



Lehrstuhl für Neuroproteomik, Medizinische Fakultät der Technischen Universität München und TUM Graduate School

## **Proteolytische Spaltung der Transmembranproteine PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 durch die Alzheimer-Protease BACE1**

Felix Wieland Ricardo Wohlrab

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Mikael Simons

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Mikael Simons
2. Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler
3. apl. Prof. Dr. Achim Krüger

Die Dissertation wurde am 05.03.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.07.2018 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Die Alzheimer-Krankheit.....</b>	<b>8</b>
2.1.1. Geschichte .....	8
2.1.2. Epidemiologie .....	8
2.1.3. Klinik.....	9
2.1.4. Histopathologische Veränderungen.....	9
2.1.5. Regulierte Intramembranproteolyse von APP .....	10
2.1.6. Pathogenese: Die Amyloid-Kaskade-Hypothese.....	13
2.1.6. Genetische Risikofaktoren.....	17
2.1.7. Therapie der Alzheimer-Krankheit .....	18
<b>2.2. Die beta-Sekretase BACE1 .....</b>	<b>22</b>
2.2.1. BACE1 ist ein zentraler medikamentöser Ansatzpunkt für die Alzheimer-Krankheit.....	22
2.2.2. Identifizierung, Domänenstruktur, intrazelluläre Lokalisation, posttranslationale Modifikationen und Expression von BACE1 .....	22
2.2.3 Biologische Funktionen.....	24
<b>2.3. Quantitative proteomische Analyse von BACE1-Knockout-Maus-CSF .....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Identifizierung von potentiellen BACE1-Substraten im CSF von Mäusen .....	26
<b>2.4. Die Transmembranproteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 .....</b>	<b>29</b>
2.4.1. Receptor-type Tyrosine-protein Phosphatase N2 (PTPRN2) .....	30
2.4.2. Plexin Domain Containing Protein 2 (PLXDC2) .....	32
2.4.3. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Family Member 5 (ENPP5).....	33
<b>3. Problemstellung .....</b>	<b>35</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken .....</b>	<b>30</b>
4.1.1. Übersicht über die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide .....	30
4.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	33
4.1.3. Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
4.1.4. Subklonierung von cDNAs in Expressionsplasmide mit der Gibson Assembly Technik....	36
4.1.5. Transformation von chemisch kompetenten E.coli vom Stamm DH5alpha mit Plasmidvektoren .....	36
4.1.6. Präparation von Plasmidvektoren DNS im kleinen (Mini-Präp) und mittleren (Midi- Präp) Maßstab .....	37
4.1.7. Sequenzierung von klonierten cDNA Konstrukten durch die Kettenabbruch-Methode nach Sanger .....	38
4.1.8. Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen mittels PCR .....	39
<b>4.2. Zellkultur .....</b>	<b>39</b>
4.2.1. Zelllinien und Kulturmedien .....	39
4.2.2. Zellkultivierung .....	39
4.2.3. Transient liposomale Transfektion mit Plasmidvektoren .....	40

4.2.4. Selektion stabil transfizierter Zellpopulationen .....	40
4.2.5. Zellkultur primärer muriner corticaler Neurone von Mäuseembryonen.....	41
4.2.6. Lentivirale Transduktion.....	42
4.2.7. Behandlung von Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 .....	44
<b>4.3. Biochemische Arbeitstechniken .....</b>	<b>44</b>
4.3.1. Zellyse .....	44
4.3.2. BC Test.....	45
4.3.3. Immunpräzipitation .....	45
4.3.4. Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) und Western Blot/Immunblot .....	47
4.3.5. In vitro Deglykosylierung von Glykoproteinen .....	51
4.4. Methodische Ergebnisse.....	52
4.4.1. BACE1-in-vitro-Assay zur Prozessierung von rekombinanten Proteinen .....	52
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
5.1. Aminosäuresequenzvergleich tryptischer Peptide von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 .....	55
5.2. APLP1 und APLP2 werden von BACE1 defizienten Mäusen weniger ins CSF sezerniert .....	58
5.3. Validierung von APLP1 und APLP2 als BACE1-Substrate in primären murinen Neuronen.....	59
5.4. Stabile Expression von HA-ENPP5-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG in humanen embryonalen Nierenzellen 293 (HEK293) .....	62
5.4.1. Deglykosylierung von HA-ENPP5-FLAG durch Peptid-N-Glykosidase F.....	65
5.5. BACE1-abhängige Ektodomänenspaltung von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 in HEK293 Zellen.....	66
5.6. PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 können von BACE1 direkt proteolytisch gespalten werden ....	70
5.7. ENPP5 wird durch endogen exprimiertes BACE1 in Neuronen geschnitten und sezerniert... 73	
5.8. Charakterisierung von Antikörpern gegen murines ENPP5 und PTPRN2 in primären murinen Neuronen .....	76
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>79</b>
6.1. Die tryptischen Peptide von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 aus den Daten der massenspektrometrischen Analyse von CSF von BACE1-Knockout-Mäusen sind in den Ektodomänen der Proteine lokalisiert .....	80
6.2. Die Sekretion von APLP1 und APLP2 ins CSF von Mäusen wird durch die Protease BACE1 vermittelt .....	81
6.3. APLP1 und APLP2 sind Substrate von endogen exprimiertem BACE1 in primären murinen Neuronen .....	82
6.4. Stabile Expression der rekombinanten Proteine HA-ENPP5-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG .....	83
6.5. Die Sekretion der Ektodomänen von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 ist direkt abhängig von der proteolytischen Aktivität von BACE1 .....	84
6.6. ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 werden von BACE1 in einem in-vitro-Assay proteolytisch geschnitten .....	86
6.7. ENPP5 wird in primären murinen Neuronen von endogen exprimiertem BACE1 proteolytisch geschnitten .....	88
6.8. Charakterisierung von Antikörpern die endogenes ENPP5 und PTPRN2 in Neuronen detektieren können.....	89
6.9. Ausblick.....	91

<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>8. Aminosäurecode.....</b>	<b>98</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>115</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>116</b>
<b>12. Schriftenverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>13. Publikationen.....</b>	<b>118</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ADAM10	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Containing Protein 10
ADAM17	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Containing Protein 17
AICD	APP-intrazelluläre-Domäne
Aph1	Anterior-Phalanx Defective 1
APLP1	Amyloid Precursor Like Protein 1
APLP2	Amyloid Precursor Like Protein 2
APOE $\epsilon$ 4	Apolipoprotein E Allel $\epsilon$ 4
APP	Amyloid Precursor Protein (Amyloid-Vorläuferprotein)
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
A $\beta$ (pE3)	Pyroglutamat-modifiziertes Amyloid- $\beta$ -Peptid
BACE1	$\beta$ -Site Of APP Cleaving Enzyme
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovine Serum Albumin
C83	C-terminales Peptid von APP nach dem Schnitt durch ADAM10
C99	C-terminales Peptid von APP nach dem Schnitt durch BACE1
CHL1	Neural Cell Adhesion Molecule L1-like Protein/ Close Homologue of L1
COS	CV-1 in Origin
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid/Desoxyribonukleinsäure
DIAN-TU	Dominantly Inherited Alzheimer Network Trial Unit
E. coli	Escherichia coli
E	Embryonic day
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ENPP5	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 5
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GGA	Golgi-localized Gamma Ear-containing ADP Ribosylation Factor-binding
GLG1	Golgi Apparatus Protein 1
HA	Human influenza hemagglutinin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
HeLa	Henrietta Lacks (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
IA-2	Islet Antigen-2
IA-2 $\beta$	Islet Antigen-2 $\beta$
ICA512	Islet Cell Autoantigen
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IGF2R	Cation-independent Mannose-6-phosphate Receptor

IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB	Lysogeny Broth
LPA	Lysophosphatidsäure
LRIG2	Leucine-rich Repeats and Immunoglobulin-like Domains Protein 2
LRIG3	Leucine-rich Repeats and Immunoglobulin-like Domains Protein 3
LTR	Long Terminal Repeats
MIN6	Mouse Insulinoma 6
MT5-MMP	Membrane-type 5-Matrix Metalloproteinase
NCAM-L1	Neural Cell Adhesion Molecule L1
NP40	Nonidet P-40
NrCAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
OD	Optische Dichte
P3	Durch die $\gamma$ -Sekretase aus C83 proteolytisch freigesetztes Peptid
PAM	Peptidyl-Glycine A-Amidating Monooxygenase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Prohormonkonvertase
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
Strep	Streptomycin
PEN2	Presenilin Enhancer 2
PLXDC2	Plexin Domain-containing Protein 2
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PNS	Peripheres Nervensystem
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTP NE-6	A Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase NE-6
PTPRN	Receptor-type Tyrosine-protein Phosphatase N
PTPRN2	Receptor-type Tyrosine-protein Phosphatase N2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
Rpm	Revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
S2	Sicherheitsstufe 2
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SEZ6	Seizure Protein 6
SEZ6L1	Seizure Protein 6-Like 1
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
ST6Gal1	$\beta$ -Galactoside $\alpha$ 2 6-Sialyltransferase
STEN	Sodium Tris EDTA NP40
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus-DNA-Ligase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TDP-43	Transactive Response DNA Binding Protein 43 kDa

TEM7R	Tumor Endothelial Marker 7-related protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UAS	Upstream Activating Sequence
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **2. Einleitung**

### **2.1. Die Alzheimer-Krankheit**

#### **2.1.1. Geschichte**

Die Alzheimer-Krankheit ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des Gehirns, die von Alois Alzheimer im Jahre 1906 zum ersten Mal beschrieben wurde (Alzheimer, 1907). Er beobachtete bei der 51-jährigen Patientin Auguste Deter eine präsenile Demenz, welche durch den Verlust von Gedächtnis und anderer kognitiver Funktionen gekennzeichnet war. Nach dem Tod von Auguste Deter konnte Alzheimer bei der Autopsie des Gehirns auffällige histopathologische Veränderungen feststellen. Er fand neurofibrilläre Bündel und extrazelluläre Plaques, die bis heute die zwei charakteristischen Läsionen der Alzheimer-Krankheit darstellen.

