ($p < 0,001, n=6$) Erhöhung der Anzahl an Neuronen, die zahlreiche Fortsätze auf der Oberfläche ihrer Membran gebildet haben.

(B) Nach der Transfektion mit humanem APLP1 steigt die Anzahl an Fortsätzen pro μm Neurit signifikant ($p < 0,001, n=6$) gegenüber den Ansätzen mit humanem APPmyc bzw. APLP2myc.

Wie in Abbildung 3.11A ersichtlich kam es nach der Expression von APLP1 zu einer signifikanten Erhöhung von Zellen, deren Membran mit zahlreichen Fortsätzen übersät war. Dieser Phänotyp konnte in den Kontrollen mit einer maximalen Intensität von 12% beobachtet werden und stieg nach APLP1-Expression auf ca. 70% an.

Während die Ansätze mit humanem APP bzw. APLP2 kaum Fortsätze erkennen ließen, fanden sich im Ansatz mit humanem APLP1 durchschnittlich 40 Fortsätze pro $50\mu\text{m}$ Neurit (siehe Abb3.11B).

Anhand der p-Werte ($p < 0,001$) aus den zweiseitigen, heteroskedastischen T-Tests konnte die hohe Signifikanz des durch APLP1-vermittelten Effektes belegt werden.

Diese Daten zeigen, dass der bereits in PC12-Zellen beschriebene APLP1-spezifische Einfluss auf das Auswachsen von Fortsätzen auch in cortikalen Neuronen zu beobachten ist. In beiden Zellsystemen kam es nach einer Überexpression von APLP1 zu einer drastischen Änderung der Zellmorphologie, die von keinem der beiden anderen APP-Familienmitglieder hervorgerufen werden konnte.

Um festzustellen, ob die Überexpression einzelner APP-Familienmitglieder die Anzahl der Dendriten oder die Anzahl der Verzweigungen eines Dendriten beeinflusst, wurden die untersuchten Neuronen einer Scholl-Analyse unterzogen. Im Rahmen dieser Analyse wurden 2 Kreise mit einem Durchmesser von 15µm bzw. 40µm angelegt, deren Mittelpunkt im Zellsoma lag (siehe Abb3.12). Die Anzahl der Dendriten, welche diese Kreise schneiden, wurde pro Ansatz von je 10 Neuronen erfasst und die Zahlen gemittelt. Wie die Statistik in Abb3.12 zeigt, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen festgestellt werden.

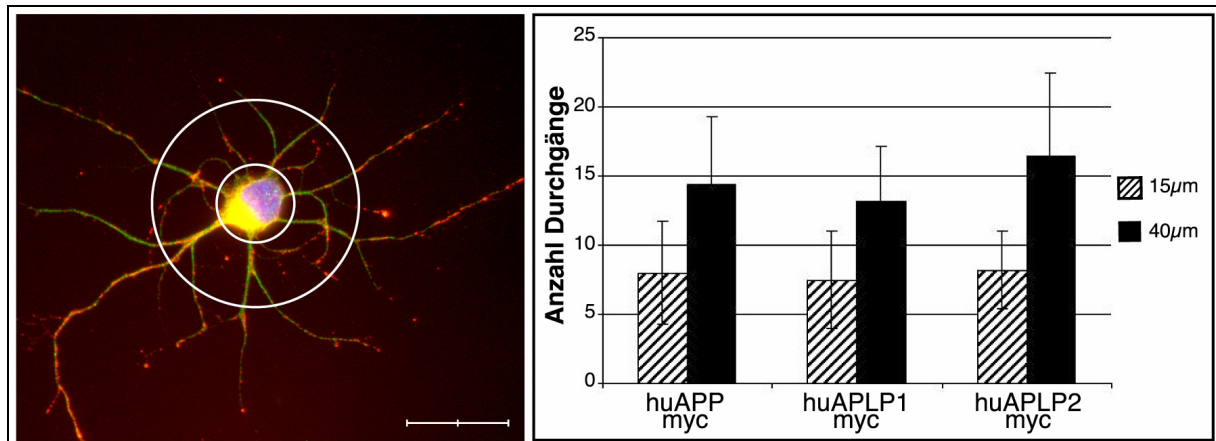


Abb3.12: Scholl-Analyse cortikaler Neuronen nach Transfektion mit APP, APLP1 und APLP2

Cortikale Neuronen der Ratte (E18.5) wurden wie oben beschrieben mit humanem **APPmyc**, **APLP2myc** bzw. **APLP1myc** transfiziert, nach 72 h Kultur fixiert und mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Um einen Einfluss der Transfektion auf die Anzahl der Neuriten zu erfassen, wurden transfizierte Neuronen einer Scholl-Analyse unterzogen. Wie exemplarisch für ein mit APP-transfiziertes Neuron gezeigt wurden ausgehend vom Mittelpunkt des Zellsoma 2 Kreise mit 15µm bzw. 40µm gezogen und die Anzahl durchgehender Dendriten quantifiziert. Die statistische Auswertung ließ keinen signifikanten Unterschied innerhalb der einzelnen Ansätze beobachten (n=10).

Die Scholl-Analyse zeigt, dass die Transfektion cortikaler Neuronen mit APLP1 zwar die Bildung von zahlreichen Filopodien induziert, nicht aber Einfluss auf die Anzahl oder die Verzweigung der Dendriten eines Neuron hat.

Wie in den Versuchen mit PC12-Zellen konnte auch in den Versuchen mit cortikalen Neuronen eine Spezies-übergreifende Funktion des APLP1 belegt werden. Zudem scheint diese Funktion innerhalb verschiedener Säugetiere hoch konserviert, da sowohl die humanen als auch die murinen Formen des APLP1 die Morphologie der Rattenneuronen beeinflussten. Die Art der beobachteten Morphologieänderung lässt auf eine Rolle des APLP1 bei der Differenzierung bzw. dem Zellwachstum schließen. Insbesondere für Neuronen konnte gezeigt werden, dass durch die Bildung von Fortläufern auf der Zellmembran ein Prozess beginnt, der schließlich zur adulten Zelle mit polarem Charakter führt (Craig A.M. and Banker G. 1994).

3.3 Untersuchungen zur Effektdomäne von APLP1

Je nach Art und Größe eines Polypeptids besitzen Proteine eine bis mehrere Domänen, die für unterschiedliche Funktionen essentiell sind. Für die teilweise hochgradig homologen Proteine

der APP-Familie konnten bisher vor allem im C-Terminus einige Domänen identifiziert werden, deren Interaktion mit anderen Proteinen oder Ionen gezeigt werden konnte.

Es ist davon auszugehen, dass für den APLP1-spezifischen Phänotyp bestimmte Bereiche des Proteins essentiell sind und eine Deletion dieses Bereiches zum Ausbleiben des Phänotyps führt. Um innerhalb des APLP1 eine solche Domäne ausfindig zu machen, wurden C- und N-terminale Deletionskonstrukte kloniert und in PC12-Zellen zur Expression gebracht.

3.3.1 Deletion des intrazellulären C-Terminus von APLP1

Besonders der kurze C-Terminus der APP-/APLP-Proteine kann eine Vielzahl von Bindungen mit anderen Proteinen wie zum Beispiel Fe65 (Fiore F. et al. 1995; McLoughlin D.M. and Miller C.C.J. 1996; Sabo S.L. et al. 1999; Sabo S.L. et al. 2001) Dab1 oder X11/Mint-1 (zur Übersicht siehe De Strooper B. et al. 2000) eingehen. Insbesondere das nahe dem C-Terminus gelegene YENPTY-Motiv scheint in der Lage zu sein, nach Bindung unterschiedlicher Proteine Einfluss auf Prozesse des Zellwachstums und des Transkriptionsprofils zu nehmen (Duilio A. et al. 1998; Coulson E.J. et al. 2000; Sabo S.L. et al. 2001).

Diese Beobachtungen ließen eine Involvierung des C-Terminus auf die APLP1-induzierte Bildung von Fortsätzen vermuten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden vier C-terminale Deletionskonstrukte generiert und so die zytoplasmatische Domäne schrittweise deletiert. Bei der Herstellung der C-terminalen Deletionskonstrukte wurden insbesondere die Positionen der bereits bekannten Bindedomänen beachtet.

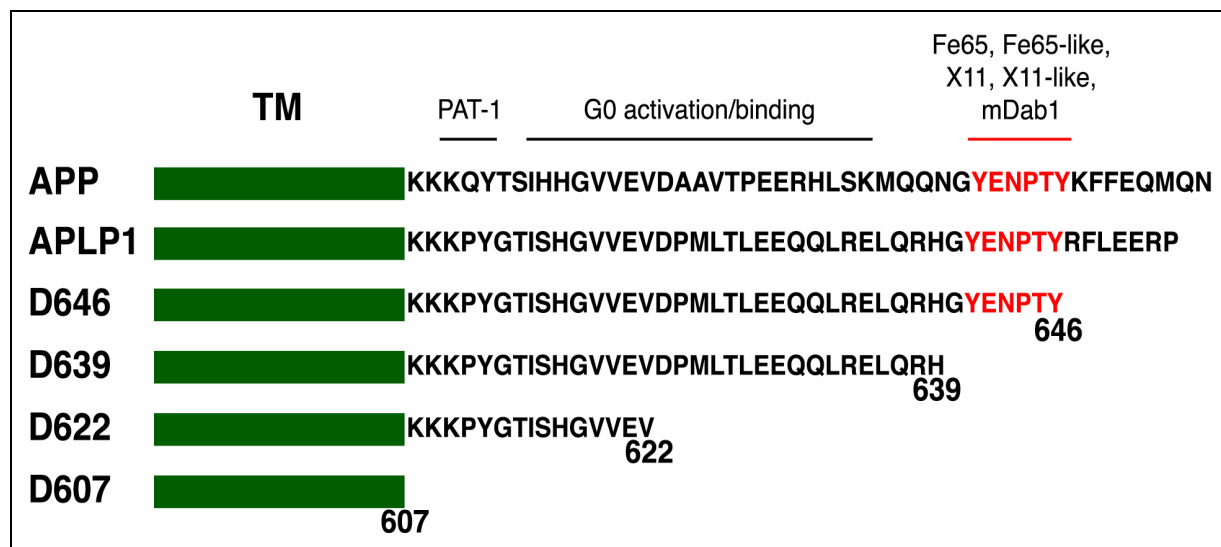


Abb3.13 Schematische Darstellung der verwendeten C-terminalen Deletionskonstrukte

Übersicht der 4 verwendeten Konstrukte (D646 bis D607), bei denen unterschiedlich lange Bereiche des C-Terminus deletiert wurden.

Die primäre Proteinstruktur der Deletionskonstrukte ist vergleichend zu den nativen C-Termini von murinem APP bzw. APLP1 dargestellt; in grün abgebildete Bereiche symbolisieren die Transmembrandomäne (TM). Bereits bekannte Bindedomänen innerhalb des C-Terminus inklusive der in rot dargestellten YENPTY-Bindedomäne sind angezeigt. Beim Deletionskonstrukt D607 kam es zur Bildung eines APLP1-Proteins, dem der komplette C-Terminus fehlt.

Abbildung 3.13 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Deletionskonstrukte. Das Konstrukt D646 war vom C-Terminus ausgehend bis zur YENPTY-Domäne deletiert, wogegen den Konstrukten D639 und 622 diese Domäne fehlte. Ein Verlust des gesamten intrazellulären Teils von APLP1 konnte mit dem Konstrukt D607 erreicht werden. Für den Fall, dass der APLP1-C-Terminus in die Bildung des APLP1-Phänotyps involviert ist, sollte die Expression dieser Konstrukte zum Ausbleiben der Bildung von Fortsätzen führen.

Entsprechend verkürzte Proteine wurden wie in Kapitel 3.1 beschrieben in PC12-Zellen zur Expression gebracht. Nach 48 Stunden Kultur wurden die transfizierten Zellen fixiert und mit vsv-Epitop-spezifischen Antikörpern unter Verwendung von Alexa546 gekoppelten Zweitantikörpern fluoreszenzmarkiert. Im Mikroskop wurden je 6 Wiederholungen für jedes Deletionskonstrukt auf das Auftreten des APLP1-induzierten Phänotyps im Vergleich zu den Kontrolltransfektionen mit murinem APP, APLP2 und APLP1 analysiert und danach statistisch ausgewertet.

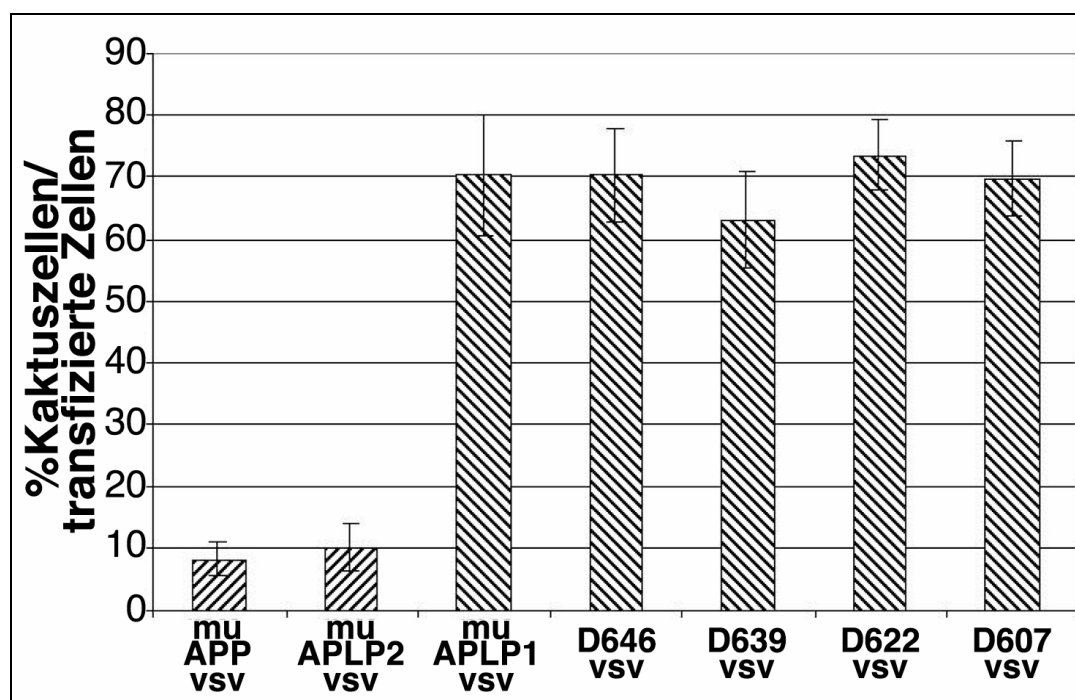


Abb3.14 Einfluss der intrazellulären Domäne auf den APLP1-induzierten Phänotyp

PC12-Zellen wurden mit murinem APP, APLP1 und APLP2 (**muAPP**, **muAPLP1**, **muAPLP2**) und C-terminalen Deletionskonstrukten (**D653**, **D646**, **D639**, **D607**) transfiziert, nach 48h fixiert und die transfizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (α -myc Erstantikörper, Alexa546 konjugierter Zweitantikörper) sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Menge APLP1-phänotypischer Zellen quantifiziert (n=6).

Keine der Deletionen führte zu einer signifikanten Abnahme des durch Wildtyp-APLP1 induzierten Phänotyps.

Wie die Statistik in Abbildung 3.14 zeigt, führt eine Deletion des C-Terminus nicht zum Ausbleiben des APLP1-Phänotyps. Unabhängig von der Länge der Deletion kam es in ca. 70% aller transfizierten Zellen zu einer vermehrten Bildung von filopodalen Fortsätzen. Die anhand eines zweiseitigen, heterosdeskastischen T-Tests berechnete Signifikanz zwischen muAPP bzw. muAPLP2 gegenüber den Ansätzen mit den Deletionskonstrukten und der Wildtyp-Kontrolle mit muAPLP1 zeigt einen hoch signifikanten Unterschied. Hingegen zeigen die Ansätze mit den Deletionskonstrukten keinen signifikanten Unterschied zum Ansatz mit dem Wildtyp-APLP1-Plasmid.

Eine Involvierung des C-Terminus der transfizierten Konstrukte bei der Bildung der Fortsätze scheint ebenso wie ein Mitwirken bei der Signalweiterleitung ausgeschlossen. Die sowohl in PC12-Zellen als auch in Neuronen beobachteten morphologischen Abnormitäten müssen daher auf eine weiter N-terminal gelegene APLP1-Domäne zurückgeführt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die APLP1-spezifische Bildung von Fortsätzen nicht über eine der bereits bekannten Interaktionen mit C-terminalen Bindepartnern wie z.B. Fe65 vermittelt wird.

3.3.2 N-terminale Deletionen der extrazellulären Domäne

Während der relativ kurze C-Terminus von APLP1 eine hohe Homologie zu den beiden anderen Familienmitgliedern aufweist, enthält der extrazelluläre N-Terminus zwei Domänen (DI und DII) und andere Abschnitte, die starke Divergenzen in der Primärstruktur der APP-Familie aufweisen. Da eine Involvierung des C-Terminus bei der Filopodieninduktion ausgeschlossen werden konnte (vergleiche 3.3.1), sollten N-terminale Deletionskonstrukte Hinweise auf für den APLP1-Phänotyp essentielle Domänen liefern. Ausgehend vom humanen APLP1-Expressionsvektor wurden daher Vektoren konstruiert, die zur Expression von N-terminal deletiertem APLP1 führten.