#### **2.1.2. Epidemiologie**

Die Diagnose „Demenz bei Alzheimer-Krankheit“ nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) nimmt ca. 2/3 der Demenz Diagnosen ein und stellt damit die häufigste Form der neurodegenerativen Erkrankungen dar (Nussbaum and Ellis, 2003). Durchschnittlich 3 bis 9 Jahre nach Diagnosestellung führt die Alzheimer-Krankheit zum Tode. Hohes Alter stellt den Hauptrisikofaktor für die Alzheimer-Krankheit dar (Citron, 2010; Querfurth and LaFerla, 2010). Die globale Prävalenz der Demenz wird auf 24 Mio. eingeschätzt und wegen der weltweit alternden Bevölkerung legen epidemiologische Kalkulationen nahe, dass die Zahl der globalen Prävalenz sich alle 20 Jahre ungefähr verdoppeln wird (Mayeux and Stern, 2012). So wird die Prävalenz von Demenz für das Jahr 2030 auf ca. 75 Mio. geschätzt und für das Jahr 2050 auf ca. 132 Mio. (World Alzheimer Report 2015). Demenz Patienten benötigen eine aufwändige, intensive pflegerische Unterstützung, weshalb die steigenden Alzheimer-Krankheit Prävalenzen auch steigende Kosten im Gesundheitswesen mit sich bringen (Gustavsson et al., 2011). Somit werden die globalen, durch Demenzkranke verursachten Kosten für das Jahr 2015 auf 818 Milliarden US-Dollar und für 2030 auf ca. 2 Billionen US-Dollar eingeschätzt (World Alzheimer Report 2015). Nach diesen Einschätzungen wird die Alzheimer-Demenz bis zum Jahr 2030 die teuerste Krankheit in unserer Gesellschaft darstellen (Schaller et al., 2015). Da es bis heute keine kausale Therapie der Alzheimer-Krankheit gibt, die

die Krankheit heilen kann, sondern nur symptomatische Therapien, die den Verlauf der Krankheit verzögern können, ist die Erforschung der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit und die Entwicklung von neuen Medikamenten eine wichtige gesellschaftliche Aufgabe der Wissenschaft (Geldenhuys and Darvesh, 2015).

### **2.1.3. Klinik**

Die Alzheimer-Krankheit ist eine progressive, tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung des Gehirns, die sich durch Verfall der Kognition und des Gedächtnisses manifestiert. Die klassischen klinischen Zeichen sind eine amnestische Gedächtnisverschlechterung, Verfall der Sprache und visuospatiale Defizite. Zunächst fallen höhere Funktionen des Alltagslebens wie z.B. Benutzung der öffentlichen Verkehrsmittel aus, später basale Funktionen des Alltagslebens wie z.B. Essen, Toilettengang und Ähnliches. In der Spätphase der Krankheit können motorische und sensorische Symptome, Gangstörungen und epileptische Anfälle auftreten. Die Manifestationen der Alzheimer-Krankheit führen zur Einschränkung der Lebensführung, in Bezug auf alltagsrelevante funktionelle Fähigkeiten. Es treten zusätzlich neuropsychiatrische Symptome wie Veränderung der Stimmung, Apathie, Depressionen, Psychosen und Agitationen auf (Cummings, 2004).

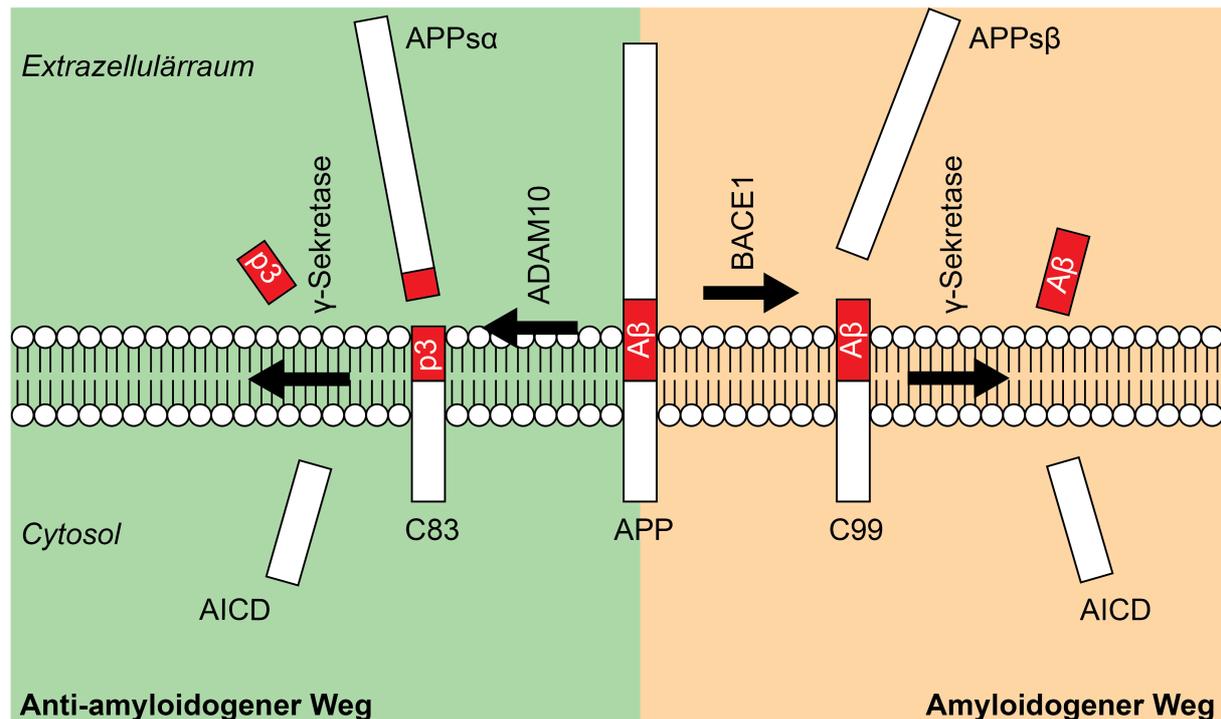
### **2.1.4. Histopathologische Veränderungen**

In post mortem Gehirnen von an der Alzheimer-Krankheit erkrankten Patienten finden sich ein Verlust von Neuronen und Synapsen und außerdem Ablagerungen von abnormen Proteinen. Intrazellulär finden sich sogenannte neurofibrilläre Bündel, welche aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen, wogegen sich extrazellulär zerebrale Amyloid-Plaques ablagern, welche aus Multimeren von 38 bis 43 Aminosäuren langen beta-Amyloid Peptiden ( $A\beta$ ) und dystrophen Neuriten bestehen (Selkoe and Hardy, 2016a). Das Tau-Protein ist ein in Axonen abundantes, lösliches Protein, das die Zusammensetzung und Stabilität von Mikrotubuli und den Transport von Vesikeln unterstützt. Das Ausmaß an Phosphorylierung von Tau-Protein wird durch ein Gleichgewicht von Enzymen reguliert und hat einen Einfluss auf die Aktivität von Tau-Protein in der Mikrotubuli Zusammensetzung und Stabilität. Deregulierte Hyperphosphorylierung von Tau macht dieses unlöslich und führt zu Polymerisation von Tau und Bildung von intrazellulären, neurofibrillären Bündeln. Diese zeigen keine Affinität zu Mikrotubuli und wirken durch den Zusammenbruch des Mikrotubuli-Systems toxisch auf Zellen (Iqbal et al., 2005). Die 36 bis 43 Aminosäuren langen  $A\beta$ -

Peptide ( $A\beta_{36}$  –  $A\beta_{43}$ ) sind physiologische Metaboliten der meisten Zelltypen, jedoch sind Neurone deren Hauptproduzenten. Die 42 Aminosäuren langen Peptid-Spezies  $A\beta_{42}$  sind die Hauptbestandteile der Amyloid-Plaques (Gu and Guo, 2013). Diese  $A\beta$ -Peptide werden sequentiell durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 (Beta-site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1) und  $\gamma$ -Sekretase, einen Proteinkomplex mit Presenilin 1 als katalytisches Zentrum, proteolytisch aus dem Amyloid-Vorläuferprotein APP (Amyloid Precursor Protein) herausgeschnitten und können durch diese Prozessierung verschiedene Längen haben. Monomere von  $A\beta_{40}$  sind häufiger als die zu Aggregation neigenden, schädlichen  $A\beta_{42}$  Spezies. Eine Imbalance zwischen Generierung und Abbau der  $A\beta$ -Peptide führt dazu, dass  $A\beta$  aggregiert und Amyloid-Plaques entstehen (Haass and Selkoe, 2007; Selkoe and Hardy, 2016a).

#### **2.1.5. Regulierte Intramembranproteolyse von APP**

Das Amyloid-Vorläufer-Protein APP ist ein neuronal exprimiertes 770 Aminosäuren langes Typ-1 Transmembranprotein und bildet zusammen mit seinen Homologen APLP1 (Amyloid Precursor Like Protein 1) und APLP2 (Amyloid Precursor Like Protein 2) eine Proteinfamilie. APP unterliegt kontinuierlich einem Prozess, der als regulierte Intramembranproteolyse (RIP) bezeichnet wird (siehe Abbildung 1) (Lichtenthaler et al., 2011).



**Abbildung 1: Darstellung der regulierten Intramembranproteolyse von APP.** APP wird von ADAM10 in einem membrannahen Schnitt prozessiert, wodurch das N-terminale APPs $\alpha$  und das C-terminale C83 und nach dem intramembranösen Schnitt durch die  $\gamma$ -Sekretase das nicht-pathogene p3 Peptid und die APP intrazelluläre Domäne (AICD) entstehen (anti-amyloidogener Weg). BACE1 schneidet APP ebenfalls membrannah, wodurch das N-terminale APPs $\beta$  und das C-terminale C99 entstehen. Der darauf folgende intramembranöse Schnitt durch die  $\gamma$ -Sekretase setzt aus C99 das pathogene A $\beta$ -Peptid in den Extrazellulärraum und die APP intrazelluläre Domäne (AICD) ins Cytoplasma frei (amyloidogener Weg).