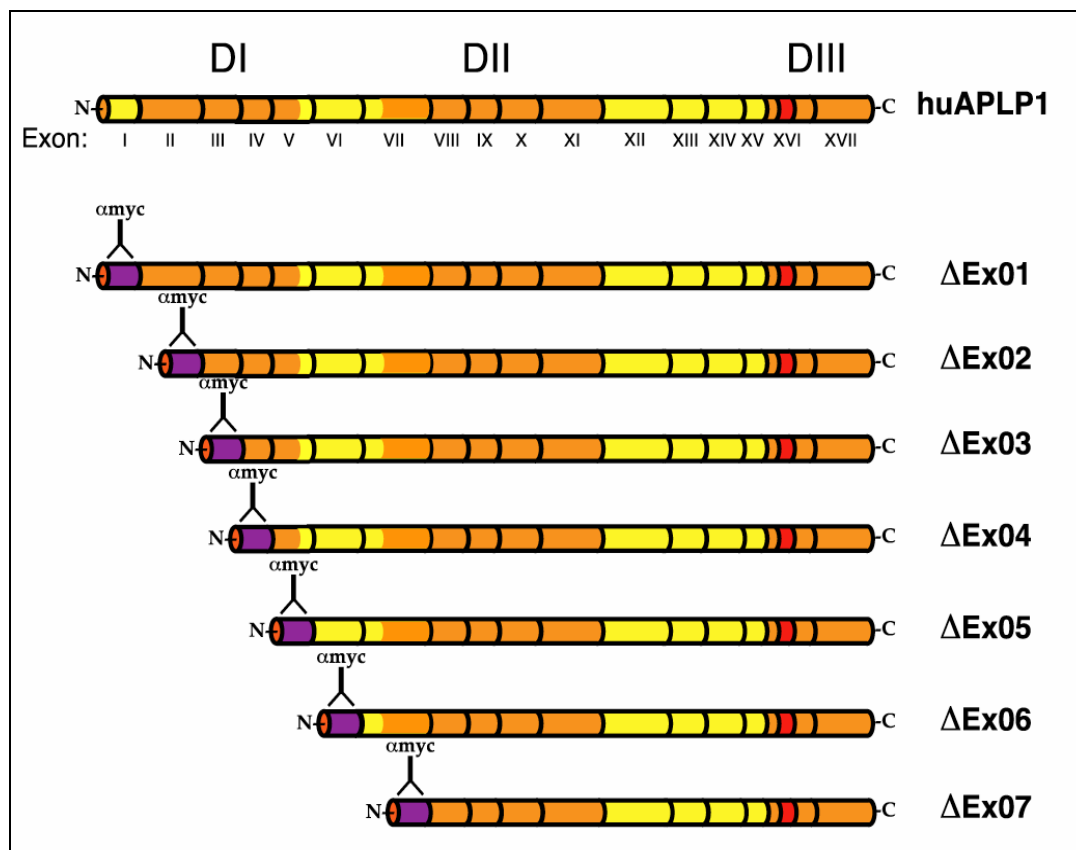


Abb 3.15: Schematische Darstellung der verwendeten N-terminalen Deletionskonstrukte

Die verwendeten N-terminalen Deletionskonstrukte (ΔEx01 bis ΔEx07) sind im Vergleich zum humanen Wildtyp APLP1 (**huAPLP1**) dargestellt. Drei innerhalb der APP-Familie hoch homologe Domänen (**DI-DIII**) sind dunkel unterlegt. Die Transmembrandomäne ist rot eingefärbt und die einzelnen Exone (**I bis XVII**) sind durch schwarze Balken abgegrenzt. Alle Deletionskonstrukte verfügen am N-Terminus über ein myc-Epitop, um die gebildeten Proteine mittels Immunfluoreszenz detektieren zu können

Die jeweils um ein Exon verkürzten Konstrukte wurden wie unter 3.1 beschrieben in PC12-Zellen zur Expression gebracht. Nach 48h Kultur wurden die Zellen lysiert und je 60µg Zelllysat pro Ansatz einer Western-Blot-Analyse unterzogen (siehe Abb3.16A). Anhand eines gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörpers konnte gezeigt werden, dass alle Konstrukte in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden und somit ein Einfluss auf die Ausbildung des APLP1-spezifischen Phänotyps aufgrund unterschiedlicher Expressionsmengen ausgeschlossen werden kann. Die parallel durchgeführte Quantifizierung des Tubulins zeigt, dass identische Mengen Gesamtprotein aufgetragen wurden.

Um den Einfluß der N-terminalen Deletionskonstrukte auf den APLP1-Phänotyp zu erfassen, wurden transfizierte PC12-Zellen 48 kultiviert, anschließend fixiert und wie unter 3.1 beschrieben fluoreszenzmarkiert. In einer mikroskopischen Analyse wurden in je 6 Wiederholungen pro Deletionskonstrukt ca.100 Zellen analysiert und das Auftreten des APLP1-spezifischen Phänotyps quantifiziert. Als Positiv-Kontrolle dienten mit humanem Wildtyp-APLP1 transfizierte Zellen

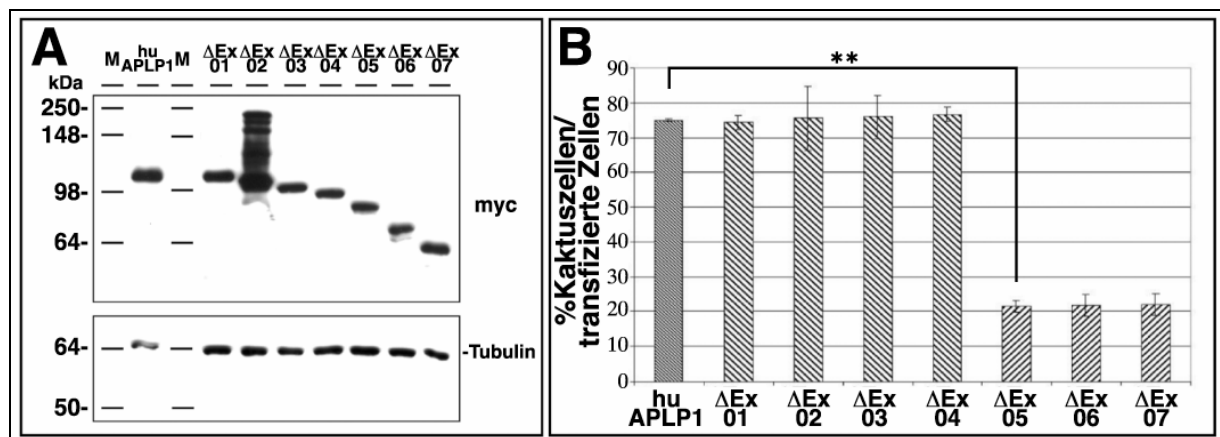


Abb 3.16: Einfluss einzelner N-terminaler Domänen auf die Ausbildung des APLP1-induzierten Phänotyp

PC12-Zellen wurden mit humanem APLP1myc (**huAPLP1**) und N-terminalen Deletionsmutanten (**ΔEx01-07**) desselben transfiziert, 48h kultiviert.

(A) Anhand einer Westernblotanalyse unter Verwendung eines Tubulin-spezifischen und eines myc-Epitop-spezifischen Antikörpers wurden die Mengen an gebildetem Konstrukt miteinander verglichen, um einen Einfluss unterschiedlicher Expressionsstärken ausschließen zu können.

(B) Fixierte PC12-Zellen wurden nach Immunfärbung fluoreszenzmikroskopisch auf die Ausbildung von Filopodien analysiert. Die Quantifizierung phänotypischer Zellen (n=6) zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid, dass eine Deletion bis einschließlich Exon 4 keinen Einfluss auf die APLP1-induzierte Filopodienbildung hat. Weiterreichende Deletionen resultierten in einem signifikanten Rückgang ($p < 0,001$) der Menge an phänotypischen Zellen.

Wie Abbildung 3.16B zeigt, führt eine Deletion der von den ersten 4 Exons codierten Bereiche nicht zu einer signifikanten Abnahme des beschriebenen Phänotyps. Erst eine weitergehende Deletion der von Exon 1 bis 5 codierten Bereiche führt zu einer hoch signifikanten Abnahme ($p < 0,001$) der Anzahl an Kaktuszellen. Weiterreichende Deletionen bis einschließlich Exon 7 bestätigen diese Beobachtungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Ausbildung des APLP1-spezifischen Phänotyps eine Domäne innerhalb des extrazellulären N-Terminus essentiell ist. Diese Domäne muss c-terminal der von Exon4 codierten Region und somit außerhalb der in der APP-Familie hoch homologen Domäne DI (siehe Abb3.15) liegen. Dieser Befund ist konsistent mit der Beobachtung, dass weder APP noch APLP2 Filopodien-induzierende Funktion haben.

3.3.3 Eingrenzung der Effektdomäne anhand von Expressionsversuchen mit APLP1/APLP2-Chimären

Nachdem anhand der N-terminalen Deletionskonstrukte gezeigt werden konnte, dass für den APLP1-spezifischen Phänotyp eine c-terminal des von Exon 4 codierten Bereichs von APLP1 essentiell ist, sollten chimäre Konstrukte die Lage der Filopodien-induzierenden Domäne weiter eingrenzen. Hierfür wurden Plasmide generiert, die APLP1/APLP2 chimäre Proteine zur Expression brachten (siehe Abb3.17).

Diese Chimärproteine setzten sich aus unterschiedlich großen Bereichen des APLP1-N-Terminus und dem C-Terminus von APLP2 zusammen. Da APLP1 als einziges Mitglied der APP-Familie in keiner Splicevariante eine KPI-Domäne enthält, wurden die von Exon1 bis inclusive Exon5 bzw. Exon6 codierten Bereiche des APLP1 mit unterschiedlichen C-Termini des APLP2 fusioniert. Während bei der Chimäre Ex1-5/Ex6-18 die von den Exons 6 und 7 kodierte KPI-Domäne von APLP2 noch vorhanden war, fehlte diese in den beiden anderen Konstrukten Ex1-5/Ex8-18 bzw. Ex1-6/Ex8-18. Alle Chimären sowie die zur Kontrolle verwendeten huAPLP1- bzw. huAPLP2-Wildtyp-Konstrukte enthielten zu Detektionszwecken N-terminal ein myc-Epitop.

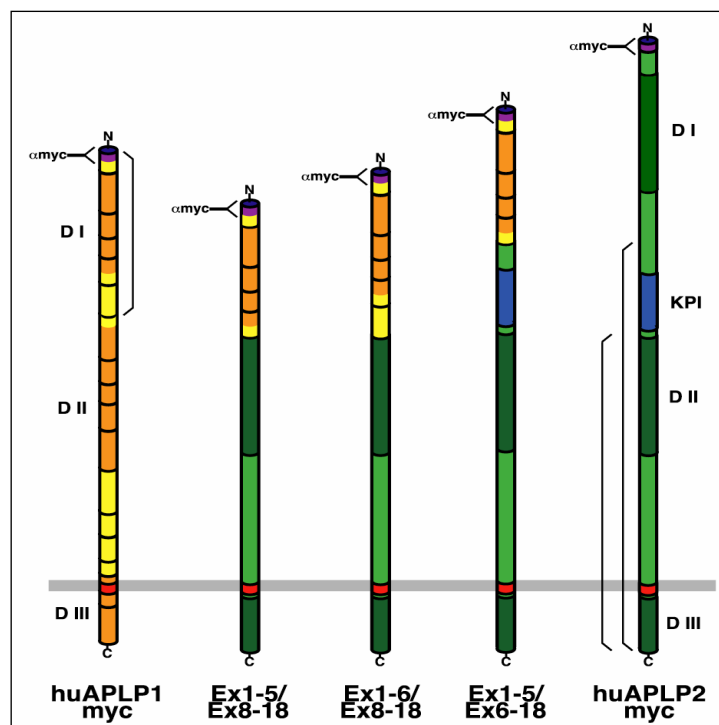


Abb3.17 Schematische Darstellung der erzeugten APLP1/APLP2-Chimären

Ausgehend von den humanen Konstrukten (**huAPLP1myc** und **huAPLP2myc**) wurden 3 Chimären erzeugt, die N-terminale Bereiche von humanem APLP1 auf C-terminalen Teilstücken des humanen APLP2 exprimierten. Zwei Konstrukte (**Ex1-5/Ex8-18** und **Ex1-6/Ex8-18**) besitzen die von den ersten 5 bzw. 6 Exons codierten N-terminalen Bereiche von APLP1 und den nach der KPI-Domäne (blau) liegenden Teil von APLP2. Bei der dritten Chimäre (**Ex1-5/Ex6-18**) liegt der Übergang der zusammengeführten Teilstücke zwischen dem von Exon5 codierten Teil von APLP1 und unmittelbar vor der KPI-Domäne des APLP2-Proteins.

Die von den einzelnen Exons codierten Bereiche des APLP1 sind als schwarze Tuben eingezeichnet. Innerhalb der APP-Familie hoch homologe Domänen (**D I**, **D II**, **D III**) sind als dunklere Bereiche, die Transmembrandomänen in rot dargestellt. Alle Konstrukte trugen an ihrem N-Terminus ein zur Detektion verwendetes myc-Epitop.

Die Konstrukte wurden wie unter 3.1 beschrieben in PC12-Zellen zur Expression gebracht und nach erfolgter Lyse einer Western-Blot-Analyse gegen das verwendete myc-Epitop und Tubulin unterzogen, wodurch gezeigt wurde, dass alle Konstrukte in der gleichen Stärke zur Expression kamen (siehe Abb3.18A).

Parallel transfizierte PC12-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und nach 48h fixiert. Die anschließend fluoreszenzmarkierten Zellen wurden auf das Auftreten des APLP1-spezifischen Phänotyps analysiert. Pro Transfektionsansatz wurden je 6 Wiederholungen quantifiziert und die Anzahl an phänotypischen Zellen relativ zur Anzahl nach Transfektion mit huAPLP1myc bestimmt. Die Anzahl an Kaktus-Phänotyp-Zellen nach huAPLP1myc-Transfektion wurde hierbei als 100% gesetzt.

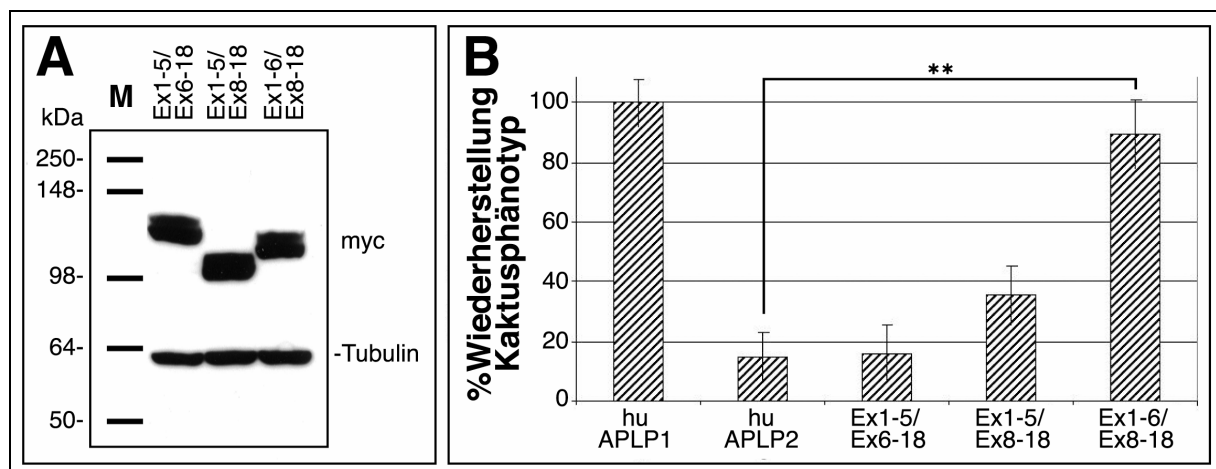


Abb3.18: Auswirkung der verwendeten APLP1/APLP2-Chimären

Drei Chimären mit unterschiedlich langen Stücken des N-Terminus von APLP1 und verschiedenen C-Termini von APLP2 wurden in PC12-Zellen zur Expression gebracht und die Zellen nach 48h analysiert.

(A) Anhand einer Westernblotanalyse unter Verwendung eines Tubulin-spezifischen und eines myc-Epitop-spezifischen Antikörpers wurden die Mengen an gebildeten APLP1-APLP2-Chimären miteinander verglichen.

(B) Fixierte PC12-Zellen wurden nach Immunfärbung fluoreszenzmikroskopisch auf die Wiederherstellung des APLP1-spezifischen Phänotyps untersucht (n=6). Die Quantifizierung zeigt, dass lediglich die Chimäre mit dem von APLP1 Exon 1-6 codierten Bereich (**Ex1-6/8-18**) eine dem Wildtyp-APLP1 (**APLP1myc**) signifikant vergleichbare Menge an phänotypischen Zellen hervorruft. Die beiden anderen Chimären (**Ex1-5/Ex6-18** und **Ex1-5/Ex8-18**) zeigten hingegen keine signifikante Änderung der Menge an APLP1-spezifischem Phänotyp gegenüber der mit APLP2 (**Aplp2myc**) transfizierten Kontrolle.

Wie aus Abb3.18 ersichtlich waren Konstrukte, welche den N-Terminus von APLP1 bis einschließlich Exon 5 enthielten (Ex1-5/Ex6-18, Ex1-6/Ex8-18), funktionell inaktiv. Im Gegensatz hierzu führte jedoch die Fusion der APLP1-Exons 1 bis 6 mit dem APLP2-C-Terminus zu einer Induktion von Filopodien, die dem Effekt des Wildtyp-APLP1 entsprach. Diese Experimente zeigen somit eindrücklich, dass die APLP1-spezifische Effektor-domäne innerhalb der von Exon 5 und 6 codierten Bereiche lokalisiert sein muss.

3.4 Einfluss sezernerter APLP1-Fragmente auf die Induktion von Filopodien

Die Mitglieder der APP-Familie können von verschiedenen Sekretasen innerhalb spezifischer Bereiche geschnitten werden. Alle drei Familienmitglieder unterliegen der sogenannten α -Sekretierung, bei der eine Metalloprotease, die sogenannte α -Sekretase, den extrazellulären N-Terminus unmittelbar vor der Transmembrandomäne vom C-Terminus trennt (zur Übersicht siehe Reinhard C. et al 2005). Eine solche Prozessierung stellt neben der Transkriptions- und Translationskontrolle einen weiteren Regulationsmechanismus für die Funktion eines Proteins dar. Deshalb war zu vermuten, dass die Prozessierung des APLP1-Proteins regulatorisch auf die oben beschriebene Bildung von Filopodien wirkt und somit auf die Entstehung der Kaktuszellen Einfluss nimmt. Insbesondere die α -Sekretierung, bei der APLP1 in einen membranständigen C-Terminus und einen sekretierten extrazellulären Teil (sAPLP1) zerlegt wird, könnte somit die Funktion des APLP1 modulieren, da sie direkt das Gleichgewicht zwischen sekretiertem (sAPLP1) und noch membranständigem APLP1 (FL-APLP1) beeinflusst. Die Vermutung lag nahe, dass nur eine der beiden Formen des APLP1 (sAPLP1 oder FL-APLP1) für die Entstehung der Kaktuszellen verantwortlich ist. Da die Deletion des C-Terminus nicht zum Verschwinden des Kaktus-Phänotyps führte, wurde zunächst angenommen, dass das sekretierte sAPLP1 an einen Rezeptor bindet und die Bildung der Filopodien induziert. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden Cokultorexperimente durchgeführt, die schematisch in Abb 3.18 dargestellt sind. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden in PC12-Zellen mittels Elektroporation die unter 3.1 beschriebenen APP/APLP-Proteine zur Expression gebracht. Als Kontrolle wurde ein leerer pcDNA3.1-Vektor verwendet. Ca. 70% dieser "Spenderzellen" exprimierten jeweils eines der rekombinanten Proteine und sollten daher hohe Mengen an sekretierten Proteinfragmenten (sAPP, sAPLP2, sAPLP1) sezernieren. Parallel wurden PC12-Zellen auf Fibronectin-beschichteten Glasplättchen mittels lipofectAMINE mit Expressionsvektoren transfiziert, die für dNTPDase6 bzw. 14-3-3 ζ codierten. Hierbei wurde eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 5% erzielt. Die Glasplättchen mit diesen "Empfängerzellen" wurden 24h nach Transfektion in die Kulturschalen mit den "Spenderzellen" überführt, invertiert und kokultiviert. Um einen direkten Kontakt zwischen den "Empfänger-" und "Spenderzellen" zu verhindern wurden Abstandhalter verwendet. Nach 48h Cokultur wurden die Zellen fixiert und auf das Auftreten von Kaktuszellen analysiert.