Bei diesem streng regulierten Prozess kommt es zunächst zu einem als Ektodomänenspaltung bezeichneten, initialen Schnitt in der membrannahen, extrazellulären Domäne des Transmembranproteins durch eine als Sheddase bezeichnete Protease. Durch diesen Schnitt wird die Ektodomäne (Extrazelluläre Domäne) in das Lumen von Vesikeln oder in den Extrazellulärraum freigesetzt und hinterlässt einen membrangebundenen Stumpf, welcher durch einen intramembranös stattfindenden zweiten Schnitt (Intramembranproteolyse) in ein kurzes Peptid und in eine intrazelluläre Domäne gespalten wird. Das kurze Peptid wird wie die Ektodomäne entweder in ein Vesikellumen oder das extrazelluläre Milieu freigesetzt, die entstandene intrazelluläre Domäne wird in das Cytoplasma freigegeben. Dies ist ein genereller Mechanismus durch den verschiedene Transmembranproteine und GPI-verankerte Proteine durch RIP-Proteasen prozessiert werden können. Hierdurch entstehen entweder Ektodomänen, kurze Peptide oder intrazelluläre Domänen, die eine Signalfunktion übernehmen können oder weiterhin abgebaut werden. Die zentralen Funktionen von RIP sind Signalfunktionen und Degradierung von

Transmembranproteinen. APP, eines der ersten bekannten RIP-Substrate wird konstitutiv in zwei RIP-Stoffwechselwegen prozessiert (Lichtenthaler et al., 2011). Die beteiligten Proteasen wurden vor ihrer Identität als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Sekretase bezeichnet. Die in vivo relevante  $\alpha$ -Sekretase von APP in Neuronen ist die Metalloprotease ADAM10 (A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 10) (Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010; Lammich et al., 1999; Postina et al., 2004). Die  $\beta$ -Sekretase ist die Aspartyl-Protease BACE1, die bei ihrer Entdeckung 1999 von 5 unabhängigen Autoren charakterisiert wurde (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die  $\gamma$ - Sekretase wurde als ein Protein-Komplex bestehend aus den integralen Membranproteinen Presenilin 1 oder 2, Anterior-Phalanx defective 1 (Aph1), Presenilin Enhancer 2 (PEN2) und Nicastrin beschrieben (Kimberly et al., 2003). Das katalytische Zentrum wird durch das Presenilin 1 oder 2 gebildet. Kürzlich wurde entdeckt, dass die Protease MT5-MMP (Membrane-type 5-Matrix Metalloproteinase) an der APP Prozessierung beteiligt ist, diese wurde als  $\eta$ -Sekretase charakterisiert (Willem et al., 2015). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase sind Sheddasen von APP und schneiden die extrazelluläre Domäne an einer membranahen Position. Durch den Schnitt durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 wird die Ektodomäne APP $\alpha$  freigesetzt, für welche eine neurotrophische und neuroprotektive Funktion beschrieben wurde (Turner et al., 2003). Der entstandene membrangebundene Stumpf C83 wird durch die  $\gamma$ -Sekretase intramembranös geschnitten und führt zur Generierung des kurzen p3 Peptids, für das keine pathologische Wirkung beschrieben ist und der APP intrazellulären Domäne (AICD), die im Cytoplasma abgebaut wird. Da der durch die  $\alpha$ -Sekretase katalysierte Stoffwechselweg nicht zur Entstehung von toxischen A $\beta$ -Fragmenten führt, wird dieser scheinbar benigne Vorgang auch als anti-amyloidogener Stoffwechselweg bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird im pro-amyloidogenen Stoffwechselweg APP durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 in die Ektodomäne APP $\beta$ , sowie den membrangebundenen Stumpf C99 gespalten, aus welchem durch den intramembranösen Schnitt durch die  $\gamma$ - Sekretase das zu Amyloid-Plaques aggregierende, hydrophobe A $\beta$ -Peptid in den Extrazellulärraum, sowie die AICD ins Cytoplasma freigegeben wird (Lichtenthaler et al., 2011). Da A $\beta$  den Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques im Gehirn von Alzheimerkranken bildet, hält man A $\beta$  für den initialen Auslöser der Alzheimer-Krankheit. Durch diese Annahme stellt die  $\beta$ -Sekretase BACE1, die den ersten Schritt im A $\beta$ -produzierenden, amyloidogenen Stoffwechselweg katalysiert, einen zentralen

Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie der Alzheimer-Krankheit dar (Yan et al., 2016; Yan and Vassar, 2014).

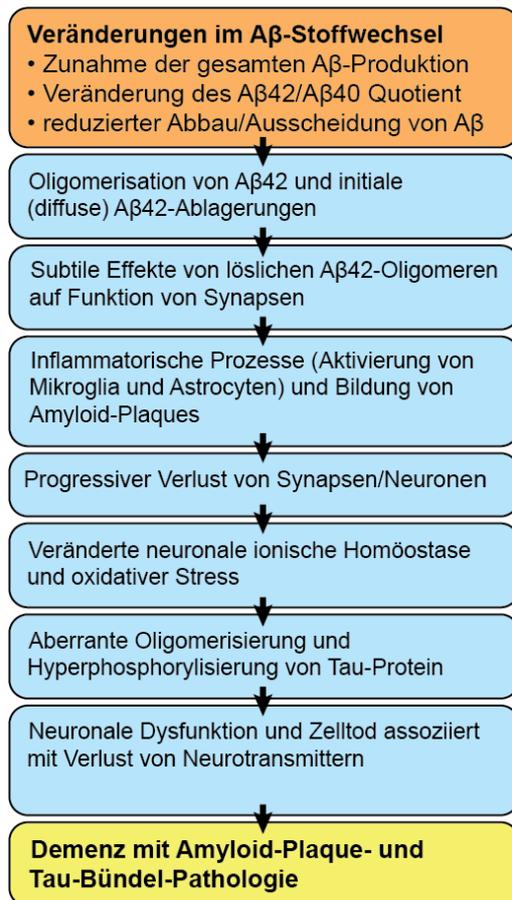
Vor dem Schnitt durch die Sheddasen  $\alpha$ - und  $\beta$ - Sekretase, kann die Ektodomäne von APP durch die  $\eta$ -Secretase MT5-MMP verkürzt werden und es entsteht s-APP $\eta$ . Gefolgt von einem Schnitt durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase entstehen so die Peptide A $\eta$ - $\alpha$  oder A $\eta$ - $\beta$  (Willem et al., 2015).

### **2.1.6. Pathogenese: Die Amyloid-Kaskade-Hypothese**

Die zwei Hauptläsionen der Alzheimer-Krankheit sind die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehenden, intrazellulären fibrillären Bündel und die extrazellulären Amyloid Plaques, die sich aus A $\beta$ -Peptiden zusammensetzen. Im Jahr 1992 stellten Hardy und Higgins die Hypothese auf, dass die Amyloid-Plaques bildenden A $\beta$ -Peptide die ursächlichen Agentien für die Entstehung der Alzheimer Pathologie sind. In ihrer sogenannte Amyloid-Kaskade-Hypothese postulieren sie, dass der APP-Metabolit A $\beta$  neurotoxisch wirkt und in der Folge zur Formation von neurofibrillären Bündeln und final zum Zelltod und schließlich zur Alzheimer-Demenz führt (Hardy and Higgins, 1992). Eine ähnliche Hypothese zur Beschreibung der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit wurde 1991 von Selkoe aufgestellt, der auch die vermehrte Produktion des APP-Metabolits A $\beta$  als zentralen Mechanismus für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit postulierte (Selkoe, 1991). Das A $\beta$ -Peptid wurde aus Amyloid-Plaques von verstorbenen Alzheimerpatienten isoliert und sequenziert (Glennner and Wong, 1984). Die stärkste Evidenz, die während der folgenden 2 Jahrzehnte Forschung die Amyloid-Kaskade-Hypothese unterstützte, kam aus dem Bereich der Genetik. Es wurden mehrere autosomal dominant vererbte familiäre Formen der Alzheimer-Krankheit identifiziert, bei denen die Mutationen in Genen liegen, die am APP- Metabolismus und insbesondere an der Produktion von A $\beta$  maßgeblich beteiligt sind. So befinden sich die gefundenen, für familiäre Alzheimer-Krankheit verantwortlichen Mutationen im APP Gen, und in den PSEN1 und 2 Genen, die für Presenilin, die katalytische Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase codieren (Cacace et al., 2016; De Strooper et al., 1998; Musiek and Holtzman, 2015; Wolfe et al., 1999). Bei den familiären Alzheimerformen kommt es zu Amyloid-Plaque-Ablagerungen in jungem Alter (<50 Jahre) und zur präsenilen Demenz vom Alzheimerstyp. Da die Mutationen sich zum Großteil in Regionen gruppieren, die zur vermehrten amyloiden Prozessierung von APP durch die  $\beta$ - Sekretase und  $\gamma$ - Sekretase und somit zur

vermehrten Produktion von A $\beta$  und zu vermehrten Amyloid-Plaque-Ablagerungen in Gehirnen von Mutationsträgern führen, stellen diese familiären Formen der Alzheimer-Krankheit starke Evidenz dar, dass A $\beta$  eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt (Cacace et al., 2016; Musiek and Holtzman, 2015). Außerdem entwickeln Down-Syndrom Patienten, die eine Trisomie 21 und somit eine zusätzliche Kopie des auf Chromosom 21 lokalisierten APP Gens haben, Amyloid-Plaque-Ablagerungen und Demenz vom Alzheimerstyp (Selkoe and Hardy, 2016a).

Aktualisierte Formen der Amyloid-Kaskade-Hypothese beschrieben Haass und Selkoe im Jahr 2007 und Selkoe und Hardy im Jahr 2016: Veränderungen im A $\beta$ -Metabolismus führen zu einer vermehrten Produktion des vermehrt zu Aggregation neigenden, hydrophoben A $\beta_{42}$  im Vergleich zum physiologischerweise abundanteren A $\beta_{40}$ . Dies kann auch bei hereditären Formen der Alzheimer-Krankheit durch Mutationen in den Genen APP, PSEN1 und PSEN2 verursacht werden. Daraufhin entwickeln sich lösliche A $\beta_{42}$ -Oligomere, die eine zunehmende synaptische Dysfunktion bewirken. Gleichzeitig entwickeln sich mikroskopisch sichtbare, zunächst benigne A $\beta_{42}$ -Plaques, die später A $\beta$ -Fibrillen ausbilden und inflammatorische Reaktionen in Form von Astrozytose und Mikrogliose nach sich ziehen. Es kommt zum progressiven Verlust von Synapsen und zur Ausbildung von dystrophen Neuriten. Später kommt es zu oxidativem Stress, veränderter ionischer Homöostase und anderen biochemischen Veränderungen. Neurofibrilläre Bündel werden durch veränderte Kinasen- und Phosphatasen-Aktivität und folglich Hyperphosphorylierung von Tau-Protein gebildet. Diese führen zu weiterer synaptischer und neuronaler Dysfunktion, schließlich zu Zelltod und folgender progressiven Demenz (siehe Abbildung 2) (Haass and Selkoe, 2007; Selkoe and Hardy, 2016a).