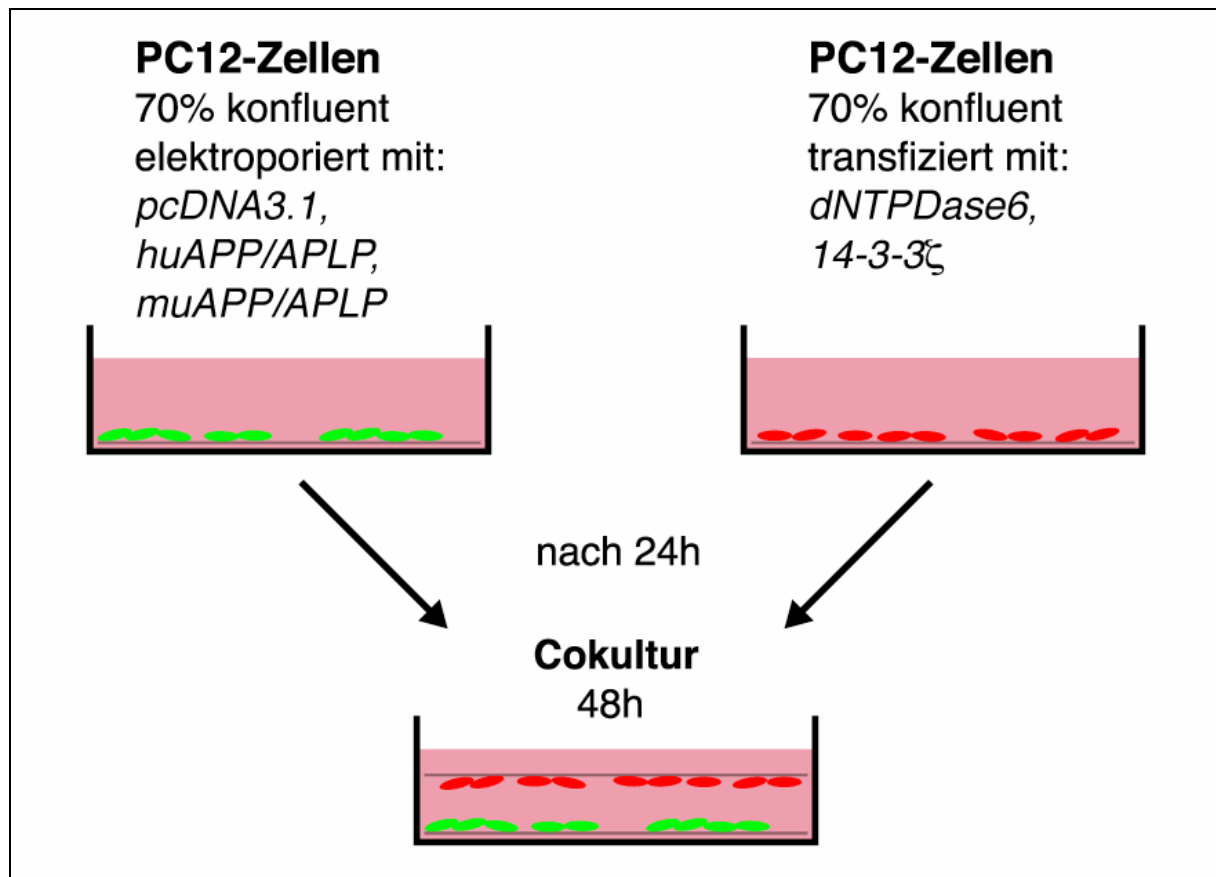


Abb3.19: Cokulturversuch transfizierter PC12-Zellen

Um die Bildung von Filopodien durch sAPLP1 zu untersuchen wurden sogenannte Spenderzellen (links, grün) mit für die Proteine der APP-Familie codierenden Plasmiden elektroporiert. Die Empfängerzellen (rechts, rot) wurden mit *dNTPDase6* bzw. *14-3-3ζ* transfiziert, um ein späteres Anfärben zu ermöglichen. Nach 24h wurden die Empfängerzellen umgekehrt in die Kultur der Spenderzellen gelegt. Um lediglich einen durch sAPLP1 vermittelten Effekt zu erfassen, wurden zwischen die Kulturen Abstandhalter eingesetzt. Nach 48h Cokultur wurden die Zellen gefärbt und auf das Auftreten von Kaktuszellen analysiert.

Die Auswertung zeigte, dass die mit *dNTPDase6* bzw. *14-3-3ζ* transfizierten Zellen nach Cokultur mit APP-, APLP1- bzw. APLP2-exprimierenden Zellen keine erhöhte Anzahl von Kaktuszellen gebildet hatten. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen reicht eine Sezernierung von sAPLP1 durch die "Spenderzellen" in das Kulturmedium der Cokultur nicht aus, um eine Morphologieänderung der "Empfängerzellen" auszulösen. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass möglicherweise nicht genügend sAPLP1 ins Medium abgegeben wurde, oder die Entstehung der Kaktuszellen nicht durch sAPLP1 hervorgerufen wird. Um weiteren Aufschluss über den Einfluss der α -Sekretierung auf die Filopodieninduktion zu erhalten sollte in einem weiteren Versuch mittels Inhibitoren die α -Sekretierung beeinflusst werden.

Im Rahmen dieses Versuches wurden PC12-Zellen, wie unter 3.1 beschrieben, mit APLP1 transfiziert und während 48h Kultur mit Metalloproteaseinhibitoren inkubiert. Zum Einsatz kamen in diesem Versuch sowohl ein genereller Metalloproteaseinhibitor GM6001 sowie ein für die α -Sekretase ADAM10 und ADAM17 spezifischer Inhibitor TAPI-2 (siehe 2.1.1.11.3). Zur Kontrolle wurden APLP1-transfizierte PC12-Zellen mit Kontrollsubstanzen inkubiert. Mit DMSO versetzte Zellen dienten als Kontrolle für den Ansatz mit TAPI-2, da dieser Inhibitor in DMSO gelöst wird. Als Kontrolle für den Ansatz mit Metalloproteaseinhibitor

GM6001 wurde äquimolar die Substanz c6001 verwendet, welcher die gegenüber den Metalloproteasen funktionell wirksame Gruppe des GM6001 fehlt. Beide Inhibitoren wurden in einer Konzentration eingesetzt (TAPI-2: 20 μ M, GM6001: 2,6 μ M), die weit über der Konzentration für den beschriebenen EC50-Werten (TAPI-2: 1,8 μ M (Camden J.M., 2005), GM6001: 0,5 μ M, siehe auch www.Calbiochem.com) liegt. Die Aktivität der α -Sekretase sollte somit gänzlich inhibiert sein.

Nach 48h Kultur wurden die Zellen wie in 3.1 fixiert, fluoreszenzmarkiert und die Morphologie der PC12-Zellen untersucht.

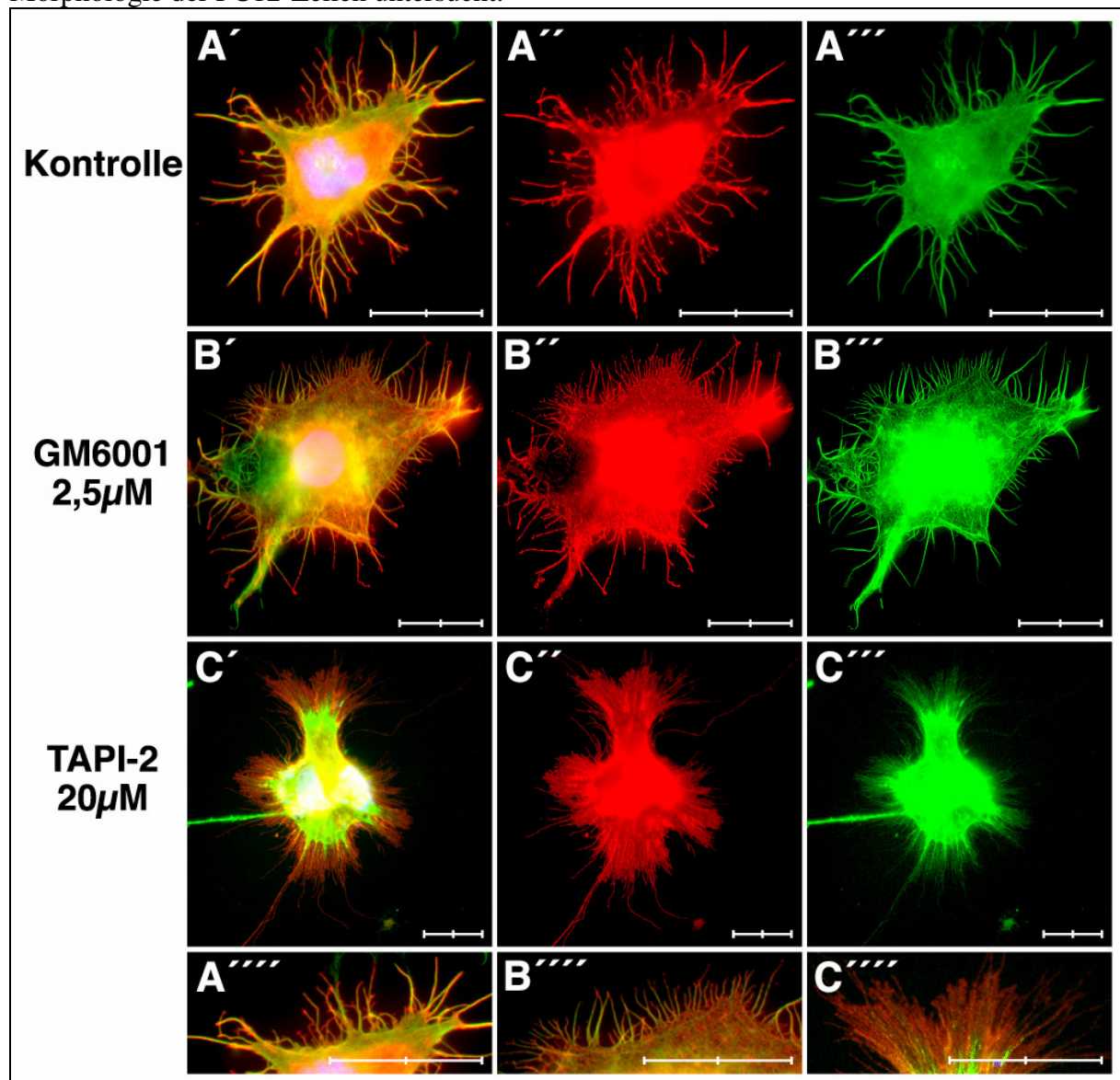


Abb3.20: Erhöhte Filopodienanzahl aufgrund inhibierter α -Sekretierung

PC12-Zellen wurden mit humanem APLP1myc transfiziert und nach 4 Stunden mit Metalloprotease-(GM6001) bzw. spezifischen ADAM-Inhibitoren (TAPI-2) versetzt. Nach 48 Stunden Kultur wurden die Zellen fixiert, gefärbt und Fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit huAPLP1 (A) transfiziert und unter normalen Wachstumsbedingungen kultiviert. Morphologische Vergleiche dieser Kontrolle mit PC12-Zellen, die nach huAPLP1-Transfektion mit den Metalloproteaseinhibitoren GM6001 (B) und TAPI-2 (C) inkubiert wurden, zeigten einen Anstieg der Menge an Kaktuszellen und der Filopodienanzahl pro Zelloberfläche. Dieser Effekt ist in den Vergrößerungen (''') visualisiert, die aus den Aufnahmen mit huAPLP1-transfizierten PC12-Zellen ohne Inhibitor, mit GM6001 oder TAPI-2 stammen.

Die abgebildeten Längenstandards entsprechen 20 μ m.

Die nach erfolgter Transfektion mit Inhibitor kultivierten Zellen zeigten gegenüber den Kontrollen mit DMSO bzw. c6001 ein signifikant häufigeres Auftreten des Phänotyps (siehe Abb3.20). Zudem zeigten die phänotypischen Zellen eine deutlich erhöhte Anzahl an Filopodien an ihrer Oberfläche. Je 6 Wiederholungen pro Ansatz wurden auf das Auftreten des Phänotyps analysiert und der prozentuale Anteil an phänotypischen Zellen miteinander verglichen.

In einer weiteren Analyse wurde die Anzahl an Filopodien pro 100µm Membran in je 6 phänotypischen Zellen pro Ansatz erfasst.

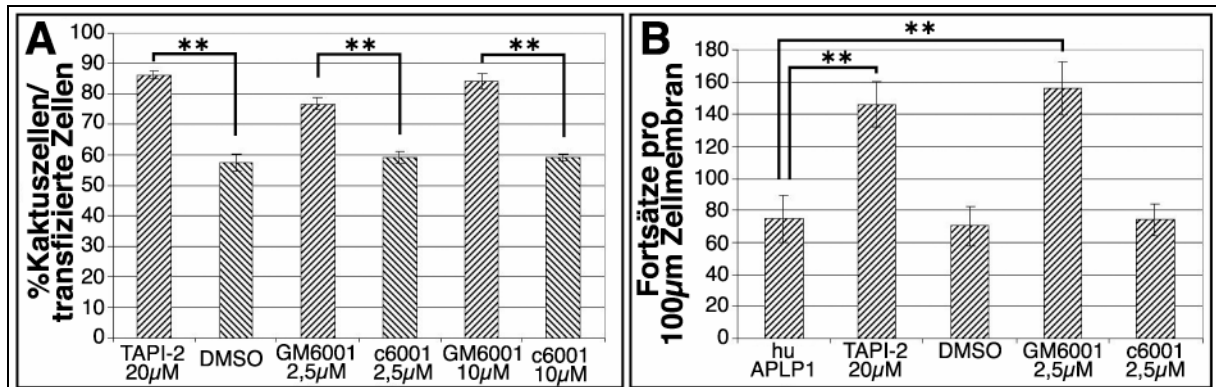


Abb3.21 Einfluss von α -Sekretase-Inhibitoren auf die Filopodiogenese

PC12-Zellen wurden mit humanem APLP1myc transfiziert und nach 4 Stunden mit Metalloprotease-(GM6001) bzw. spezifischen ADAM10-Inhibitoren (TAPI-2) versetzt. Nach 48 Stunden Kultur wurden die Zellen fixiert, gefärbt und Fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur Kontrolle wurden APLP1-transfizierte Zellen verwendet, deren Medium nur mit Lösungsmittel (DMSO) bzw. mit einer nicht inhibierenden Substanz (c6001) versetzt wurde.

(A) In allen Ansätzen mit Inhibitor zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl ($p < 0,001$) phänotypischer Zellen gegenüber den Kontrollansätzen ($n=6$).

(B) Die Inkubation mit α -Sekretaseinhibitoren führte zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) der Anzahl an Fortsätzen pro 100µm Zellmembran ($n=6$).

Wie Abbildung 3.21 zeigt, führt die Inhibierung der α -Sekretierung sowohl zu einem Anstieg an phänotypischen Zellen als auch zu einer Erhöhung der Anzahl an Fortsätzen. Da die aufgrund der Transfektion gebildete Menge an APLP1 in allen Ansätzen gleich ist, kann der Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Inhibitor lediglich auf die unterschiedlichen Prozessierungsraten des APLP1 oder eines anderen Metalloprotease-Substrates zurückgeführt werden.

Die α -Sekretierung stellt somit einen Mechanismus zur Regulation der APLP1 vermittelten Bildung von Filopodien dar. Es ist zudem zu vermuten, dass die Verankerung des APLP1 in der Membran für die Ausbildung des Phänotyps essentiell ist und nicht vom sekretierten, extrazellulären Teil des APLP1 (sAPLP1) übernommen werden kann.

3.5 Untersuchungen APLP1 induzierter Signalwege

Morphologieänderungen wie die durch APLP1 in PC12-Zellen und cortikalen Neuronen beschriebene Bildung von Filopodien benötigen neben einem Signal-induzierenden, primären Prozess (z.B. Bindung eines Liganden an einen Rezeptor) eine Weiterleitung des Signals in die Zelle, was letztendlich zu Aktinreorganisationsprozessen führt. In vielen Fällen erfolgt eine solche Weiterleitung über die Familie der kleinen G-Proteine. Diese Proteine können aufgrund ihrer Fähigkeit zur GTP- bzw. GDP-Bindung aktiviert bzw. inaktiviert werden. In der Literatur beschriebene Untersuchungen mit Aktivierungsanalysen kleiner G-Proteine und Cotransfektionen mit dominant negativen Konstrukten zeigen, dass vor allem Rho, Rac und CDC42 bei der Entstehung von Filopodien und Lamellipodien eine Rolle spielen.

Auch die durch APLP1 hervorgerufene Induktion von filopodialen Fortsätzen könnte über eines oder mehrere dieser GTP-gekoppelten Proteine von der Membran zum Zytoskelett weitergeleitet werden.

Eine Methode, um die Involvierung bestimmter G-Proteine in Signalkaskaden zu untersuchen, ist die Expression von dominant negativen Konstrukten. Die Expression eines solchen Konstruktes führt zu einer Inhibierung des endogen vorhandenen Proteins und schaltet somit den Signalweg ab. Kommt es nach der Expression eines solchen dominant negativen Konstruktes nicht zur Ausbildung des Phänotyps, so spielt das durch das dominant negative Konstrukt inaktivierte Protein vermutlich bei der Entstehung des Phänotyps eine entscheidende Rolle.

Um eine solche Involvierung eines G-Proteins bei der APLP1-vermittelten Induktion von Filopodien aufzudecken, wurden PC12-Zellen mit dominant negativen Konstrukten für die Proteine CDC42, RhoA bzw. Rac und humanem APLP1myc cotransfiziert. Neben diesen drei Ansätzen wurde in einer weiteren Cotransfektion die CDC42-Bindedomäne von WASP gemeinsam mit APLP1 transfiziert. Das hierdurch gebildete Protein legt den CDC42 vermittelten Signalweg lahm, da es das endogen vorhandene CDC42 bindet und dessen Funktion somit unterdrückt. Zur Kontrolle wurde humanes APLP1myc mit einem leeren pcDNA3.1 cotransfiziert.

Nach 48h Kultur wurden die PC12-Zellen fixiert und gegen das myc-Epitop des APLP1-Konstruktes und gegen das HA-Epitop der G-Protein-Inhibitoren fluoreszenzmarkiert. Von den so gewonnenen Präparate wurden pro Ansatz jeweils 6 x 100 Zellen im Mikroskop auf die Menge an APLP1-phänotypischen Zellen untersucht (n=6).

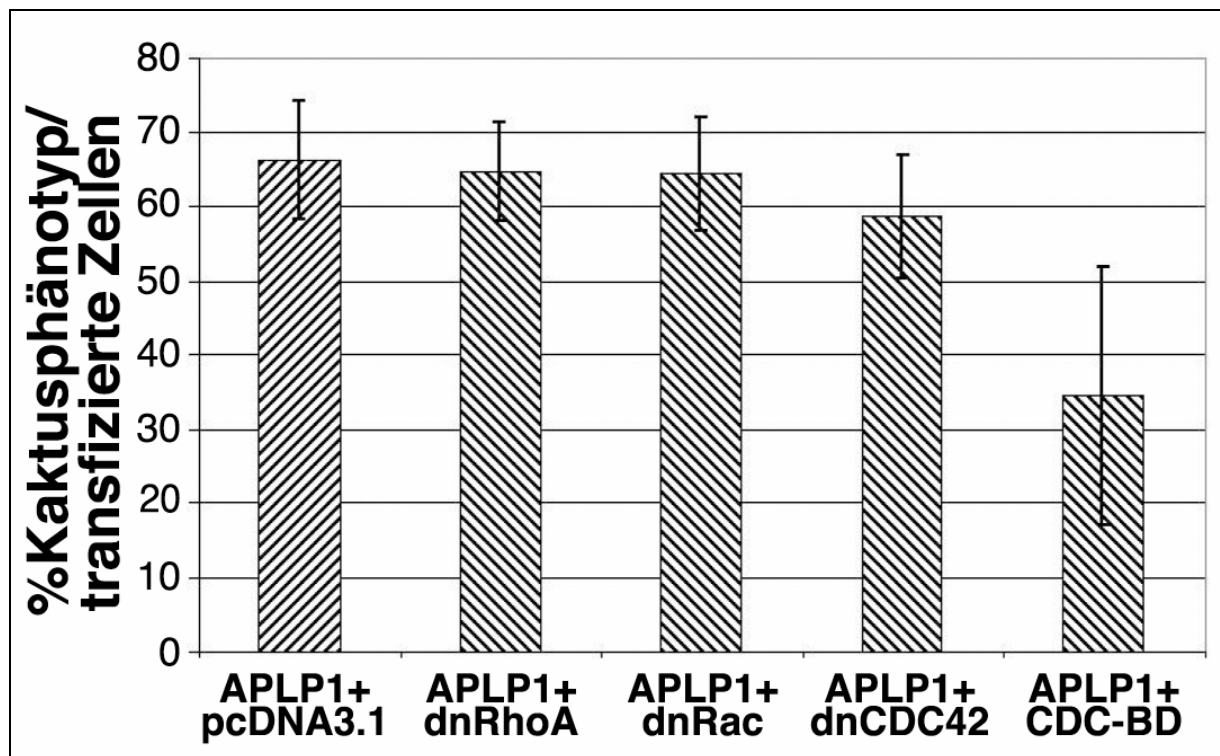


Abb3.22 Einfluss dominant negativer G-Proteine

PC12-Zellen wurden mit humanem APLP1myc (**APLP1**) und Konstrukten cotransfiziert, die unterschiedliche G-Protein-regulierte Signalwege inaktivieren. Neben 3 dominant negativen Konstrukten für RhoA (**dnRhoA**), Rac (**dnRac**) bzw. CDC42 (**dnCDC42**) wurde ein Konstrukt mit der CDC42-Bindedomäne (**CDC-BD**) in den Zellen exprimiert. Zur Kontrolle wurde in einem Ansatz zu Cotransfektion ein leerer pcDNA3.1-Vektor (**pcDNA3.1**) verwendet.

Während die Expression der dominant negativen Proteine keinen Einfluss auf die Ausbildung des APLP1-spezifischen Phänotyps zeigt, reduziert die Coexpression der CDC42-Bindedomäne das Auftreten des Phänotyp ($p > 0,05$).

Wie die Quantifizierung in Abbildung 3.22 zeigt, führt die Coexpression der dominant negativen Konstrukte für RhoA, Rac und CD42 nicht zum Rückgang der Menge an APLP1-phänotypischen Zellen. Lediglich nach der Cotransfektion von APLP1 und der CDC42-Bindungsdomäne von WASP nimmt die Menge an phänotypischen Zellen gegenüber der Kontrolle (APLP1+pcDNA3.1) ab. Diese Abnahme ist mit einem p-Wert weit über 0,05 nicht signifikant. Dennoch stellt dieses Ergebnis einen Trend dar, der indiziert, dass die Entstehung von filopodalen Fortsätzen nach APLP1-Überexpression vermutlich über einen CDC42-vermittelten Signalweg in die Zelle weitergeleitet wird.

4. Diskussion

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der pathophysiologischen Funktion der APP-Familie, insbesondere mit der Entstehung des β -Amyloid-Proteins aus seinem Vorläuferprotein APP und dessen Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit. Die physiologische Funktion dieser Proteine hingegen bleibt bisher größtenteils unverstanden. Eine Behandlung oder Prävention der Alzheimer-Krankheit, z.B. durch Beeinflussung des APP-Metabolismus, erfordert jedoch neben dem Wissen über die Ätiopathologie auch ein tiefes Wissen über die natürlichen Funktionen der Proteine der APP-Familie.

Die vorliegende Arbeit zeigt Ergebnisse, die sich mit einer solchen physiologischen Funktion des Familienmitglieds APLP1 beschäftigen. Anhand von transienten Überexpressionen der einzelnen APP/APLP-Proteine in neuronalen Zelllinien und kortikalen Neuronen wurden mögliche Auswirkungen der Familienmitglieder auf die Zellmorphologie analysiert. Die Versuche beschreiben einen Effekt von APLP1 auf die Entstehung filopodiale Strukturen. Diese Untersuchungen belegen erstmals einen für APLP1 spezifischen Effekt *in vitro*, der sowohl in neuronalen Zelllinien als auch in Nervenzellen zu beobachten ist. Eine hieraus abgeleitete Funktion des APLP1-Proteins *in vivo* wird im Folgenden diskutiert.

Wie seine Homologen APP und APLP2 verfügt das APLP1-Protein über verschiedene Domänen, denen bestimmte Interaktionen und Funktionen zugeordnet werden können (zur Übersicht siehe Coulson E.J. et al., 2000; Reinhard C. et al., 2005). Weiterführende Experimente dieser Arbeit führten zur Identifikation einer bisher unbekannt, extrazellulären Domäne des APLP1-Proteins, die für die Induktion von Filopodien verantwortlich ist. Die Lage dieser Domäne, außerhalb der in der APP-Familie hoch-konservierten Domänen DI bis DIII, belegt die Sonderstellung des APLP1 innerhalb der APP-Familie.

Diskutiert wird im Weiteren der Einfluss der α -Sekretierung auf die Induktion der Filopodien, da, wie in den Ergebnissen beschrieben, dieser Effekt *in vitro* durch membranständiges, unsekretiertes APLP1 hervorgerufen wird. Diese Beobachtungen lassen über mögliche Regulationsmechanismen der Filopodieninduktion spekulieren.

Abschließend wurden mittels dominant negativer kleiner G-Proteine erste Hinweise auf Signaltransduktionswege analysiert, die von APLP1 genutzt werden könnten, um den Prozess der Filopodien-Induktion auszulösen.

4.1 APLP1 induziert die Bildung von Filopodien in PC12-Zellen

Anhand der oben beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass APLP1 als einziges Protein der APP-Familie nach transienter Überexpression *in vitro* die Bildung zahlreicher Filopodien in PC12-Zellen induziert. Bis zu 75% der mit humanem APLP1 transfizierten Zellen konnten dem sogenannten „Kaktus-Phänotyp“ zugeordnet werden. Eine vergleichbare Transfektion mit humanem APP (770AS) und humanem APLP2 (763AS), zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zur Morphologie nicht transfizierter Zellen. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch Transfektionsversuche mit murinen Konstrukten der APP-Familie. Auch in diesen Ansätzen war lediglich APLP1 in der Lage die Bildung von Filopodien auszulösen. Die Tatsache, dass sowohl beim Einsatz der humanen als auch der murinen cDNA's nur APLP1 die Morphologie der transfizierten Zellen beeinflussen kann, lässt auf einen innerhalb verschiedener Säugetier-Spezies hoch konservierten Effekt schließen.

Während APP und APLP2 in mehreren Isoformen exprimiert werden, die sich insbesondere durch die Anwesenheit der KPI-Domäne in den längsten Splicevarianten APP₇₇₀ und APLP2₇₆₃ auszeichnen, existiert APLP1 nur in einer einzigen, die KPI-Domäne nicht enthaltenden Isoform (APLP1₆₉₅) (Coulson E.J. et al., 2000). Um einen Effekt der KPI-Domäne ausschließen zu können wurde in den Transfektionsversuchen eine KPI-negative APP-Splicevariante eingesetzt. Diese Isoform APP₆₉₅ zeigte jedoch wie die längste APP Splicevariante mit KPI-Domäne keinen Effekt auf die Induktion von Filopodien. Dieses Ergebnis indiziert, dass die Funktion des APLP1 bei der Entstehung von Filopodien nicht von KPI-negativen Splicevarianten des APP übernommen werden kann.

PC12-Zellen werden in der Neurobiologie häufig als Modellsystem für neuronale Differenzierungsprozesse eingesetzt. Diese leicht kultivierbare Zelllinie wurde aus dem Nebennierenphäochromozytom der Ratte generiert und stellt wie Neuronen einen Zelltyp dar, der einer Polarisierung unterliegt (Greene L.A. and Tischler A.S. 1976). Schon früh konnte gezeigt werden, dass NGF (engl. nerve growth factor) einen dramatischen Effekt auf den Phänotyp dieser Zellen ausübt. Die Applikation des neuronenspezifischen Wachstumsfaktors NGF resultiert unter anderem in der Bildung von neuritischen Fortsätzen und induziert die Möglichkeit der elektrischen Erregbarkeit (Greene L.A. 1984; Levi A. and Alema S. 1991). Wenngleich PC12-Zellen nicht alle Charakteristika eines Neurons wie z.B. das Auftreten spezifischer prä- und postsynaptischer Proteine zeigen, können Untersuchungen mit dieser Zelllinie Einblicke in die Polarisierung und die Physiologie von Nervenzellen liefern. Eine verstärkte Bildung von filopodialen Strukturen in dieser Zelllinie lässt vermuten, dass APLP1 eine Rolle in der neuronalen Differenzierung zukommt.

Unterstützt wird diese Annahme anhand des Expressionsprofils des APLP1-Proteins während der Entwicklung (siehe 1.2.2.). Während APP und APLP2 ubiquitär exprimiert werden, findet eine Bildung des APLP1-Proteins fast ausschließlich im Nervensystem statt, wobei die Expression von APLP1 in der Maus zwischen Embryonaltag E10 und E13 einen charakteristischen Anstieg zeigt. Während der folgenden Entwicklungsstadien steigt die Expression des APLP1 bis zur Geburt des Embryo weiter an und bleibt dann im adulten Tier konstant (Lorent K. et al. 1995). Das Zeitfenster der embryonalen APLP1-Expression fällt somit mit Prozessen der Entwicklung des zentralen Nervensystems zusammen, welche insbesondere durch das Auswachsen neuronaler Fortsätze und die Etablierung von synaptischen Kontakten und neuronalen Netzwerken gekennzeichnet ist. Diese Tatsache und

die gewebespezifische Expression unterstützen die These, dass APLP1 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Neuronen übernimmt. Auch die Ergebnisse der durchgeführten Transfektionsversuche mit APP-Familienmitgliedern in anderen nicht-neuronalen Zelllinien wie z.B. COS-Zellen, bei denen eine Induktion von Filopodien durch APLP1 nicht gezeigt werden konnte, deuten auf eine spezifische Funktion in Neuronen hin. Neben den endogenen Faktoren können Zellen in ihrer Morphologie und ihrem Wachstumsverhalten auch vom Substrat beeinflusst werden, auf dem sie kultiviert werden (zur Übersicht siehe Chothia C, Jones E.Y., 1997; Dewez J.L. et al., 1998). Um einen solchen Einfluss des Kultursubstrates zu erfassen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Substrate (Fibronectin bzw. poly-Ornithin) verwendet, die nach der Expression von APLP1 in gleicher Weise zur Filopodieninduktion führten. Obwohl der Einfluss anderer Substrate nicht systematisch untersucht wurde, scheint daher die Entstehung der Filopodien primär auf die APLP1-Überexpression zurückzuführen zu sein.

4.2 APLP1 induziert die Bildung filopodialer Strukturen in cortikalen Neuronen

Da es sich bei PC12-Zellen wie oben beschrieben um ein Modellsystem für das Wachstum und die Polarisierung von Neuronen handelt, wurden die murinen und humanen APP-Familienmitglieder anschließend in Kulturen aus dissoziierten, cortikalen Neuronen der Ratte überexprimiert. Auch im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich, dass die Transfektion von APLP1 die Morphologie der Zellen in charakteristischer Weise verändert. Nach Überexpression des APLP1 zeigten ca. 70% der transfizierten Neuronen filopodiale Aussprossungen entlang des Somas, der gesamten Länge der Neuriten und im Bereich der neuritischen Termini. Die Dichte der filopodialen Fortsätze erhöhte sich gegenüber Kontrollexperimenten um den Faktor 10 von durchschnittlich 4 Fortsätzen auf durchschnittlich 40 Fortsätze pro 100µm Membran (siehe 3.2).

Wie in den Transfektionsversuchen in PC12-Zellen wurden die Neuronen auf zwei unterschiedlichen Substraten (poly-Ornithin und Fibronectin) kultiviert, was jedoch keinen Effekt auf die Induktion von Filopodien hatte und erneut indiziert, dass das Kultivierungssubstrat primär keine Rolle bei der Entstehung des APLP1-spezifischen Kaktus-Phänotyps spielt.

Bei den verwendeten cortikalen Neuronen der Ratte handelt es sich um eine Mischkultur unterschiedlicher Nervenzellentypen, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme (E18,5) bzw. der Transfektion im Stadium der Differenzierung befanden. Insbesondere der zum Cortex gehörende Hippocampus zeigt in diesem Stadium eine Vielzahl von Pyramidalneuronen, die bereits ein Axon und Anlagen von Dendriten gebildet haben (Schlessinger A.R. et al. 1978; Bayer S.A. 1980; Gary Banker and Goslin 1998). Die Neuronen befanden sich somit zum Zeitpunkt der Entnahme in dem Stadium, in dem für APLP1 ein charakteristischer Anstieg der Expression beobachtet werden konnte (siehe 4.1; Lorent K. et al. 1995).

Die Entstehung von Filopodien auf der Membran von sich entwickelnden und adulten Neuronen wird mit unterschiedlichen Prozessen in Verbindung gebracht. Filopodien sind hoch-dynamische Strukturen die aus Aktin-Filamenten aufgebaut sind. Parallel gebündelte Aktin-Moleküle bilden das Grundgerüst eines Filopodiums. Bei der Entstehung einer solchen Struktur lagert sich F-Aktin an das schnell wachsende Ende einer Aktinfaser an und die Aktinfaser drückt gegen die Plasmamembran. Aufgrund einer fortschreitenden Verlängerung dieser Aktinfaser wird die Zellmembran ausgestülpt und es entsteht ein dünner Fortsatz auf

der Membran einer Zelle. Filopodien treten auf einer Vielzahl von Zellen auf und sind meist der Beginn von Differenzierungs- bzw. Migrationsprozessen. So formieren sich zahlreiche Filopodien auf den Wachstumskegeln von Axonen bei der Suche nach somatodendritischen Kontakten. Auch die Bildung von sogenannten „microspikes“ auf Neuriten und die primären Prozesse, die zur Entstehung einer Synapse führen, starten mit der Ausbildung dieser von paarweise gebündelten Aktinfilamenten durchzogenen Strukturen (Faix J. et al. 2006; Winder S.J. 2004; Svitkina T.M. 2003). Nicht zuletzt beginnt auch die Entstehung der Neuriten selbst, welche sich später in Dendriten und Axon differenzieren, mit der Bildung von Filopodien (Craig A.M. and Banker G., 1994). Welchem dieser Prozesse die APLP1-spezifische Induktion von Filopodien nach transienter Überexpression entspricht bzw. als Modell fungieren könnte, bleibt jedoch bisher ungeklärt. Da die durchgeführten Scholl-Analysen (siehe 3.2) weder eine Zunahme der Dendritenzahl noch ein verstärktes Längenwachstum der Neuriten erkennen ließ, konnte eine Beteiligung von APLP1 bei der Entstehung bzw. Verzweigung von Neuriten in Neuronen des Embryonalstadiums E 18.5 nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass APLP1 zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung an der Entstehung von Neuriten beteiligt sein könnte.

Interessanterweise werden die Proteine bzw. die sekretierten Fragmente der APP-Familie mit zahlreichen der oben erwähnten Prozesse in Verbindung gebracht (zur Übersicht siehe Reinhard C. et al., 2005). *In vitro*-Experimente zeigen, dass rekombinantes, substratgebundenes sAPP und sAPLP2 die Anzahl und Länge von Neuriten erhöhen kann (Cappei R. et al., 1999). Bestätigt werden diese Beobachtungen durch Versuche in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, bei der das einzige APP/APLP-Homolog APPL ausgeschaltet wurde. Nach Überexpression von APPL bzw. humanem APP₆₉₅ in diesen Tieren zeigte sich, dass sogenannte sLN-Neuronen (engl. *small lateral neurons*) des Gehirns sich stärker verzweigten und längere Axone bildeten (Chen Y. and Tang B.L. 2006). Diese Beobachtungen belegen, dass Proteine der APP-Genfamilie unterschiedliche Prozesse bei der Differenzierung von Neuronen beeinflussen. Inwiefern das APLP1-Protein an einem dieser Prozesse beteiligt ist, konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Aufgrund der hohen Homologie des APLP1-Proteins zu den Proteinen APP, APLP2 und besonders APPL (siehe 1.3) liegt die Vermutung nahe, dass APLP1 ebenfalls die Differenzierung von Neuronen beeinflussen kann.

Ein weiterer Prozess, bei dem die Proteine der APP-Familie beteiligt sind, ist die Bildung von Synapsen und die Modulation der synaptischen Plastizität (Turner et al., 2003; Kim T.W. et al. 1995; Kamal A. et al. 2000; Gunawardena S. and Goldstein L.S.B. 2001; Müller U. and Kins S. 2002; Adlerz I. et al., 2003). Insbesondere die Tatsache, dass APLP1 sich in die Membran von Postsynapsen einlagert (Kim T.W. et al. 1995), lässt vermuten, dass APLP1 an der Entstehung von Synapsen beteiligt ist. Es wäre denkbar, dass der beobachtete Effekt von APLP1 auf die Induktion von Filopodien *in vitro* einen Prozess *in vivo* widerspiegelt, bei dem die Einlagerung von APLP1 in die Membran eines Neuriten zur Entstehung einer filopodialen Struktur führt, aus der sich im Weiteren eine präsynaptische oder postsynaptische Struktur entwickelt. Es wäre daher interessant, in weiterführenden Experimenten, z.B. in hippocampalen Schnittkulturen APLP1 über einen längeren Zeitpunkt zu exprimieren und potentielle Effekte auf die Synaptogenese zu untersuchen.

Die Tatsache, dass auf der gesamten Membran der Neuronen Filopodien entstehen, muss auf die Überexpression zurückgeführt werden, wobei relativ zum endogenen Expressionsniveau eine deutlich höhere Menge an APLP1-Protein in den transfizierten Zellen gebildet wird. Unter physiologischen Bedingungen könnte die Anreicherung von APLP1 in einem

bestimmten Membranbereich zur Entstehung einer filopodialen Struktur führen. Dieser Initiationsprozess könnte dann unter Beteiligung weiterer regulatorischer Proteine zur Ausbildung einer Synapse führen. Eine Erhärtung der These, dass die beobachtete Induktion von Filopodien durch Überexpression von APLP1 der physiologischen Funktion dieses Proteins bei der Synaptogenese entspricht, erfordert jedoch weitere Untersuchungen. Insbesondere wäre eine detaillierte Analyse von APLP1-, bzw. APP/APLP1 oder APLP2/APLP1-defizienten Schnittpräparaten bezüglich möglicher Defekte der Synaptogenese interessant. Bisher durchgeführte Untersuchungen (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004) beschränkten sich lediglich auf eine grobmorphologische Charakterisierung der APLP1^{-/-} bzw. der APP^{-/-}/APLP1^{-/-}-Knockoutmäuse. Zudem stellt sich die Frage, welche Bereiche des APLP1 für die Bildung der filopodialen Strukturen essentiell sind.