**Abbildung 2: Die Amyloid-Kaskade-Hypothese.** Zusammenfassende Darstellung der Amyloid-Kaskade-Hypothese von Haass und Selkoe, 2007. Veränderungen im Aβ-Metabolismus setzen eine Kaskade in Gang, die zu Verlust von Synapsen und Neuronen und letztlich zu Demenz führt.

Die Schwachstellen der Amyloid-Kaskade-Hypothese sind vor allem Diskrepanzen in der anatomischen und zeitlichen Korrelation des Auftretens von Amyloid Plaques, der Tau Pathologie und des Verlustes von Neuronen (Musiek and Holtzman, 2015). Für diese Diskrepanzen lassen sich allerdings Erklärungen finden, die im Einklang mit der Amyloid-Kaskade-Hypothese sind und im Folgenden dargestellt werden. Deshalb stellt die Amyloid-Kaskade-Hypothese das beste Erklärungskonzept der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit heutzutage dar.

Amyloid-Plaques treten in sporadischen, wie in familiären Fällen der Alzheimer-Krankheit als erstes in Regionen des Precuneus und des Frontallappens auf, der Verlust von Nervenzellen und das Auftreten von neurofibrillären Bündeln und Tau-Pathologie beginnt dagegen in zentraleren Gehirnregionen wie dem entorhinalen Kortex und dem Hippocampus (Braak and Braak, 1991; Musiek and Holtzman, 2015; Serrano-Pozo et al., 2011). In Annahme der Amyloid-Kaskade-Hypothese bedeutet das, dass Aβ scheinbar ohne direkte anatomische Korrelation das Auftreten der Tau-

Pathologie und Neurodegeneration verursacht. Tatsächlich gibt es Evidenz, dass dies der Fall ist. So weisen erbliche Formen der Alzheimer-Krankheit, bei denen eine genetische Mutation A $\beta$ -Überproduktion bedingt, die oben beschriebene Verteilung von Amyloid-Plaques und Tau-Pathologie im Gehirn auf (Bateman et al., 2012). Die genetischen Daten zeigen also, dass A $\beta$ -Überproduktion, unabhängig von der Lokalisation der A $\beta$ -Plaques die Tau-Pathologie und neurodegenerativen Prozesse der Alzheimer-Krankheit vorantreibt. Außerdem wurde bei Patienten beobachtet, dass eine vorhandene Tau-Pathologie ohne das Auftreten von Amyloid-Plaques nicht zu neuronalem Sterben führt, das Auftreten der Amyloid-Plaques also eine Voraussetzung der Entwicklung von Tau-Pathologie ist (Knopman et al., 2003; Price and Morris, 1999). Auch präklinische Ergebnisse unterstützen die Amyloid-Kaskade-Hypothese, da in Zellkultur und in Mäusen gezeigt wurde, dass A $\beta$ -Spezies in direktem Wege Tau-Pathologie und folgende Neurodegeneration bewirken können. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass oligomeres A $\beta$  durch spezifische Signalwege eine Tauopathie in Neuronen initiieren kann, wie durch Aktivierung der Src Kinase Fyn, durch welche Tau-spezifische Kinasen oder Proteasen, die Tau modifizieren können, aktiviert werden (Guerreiro et al., 2013; Ittner et al., 2010; Roberson et al., 2011). Außerdem gibt es eine Vielzahl von A $\beta$ -Spezies und toxischer oligomerer Formen von A $\beta$ , die nicht notwendigerweise mit dem Auftreten von Amyloid-Plaques anatomisch und zeitlich korrelieren. Den höchsten Stellenwert in Vermittlung der Alzheimer-Pathologie besitzen unter den A $\beta$ -Spezies Oligomeren die hochgradig selbstaggregierenden A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere (Selkoe and Hardy, 2016a). Allerdings ist bisher nicht letztlich geklärt, welche A $\beta$ -Spezies die Downstream-Pathologie vermittelt. Erst kürzlich wurde Pyroglutamat-modifiziertes Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ (pE3)) als zusätzliche A $\beta$ -Spezies diskutiert, die eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Downstream-Pathologie spielen könnte (Jawhar et al., 2011; Schilling et al., 2008) .

Die Diskrepanz in der zeitlichen Korrelation zwischen dem Auftreten von Amyloid-Plaques, Tau-Pathologie und Neurodegeneration äußert sich darin, dass in sporadischen und familiären Fällen der Alzheimer-Krankheit Amyloid-Plaques meist schon mehrere Jahre vor Auftreten von Tau-Pathologie und Jahrzehnte vor Auftreten von klinischer Symptomatik vorhanden sind (Bateman et al., 2012; Villemagne et al., 2013; Vos et al., 2013). Dies lässt sich dadurch erklären, dass der von A $\beta$  ausgelöste Pathomechanismus komplex und langwierig ist und verschiedene Mechanismen wie gestörte Proteostase, Ablagerungen anderer Proteinaggregate wie  $\alpha$ -synuclein und

TDP-43 (Transactive response DNA binding protein 43 kDa), dysregulierter Transport von A $\beta$ , Neuroinflammation, oxidativer Stress, mitochondriale Fehlfunktionen und altersbedingte Effekte von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, vaskulären Erkrankungen, Kopftraumata und Schlafstörungen eine potentielle Rolle in der Progression des von A $\beta$  angestoßenen Krankheitsprozesses spielen (Musiek and Holtzman, 2015). Es wurden z.B. für neuroinflammatorische Prozesse ein Einfluss von Polymorphismen im Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2), einem Rezeptor von myeloischen Zellen, auf die Aktivierung von Mikrogliazellen und ein damit verbundenes, erhöhtes Risiko für die Alzheimer-Krankheit gezeigt (Abduljaleel et al., 2014; Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013; Lu et al., 2015). Außerdem ist zu beachten, dass nicht primär die Amyloid-Plaques, sondern vor allem die löslichen A $\beta_{42}$ -Oligomere als toxische Agentien gelten, welche direkte toxische Effekte auf Synapsen haben und zusätzlich die neurotoxische Tau-Pathologie vorantreiben (Selkoe and Hardy, 2016a).

### **2.1.6. Genetische Risikofaktoren**

Die familiären Formen der Alzheimer-Krankheit (fAK) geben Aufschluss über die molekularen Ursachen, die zur Alzheimer-Krankheit führen. So sind die drei bekannten deterministischen Gene PSEN1, PSEN2 und APP, in denen Mutationen zum früheren Auftreten der Alzheimer-Krankheit führen, allesamt an der Generierung von A $\beta$ -Peptiden beteiligt (Levy-Lahad et al., 1995; Mullan et al., 1992; Schellenberg et al., 1992). PSEN1 und PSEN2 kodieren für Presenilin, die katalytische Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase. Insgesamt konnten mehr als 200 autosomal dominante Mutationen in den Genen für APP, PSEN1 und PSEN2 identifiziert werden, die die familiäre Alzheimer-Krankheit verursachen (Cacace et al., 2016). Hierbei führen die Mutationen ausnahmslos zur vermehrten Produktion von allen A $\beta$ -Isoformen oder zu einer Verschiebung der A $\beta$ -Produktion in Richtung der toxischen Isoform A $\beta_{42}$ . Die relevanten APP-Mutationen befinden sich in der Nähe der  $\beta$ -Sekretase und der  $\gamma$ -Sekretase Schnittstelle von APP und führen zu einer vermehrten A $\beta$ -Produktion (Yan and Vassar, 2014). So sind die sogenannte Schwedische K670N;M671L-Doppelmutation und die A673V-Mutation in der Nähe der  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle lokalisiert und führen zu einer vermehrten  $\beta$ -Sekretase Prozessierung von APP und somit zu vermehrter A $\beta$  Produktion (Di Fede et al., 2009; Mullan et al., 1992). Auch die Duplikation des APP-Lokus auf Chromosom 21 verstärkt die A $\beta$ -Produktion durch erhöhte Gen Dosis und verursacht Alzheimer-

Demenz (Cabrejo et al., 2006; Rovelet-Lecrux et al., 2006; Sleegers et al., 2006). Außerdem leiden Down-Syndrom-Patienten, die durch Trisomie des Chromosoms 21 eine zusätzliche Kopie des APP Gens tragen, häufig unter Amyloid-Plaques-Ablagerungen und entwickeln folglich Demenz (Olson and Shaw, 1969; Prasher et al., 1998; Wiseman et al., 2015). Im Gegenteil wurde auch eine Mutation des APP-Gens (A673T-Mutation) in einer genomweiten Studie der isländischen Bevölkerung identifiziert, die zu verminderter Bildung von A $\beta$  und somit protektiv gegenüber der Alzheimer-Krankheit und kognitiver Beeinträchtigung wirken (Jonsson et al., 2012).

Die Genetik der familiären Formen der Alzheimer-Krankheit spricht dafür, dass die zerebrale Produktion und Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt und unterstützt die Amyloid-Kaskade-Hypothese (Hardy and Higgins, 1992).

Zusätzlich zu den drei deterministischen Genen wurde Apolipoprotein E (APOE) als ein viertes Gen identifiziert, das ein Risikogen für die sporadische Alzheimer-Krankheit darstellt. APOE hat die drei Isoformen  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3, und  $\epsilon$ 4. Heterozygote Träger des  $\epsilon$ 4-Allels haben ein ca. 4-faches und homozygote Träger ein ca. 12-faches Risiko an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken (Verghese et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass APOE  $\epsilon$ 4 den Stoffwechsel von A $\beta$  beeinflusst, indem es die Aggregation und Ablagerung von Amyloid Plaques beschleunigt (Castellano et al., 2011; Fagan et al., 2002; Hudry et al., 2013; Vemuri et al., 2010; Verghese et al., 2013). Diese Erkenntnis stellt den Mechanismus um APOE auch in Unterstützung für die Amyloid-Kaskade-Hypothese. Allerdings ist die Assoziation von APOE  $\epsilon$ 4 mit der Pathophysiologie und Progression der Alzheimer-Krankheit noch nicht ausreichend geklärt und weitere Studien werden benötigt um dies weiter zu evaluieren.