4.3 APLP1 induziert die Neuritogenese unabhängig vom zytoplasmatischen YENPTY-Bindemotiv und dessen Interaktionspartnern

Prinzipiell besitzt APLP1 aufgrund seiner Rezeptor-ähnlichen Struktur die Möglichkeit extrazelluläre Stimuli ins Zellinnere zu vermitteln. Für das APLP1-Homolog APP konnte gezeigt werden, dass an die extrazelluläre Domäne des Proteins Heparin, Collagen, Heparansulphatproteoglycane, Kupfer, Zink und und F-Spondin binden können (siehe 1.2.1). Identische Bindungstellen kommen auch in der extrazellulären Domäne des APLP2 vor. Lediglich für APLP1 konnten bisher nur die Domänen identifiziert werden, die Zink, Heparin und Kollagen binden (zur Übersicht siehe Coulson E.J. et al., 2000). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass der extrazelluläre N-Terminus von APLP1 mit dem Alpha(2A)-adrenergic Rezeptor interagieren kann (Weber B., 2006). Obwohl also für APLP1 bisher kaum extrazelluläre Liganden identifiziert wurden, wäre es durchaus denkbar, dass APLP1 einen extrazellulären Stimulus von außen über eine intrazelluläre Interaktion auf das Zytoskelett überträgt und somit eine Morphologieänderung der Zelle induziert wird. Ein solcher Mechanismus wäre bei der beobachteten Induktion von Filopodien möglich. APLP1 würde in diesem Fall die Funktion eines Rezeptors übernehmen, der ein extrazelluläres Signal z.B. anhand einer Konformationsänderung auf den intrazellulären C-Terminus weiterleitet. Eine nun folgende Interaktion dieses C-Terminus mit weiteren Signalisierungsproteinen würde letztendlich in der Bildung filopodialer Strukturen resultieren.

Die Entstehung eines Filopodiums beginnt mit der Aktivierung Aktin-modulierender Faktoren und löst somit Aktinreorganisationsprozesse aus. Die intrazellulären C-Termini der APP/APLP-Proteine besitzen die Fähigkeit, über ihre YENPTY-Domäne mit unterschiedlichen Proteinen zu interagieren (zur Übersicht siehe Reinhard C. et al., 2005). Eine solche Interaktion der zytoplasmatischen Domäne des APLP1 und des Adaptorproteins Fe65 (Fiore F. et al. 1995), welches wiederum mit Mena interagiert (Gertler F.B. et al. 1996; Ermekova K.S. et al. 1997), könnte ein von APLP1 ausgehendes Signal zum Aktinzytoskelett weiterleiten. Mena, welches zur Ena/VASP-Familie gehört, bewirkt nach Überexpression eine verstärkte Bildung filopodialer und lamellipodialer Strukturen (Gertler F.B. et al. 1996). Somit ließe sich die beobachtete Induktion von Filopodien über einen Fe65-vermittelten Effekt auf Mena erklären.

Um eine solche Induktion der Filopodien zu untersuchen, wurden Versuche mit C-terminalen Deletionskonstrukten durchgeführt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Deletion des APLP1-C-Terminus inklusive der YENPTY-Domäne die Entstehung des Kaktusphänotyps nicht verhindert. Somit muss die These, dass APLP1 die Induktion von Filopodien verursacht, indem der C-Terminus des überexprimierten Proteins die Aktinreorganisation über einen Fe65-vermittelten Effekt auf Mena auslöst, verworfen werden.

Dieses Ergebnis spricht gleichzeitig gegen einen Einfluss anderer an das YENPTY-Motiv bindender Interaktionspartner wie z.B. Dab1 oder MintX1/X11. Auch die Möglichkeit der Bindung von Fe65 an die durch γ -Sekretasespaltung gebildeten APLP1 intrazellulären Domänen ALID (engl. APLP intracellular domain), die zu einer Translokation in den Zellkern und letztendlich zu einem veränderten Expressionsprofil der Zelle führt, scheint somit ausgeschlossen.

Diese Ergebnisse sind jedoch konsistent mit der Beobachtung, dass nur APLP1, nicht aber APP oder APLP2 in der Lage sind, den Kaktus-Phänotyp hervorzurufen. Wäre das vermehrte Auftreten der YENPTY-Domäne des überexprimierten APLP1 der alleinige Grund für die Induktion der Filopodien, hätten auch die Ansätze mit APP und APLP2 die Induktion von Filopodien auslösen müssen, da alle Proteine der APP-Familie dieses C-terminal gelegene Motiv besitzen.

Die Filopodien-induzierende Domäne muss also innerhalb der APLP1-Ektodomäne liegen und das durch eine Interaktion dieser Domäne ausgelöste Signal kann nicht über den C-Terminus des überexprimierten APLP1 in die Zelle übertragen werden.

4.4 Die Filopodien-induzierende Domäne des APLP1 liegt innerhalb der Ektodomäne

Die Tatsache, dass offenbar große Teile des zytoplasmatischen Bereichs des APLP1 deletiert werden können, ohne dass die Fähigkeit zur Induktion von Filopodien verloren geht, begründete die Suche nach einer Domäne innerhalb des extrazellulären N-Terminus.

Um die Filopodien-induzierende Domäne lokalisieren zu können, wurden zunächst N-terminal deletierte APLP1-Proteine zur Überexpression in PC12-Zellen gebracht (siehe 3.3.2). Eine Deletion des N-Terminus im Bereich der von Exon 1 bis Exon 4 codierten Bereiche zeigte, dass dieser Bereich nicht essentiell für die Induktion der Filopodien ist. Die statistische Auswertung der Transfektionsversuche mit diesen Konstrukten ergab, dass der Kaktus-Phänotyp mit derselben Häufigkeit (ca.70%) auftrat wie nach der Transfektion mit den wt-Konstrukten. Erst die Deletion der von Exon 1 bis 5 codierten Bereiche führte zum Ausbleiben des Phänotyps. Auch weiterreichende N-terminale Deletionen zeigten wie die Kontrollversuche mit APP und APLP2 keine erhöhte Filopodieninduktion. Die Filopodien-induzierende Domäne muss demzufolge C-terminal der von Exon 4 codierten Bereiche des APLP1-Proteins liegen. Eine weitere Eingrenzung der Lage lediglich aufgrund dieser Versuche ist jedoch nicht möglich. Das Ausbleiben des Kaktus-Phänotyps durch die Deletion der von Exon 5 codierten Region könnte auf dem Fehlen der Filopodien-induzierenden Domäne beruhen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass diese Domäne weiter C-terminal liegt und die deletierte Region als Struktur-gebendes Element z.B. für die Bindung an einen Rezeptor nötig ist.

Um die Filopodien-induzierende Domäne weiter eingrenzen zu können, wurden daher im Folgenden Transfektionsversuche mit APLP1/APLP2-Chimärproteinen durchgeführt (siehe 3.3.3). Hierbei zeigte sich, dass Konstrukte, die die von Exon 1 bis Exon 5 codierte APLP1-Region fusioniert mit dem C-terminalen Bereich des APLP2 enthielten, nicht ausreichen um die Bildung von Filopodien zu induzieren. Erst die Verwendung eines weiteren Konstruktes (Ex1-6/Ex8-18), welches die von Exon 1 bis Exon 6 codierten APLP1-Regionen in Verbindung mit dem C-terminalen Bereich von APLP2 exprimiert, führte zu einer dem nativen APLP1 vergleichbaren Phänotyp.

Fasst man die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen mit N-terminalen Deletionen und APLP1/APLP2-Chimären zusammen, so muss die dem Kaktus-Phänotyp zu Grunde liegende, Filopodien-induzierende Domäne innerhalb der von Exon 5 und 6 codierten Region liegen, wobei jedoch Exon5 eher eine strukturgebende Funktion zukommt, da wie in den Versuchen mit den APLP1/APLP2-Chimären gezeigt Exon5 nicht ausreicht, um die Entstehung von Filopodien zu induzieren.

Den größten Teil dieses 107 Aminosäuren umfassenden Bereichs macht der C-Terminus der DI-Domäne mit seiner Kupfer-Bindestelle aus. Der kleinere Teil dieses Peptidbereichs liegt innerhalb der „sauren Domäne“, die eine hohe Dichte negativ geladener Aminosäuren aufweist (siehe Abb 4.1). Bisher ist über die Funktion dieser sauren Domäne nur sehr wenig bekannt. Innerhalb der APP-Genfamilie wurde bisher lediglich für die saure Domäne von APP ein funktioneller Effekt beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich des APP die Apoptose von Gliazellen induziert (Sun K.H. et al., 2004).

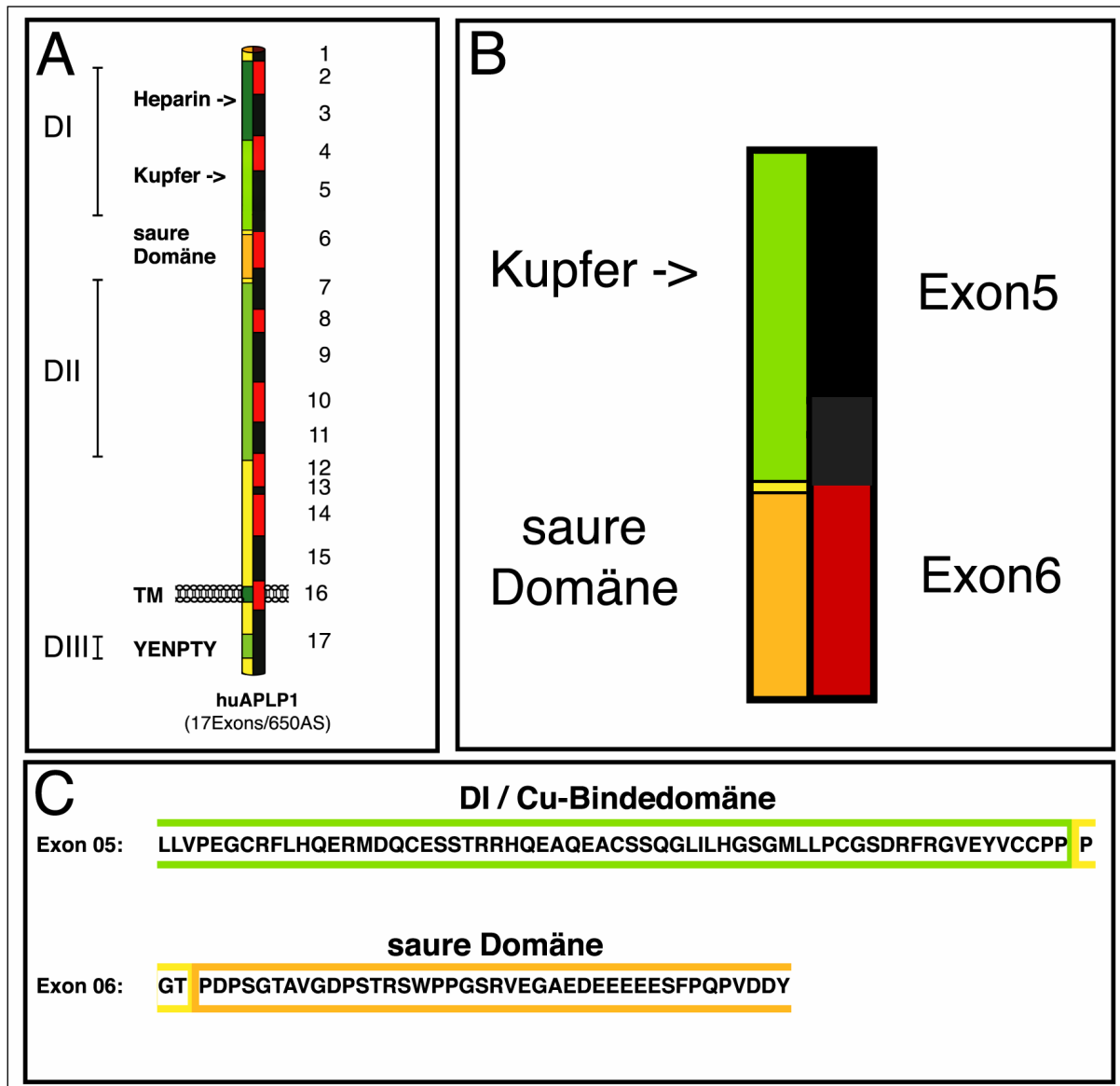


Abb4.1: Lage der Filopodien-induzierenden APLP1-Domäne

(A) Schematische Darstellung des APLP1-Proteins.

Gezeigt sind bisher identifizierte Domänen (DI bis DIII) sowie funktionelle Bereiche (**Heparin**: Heparin-Bindung; **Kupfer**: Kupfer-Bindung;; saure Domäne; **TM**: Transmembrandomäne; **YENPTY**-Domäne). Die einzelnen durch die Exons 1 bis 17 kodierten APLP1-Bereiche sind räumlich hierzu abgebildet.

(B) Funktionelle Domänen innerhalb der von Exon 5 und 6 codierten Bereiche

Während Exon 5 (**schwarz**) hauptsächlich für den C-Terminus der Kupfer-Bindedomäne (**Kupfer**, **grün**) codiert, trägt Exon 6 (**rot**) die genetische Information für einen Bereich des APLP1, der eine hohe Anzahl saurer Aminosäurereste aufweist (**saure Domäne**, **orange**).

(C) Primäre Aminosäuresequenz der von Exon 5 und 6 codierten Bereiche des humanen APLP1

Die Abbildung zeigt die Lage des C-Terminus der Kupfer-Bindedomäne (**grün**) und des N-Terminus der sauren Domäne (**orange**) innerhalb der von Exon 5 und 6 codierten APLP1-Bereiche.

Die für die Induktion der Filopodien verantwortlichen Aminosäuren müssen innerhalb dieses APLP1-Abschnitts liegen.

Wie oben beschrieben liegen die von Exon 5 codierten Bereiche des APLP1 innerhalb der DI-Region. Diese Region gehört zu 3 Domänen der APP-Familie, die evolutionär hoch konserviert sind. Da APP und APLP2 nicht in der Lage sind, die Bildung von Filopodien zu induzieren, obwohl sie innerhalb des durch Exon5 codierten Bereiches hohe Homologien zu

APLP1 aufweisen (bis zu 73%), liegt die Vermutung nahe, dass die Filopodien-induzierende Domäne nicht innerhalb dieses Abschnitts von APLP1 zu suchen ist. Vielmehr ist zu vermuten, dass diese Domäne innerhalb der sauren Domäne von APLP1 liegt.

Vergleicht man die primäre Aminosäuresequenz aller murinen und humanen APP/APLP-Proteine, fällt auf, dass die Familienmitglieder innerhalb dieser sauren Domäne stark divergieren (siehe Abb 4.2).

	Exon5
huAPLP1	LLVPE GCRFLHQERMDQCESSTRRHQEAQEACSSQGLILHGS GMLLPCGSDRFRGVEYVCCPP
muAPLP1	LLVPE GCRFLHQERMDQCESSTRRHQEAQEACSSQGLILHGS GMLLPCGSDRFRGVEYVCCPP
huAPP	LLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFRGVEYVCCPL
muAPP	LLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFRGVEYVCCPL
huAPLP2	LLVPEKQFFHKERMEVCENHQHWHTVVKEACLQGMTLYSYGMLLPCGVDQFHGTEYVCCPQ
muAPLP2	LLVPDNCQFFHKERMEVCEKHQRWHTLVKEACLTEGLTLYSYGMLLPCGVDQFHGTEYVCCPQ
consensus	LLVP C FLHQERMDVCE H WHT AKEACS G LH YHMLLPCG D FRGVEYVCCP

	Exon6
huAPLP1	PGT P DSGTAVGDPS-TR S W P PGSR---VE G AE-----DEEE E SFPQ P VDD Y
muAPLP1	PAT P N P SGMAAGDPS-TR S W P L G GR---A E GGE-----DEEE V ESFPQ P VDD Y
huAPP	AEESDNVDSADAEEEDSDVWGGADTDYADGSEDKVVEVAEEEEVAEVEEEAD-
muAPP	AEESDSVDSADAEEEDSDVWGGADTDYADGGEDKVVEVAEEEEVADVEEEAD-
huAPLP2	TKIIGSVSKEEEEEDEEEEEDEEEDYDVYKS----EFPTEADLEDFTEAAVDE
muAPLP2	TKTVDS DSTMSKEEEEEDEEEEEDEEEDYDLDKS----EFPTEADLEDFTEAAVDE
consensus	D A EE W G DY G EDK V E EEE E F E D

Abb4.2: Vergleich der primären Aminosäuresequenz der Filopodien-induzierenden APLP1-Domäne mit homologen Bereichen der murinen und humanen APP-Familienmitglieder

Gezeigt ist ein Homologievergleich der Exons 5 und 6 des murinen und humanen APLP1 (**mu** bzw. **hu**APLP1) mit entsprechenden Bereichen der murinen und humanen APP- bzw. APLP2-Proteine (**mu** bzw. **hu** APP/APLP2). Während der durch Exon5 codierte APLP1-Proteinabschnitt eine hohe Konservierung innerhalb der APP-Familie aufzeigt, ist der durch Exon 6 codierte Abschnitt hoch divergent gegenüber den beiden weiteren APP-Familienmitgliedern. Aminosäurereste innerhalb der APLP1-Struktur, die keinerlei Homologie zeigen, sind rot hervorgehoben.

Interessanterweise identifiziert der Homologievergleich des murinen und humanen APLP1 lediglich 3 Aminosäuren, die innerhalb der sauren APLP1-Domäne divergieren. Dies erklärt möglicherweise, warum die Proteine beider Spezies die Bildung von Filopodien in PC12-Zellen und corticalen Neuronen auslösen. Welche Aminosäuren innerhalb der diskutierten Region tatsächlich für die Induktion der Filopodienbildung verantwortlich sind, bedarf weiterführender Untersuchungen.

Die an der Filopodieninduktion beteiligten Aminosäuren müssen jedoch innerhalb dieser Region liegen, da bereits die Deletion des von Exon1-5 codierten Bereiches zum Verlust des Kaktus-Phänotyps führt, aber erst das APLP1/APLP2-Chimärprotein mit der von Exon 1 bis Exon 6 codierten Region die Entstehung des Kaktusphänotyp wiederherstellen kann. Die Schlussfolgerungen aus dem Homologievergleich lassen vermuten, dass die von Exon 5 codierte Region für die Konformation des APLP1-Proteins essentiell sind und die bezüglich der Induktion von Filopodien essentiellen Aminosäuren innerhalb der von Exon 6 codierten Region liegen.

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen könnten Mutationen bestimmter Sequenzabschnitte oder gar einzelner Aminosäuren eine noch präzisere Lokalisation der spezifischen APLP1-Domäne ermöglichen. Auch die Aufklärung der räumlichen Struktur des

APLP1-Proteins wäre ein geeignetes Mittel zur Identifikation der Filopodien-induzierenden Domäne.

Um Aussagen über die räumliche Struktur eines Proteins treffen zu können, werden Proteine oder Teilstücke kristallographischen bzw. Röntgenstrukturanalysen unterzogen. Während für die beiden APLP-Proteine zur Zeit noch keine Strukturdaten vorhanden sind, beschreiben mehrere Veröffentlichungen die Konformation bestimmter APP-Fragmente. Anhand von Homologievergleichen konnte die Struktur des Signalpeptides und der Transmembranregion als α -Helix beschrieben werden. In zwei unabhängigen Arbeiten wurden Bereiche der hoch konservierten Domäne DI analysiert. Diese Ergebnisse lieferten Aufschluss über die tertiäre Struktur der Heparin- und der Kupfer-Bindedomäne (Rossjohn J. et al. 1999; Barnham K.J. et al. 2003). Auch die DII-Domäne des APP konnte inzwischen in ihrer Konformation bestimmt werden (Dulubova I. et al. 2004; Wang Y. and Ha Y. 2004). Bei diesen Bereichen des APP handelt es sich um hoch konservierte Abschnitte, die allen Familienmitgliedern gemeinsam sind. Daher ist zu erwarten, dass die für APP beschriebenen räumlichen Strukturen dieser Teilstücke auch auf APLP1 anwendbar sind. Sämtliche zwischen diesen Subdomänen liegenden Bereiche sind jedoch bisher in ihrer räumlichen Struktur nicht analysiert.

Verbindet man die bisher bekannten Strukturdomänen, zeigt sich, dass die Filopodien-induzierende Domäne zwischen zwei Bereichen liegt, die globuläre Strukturen ausbilden (siehe Abb 4.3).