### **2.1.7. Therapie der Alzheimer-Krankheit**

Nach der sogenannten cholinergen Hypothese kommt es durch extensiven Verlust von cholinergen Neuronen in Regionen wie dem Nucleus basalis Meynert und damit einhergehender Unfähigkeit neurologische Impulse über cholinerge Synapsen zu übertragen zu Demenz vom Alzheimer-Typ. Daher wurden die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Tacrin, Donepezil, Rivastagmin und Galantamin, die eine cholinerge Wirkung im Gehirn entfalten, klinisch als therapeutische Ansatzpunkte der Alzheimer-Krankheit getestet und sind heute für eine symptomatische Therapie etabliert. Zusammen mit dem N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Antagonist Memantin, der durch

Modulation der NMDA-Rezeptor Aktivität eine antiglutamaterge Wirkung und außerdem cholinerge und antiserotonerge Wirkung im Gehirn hat, handelt es sich um die einzigen Medikamente die zur Zeit für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit zugelassen und im klinischen Gebrauch sind. Allerdings wurde für diese Medikamente gezeigt, dass sie den Verlauf der Alzheimer-Krankheit im Sinne einer symptomatischen Therapie zwar verlangsamen, jedoch nicht zur Heilung führen können (Geldenhuys and Darvesh, 2015). Daher ist es in Anbetracht der epidemiologischen Relevanz der Alzheimer-Krankheit ein wichtiges gesellschaftliches Anliegen neue Medikamente für die Alzheimer-Krankheit zu entwickeln. Die vielversprechendsten, sich in Entwicklung befindenden Medikamente zielen gegen A $\beta$ , das nach der Amyloid-Kaskade-Hypothese das krankheitsverursachende Agens der Alzheimer-Krankheit darstellt (Selkoe and Hardy, 2016b; Yan and Vassar, 2014). So werden momentan immuntherapeutische Ansätze in Form von aktiver und passiver Immunisierung gegen A $\beta$ -Spezies versucht. Die passiven Immunisierungen durch die monoklonalen Antikörper Bapineuzumab, Solanezumab, Gantenerumab und Crenezumab befinden sich in Phase-III-Studien. Allerdings konnte bisher für keine der Immuntherapien eine Wirksamkeit im Sinne einer klinischen Besserung der Patienten gezeigt werden. Eine Phase-III-Studie (EXPEDITION3-Trial) des Antikörpers Solanezumab konnte bei Alzheimer-Patienten keine signifikante Verlangsamung des kognitiven Abbaus zeigen (Sacks et al., 2017). Eine neu aufgelegte Studie für Solanezumab läuft aktuell unter vervierfachter Dosis und einem auf 5 Jahre verlängerten Beobachtungszeitraum (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02008357>). Dagegen konnte in einer Phase-I-b Studie (PRIME-Trial) für den monoklonalen Antikörper Aducanumab eine Verlangsamung des kognitiven Abbaus bei Alzheimer-Patienten gezeigt werden und das Medikament wird nun Phase-III-Studien (ENGAGE- und EMERGE-Trial) untersucht (Budd Haeberlein et al., 2017; Sevigny et al., 2016).

Da die  $\gamma$ -Sekretase die Freisetzung und Produktion von A $\beta$  katalysiert, wurde sie als vielversprechender Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie bewertet. Die Entwicklung und klinische Testung von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren stellte sich jedoch als schwierig heraus, da die  $\gamma$ -Sekretase eine essentielle Rolle im Notch-Signalweg spielt und eine pharmakologische Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase zu Notch-Signalweg-bezogenen Nebenwirkungen wie gastrointestinalen, hämatologischen und dermatologischen Symptomen führen kann (Tong et al., 2012). So scheiterte eine Phase-III-Studie des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors Semagacestat, da es zu

schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust, Hautkrebs, Infektionen und außerdem zu einer Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten der Patienten kam (De Strooper and Chavez Gutierrez, 2015). Einer der im Moment vielversprechendsten und primären medikamentösen Ansatzpunkte für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit ist die A $\beta$ -generierende  $\beta$ -Sekretase BACE1. Durch die genetische Deletion von BACE1 wird die Produktion und Ablagerung von A $\beta$ -Peptiden im Gehirn vollständig verhindert (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Daher sollte die pharmakologische Inhibition von BACE1 zu einer Abnahme der A $\beta$ -Produktion führen und somit die Bildung von Amyloid-Plaques und folgende Alzheimer-Pathologie verhindern können. Die medikamentöse Anwendung eines BACE1-Inhibitors wäre sowohl primär therapeutisch als auch präventiv denkbar, da A $\beta$ -Oligomere unabhängig vom Stadium der Alzheimer-Krankheit toxisch sind (Walsh and Selkoe, 2007). Es wurden mehrere „Small Molecule“-BACE1-Inhibitoren entwickelt, die sich gerade in klinischen Studien befinden. Für den BACE1-Inhibitor Verubecestat der Firma Merck konnte bereits in einer Phase-Ib Studie gezeigt werden, dass er die A $\beta$ -Konzentration im CSF von Alzheimer-Patienten bis zu 84% reduzieren kann (Kennedy et al., 2016). Da die A $\beta$ -Konzentration im CSF für den besten Biomarker für den Status von löslichem A $\beta$  im Gehirn von Patienten gehalten wird, stellt dieser BACE1-Inhibitor einen guten Kandidaten für eine mögliche therapeutische Anwendung dar und zeigt auf, dass die Amyloid-Kaskade-Hypothese mit BACE1 als primären Produzenten von A $\beta$  im Gehirn in diesem Zusammenhang konsistent ist. Allerdings musste eine Phase-II/III Studie (EPOCH-Trial) von Verubecestat wegen mangelnder Wirkung Anfang 2017 eingestellt werden. Dieser BACE1-Inhibitor konnte zwar die Amyloid-Plaques in Gehirnen von Patienten reduzieren, zeigte aber keine klinische Besserung (Hawkes, 2017). Da in die Studie Patienten eingeschlossen wurden, die bereits an der Alzheimer-Krankheit erkrankt waren, sollen nun Konzepte der präventiven Anwendung von BACE1-Inhibitoren getestet werden und für Verubecestat wird zur Zeit eine Phase-III-Studie in präsymptomatischen Alzheimer-Fällen durchgeführt, für welche erste Ergebnisse im Jahr 2019 erwartet werden (Mullard, 2017). Weitere Studien, die BACE1-Inhibitoren als Medikamente für die Prävention der Alzheimer-Krankheit etablieren wollen, sind die Generation 1- und 2-Studie und die EARLY-Studie, welche BACE1-Inhibitoren in asymptomatischen Amyloid-positiven oder genetisch-veranlagten Patienten testen wollen ([www.generationprogram.com](http://www.generationprogram.com), [www.earlytrial.com](http://www.earlytrial.com)). Außerdem wurde für den BACE1-

Inhibitor E-2069 der Firma Eisai eine Phase-I-Studie erfolgreich abgeschlossen und weitere klinische Studien sind zu erwarten (Vassar et al., 2014; Yan and Vassar, 2014). Jedoch wurde zuvor schon eine Phase-II-Studie für den in Phase-I-Studien potenten und etablierten BACE1-Inhibitor LY2886721 der Firma Eli Lilly wegen nebenwirkungsbedingt abnormen Leberwerten bei Patienten abgebrochen (Lahiri et al., 2014; May et al., 2015). Diese Ergebnisse waren unerwartet, da es in präklinischen Sicherheitsstudien keinerlei Indizien für eine Lebertoxizität gegeben hatte und nach jetzigem Wissensstand die Lebertoxizität nicht auf die BACE1-Inhibitor bezogen werden kann (Vassar et al., 2014). Konform mit Ergebnissen aus der präklinischen Forschung, demonstrieren diese Ergebnisse, dass die Biologie von BACE1 komplex und nicht vollständig aufgeklärt ist. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren ein komplexer Phänotyp der BACE1-Knockout-Maus, sowie zahlreiche neue Substrate von BACE1 in vitro und in vivo entdeckt (Vassar et al., 2014). Es ist daher von besonderer Relevanz neue BACE1-Substrate zu finden und zu beschreiben, da diese nicht nur zur Einschätzung und Charakterisierung von BACE1-Inhibitor bezogenen Nebenwirkungen hilfreich sein, sondern auch als Biomarker für BACE1-Aktivität im Liquor cerebrospinalis von Patienten, die mit BACE1-Inhibitoren behandelt werden, dienen können.

Es bleibt jedoch eine offene Frage zu welchem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf die Behandlung mit BACE1-Inhibitoren begonnen werden soll. Denkbar wären einerseits präventive Ansätze, Patienten mit Risikomeerkmalen vor Ausbruch der klinisch manifesten Alzheimer-Krankheit mit BACE1-Inhibitoren zu behandeln. Auf der anderen Seite steht die Behandlung von Patienten mit bereits klinisch manifester Alzheimer-Krankheit. Die bisherige Studienlage und die klinische Testung des BACE1-Inhibitors Verubecestat sprechen dafür, dass der Einsatz von BACE1-Inhibitoren vor allem in der Prävention der Alzheimer-Krankheit eine Rolle einnehmen könnten und die betonen die Wichtigkeit von klinischen Studien mit BACE1-Inhibitoren in präsymptomatischen autosomal-dominant-veranlagten Alzheimer-Patienten, wie im Rahmen der DIAN-TU (Dominantly Inherited Alzheimer Network Trial Unit) -Studien.

## **2.2. Die $\beta$ -Sekretase BACE1**

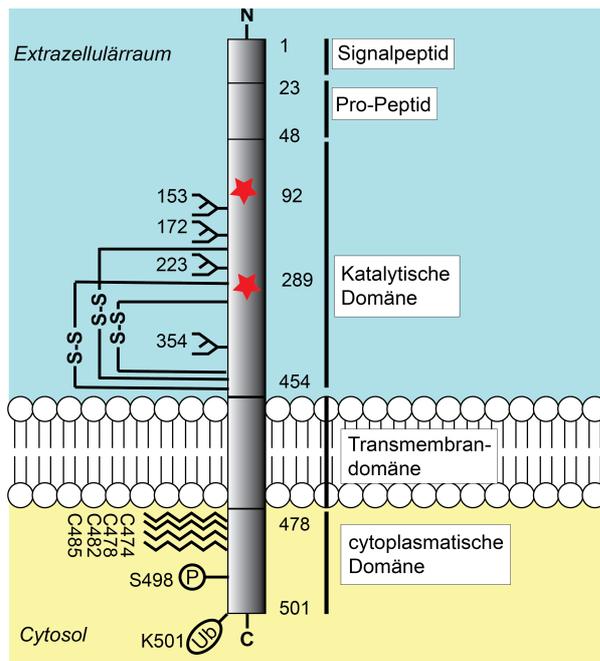
### **2.2.1. BACE1 als zentraler medikamentöser Ansatzpunkt für die Alzheimer-Krankheit**

Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) katalysiert den ersten Schritt in der Herstellung des amyloidogenen A $\beta$ -Peptids, dem Grundbaustein von A $\beta$ -Plaques und A $\beta$ -Oligomeren. Da A $\beta$ -Oligomere als die primären Agentien angesehen werden, die die Alzheimer-Krankheit auslösen, stellt BACE1 einen zentralen medikamentösen Ansatzpunkt für die Behandlung oder die Prävention der Alzheimer-Krankheit dar (Yan et al., 2016; Yan and Vassar, 2014). Es ist zwar nicht sicher, dass die vermehrte Bildung von A $\beta$  durch BACE1 der zentrale Pathomechanismus für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit ist, aber in Gehirnen von Alzheimer-Patienten wird eine erhöhte Aktivität von BACE1 beobachtet (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Li et al., 2004; Yang et al., 2003)

### **2.2.2. Identifizierung, Domänenstruktur, intrazelluläre Lokalisation, posttranslationale Modifikationen und Expression von BACE1**

Nach der Charakterisierung von APP und der Beschreibung von A $\beta$  als krankheitsauslösendes Agens für die Alzheimer-Krankheit, wurde im Jahr 1999 durch 5 verschiedene Arbeitsgruppen in verschiedenen Herangehensweisen die Identität der  $\beta$ -Sekretase als die des 501 Aminosäuren (AS) langen Typ-1 Transmembranproteins BACE1, initial auch als Asp2 oder Memapsin 2 beschrieben, festgestellt (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die relativ große extrazelluläre Domäne (AS 1- 454) enthält die katalytische Domäne (AS 49-454), gefolgt von der Transmembrandomäne (AS 455-478) und der cytoplasmatischen Domäne (AS 479-501). BACE1 ist eine Aspartyl-Protease und gehört zu der Protease-Gruppe der Pepsin-Familie und der retroviralen Aspartyl-Proteasen (siehe Abbildung 3) (Dislich and Lichtenthaler, 2012; Vassar et al., 2014). Das aktive Zentrum enthält die für Aspartyl-Proteasen typischen zwei Asparaginsäurereste, die an Aminosäure 92 und Aminosäure 189 lokalisiert und somit ungefähr 200 Aminosäuren voneinander entfernt sind. Physiologischerweise bildet BACE1 Dimere, die eine höhere enzymatische Aktivität besitzen als Monomere (Schmechel et al., 2004; Westmeyer et al., 2004). Das mit pH 4,0-4,4 saure pH-

Optimum für die proteolytische Aktivität von BACE1 korreliert mit der Lokalisation von BACE1 in intrazellulären Kompartments wie den Endosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk (Gruninger-Leitch et al., 2002; Shimizu et al., 2008; Vassar et al., 1999). BACE1 wird als 501 Aminosäuren langes Zymogen translatiert, anschließend im endoplasmatischen Retikulum das Signalpeptid (AS 1-23) durch Signalpeptidasen abgespalten und das mature Protein an vier Asparaginresten N-glykosyliert (N153, N172, N223, N354), transient acetyliert und palmitoyliert. Die katalytische Domäne von BACE1 wird während des Transports durch das Endoplasmatische retikulum (ER) gefaltet und durch Disulfidbrückenbildung an 3 Stellen querverknüpft (C216-C420, C278-C443, C330-C380) (Benjannet et al., 2001; Costantini et al., 2007; Haniu et al., 2000; Ko and Puglielli, 2009). Das Pro-Peptid (AS 24-48) wird im Trans-Golgi-Netzwerk durch Pro-Protein-Konvertasen abgespalten und das mature BACE1 auf die Länge von 453 Aminosäuren trunkiert (Bennett et al., 2000). Die cytosolische Domäne von BACE1 kann am Serin-Aminosäurerest 498 phosphoryliert werden, wodurch der retrograde Transport von BACE1 von frühen in späte Endosomen und ins Trans-Golgi-Netzwerk durch GGA-Proteine (Golgi-localized, gamma ear-containing, ADP ribosylation factor-binding) vermittelt wird (He et al., 2002; He et al., 2005; He et al., 2003; von Arnim et al., 2006; von Arnim et al., 2004; Wahle et al., 2005). Außerdem kann BACE1 in der cytoplasmatischen Domäne an Lysin 501 ubiquitinyliert werden (Kang et al., 2010). Die höchste Expression von BACE1 findet sich im Gehirn und wird hauptsächlich durch neuronale Expression repräsentiert, während die BACE1-Expression in Gliazellen wesentlich niedriger ist (Harada et al., 2006; Laird et al., 2005; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Zhao et al., 2007). In Mäusen wird während der frühen postnatalen Phase ein Gipfel der BACE1-Expression, vor allem in Neuronen des Cortex, Hippocampus und Kleinhirns beobachtet (Irizarry et al., 2001; Willem et al., 2006). Außerdem findet sich eine hohe Expression einer Isoform von BACE1 mit geringerer enzymatischer Aktivität im Pankreas (Bodendorf et al., 2001; Eehalt et al., 2002; Mowrer and Wolfe, 2008; Sinha et al., 1999). Zusätzlich wird BACE1 in den meisten peripheren Geweben exprimiert, allerdings nur zu geringem Ausmaß (Vassar et al., 1999). Es werden neben dem intrazellulär lokalisierten BACE1 aber auch lösliche Formen von BACE1 in der humanen cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) beschrieben (Verheijen et al., 2006).



**Abbildung 3: struktureller Aufbau von BACE1.** Schematische Darstellung der Domänenstruktur und posttranslationalen Modifikationen von BACE1. Die Asparaginsäurereste des aktiven Zentrums sind als rote Sterne markiert. Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Aminosäureresten 216–420, 278–443, 330–380 sind mit „S-S“ markiert. N-Glykosylierungen an den Aminosäureresten 153, 172, 223 und 354 wurden schematisch dargestellt. Eine Phosphorylierung (P) an Aminosäurerest 498 und eine Ubiquitinylierungsstelle (Ub) an Aminosäure 501 wurden dargestellt. S-Palmitoylierungen an den Aminosäureresten 474, 478, 482 und 485 wurden durch gezackte Linien dargestellt. (verändert nach Dislich und Lichtenthaler (Dislich and Lichtenthaler, 2012))

### 2.2.3 Biologische Funktionen

Die biologische Funktion einer Protease ist durch ihre Substrate definiert. Zunächst war APP das einzige bekannte BACE1-Substrat und die ersten BACE1-Knockout-Mäuse zeigten keinen schwerwiegenden Phänotyp. Ergebnisse aus weiteren BACE1-Knockout-Maus Studien haben allerdings gezeigt, dass BACE1-Knockout-Mäuse einen komplexen Phänotyp aufweisen. Im Vordergrund steht hierbei der vielschichtige neurologische Phänotyp mit axonalen Defekten, Hypomyelinisierung, Gedächtnisdefiziten, Muskelspindelveränderungen, neurochemischen Defiziten, Abnormalitäten in der Astro- und Neurogenese, Neurodegeneration mit dem Alter, reduzierte Dichte von dendritischen Dornen, schizophrene Symptome, Krampfanfälle und ein retinaler Phänotyp (Vassar et al., 2014). Die Charakterisierung dieses Phänotyps zeigte, dass BACE1 zahlreiche Funktionen im peripheren und zentralen Nervensystem erfüllt. Für einige Aspekte des BACE1-Knockout-Maus-Phänotyps konnten verantwortliche BACE1 Substrate identifiziert und somit physiologische Funktionen von BACE1 charakterisiert werden (Dislich and Lichtenthaler, 2012; Vassar et al., 2014).

Die am besten verstandenen Substrate von BACE1 im peripheren Nervensystem sind Neuregulin 1 Typ III und Neuregulin 1 Typ I. Die verminderte Prozessierung von Neuregulin 1 Typ III durch BACE1 führt zur Hypomyelinisierung und inkorrekt

Bündelung von Axonen durch Schwannzellen im peripheren Nervensystem. Durch eine zweifache Prozessierung durch BACE1 wird aus dem Transmembranprotein Neuregulin 1 Typ III die lösliche Epidermal Growth Factor (EGF)-Domäne freigesetzt, die eine wichtige Rolle in der frühen postnatalen Myelinisierung von peripheren Nerven spielt (Fleck et al., 2013; Willem, 2016; Willem et al., 2006). Für die Bildung und Aufrechterhaltung von Muskelspindeln wird die proteolytische Prozessierung von Neuregulin 1 Typ I durch BACE1 benötigt (Cheret et al., 2013).

Es wurden auch einige Substrate und zusammenhängende physiologische Funktionen von BACE1 im zentralen Nervensystem (ZNS) entdeckt. Bei fehlender Prozessierung des Transmembranproteins Neuregulin 1 durch BACE1 kommt es bei BACE1-Knockout-Mäusen zu neuropsychiatrischen Symptomen und schizophrenen Phänotypen (Savonenko et al., 2008). Außerdem kommt es bei BACE1-Knockout-Mäusen zu einer erhöhten Krampfbereitschaft und epileptischen Krampfanfällen. Dies ist durch die verminderte proteolytische Prozessierung der  $\text{Na}_V \beta$ -Untereinheiten durch BACE1 im ZNS zu erklären (Wong et al., 2005). BACE1 spielt außerdem eine wichtige Rolle in der axonalen Wegfindung. Das Transmembranprotein Close Homologue Of L1 (CHL1) ist ein BACE1-Substrat im ZNS und erfüllt durch die proteolytische Spaltung durch BACE1 eine Funktion in der axonalen Wegfindung. Außerdem wurden in proteomischen Studien BACE1 Substrate in murinen Neuronen identifiziert, die unabhängig vom BACE1-Knockout-Maus-Phänotyp auf Funktionen von BACE1 im ZNS hinweisen. Zu erwähnen sind die Substrate Zelladhäsionsprotein L1, CHL1, Contactin-2, Seizure Protein 6 (SEZ6), Seizure Protein 6-Like 1 (SEZ6L1), Golgi Apparatus Protein 1 (GLG1) und Peptidyl-Glycine A-Amidating Monooxygenase (PAM) (Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Diese Substrate scheinen hauptsächlich in der Funktion der Synapse, der axonalen Wegfindung und der Regulierung des astro- und oligodendroglären Milieus involviert zu sein.

Der BACE1-Knockout-Maus-Phänotyp und die neu identifizierten BACE1-Substrate zeigen, dass die BACE1-Biologie komplex und möglicherweise essentiell für die Funktion des ZNS und PNS ist. Deswegen ist es für die Entwicklung von BACE1-Inhibitoren als therapeutischem oder präventivem Ansatz für die Alzheimer-Krankheit wichtig, die BACE1-Physiologie eingehend zu erforschen und die Substrate und Funktionen von BACE1 zu erklären.