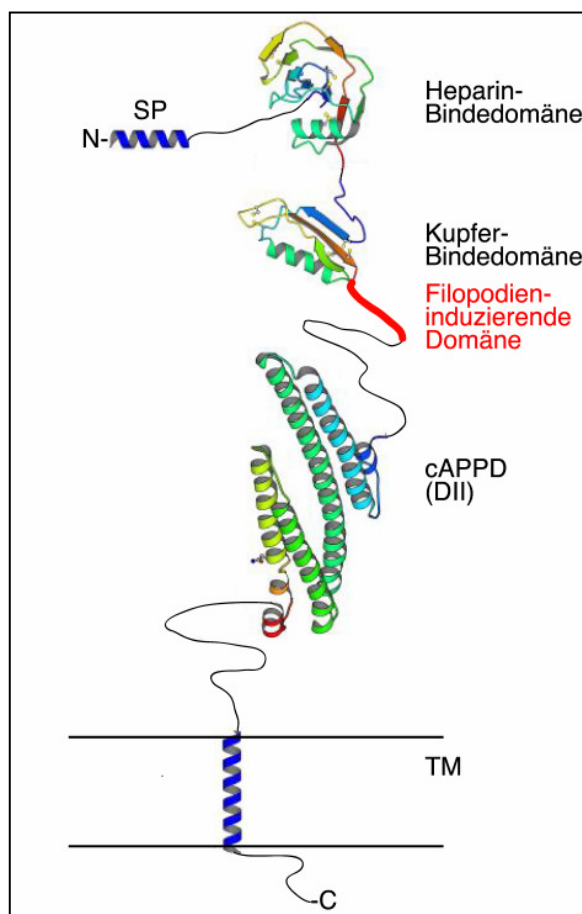


Abb4.3: Lage der Filopodien-induzierenden Domäne in Bezug zu bisher charakterisierten APLP1-Bereichen

Die schematische Darstellung des APLP1-Proteins zeigt die Lage der Filopodien-induzierenden Domäne im Vergleich zu bereits funktionell und räumlich charakterisierten Domänen (**SP**: Signalpeptid; **Heparin-Bindedomäne**; **Kupfer-Bindedomäne**, **cAPPD**: engl. conserved APP domain.; **TM**: Transmembrandomäne) Diese in ihrer tertiären Aminosäurestruktur abgebildeten Bereiche wurden aufgrund ihrer hohen Homologie innerhalb der APP-Familie aus Strukturanalysen des APP-Proteins übernommen.

Die für die Induktion der Filopodien verantwortlichen Aminosäuren des Exon 6 (rot) liegen C-terminal der Kupfer-Bindedomäne und sind über einen relativ großen strukturell bisher nicht näher charakterisierten Proteinbereich mit der cAPPD verbunden.

(zusammengestellt aus (Rossjohn J. et al. 1999; Barnham K.J. et al. 2003; Dulubova I. et al. 2004; Wang Y. et al. 2004)

4.5 Sekretierung als Modulator der Induktion von Filopodien?

Die Funktionalität der C-terminalen Deletionsmutanten (siehe 4.3) und die Lokalisation der essentiellen Domänen innerhalb Exon 5 und 6 eröffnet prinzipiell 3 denkbare Modelle einer Signaltransduktion, bei der die Filopodien-induzierende Domäne des APLP1 die Entstehung von Filopodien auslöst:

A.) Die sekretierte Ektodomäne des APLP1 (sAPLP1) ist das funktionelle Fragment. Dieses Teilstück kann nach erfolgter Sezernierung an einen bisher unbekanntem Rezeptor binden. Vom Rezeptor wird ein Signal in die Zelle geleitet und die Bildung der Filopodien ausgelöst.

B.) Das membranständige, nicht sekretierte APLP1 interagiert in *trans* mit Rezeptoren auf einer benachbarten Zelloberfläche. Diese Interaktion ist der Beginn einer Signalkaskade die zur Entstehung der Filopodien führt.

C.) Membranständiges APLP1 interagiert in *cis* mit Membranproteinen der gleichen Zelle.

Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden wurden zunächst Cokultorexperimente von APLP1-überexprimierenden HEK293T-Zellen („Spenderzellen“) mit untransfizierten PC12-Zellen als „Empfängerzellen“ durchgeführt, wodurch jedoch keinerlei Filopodieninduktion erzielt werden konnte. Wenngleich diese Daten einen wesentlichen Beitrag von sAPLP1 zur beobachteten Filopodieninduktion sehr unwahrscheinlich erscheinen lassen, kann ein derartiger *trans*-Effekt nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Möglicherweise wurde trotz starker Überexpression von APLP1 von den Spenderzellen keine ausreichende Menge an sekretiertem APLP1 im Medium produziert, um die Induktion von Filopodien auf der Membran der Empfängerzellen auszulösen.

Interessanterweise zeigte die Behandlung mit den Metalloprotease-Inhibitoren TAPI-2 und Galardin, die insbesondere die α -Sekretasen inhibieren, einen signifikanten Anstieg der Filopodienanzahl (bis zu 300% gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor) und der Anzahl phänotypischer Zellen (bis zu 150% gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor). Diese Daten sprechen wie die Cokulturversuche gegen eine dominante Rolle des sAPLP1 und stützen einen über membranständiges, unsekretiertes APLP1 vermittelten Mechanismus. Je mehr membranständiges APLP1 vorhanden ist, umso stärker scheint die Zelle zur Bildung von Filopodien angeregt zu werden.

Hierbei könnte der Spaltung von membranständigem APLP1 durch α -Sekretasen eine regulatorische Rolle zukommen. Im Gegensatz zur Regulation der Expression, Transkription und dem Transport zur Membran greift dieser Prozess am Ende des APLP1-Metabolismus, wenn das Protein bereits in die Membran inseriert wurde. Insbesondere während der Entwicklung und der zielgerichteten Polarisierung einer Zelle ist so eine Regulation möglich, die einen durch membranständiges APLP1 ausgelösten Prozess relativ zügig verstärken, vermindern oder gänzlich abschalten könnte.

Ein derartiger Regulationsmechanismus durch α -Sekretasen konnte kürzlich für das neuronale Adhäsionsmolekül L1 gezeigt werden. L1 kann durch die beiden α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 prozessiert werden und die Sezernierung der extrazellulären Domäne spielt eine regulatorische Rolle bei der Zelladhäsion, der Zellmigration und dem Auswachsen von Neuriten (Maretzky T. et al., 2005).

Die These, dass der α -Sekretierung eine regulatorische Rolle beim beobachteten APLP1-spezifischen Phänotyp zukommt, wird unterstützt von Beobachtungen, die zeigen, dass in PC12-Zellen nach Differenzierung durch Retinsäure sowohl die Expression der α -Sekretasen als auch die Expression des Substrates APLP2 induziert wird (Endres K. et al., 2005).

Inwiefern eine durch Differenzierungsprozesse regulierte α -Sekretase-Induktion in ähnlicher Weise die Filopodienbildung in PC12-Zellen oder Neuronen moduliert, könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.6 Mögliche Signalübertragungswege der APLP1-induzierten Filopodiengese

Eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege wird mit der Entstehung filopodialer Strukturen in Verbindung gebracht. Die meisten dieser Signalwege sind durch die Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie charakterisiert (Meyer G. and Feldman E.L. 2002; Heo W.D. and Meyer T. 2003; Govek E.E. et al. 2005). Ein besonders gut beschriebener Mechanismus ist die Formation von Filopodien mittels CDC42, einer GTPase, die direkt mit den Proteinen der WASP-Familie WASP (engl. Wiskott-Aldrich syndrom protein) und N-WASP (engl. neural WASP) interagieren kann. Aufgrund der Bindung des CDC42-Proteins kann WASP seinerseits den sogenannten Arp2/Arp3-Komplex aktivieren. Dieser Komplex bindet sodann an existierende Aktinfasern, erlaubt die Anlagerung weiterer Aktin-Moleküle, führt dann zur Verzweigung der bisherigen Aktinfasern und kann somit der Ausgangspunkt für die Entstehung eines Filopodiums sein (Svitkina T.M. et al., 2003).

Alternativ zum CDC42-WASP-Arp2/Arp3-Signalweg kann die Verzweigung der Aktinfasern auch durch sogenannte Formine ausgelöst werden. CDC42 kann mit mDia2/Drf3 (engl. mouse Diaphanous 2/Diaphanous related formin 3) direkt interagieren und diese Proteine aktivieren. Diese Aktivierung löst wie die Aktivierung von Asp2/Arp3 die Verzweigung von Aktinfasern aus. Neben CDC42 können aber auch weitere G-Proteine der Rho-Familie z.B. Rif (engl. Rho in filopodia) und RhoD an Dif3 binden und dieses aktivieren (Pellegrin S. and Mellor H., 2005, Faix J. and Rottner K., 2006).

Neben Initiationsprozessen erfordert das Wachstum von Filopodien Verlängerungs- und Stabilisierungsprozesse. Aktinfasern können an ihrem schnellwachsenden Ende sogenannte „capping“-Proteine binden, die eine weitere Anlagerung von F-Aktin und damit die Filopodienverlängerung unterbinden. Gegenspieler dieser den Elongationsprozess hemmenden „capping“-Proteine sind die Proteine der Ena/Vasp- (engl. enabled/yasodilator-stimulated phosphoprotein) und der MENA-Familie (engl. mammalian enabled). Diese Proteine wurden in den Spitzen von wachsenden Filopodien nachgewiesen und ermöglichen eine kontinuierliche Verlängerung der Aktinfasern.

Um einen möglichen Einfluss der G-Proteine RhoA, Rac und CDC42 bei der APLP1-spezifischen Induktion von Filopodien zu untersuchen, wurden Versuche mit dominant negativen Konstrukten für diese Proteine durchgeführt. Zellen, die APLP1 und jeweils ein dominant negatives Konstrukt überexprimierten (dnRhoA bzw. dnRac bzw. dn CDC42), wurden auf die Ausbildung des Kaktus-Phänotyp untersucht. Keiner dieser Ansätze ließ jedoch eine signifikante Änderung bezüglich der phänotypischen Zellen gegenüber der Kontrolle ohne dominant negative Konstrukte erkennen. Die Cotransfektion von APLP1 mit einem Konstrukt, welches die CDC42-Bindedomäne von WASP exprimiert (CDC-BD, siehe 3.5) und hierdurch CDC42 inhibiert, zeigte hingegen eine Verringerung der Anzahl an phänotypischen Zellen (ca. 50%). Wenngleich bedingt durch eine hohe Varianz der

Messwerte die Reduktion der filopodialen Zellen nicht Signifikanzniveau erreichte ($p > 0,05$), ergeben sich aus diesem Trend erste Hinweise, dass CDC42 direkt oder indirekt am Prozess der Filopodieninduktion beteiligt sein könnte. In weiterführenden Versuchen könnte insbesondere die Menge der dominant negativen CDC-BD variiert werden oder zeitlich die Transfektion von APLP1 nach Transfektion von CDC-BD erfolgen, um eine Inhibierung CDC42-vermittelter Signalwege durch CDC-BD sicherzustellen.. Auch stellt sich die Frage, ob CDC42 bei der Initiation der Aktinfaser z.B. über Arp2/Arp3 oder während der Elongation der durch APLP1-induzierten Filopodien eine Rolle spielt.

Anhand der bisher gezeigten Ergebnisse lässt sich ein putativer Signalübertragungsweg erstellen, wenngleich wichtige Interaktionspartner bisher unidentifiziert blieben.

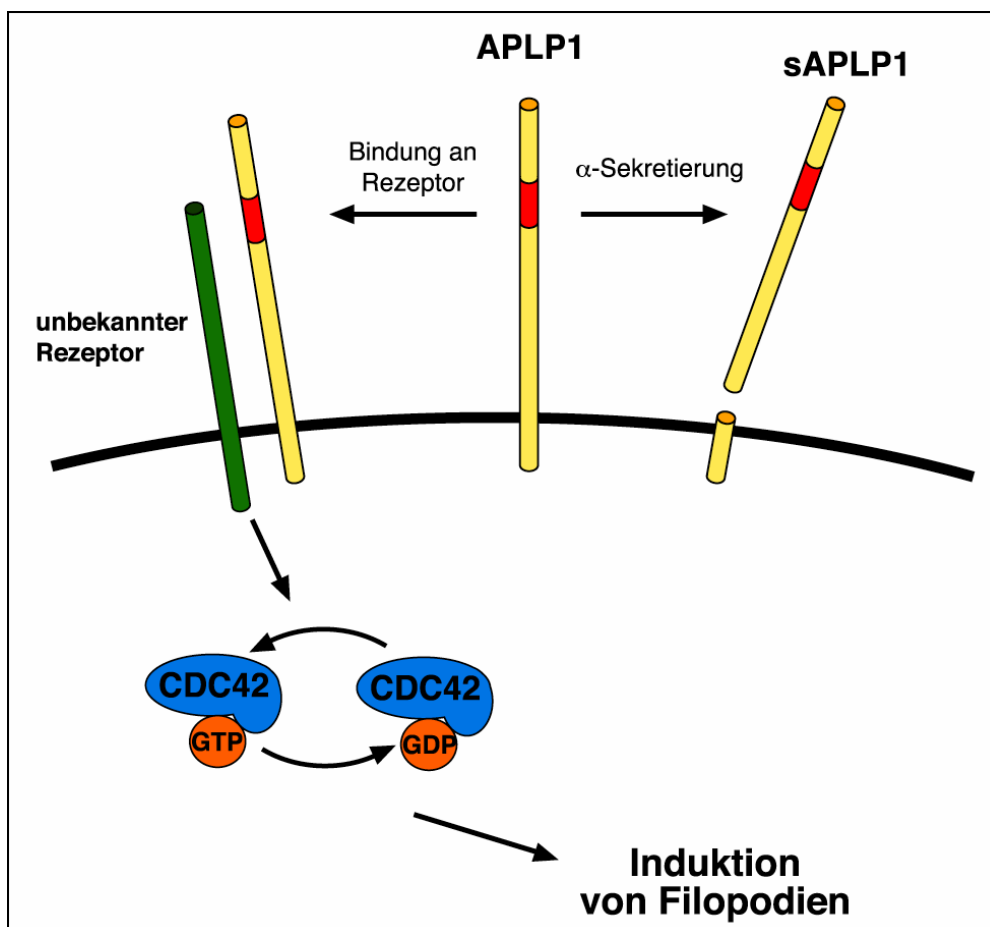


Abb4.4: Putatives Modell zur APLP1-vermittelten Induktion von Filopodien

Dargestellt ist ein stark vereinfachtes Schema der durch APLP1 induzierten Bildung von filopodialen Strukturen. Das membranständige APLP1 bindet an einen bisher unbekanntes Rezeptor. Über diesen Rezeptor wird nach erfolgter APLP1-Bindung ein Signal vom Interzellularraum in die Zelle übermittelt. Die Weiterleitung des Signals innerhalb der Zelle erfolgt vermutlich anhand einer Signalkaskade, bei der CDC42 eine entscheidende Rolle spielt. Der Filopodien-induzierende Effekt des APLP1 kann durch die Prozessierung des Proteins durch die α -Sekretase moduliert werden, wodurch die Ektodomäne des APLP1 (sAPLP1) und somit die Filopodien-induzierende Domäne sezerniert wird.

Ein in die Zellmembran inseriertes APLP1-Protein bindet über die Filopodien-induzierende Domäne an einen bisher unbekanntem Rezeptor und übermittelt so ein Signal vom Extrazellularraum in das Zellinnere. Über Interaktionen mit weiteren Proteinen, zu denen auch das kleine G-Protein CDC42 gehört, wird die Reorganisation des Aktinzytoskeletts angesteuert.

Die Identifikation des putativen APLP1-Rezeptors ist daher von zentralem Interesse für die Aufklärung des Signaltransduktionsmechanismus, der zur Entstehung der Filopodien führt.

Aktuelle Veröffentlichungen beschreiben die Möglichkeit zahlreicher Homo- und Heterodimere innerhalb der APP-Familie (Scheuermann S. et al. 2001; Soba P. et al. 2005).

Eine effiziente Coimmunopräzipitation gelang insbesondere für APP/APLP1-Heterodimäre sowie für APLP1 Homodimere, wobei die für die Dimerisierung notwendigen Domänen im extrazellulären Anteil innerhalb der konservierten DI- und DII- Abschnitte lokalisiert wurden. Diese Dimerisierung stellt neben der Bindung von F-Spondin an die CAAPD (engl. conserved APP domain) (Ho A. et al., 2004) eine der wenigen bisher dokumentierten Protein-Protein-Interaktionen der Ektodomäne dar.

Die Heterodimerisierung von transfiziertem APLP1 mit endogenen APP- oder APLP2-Proteinen an der Zelloberfläche könnte möglicherweise der initiale Schritt der Filopodien-induzierenden Signalkaskade sein. Auch endogenes APLP1 kommt als Rezeptor in Frage. Wenngleich die Überexpression von C-terminal deltiertem APLP1 zeigte, dass der C-Terminus für die Induktion der filopodialen Zellmorphologie nicht essentiell ist, ist eine Interaktion des N-Terminus des transfizierten APLP1 mit endogenem APLP1 denkbar. Die Signalweiterleitung würde im Falle der Versuche mit den C-Terminalen Deletionskonstrukten dann über die C-Termini des endogenen APLP1 weitergeleitet.

Die Aufklärung einer Signalkaskade, bei der möglicherweise Proteine der APP-Familie und CDC42 beteiligt sind, kann zu einem besseren Verständnis der physiologischen Funktion von APLP1 und seinen Homologen APLP2 und APP führen. Erst ein solch umfassendes Wissen über die physiologische Funktion und die Prozessierung erlaubt gezielte Eingriffe in den Metabolismus der APP-Familie, wie dies im Falle der Alzheimer Krankheit nötig ist.

4.7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen zur APLP1-vermittelten Induktion von filopodialen Strukturen deuten erstmals auf eine APLP1-spezifische Funktion *in vitro* hin. Wenngleich die spezifische Domäne eingegrenzt werden konnte und erste Ergebnisse über die Regulation und die Signalkaskade vorliegen, bleiben aber einige wichtige Fragestellungen unbeantwortet.

Die Identifikation der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren innerhalb der Filopodien-induzierenden Domäne sollte anhand von Versuchen mit mutiertem APLP1 gelingen. Weiterführende Untersuchungen bezüglich des bisher nicht identifizierten Rezeptors, an den die Ektodomäne von APLP1 bindet, sind ein weiterer essentieller Schritt zur Charakterisierung der angesteuerten Signalkaskade. Versuche in Zellen, denen eines oder mehrere APP/APLP-Proteine fehlen (z.B. Neuronen von APP/APLP- Knockoutmäusen) oder deren Bildung z.B. durch siRNA unterbunden wird, könnten Auskunft geben, ob wie bereits oben diskutiert die Proteine der APP-Familie selbst als ein derartiger Rezeptor fungieren können.

Die Untersuchung von kleinen G-Proteinen durch Aktivierungs-Tests sowie weitere detaillierte Versuche mit dominant negativen oder konstitutiv aktiven G-Proteinen stellen einen zusätzlichen Einstieg in die Aufdeckung der involvierten Signalkaskade dar.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals einen APLP1-spezifischen Effekt auf die Ausbildung von Filopodien. Sowohl das humane als auch das murine APLP1 induzierten nach transienter Überexpression die Bildung zahlreicher filopodialer Fortsätze auf der Membran von PC12-Zellen. Vergleichbare Resultate konnten mit beiden APLP1-Proteinen auch auf der Membran von embryonalen (E18.5), kortikalen Neuronen der Ratte gezeigt werden. Dass APLP1 einen derartigen Effekt auf Neuronen und PC12-Zellen zeigt, begründet die Annahme, dass APLP1 *in vivo* eine Funktion bei der Entwicklung und Differenzierung von Neuronen übernimmt.