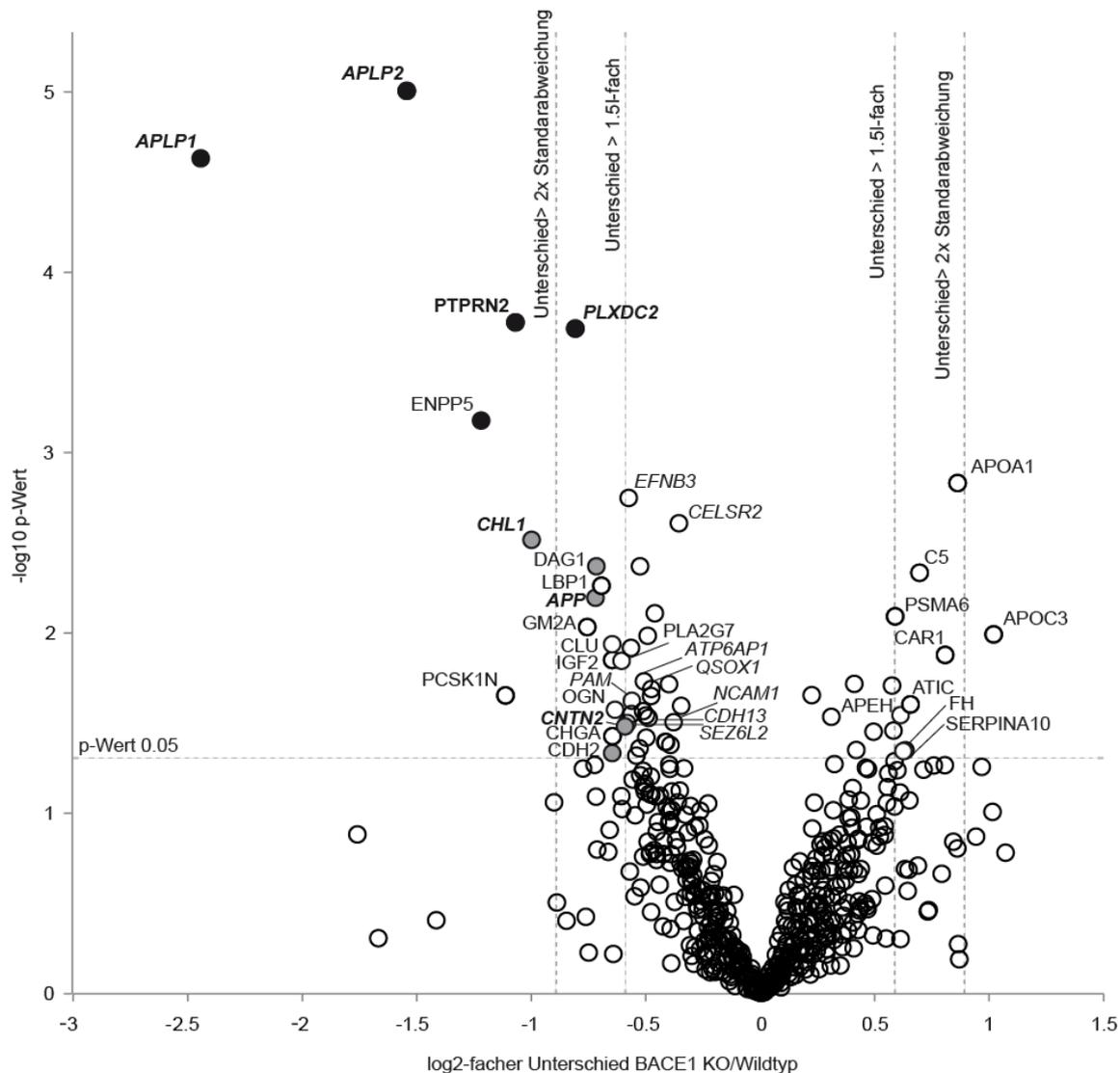
## **2.3. Quantitative proteomische Analyse von BACE1-Knockout-Maus CSF**

### **2.3.1. Identifizierung von potentiellen BACE1-Substraten im CSF von Mäusen**

Die cerebrospinale Flüssigkeit (CSF) ist eine interstitielle Flüssigkeit, die sich in ständigem Austausch zwischen dem ZNS und dem peripheren Blut befindet. Sie enthält unter anderem Proteine und Substanzen, die von Neuronen des ZNS sezerniert werden. In der Klinik ist die Analyse von CSF eine Routineaufgabe, da die Analyse von Substanzen wie Biomarkern, Entzündungsparametern oder Medikamentenspiegeln des ZNS in CSF-Proben von Patienten durchgeführt wird. Die Effizienz von Alzheimer-Medikamenten, unter anderem von BACE1-Inhibitoren wird in der erzielbaren Senkung von A $\beta$  im CSF gemessen und die A $\beta$ -Konzentration im CSF wird als der primäre Biomarker für den Status von löslichem A $\beta$  im Gehirn angesehen (Blennow et al., 2010). Quantitative Analysen von BACE1-Substraten im CSF könnten für das Monitoring der proteolytischen BACE1-Aktivität bei der Behandlung von Patienten mit spezifischen BACE1-Inhibitoren geeignet sein und könnten deshalb für die Entwicklung und klinische Erprobung von neuen BACE1-Inhibitoren von hoher Relevanz sein.

Das CSF von Mäusen ist schwierig zu analysieren, da nur ca. 10  $\mu$ l blutfreies CSF pro Maus gewonnen werden kann. Außerdem machen hochgradig abundante Proteine wie Albumin die Analyse weniger abundanter Proteine sehr schwierig. Daher gibt es bis jetzt nur wenige Studien, die das Maus-CSF-Proteom in überzeugender Tiefe darstellen (Cunningham et al., 2013; Dislich et al., 2015; Smith et al., 2014). Das CSF von Mäusen kann mittels einer kürzlich in unserem Labor entwickelten proteomischen Methode gründlich analysiert werden. Bis zu 715 Proteine können aus 5  $\mu$ l CSF identifiziert und quantifiziert werden. Dafür wird das Maus-CSF in einzelnen Hochflüssigkeitschromatographie Durchläufen in einem Tischmassenspektrometer (Q Exactive, Thermo Scientific) analysiert. Mit dem Ziel der Identifizierung von potentiellen BACE1-Substraten im CSF demonstrierte der quantitative Vergleich der proteomischen Analysen des CSF von BACE1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen, dass im CSF von BACE1-Knockout-Mäusen eine Gruppe von 42 Proteinen nach Anwenden eines zweiseitigen t-Tests statistisch signifikant reduziert vorhanden waren (siehe Abbildung 4). Unter anderem waren die bekannten BACE1-Substrate APP, APLP1, APLP2, CHL1 und Contacin-2 reduziert. Dies ist höchstwahrscheinlich dadurch zu erklären, dass in BACE1-Knockout-Mäusen, die durch BACE1 vermittelte

Sekretion der bekannten BACE1-Substrate nicht mehr vorhanden ist und die Sekretion dieser Proteine nur noch durch andere Sheddasen wie z.B. Metalloproteasen vermittelt wird. Nach Anwenden eines False-Discovery-Rate basierten multiplen Hypothesentests blieben 5 Proteine statistisch signifikant vermindert: Die bekannten BACE1-Substrate APLP1 und APLP2, sowie die bisher nicht validierten BACE1-Substrate Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 (PTPRN2) und Plexin domain-containing protein 2 (PLXDC2). Zusätzlich konnte Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (ENPP5) als ein bisher unbekanntes potentiell BACE1 Substrat identifiziert werden (siehe Abbildung 4) (Dislich et al., 2015).



**Abbildung 4: Identifizierung von potentiellen BACE1 Substraten in CSF von Mäusen (Dislich et al., 2015):** In diesem Volcano-Plot repräsentiert jeder Kreis ein Protein, das in mindestens 3 biologischen Replikaten quantifizierbar war. Der log<sub>2</sub>-fache Unterschied des Mittelwerts des BACE1 Knockout/ Wildtyp-Quotient ist gegen den  $-\log_{10}$  des p-Werts aufgetragen. Die vertikalen Linien markieren einen mindestens 1,5-fachen Unterschied, bzw. eine mindestens über 2-fache Standardabweichung. Die horizontale Linie gibt den Schwellenwert für statistische Signifikanz (p-Wert < 0,05) an. Alle Proteine über dieser Linie haben einen p-Wert < 0,05. Die als schwarze und graue Kreise markierten Proteine stellen mögliche BACE1 Substrate dar und sind als Membranproteine annotiert. Fett markierte Proteine wurden in vorherigen Studien als BACE1 Substrate beschrieben. Die Schwarz ausgefüllten Kreise zeigen die Proteine, die nach Anwenden eines multiplen Hypothesentestes noch signifikant verändert sind. Gen-Namen, die in normaler Schrift geschrieben sind zeigen Proteine, die eine mindestens 1,5-fache signifikante Ab- oder Zunahme zeigen. Die in kursiver Schrift geschriebenen Gen-Namen zeigen Proteine, die im CSF von BACE1 Knockout-Mäusen signifikant reduziert nachweisbar sind, aber eine Abnahme um weniger als den Faktor 1,5 zeigen.

Die in BACE1-Knockout-Mäusen vermindert ins CSF sezernierten Proteine repräsentieren potentielle BACE1-Substrate, es ist jedoch nicht bewiesen, dass es sich tatsächlich um BACE1-Substrate handelt, da die verminderten Proteinmengen auch durch andere Mechanismen als verminderte Ektodomänenspaltung durch BACE1 verursacht sein könnten:

1. BACE1 aktiviert Transkriptionsfaktoren, die die Expression der in BACE1-Knockout-Maus-CSF verminderten Proteine erhöht.
2. BACE1 aktiviert weitere Proteasen die zur Sekretion der im BACE1-Knockout-Maus-CSF verminderten Proteine führen und ist Teil einer Proteasen-Kaskade

Deshalb ist es wichtig, die neu im CSF identifizierten potentiellen BACE1-Substrate PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 mit einer unabhängigen Methode als Substrate von BACE1 zu validieren. Die Identifizierung und Validierung von neuen BACE1-Substraten und die Verwendbarkeit dieser als CSF-Biomarker ist von besonderer Relevanz, um die physiologische Funktion von BACE1 und den komplexen Phänotyp der BACE1-Knockout-Maus erklären zu können. Außerdem stellen im CSF von Mäusen messbare BACE1-Substrate potentielle prognostische und diagnostische Biomarker zur Überwachung der BACE1-Aktivität im Gehirn dar und könnten z.B. dabei helfen neue BACE1-Inhibitoren zu entwickeln, die, um Nebenwirkungen zu vermeiden, APP spezifisch wirken oder in klinischen Studien von BACE1-Inhibitoren, wie Verubecestat, zur Anwendung kommen.