Anhand von Versuchen mit deletierten APLP1-Proteinen und APLP1/APLP2-Chimärproteinen konnte gezeigt werden, dass die von Exon 5 und Exon 6 codierten Bereiche des APLP1 für die Induktion der Filopodien essentiell sind. Unter Einbeziehung von in ihrer räumlichen Struktur bereits bekannten Domänen und aufgrund von Homologievergleichen der primären Aminosäuresequenz dieser Region mit entsprechenden Bereichen der APP- bzw. APLP2-Proteine wurde die wahrscheinliche Lage der Filopodien-induzierenden Domäne innerhalb des von Exon 6 codierten Bereiches diskutiert.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die untersuchte Induktion von Filopodien durch die sogenannte α -Sekretierung moduliert werden kann. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war nur membranständiges APLP1, nicht aber sekretiertes APLP1 in der Lage, Filopodien zu induzieren.

Abschliessend wurden Ergebnisse gezeigt, die erste Einblicke in Signalkaskaden erlauben, die von APLP1 angesteuert werden und so die Entstehung der Filopodien auslösen. Bezüglich des primären Prozesses der Signalkaskade, der Bindung von APLP1 an einen bisher unbekanntem Rezeptor, wurde die Möglichkeit diskutiert, ob APP oder APLP2 oder sogar APLP1 selbst als Rezeptor fungieren könnten.

Die beobachteten Prozesse nach Überexpression von APLP1 entsprechen vermutlich einer physiologischen Funktion bei der Differenzierung von Neuronen, die mit der Interaktion einer extrazellulär gelegenen Domäne mit einem Rezeptor beginnt, die Aktivierung einer Signalkaskade zur Akrinreorganisation zu Folge hat und die Entstehung filopodialer Strukturen auslöst.

6. Literaturverzeichnis

Adlerz L., Beckmann M., Holback S., Tehranian R., Cortes Toro V. and Iverfeldt K. (2003). "Accumulation of the amyloid precursor-like protein APLP2 and reduction of APLP1 in retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells upon curcumin-induced neurite retraction." *Brain Res. Mol. Brain. Res.* **119** (1):62-72.

Allison T. M., Parkin E. T., Turner A. J. and Hooper N. M. (2003). "ADAMs family as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J. Neurosci Res* **74**(3): 342-352.

Andres K., Abramowski D., Duke M., Probst A., Wiederhold K.H., Bürki K., Goedert M., Sommer B. and Staufenbiel M. (1996). "Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters." *Neurobiol. Aging* **17**: 183-190.

Araki Y., Miyagi N., Kato N., Yoshida T., Wada S., Nishimura M., Komano M.I., Yamamoto T., De Strooper B., Yamamoto K., and Suzuki T. (2004). "Coordinated Metabolism of Alcadin and Amyloid- β -precursors regulates Fe65-dependent gene transactivation." *J. Biol. Chem.* **279**(23): 24343-24354

Ausubel K., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1992). *short protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons.

Barnham K.J., McKinstry W.J., Multhaup G., Galatis D., Morton C.J., Curtain C.C., Williamson N.A., White A.R., Hinds M.G., Norton R.S., Beyreuther K., Masters C.L., Parker M.W. and Cappai R. (2003). "Structure of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein Copper Binding Domain." *J.Biol.Chem.* **278** (19): 17401-17407.

Bayer S.A. (1980). "Development of the hippocampal slices maintained in organotypic cultures." *Dev. Brain. Res.* **3**: 3-20.

Bayer T.A., Paliga K., Weggen S., Wiestler O.D., Beyreuther K. and Multhaup G. (1997). "Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease." *Acta Neuropatol.* **94**: 519-524.

Bertram L. and Tanzi R. E. (2005). "The genetic epidemiology of neurodegenerative disease." *J. Clin. Invest.* **115**: 1449-1457.

Bickel H. (2000). "Dementia syndrome and Alzheimer disease an assesment of morbidity and annual incidence in Germany." *Gesundheitswesen* **62**: 211-218.

Bito H., Furuyashiki T., Ishihara H., Shibasaki Y., Ohashi K., Mizuno K., Maekawa M., Ishizaki T. and Narumiya S. (2000). "A critical role for a Rho-associated kinase p160ROCK, in determing axon outgroth in mamalien CNS neurons." *Neuron* **26**: 431-441.

Bothelo M.G., Gralle M., Oliveira C.L., Torriani I. and Ferreira S.T. (2003). "Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein." *J. Biol. Chem.* **278**: 34259-34267.

Braun N., Sevigny J., Robson S.C., Enjyoji K., Guckelberger O., Hammer K., Di Virgilio F. and Zimmermann H. (2000). "Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain." *European Journal of Neuroscience* **12**(12): 4357-4366.

Braun N., Sevigny J., Robson S.C., Hammer K., Hanani M. and Zimmermann H. (2004). "Association of the ecto-ATPase NTPase2 with glial cells of the peripheral nervous system." *Glia* **45**(2): 124-32.

Brouillet E., Trembleau A., Galanaud D., Volovitch M., Bouillot C., Valenza C., Prochiantz A. and Allinquant B. (1999). "The amyloid precursor protein interacts with G0 heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction." *J. Neuroscience* **19**: 1717-1727.

Brunkan A.L. and Goate A.M. (2005). "Presenilin function and gamma-secretase activity." *J Neurochem* **93** (4): 69-92.

Bush A.I., Pettingell W.H. Jr., de Paradis M., Tanzi R.E. and Wasco W. (1994). "The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily." *J. Biol. Chem.* **169**: 26618-26621.

Caille I., Allinquant B., Dupont E., Bouillot C., Langer A., Müller U. and Pochiantz A. (2004). "Soluble form of Amyloid Precursor Protein regulates proliferation of progenitors in the adult Subventricular Zone." *Development* **131**(9): 2173-2181.

Camden J.M., Schrader A.M., Camden R.E., Gonzalez F.A., Erb L., Seye C.I. and Weisman G.A. (2005). "P2Y2 Nucleotide Receptors Enhance α -Secretase-dependent Amyloid Precursor Protein Processing." *The Journal of Biological Chemistry* **280**(19): 18696-18702.

- Cao X. and Südhof T.C.** (2001). "A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." *Science* **193**: 115-120.
- Cappai R., Mok S.S., Galatis D., Tucker D.F., Henry A., Beyreuther K., Small D.H. and Masters C.L.** (1999). "Recombinant human amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) expressed in the yeast *Pichia pastoris* can stimulate neurite outgrowth." *FEBS Lett.* **442**: 95-98.
- Chan Y.M. and Jan Y.N.** (1999). "Presenilins, processing of b-amyloid precursor protein, and Notch signalling." *Neuron* **23**: 201-204.
- Chen Y. and Tang B.L.** (2006). "The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**: 1-5
- Chen Y., Mc Phie D.L., Hirschberg J. and Neve R.L.** (2000). "The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons." *J. Biol. Chem.* **275**: 27-33.
- Chothia C., Jones E.Y.** (1997). "The molecular structure of cell adhesion molecules." *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 823-62
- 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." *Neurochemistry International* **36**: 175-184.
- Craig A.M. and Banker G.** (1994). "Neuronal Polarity." *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 267-310.
- Cummings E.J. and Cole G.** (2002). "Alzheimer Disease." *JAMA* **287**: 2335-2338.
- Cupers P., Orlans I., Craessaerts K., Annaert W. and De Strooper B.** (2001). "The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by g-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurons in culture." *J. Neurochem.* **78**: 1168-1178.
- Daigle I. and Li C.** (1993). "Apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 12045-12049.
- De Strooper B. and Annaert W.** (2000). "Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein." *J. Biol. Chem.* **113**: 1857-1870.
- Dewez J.L., Lhoest J.B., Detrait E., Berger V., Dupont-Gillain C.C., Vincent L.M., Schneider Y.J., Bertrand P., Rouxhet P.G.** (1998). "Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns." *Biomaterials* **19**: 1441-1445
- Duilio A., Faraonio R., Minopoli G., Zambrano N. and Russo T.** (1998). "Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's b-amyloid precursor protein." *Biochem. J.* **330**: 513-519.
- Dulubova I., Ho A., Huryeva I., Südhof T.C. and Rizo J.** (2004). "Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein." *Biochemistry* **43** (20): 9583-9588.
- Dyrks T., Dyrks E., Masters C.L. and Beyreuther K.** (1992). "Membrane inserted APP fragments containing the β A4 sequence of Alzheimer's disease do not aggregate." *FEBS* **309**(1): 20-24.
- Dyrks T., Dyrks E., Männing U., Urmoneit B., Turner J. and Beyreuther K.** (1993). "Generation of bA4 from the amyloid protein precursor and fragments thereof." *FEBS* **335**(1): 89-93.
- Eggert S., Paliga K., Soba P., Evin G., Masters C.L., Weidemann A. and B. K.** (2004). "The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 promotes processing by n-glycosylation." *J Biol Chem* **279**(18): 18146-18156.
- Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C. and Simons K.** (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer b-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." *The Journal of Cell Biology* **160** (1): 113-123.
- Elser W.P. and Wolfe M.S.** (2001). "A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces." *Science* **293**: 1449-1454.
- Endres K., Postina R., Schroeder A., Mueller U. and Fahrenholz F.** (2005). "Shedding of the amyloid precursor protein-like protease APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. Retinoic acid-induced upregulation of substrate and proteinases ADAM 10 during neuronal cell differentiation." *FEBS Journal* **272**: 5808-5820

- Ernekova K.S., Zambrano N., Linn H., Minopoli G., Gertler F., Russo T. and Sudol M.** (1997). "The WW domain of neural protein Fe65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila Enabled." *J. Biol. Chem.* **272**: 32869-32877.
- Faix J. and Rottner K.** (2006). "The making of filopodia." *Current opinion in Cell Biology* **18**: 18-25
- Fiore F., Zambrano N., Linn H., Minopoli G., Donini V., Duilio A. and Russo T.** (1995). "The regions of the Fe65 protein homologues to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein." *J.Biol.Chem.* **270**: 30853-30856.
- Gary Banker and K. Goslin** (1998). "culturing nerve cells" Bradford Book, The MIT Press.
- Gertler F.B., Niebuhr K., Reinhard M., Wehland J. and Soriano P.** (1996). "Mena, a relative of VASP and drosophila enabled, is implicated in the control of microfilaments dynamics." *Cell* **87**: 227-239.
- Glennner G.G. and Wong C.W.** (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**: 885-890.
- Govek E.E., Newey S.E. and vanAelst. L.** (2005). "The role of the Rho GTPases in neuronal development." *Genes & Development* **19**: 1-49.
- Götz J., Probst A., Spillantini M.G., Schäfer T., Jakes R., Bürki K. and Goedert M.** (1995). "Somatodentritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform." *EMBO J.* **14**: 1304-1313.
- Götz J., Chen F., Barmettler R. and Nitsch R.M.** (2001a). "Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau." *J. Biol. Chem.* **276**: 529-534.
- Götz J., Chen F., van Dorpe J. and Nitsch R.M.** (2001b). "Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced Ab fibrils." *Science* **293**: 1491-1495.
- Gralle M., Bothelo M.G., de Oliveira C.L., Torriani I. and Ferreira S.T.** (2002). "Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein." *Biophys. J.* **83**: 3513-3524.
- Greene L.A. and Tischler A.S.** (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**(7): 22424-2428.
- Greene L.A.** (1984). "The importance of both early and delayed responses in the mechanism of action of nerve growth factor." *Trends Neurosci.* **7**: 91-94.
- 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.
- Guenette S., Chang Y., Hiesberger T., Richardson J.A., Eckman C.B., Eckman E.A., Hammer R.E. and Herz J.** (2006). "Essential roles for the Fe65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development." *EMBO*: 1-12
- Guenette S.Y. and Tanzi R. E.** (1999). "Progress toward valid transgenic mouse models for Alzheimer's disease." *Neurobiol. Aging* **20**: 201-211.
- Gunawardena S. and Goldstein L.S.B.** (2001). "Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in drosophila." *Neuron* **32**: 389-401.
- Guo J., Thinakaran G., Guo Y., Sisodia S. and Yu F.** (1998). "A role for amyloid precursor-like protein 2 in corneal epithelial wound healing." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**: 292-300.
- Hardy J.** (1996). "New insights into the genetics of Alzheimer's disease." *Ann. Med.* **28**: 255-258.
- Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aguzzi A., RÜlicke T., Kretschmar H., von Koch C., Sisodia S., Tremml P., Lipp H.P., Wolfer D.P. and Müller U.** (2000). "Mice with Combined Gene Knock-Out Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members." *The Journal of Neuroscience* **20**(21): 7951-7963.
- Heo W.D. and Meyer T.** (2003). "Switch-of-Function Mutants Based on Morphology Classification of Ras Superfamily Small GTPases." *Cell* **113**: 315-328.
- Herms J., Anliker B., Heber S., Ring S., Fuhrmann M., Kretschmar H., Sisodia S. and Müller U.** (2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." *EMBO* **23** (20): 4106-4115.
- Ho A. and Südhof T.C.** (2004). "Binding of F-Spondin to amyloid- β precursor protein: A candidate amyloid- β precursor protein ligand that modulates amyloid- β precursor protein cleavage." *PNAS* **101**(8): 2548-2553

- Homayouni R., Rice D.S., Sheldorn M. and Curran T.** (1999). "Disabled-1 Binds to the Cytoplasmic Domain of Amyloid Precursor-Like Protein 1." *J. Neuroscience* **19**(17): 7507-7515.
- Hsia A.Y., Masliah E., Mc Conlogue L., Yu G.Q., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Malenka R.C., Nicoll R.A. and Mucke L.** (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3228-3233.
- Huang X., Altwood C.S., Hartshorn M.A., Multhaup G., Goldstein L.E., Scarpa R.C., Cujungco M.P., Gray D.N., Lim J., Moir R.D., Tanzi R.E. and Bush A.I.** (1999). "The A β Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide Through Metal Ion Reduction." *Biochemistry* **38**(4): 7609-7616.
- Hung A.Y. and Selkoe D.J.** (1994). "Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein." *EMBO* **13**: 534-542.
- Hynes R.O.** (1996). "Targeted Mutations in Cell Adhesion Genes: What Have We Learned from Them?" *Developmental Biology* **180**: 402-412.
- Hynes T.R., Randal M., Kennedy L.A., Eigenbrot C. and Kossiakoff A.A.** (1990). "X-Ray Crystal Structure of the Protease Inhibitor Domain of Alzheimer's Amyloid b-Protein Precursor." *Biochemistry* **29**: 10018-10022.
- Jin L.W., Ninomiya H., Roch J.M., Schubert D., Masliah E., Otero D.A. and Saitoh T.** (1994). "Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension." *J. Neuroscience* **14**: 5461-5470.
- Kamal A., Stokin G.B., Yang Z., Xia C.H. and Goldstein L.S.B.** (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-1." *Neuron* **28**: 449-459.
- Kamal A., Almenar-Queralt A., Le Blanc J.F., Roberts E.A. and Goldstein L.S.B.** (2001). "Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing b-secretase and presenilin-1 requires APP." *Nature* **414**: 643-648.
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters J.C., Grzeschick K.H., Multhaup G., Beyreuther K. and Muller-Hill B.** (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor." *Nature* **325**: 733-736.
- Karther C. and Haas C.** (2004). "A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid b-peptide generation." *The Journal of Cell Biology* **167**(5): 809-812.
- Kim T.W., Wu K., Xu J.L., McAuliffe G., Tanzi R.E., Wasco W. and Black I.B.** (1995). "Selective localisation of amyloid-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density." *Molecular Brain Research* **32**: 36-44.
- Kimberly W.T., Zheng J.B., Guenette S.Y. and Selkoe D.J.** (2001). "The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner." *J. Biol. Chem.* **276**: 16022-16024.
- Kirfel G., Borm B., Rigort A. and Herzog V.** (2002). "The secretory β -amyloid precursor protein is a motogen for human epidermal keratinocytes." *European Journal of Cell Biology* **81**: 664-676.
- Laemmli U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lahiri D.K., Farlow M.R., Greig N.H. and Sambamurti K.** (2002). "Current Drug Targets for Alzheimer's Disease Treatment." *Drug Development Research* **56**: 267-281.
- Lantos P. and Cairns N.** (2000). "The neuropathology of Alzheimer's disease." In O'Brien, J.Ames, D.Burns, A. Eds. *Dementia*. 2nd ed. London, England Arnold, 443-459.
- Lazarov O., Morfini G.A., Lee E.B., Farah M.H., Szodorai A., DeBoer S.R., Koliatsos V.E., Kins S., Lee V.M., Wong P.C., Peicw D.L., Brady S.T., Sisodia S.S.** (2005). "Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited." *J.Neuroscience* **25**(9): 2386-2395
- Lenkkeri U., Kestilä M., Lamerdin J., McCreedy P., Adamson A., Olsen A and T. K** (1998). "Structure of the human amyloid-precursor-like protein gene APLP1 at 19q13.1." *Human Genetics* **102**: 192-196.
- Levi A. and Alema S.** (1991). "The mechanism of action of nerve growth factor." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **31**: 1329-1340.
- Lewis J., Mc Gowan E., Rockwood J., Melrose H., Nacharaju P., van Slegtenhorst M., Gwinn-Hardy K., Murphy P.M., Baker M., Yu X., Duff K., Hardy J., Corral A., Lin W.L., Yen S.H., Dickson D.W., Davies P. and Hutton M.** (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." *Nature Genetics* **25**: 402-405.

- Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.H., Sahara N., Skipper I., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M. and Mc Gowan E.** (2001). "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP." *Science* **293**: 1487-1491.
- Li Z.W., Stark G., Götz J., Rüllicke T., Müller U. and Weissmann C.** (1996). "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6158-6162.
- Li Z.W., Thinakaran G., Sisodia S.S. and Yang F.** (1999). "Amyloid precursor-like protein 2 promotes cell migration toward fibronectin and collagen IV." *J.Biol.Chem* **274**: 27249-27256.
- Lorent K., Overbergh L., Moechars D., De Strooper B., van Leuven F. and van de Berghe H.** (1995). "Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40.000 molecular weight receptor-associated protein." *Neuroscience* **65**: 1009-1025.
- Magara F., Müller U., Li Z.W., Lipp H.P., Weissmann C., Staglier M. and Wolfer D.P.** (1999). "Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the b-amyloid-precursor protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4651-4661.
- Mandelkow E.M. and Mandelkow E.** (1998). "Tau in Alzheimer's disease." *Trends Cell Biol.* **8**: 425-427.
- Maretzky T., Schulte M., Kludwig A., Rose-John S., Blobel C., Hartmann D., Altevogt P., Saftig P., Reiss K.** (2005) "L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neuronal cell adhesion, cell migration and neurite outgrowth." *Mol.Cell.Biol.* **25**(20): 9040-9053
- Matsuda S., Yasukawa T., Homma Y., Ito Y., Niikura T., Hiraki T., Ohno S., Kita Y., Kawasumi M., Kouyama K., Yamamoto T., Kyriakis J.M. and Nishimoto I.** (2001). "C-Jun N-Terminal Kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid protein with JNK." *J. Neuroscience* **21**: 6597-6607.
- Mattson M.P.** (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." *Physiol. Rev.* **77**(4): 1081-1132.
- Mattson M.P. and Chan S.L.** (2003). "Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease." *Cell Calcium* **34**: 385-397.
- Mbebi C., See V., Mercken L., Pradier, Müller U. and Loeffler J.P.** (2002). "Amyloid precursor protein family-induced neuronal death is mediated by impairment of neuroprotective calcium/calmodulin protein kinase IV-dependent signaling pathway." *J. Biol. Chem.* **277**: 20979-20990.
- McLoughlin D.M. and Miller C.C.J.** (1996). "The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system." *FEBS Lett.* **397**: 197-200.
- Merdes G., Soba P., Loewer A., Bilic M.V., Beyreuther K. and Paro R.** (2004). "Interference of human and Drosophila APP and APP-like proteins with PNS development in Drosophila." *EMBO* **23**: 4082-4095.
- Meyer G. and Feldman E.L.** (2002). "Signalling mechanisms that regulate actin-based motility in the nervous system." *J. Neurochem.* **83**: 490-503.
- Moya K.L., Benowitz L.I., Schneider G.E. and Allinquant B.** (1994). "The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis." *Developmental Biology* **161**: 597-603.
- Multhaup G., Schlicksupp A., Hesse L., Behr D., Ruppert T., Masters C.L. and Beyreuther K.** (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I)." *Science* **271**: 1406-1409.
- Multhaup G., Ruppert T., Schlicksupp A., Hesse L., Bill E., Pipkorn R., Masters C.L. and Beyreuther K.** (1998). "Copper-Binding Amyloid Precursor Protein Undergoes a Site-Specific Fragmentation in the Reduction of Hydrogen Peroxide." *Biochemistry* **37**: 7224-7230.
- Müller U., Cristina N., Li Z.W., Wolfer D.P., Lipp H.P., Rüllicke T., Brandner S., Aguzzi A. and Weissmann C.** (1994). "Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene." *Cell* **79**: 755-765.
- Müller U. and Kins S.** (2002). "APP on the move." *Trends in Molecular Medicine* **8**(4): 152-155.
- Naruse S., Thinakaran G., Luo J.J., Kusiak J.W., Tomita T., Iwatsubo T., Qian X., Ginty D.D., Price D. L., Borchelt D.R., Wong P.C. and Sisodia S.** (1998). "Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons." *Neuron* **21**: 1213-1221.

- Neve R.L., Finch E.A. and Dawes L.R.** (1988). "Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain." *Neuron* **1**: 669-677.
- Ninomiya H., Roch J.M., Jin L.W. and Saitoh T.** (1994). "Secreted form of amyloid beta A4 protein precursor (APP) binds to two distinct sites on rat B103 neuron-like cells through two different domains, but only one site is involved in neurotrophic activity." *J. Neurochem.* **63**: 495-500.
- Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi Y., Murayama Y. and Ogata E.** (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G0." *Nature* **362**: 75-79.
- Ohsawa I., Takamura C. and Kohsaka S.** (2001). "Fibulin-1 binds the amino-terminal head of b-amyloid precursor protein and modulates its physiological function." *J. Neurochem.* **76**: 1411-1420.
- Okamoto T., Takeda S., Murayama Y., Ogata E. and Nishimoto I.** (1995). "Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor." *J. Biol. Chem.* **270**: 4205-4208.
- Oltersorf T., Fritz L.C., Schenk D.B., Lieberburg I., Johnson-Wood K.L., Beattie E.C., Ward P.J., Blacher R.W., Dovey H.F. and Sinha S.** (1989). "The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II." *Nature* **341**: 144-147.
- Paliga K., Peraus G., Kreger S., Durrwang U., Hesse L., Multhaup G., Masters C.L., Beyreuther K. and Weidemann A.** (1997). "Human amyloid precursor-like protein 1 - cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid." *Eur. J. Biochem.* **250**: 354-364.
- Passey S., Pellegrin S. and Mellor H.** (2004). "What is a filopodium? Starfish versus hedgehogs." *Research Colloquia Biochemical Society*: 1115-1117
- Pellegrin S. and Mellor H.** (2005). "The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2." *Current Biology* **15**: 129-133
- Price D.L. and Sisodia S.S.** (1998). "Mutant genes in familiar Alzheimer's disease and transgenic models." *Annu. Rev. Neurosci.* **21**(479-505).
- Ravi R.G., Kim H.S., Servos J., Zimmermann H., Lee K., Maddileti S., Boyer J.L., Harden T.K. and Jacobson K.A.** (2002). "Adenine nucleotide analogues locked in a Northern methanocarba conformation: enhanced stability and potency as P2Y(1) receptor agonists." *J. Med. Chem.* **45**(10): 2090-2100.
- Reinhard C., Hebert S.S. and De Strooper B.** (2005). "The amyloid-b precursor protein: integrating structure with biological function." *EMBO J.* **24**(23): 3996-4006.
- Rohn T.T., Ivins K.J., Bahr B.A., Cotman C.W. and Cribbs D.H.** (2000). "A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis." *J. Neurochem.* **74**: 2331-2342.
- Rosen D.R., Martin-Morris L., Luo L.Q. and White K.** (1989). "A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2478-2482.
- Rossjohn J., Cappai R., Feil S.C., Henry A., Mc Kinstry W.J., Galatis D., Hesse L., Multhaup G., Beyreuther K., Masters C.L. and Parker M.W.** (1999). "Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein." *Nat. Struct. Biol.* **6**: 327-331.
- Runz H., Rietdorf J., Tomic I., de Bernard M., Beyreuther K., Pepperkok R. and Hartmann T.** (2002). "Inhibition of Intracellular Cholesterol Transport Alters Presenilin Localisation and Amyloid Precursor Protein Processing in Neuronal Cells." *The Journal of Neuroscience* **22**(5): 1679-1689.
- Sabo S.L., Lanier L.M., Ikin A.F., Khorkova O., Sahasrabudhe S., Greengard P. and Buxbaum J.D.** (1999). "Regulation of β -Amyloid Secretion by FE65, an Amyloid Protein Precursor-binding Protein." *J. Biol. Chem* **274**(12): 7952-7957.
- Sabo S.L., Ikin A.F., Buxbaum J.D. and Greengard P.** (2001). "The Alzheimer Amyloid Precursor Protein (APP) and Fe65, an APP-binding Protein, Regulate Cell Movement." *The Journal of Cell Biology* **153**: 1403-1414.
- Sandbrink R., Masters C.L. and Beyreuther K.** (1994). "APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's bA4-amyloid protein precursor." *Neurobiol. Dis.* **1**: 13-24.
- Sarasa M., Sorribas V., Terrado J., Climent S., Palacios J.M. and Mengod G.** (2000). "Alzheimer β -amyloid precursor proteins display specific patterns of expression during embryogenesis." *Mechanisms of Development* **94**: 233-236.
- Scheinfeld M.H., Ghersi E., Laky K., Fowlkes B.J. and D'Adamio L.** (2002). "Processing of β -amyloid Precursor-like Protein-1 and -2 by γ -Secretase Regulates Transcription." *J. Biol. Chem* **277**(46): 44195-44201.

- Scheuermann S., Hamsch B., Hesse L., Stumm J., Schmidt C., Behr D., Bayer T.A., Beyreuther K. and Multhaup G.** (2001). "Homodimerization of Amyloid Precursor Protein and Its Implication in the Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease." *J.Biol.Chem* **276**(36): 33923-33929.
- Schlessinger A.R., Cowan W.M. and Swanson L.W.** (1978). "The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields." *Anat. Embryol.* **154**: 153-173.
- Schmitz A., Tikkanen R., Kirfel G. and Herzog V.** (2002). "The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells." *Histochem. Cell Biol.* **117**: 171-180.
- Selkoe D.J.** (2001a). "Alzheimer's disease: genes proteins and therapy." *Physiol rev.* **81**: 741-766.
- Selkoe D.J.** (2001b). "Clearing the brain's amyloid cobwebs." *Neuron* **32**: 177-180.
- Siemes C., Quast T., Kummer C., Wehner S., Kirfel G., Müller U. Herzog V.** (2006) „Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro.“ *Exp. Cell Res.* **312**(11): 1939-1949
- Simons A., Ruppert T., Schmidt C., Schlicksupp A., Pipkorn R., Reed J., Masters C.L., White A.R., Cappai R., Beyreuther K., Bayer T.A. and Multhaup G.** (2002). "Evidence for a Copper-Binding Superfamily of the Amyloid Protein." *Biochemistry* **41**: 9310-9320.
- Simons M., De Strooper B., Multhaup G., Tienari P.J., Dotti C.G. and Beyreuther K.** (1996). "Amyloidogenic Processing of the Human Amyloid Precursor Protein in Primary Cultures of Rat Hippocampal Neurons." *The Journal of Neuroscience* **16**(3): 899-908.
- Soba P., Eggert S., Wagner K., Zentgraf H., Siehl K., Kreger S., Lšwer A., Merdes G., Paro R., Masters C.L., Langer A., Müller U., Kins S. and Beyreuther K.** (2005). "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion." *EMBO* **24**(20): 3624-3634.
- Sprecher C.A., Grant F.J., Grimm G., O'Hara P.J., Norris F., Norris K. and Foster D.C.** (1993). "Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family." *Biochemistry* **32**: 4481-4486.
- Steinbach J.P., Müller U., Leist M., Li Z.W., Nicotera P. and Aguzzi A.** (1998). "Hypersensitivity to seizures in β -amyloid precursor protein deficient mice." *Cell Death Diff.* **5**: 858-866.
- Steiner H.** (2004). "Uncovering gamma-secretase." *Curr. Alzheimer Res.* **1**(3): 175-81.
- Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H. and Derge J.G.** (2002). "Generation and initial analysis of more than 15.000 full-length human and mouse cDNA sequence." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16899-16903.
- Sturchler-Pierrat C., Abramowski D., Duke M., Wiederhold K.H., Mistl C., Rothacher S., Ledermann B., Bürki K., Frey P., Paganetti P.A., Waridel C., Calhoun M.E., Jucker M., Probst A., Staufenbiel M. and Sommer B.** (1997). "Two amyloid precursor transgenic mouse models with alzheimer's disease-like pathology." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13287-13292.
- Sudo H., Jiang H., Yasukawa T., Hashimoto Y., Niikura T., Kawasumi M., Matsuda S., Takeuchi Y., Aiso S., Matsuoka S., Murayama Y. and Nishimoto I.** (2000). "Antibody-regulated neurotoxic function of cell surface b-amyloid precursor protein." *Mol. Cell Neurosci.* **16**: 708-723.
- Suetsugu S., Tezuka T., Morimura T, Hattori M., Mikoshiba K., Yamamoto T. and Takenawa T.** (2004). "Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-Wasp and ubiquitination of mDab1." *Biochemical Journal* **384**: 1-8
- Sun K.H., Sun G.H., Su Y., Chang C.I., Chuang M.J., Wu W.L., Chu C.Y. and Tang S.J.** (2004). "Acidic-rich region of amyloid precursor protein induces glial cell apoptosis." *Apoptosis* **9**: 833-841.
- Suzuki T., Oishi M., Marshak D.R., Czernik A.J., Nairn A.C. and Greengard P.** (1994). "Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein." *EMBO* **13**: 1114-1122.
- Svitkina T.M., Bulanova E.A., Chaga O.Y., Vignjevic D.M., Kojima S-I, Vasiliev J.M., Borisy G.G.** (2003). "Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network." *J. of Cell Biology* **160**: 409-421
- Takahashi Y., Dore S., Ferris C.D., Tomita T., Sawa A., Wolosker H., Borchelt D.R., Iwatsubo T., Kim S.H., Thinakaran G., Sisodia S. and Snyder S.H.** (2000). "Amyloid precursor protein inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Neuron* **28**: 461-473.
- Tanaka S., Shiojiri S., Takahashi Y., Kitaguchi N., Ito H., Kameyama M., Kimura J., Nakamura S. and Ueda K.** (1989). "Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 1406-1414.

- Tanzi R.E. and Bertram L.** (2001). "new frontiers in Alzheimer's disease genetics." *Neuron* **32**: 181-184.
- Tanzi R.E. and Bertram L.** (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." *Cell* **120**: 545-555
- Tarr P.E., Roncarati R., Pelicci G., Pelicci P.G. and D'Adamo L.** (2002). "Tyrosine phosphorylation of the β -amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc." *J. Biol. Chem.* **277**: 16798-16804.
- Taru H., Iijima K., Hase M., Kirino Y., Yagi Y. and Suzuki T.** (2002a). "Interaction of Alzheimer's β -amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade." *J. Biol. Chem.* **277**: 20070-20078.
- Taru H., Kirino Y. and Suzuki T.** (2002b). "Differential roles of JIP scaffold proteins in the modulation of amyloid precursor protein metabolism." *J. Biol. Chem.* **277**(30): 27567-27574.
- Tomita S., Ozaki T., Taru H., Oguchi S., Takeda S., Yagi Y., Sakiyama S., Kirino Y. and Suzuki T.** (1999). "Interaction of a Neuron-specific Protein Containing PDZ Domains with Alzheimer's Amyloid Precursor Protein." *J. Biol. Chem.* **274**(4): 2243-2254.
- Tremml P., Lipp H.P., Müller U., Ricceri L. and Wolfer D.P.** (1998). "Neurobehavioural development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene." *Behav. Brain Res.* **95**: 65-76.
- van Gassen G., Annaert W. and vanBroeckhoven. C.** (2000). "Binding Partners of Alzheimer's Disease Proteins: Are they Physiologically Relevant?" *Neurobiology of Disease* **7**: 135-151.
- Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C.** (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol.* 2003 May;**70**(1):1-32.
- Vassar R.** (2004). "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." *J Mol Neuroscience* **23**(1-2): 105-114.
- Vassar R.** (2005). "beta-secretase, APP and A β in Alzheimer's disease." *Subcell Biochem.* **38**: 79-103.
- von Koch C.S., Zheng H., Chen H., Trumbauer M., Thinakaran G., van der Ploeg L.H., Price D. L. and Sisodia S.S.** (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." *Neurobiol. Aging* **18**: 661-669.
- Walsh D.M., Fadeeva J.V., LaVoie M.J., Paliga K., Eggert S., Kimberly W.T., Wasco W. and Selkoe D.J.** (2003). " γ -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.
- Walter J., Capell A., Hung A.Y., Langen H., Schnolzer M., Thinakaran G., Sisodia S.S., Selkoe D.J. and Haas C.** (1997). "Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations." *J. Biol. Chem.* **272**: 1896-1903.
- Wang P., Yang G., Mosier D.R., Chang P., Zaidi T., Gong Y.D., Zhao N.M., Dominguez B., Lee K.F., Gan W.B., Zheng H.** (2005) "Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein2" *J. Neuroscience* **25**(5):1219-1225
- Wang Y. and Ha Y.** (2004). "The X-Ray Structure of an Antiparallel Dimer of the Human Amyloid Precursor Protein E2 Domain." *Molecular Cell* **15**: 343-353.
- 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. USA* **89**: 10758-10762.
- Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M.D., Romano D.M., Sisodia S.S., Hyman B.T., Neve R.L. and Tanzi R.E.** (1993). "Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor." *Nature Genetics* **5**: 95-100.
- Weber B., Schaper C., Scholz J., Bein B., Rodde C., Tonner M.P.** (2006) „Interaction of the amyloid precursor like protein 1 with the alpha (2A)-adrenergic receptor increases agonist-mediated inhibition of adenylat cyclase." *Cell Signal*, Mar 9th, Epub ahead of print
- Weidemann A., König G., Bunke D., Fischer P., Salbaum J.M., Masters C.L. and Beyreuther K.** (1989). "Identification, Biogenesis, and localisation of Precursors of Alzheimer's Disease A4 Amyloid Protein." *Cell* **57**: 115-126.
- White A.R., Multhaup G., Maher F., Bellingham S., Camakaris J., Zheng H., Bush A.I., Beyreuther K., Masters C.L. and Cappai R.** (1999a). "The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress." *J. Neuroscience* **19**: 9170-9179.

White A.R., Reyes R., Mercer J.F.B., Camakaris J., Zheng H., Bush A.I., Multhaup G., Beyreuther K., Masters C.L. and Cappai R. (1999b). "Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice." *Brain Res.* **842**: 439-444.

White A.R., Multhaup G., Galatis D., Mc Kinstry W.J., Parker M.W., Pipkorn R., Beyreuther K., Masters C.L. and Cappai R. (2002). "Contrasting, species dependent modulation of copper-mediated neurotoxicity by the Alzheimer's disease amyloid precursor protein." *J. Neurochem.* **22**: 365-376.

Winder S.J. (2004). "Filopodia formation and Disabled degradation downstream of Reelin." *Biochemical J.* **384**: e1-e2

Zambrano N., Minopoli G., de Candia P. and Russo C. (1998). "The Fe65 adaptor protein interacts through its PID domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1." *J. Biol. Chem.* **273**: 20128-20133.

Zambrano N., Bruni P., Minopoli G., Mosca R., Molino D., Russo C., Schettini G., Sudol M. and Russo T. (2001). "The β -amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutive active form of the Ab1 protooncogene." *J.Biol.Chem.* **23**: 19787-19792.

Zheng H., Jiang H., Trumbauer M.E., Sirinathsinghji D.J., Hopkins R., Smith D.W., Heavens R.P., Dawson G.R., Boyce S., Conner M.W., Stevens K.A., Slunt H.H., Sisodia S., Chen H.Y. and van der Ploeg L.H.T. (1995). "Beta-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* **81**: 525-531.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Aβ	β -Amyloid
ADAM 10	Disintegrin- und Metalloprotease 10 (engl. <i>a desintegrin and metalloprotease 10</i>)
AICD	Intrazelluläre Domäne von APP (engl. <i>APP intracellular domain</i>)
ApoE	Apolipoprotein E
APLP	Amyloid-Vorläuferprotein-ähnliche Proteine (engl. <i>amyloid precursor like protein</i>)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
APP-BP1	APP-bindendes Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BACE	An der β -Position von APP sapltendes Enzym (engl. <i>beta-site APP-cleaving enzyme</i>)
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cat.No.	Katalog Nummer
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CS-CAG	Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxy ribonucleid acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dest.	destiliert
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (engl. <i>enhanced chemoluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
FAD	Familiäre Formen der Alzheimer Krankheit (engl. <i>familiar alzheimer's disease</i>)
GAP43	Wachstums-assoziiertes Protein 43 (engl. <i>growth-associated protein 43</i>)
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>horse radish peroxidase</i>)
hu	human
Ig	Immunglobulin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KPI	Kunitz-Protease-Inhibitor

LB	Luria Bertani
M	Mol
mDab	engl. mammalian homologue of Disabled
MCS	multiple Klonierungsregion (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MEF	Embryonale Fibroblasten der Maus
Mena	engl. mammalian enabled
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mu	murin
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. <i>nerve growth factor</i>)
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAT1	engl. protein interacting with the APP tail 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Para-Formaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PS	Presinilin
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleid acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s, sek	Sekunde
SAP	Schrimp Alkalische Phosphatase
sAPLP1	sezernierte Ektodomäne von APLP1
sAPP	sezernierte Ektodomäne von APP
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	simian Virus 40
TACE	Tumor-Nekrose-Fakto- α prozessierendes Enzym (engl. <i>tumor necrosis factor-α converting enzyme</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TM	Transmembranregion
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit für Enzymaktivität (engl. <i>Unit</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
VASP	engl. vasodilator-stimulated phosphoprotein
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
WT, wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen dem internationalen Ein-Buchstaben-Code.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mainz, den

Andreas Langer