#### **2.4. Die Transmembranproteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2**

In dieser Arbeit sollten die drei neuronal exprimierte Typ-1 Transmembranproteine Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 5 (ENPP5), Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 (PTPRN2) und Plexin domain-containing protein 2 (PLXDC2) als BACE1 Substrate validiert werden. PTPRN2 wurde bereits in einer anderen proteomischen Studie in  $\beta$ -Zellen des Pankreas von BACE1-Knockout-Mäusen als potentielles BACE1 Substrat beschrieben (Stutzer et al., 2013). Auch PLXDC2 wurde bereits in einer proteomischen Studie in primären murinen Neuronen, die mit einem spezifischen BACE1-Inhibitor behandelt wurden und in zwei

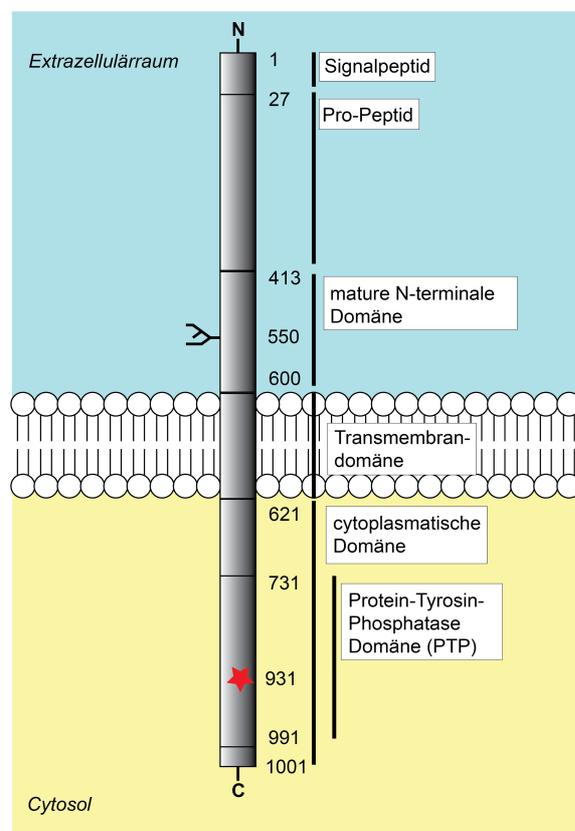
weiteren ähnlichen Studien als potentielles BACE1-Substrat charakterisiert (Hemming et al., 2009; Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Das wenig charakterisierte Transmembranprotein ENPP5 stellt einen bisher unbeschriebenes, neues potentielles BACE1-Substrat dar.

#### **2.4.1. Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 (PTPRN2)**

PTPRN2, welches auch als IA-2beta, Phogrin, PTP NE-6 oder ICA512 bezeichnet wird, ist ein 1001 Aminosäuren langes, mit dem Diabetes Typ-1 Autoantigen PTPRN (IA-2) eng verwandtes, Typ- 1 Transmembranprotein. Die Proteindomänenstruktur ist wie folgt zu erklären: Das Protein wird am rER als 1001 Aminosäuren (AS) langes, 100-120 kDa Zymogen synthetisiert, welches durch posttranslationale Modifikationen wie N-Glykosylierungen in ein 110-130 kDa Vorläuferprotein konvertiert wird. Dieses kann im oder beim Verlassen des trans-Golgi Netzwerks an der dibasischen Konsensussequenz durch die Prohormon-Konvertasen 1-3 (PC1-3) zu einem 60- bis 70-kDa-Protein trunkiert werden. Dem Signalpeptid (AS1-27) und der Pro-Region (AS 28-413) folgt die mature N-terminale Domäne (AS 414-600), gefolgt von der Transmembrandomäne (AS 601-621). Die cytoplasmatische Domäne (AS 622-1001) enthält die zwischen Maus, Ratte und Mensch hochgradig homologe Protein-Tyrosin-Phosphatase Domäne (PTP) (Hermel et al., 1999; Wasmeier and Hutton, 1996). Intrazellulär ist PTPRN2 in sekretorischen Vesikeln (SGs) lokalisiert und wird zur Zellmembran transportiert, wenn Hormone sezerniert werden (Solimena et al., 1996; Takeyama et al., 2009; Torii, 2009; Wasmeier et al., 2002). Anschließend kann PTPRN2 wieder in Endosomen zu sekretorischen Vesikeln zurückzirkulieren (Wasmeier et al., 2005). Die höchste Expression wird bei Mäusen im Gehirn und im Pankreas in den endokrinen Inselzellen, außerdem zu geringerem Ausmaß im Magen beobachtet (Chiang and Flanagan, 1996; Wasmeier and Hutton, 1996). In den endokrinen Inselzellen des Pankreas kolokalisiert PTPRN2 mit Insulin (Klumperman et al., 1998). Es ist keine katalytische Aktivität von PTPRN2 bekannt, die PTP Domäne von PTPRN2 zeigt eine sehr niedrige Phosphatidylinositol-Phosphatase-Aktivität (Caromile et al., 2010).

Die biologische Funktion von PTPRN2 liegt in der Beteiligung des Glucose-Insulin-Regelkreises, der Exocytose und Ausschüttung von Neurotransmittern, sowie der Regulation von Zellproliferation. PTPRN2-Knockout-Mäuse zeigen eine abnormale Glukoseintoleranz, verminderte Insulinsekretion und reduzierten Insulingehalt in

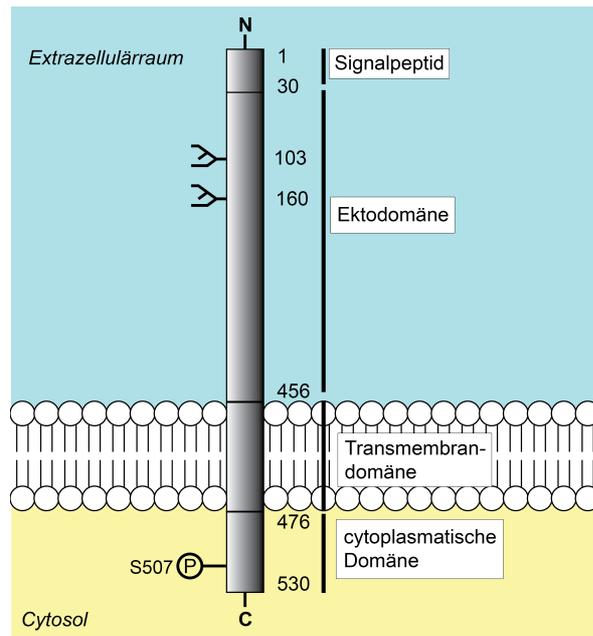
pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Cai et al., 2011; Kubosaki et al., 2006; Saeki et al., 2002). Spezifischer Knockdown von PTPRN2 in MIN6 und INS-1E-beta Zellen führt zu einer verminderten Zellproliferationsrate (Torii et al., 2009). Das immature proPTPRN2 ist in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert und ist mit Lymphknoten metastasiertem Brustkrebs assoziiert. Knockdown von proPTPRN2 in Brustkrebszellen blockiert das Tumorzellwachstum und förderte die Apoptose, dagegen bewirkt Überexpression von proPTPRN2 einen gegenteiligen Effekt (Sorokin et al., 2015). Außerdem werden PTPRN und PTPRN2 bei der Exozytose von Insulinvesikeln an die Plasmamembran transloziert und bilden einen Komplex mit dem Insulinrezeptor, wodurch das ISR2-Protein, der Hauptregulator des  $\beta$ -Zellwachstums, stabilisiert wird (Rhodes, 2005; Terauchi et al., 2007). PTPRN und PTPRN2 Doppel-Knockout-Mäuse weisen Defekte in der Ausschüttung der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin, und Serotonin auf und zeigen folglich Lern- und Verhaltensstörungen, Krampfanfälle und eine reduzierte Lebenserwartung. Außerdem zeigen Doppel-Knockout-Mäuse weibliche Infertilität und eine wahrscheinlich durch verminderte Sekretion von Katecholaminen bedingte reduzierte Plasma-Renin-Konzentration (Kim et al., 2009; Kubosaki et al., 2006).



**Abbildung 5: Struktureller Aufbau von PTPRN2.** Schematische Darstellung der Domänenstruktur und der posttranslationalen Modifikationen des Proteins. Das aktive Zentrum der Protein-Tyrosin-Phosphatase Domäne (PTP) ist durch einen roten Stern markiert. Eine N-Glykosylierungs-Stelle an Aminosäurerest 550 ist durch ein schematisches Zuckerrest markiert. Der N-Terminus (N) und der C-Terminus (C) des Proteins sind markiert.

### 2.4.2. Plexin domain containing protein 2 (PLXDC2)

Dieses 530 AS lange Typ-I Transmembranprotein wird auch als Tumor endothelial marker 7-related protein (Tem7r) bezeichnet. Nach dem Signalpeptid (AS 1-30) folgt die extrazelluläre Domäne (AS 31 – 455), die durch schwache Nidogen-Homologie und eine Plexin-Repeat oder PSI-Domäne charakterisiert wird. Die PSI-Domäne ist in einer Vielzahl von autoregulatorischen intramolekularen Kontakten involviert und findet sich in Molekülen der axonalen Wegfindung wie den Semaphorinen und Plexinen, sowie Integrinen und einer Reihe anderer kleiner Moleküle (Bunch et al., 2006; Mould et al., 2005; Zang and Springer, 2001). Der Transmembrandomäne (AS 456-476) folgt die kurze cytoplasmatische Domäne (AS 477-530). PLXDC2 besitzt eine Phosphorylierungs-Stelle an Serin-Aminosäurerest 507 und zwei N-Glykosylierungs-Stellen an Aminosäureresten 103 und 160 (Abbildung 6). Die höchste Expression von PLXDC2 bei Mäusen ist im Gehirn, insbesondere im sich entwickelnden embryonalen Gehirn, außerdem in den Extremitäten, den Lungen, im sich entwickelnden Herz, dem Rückenmark und den dorsalen Wurzelganglien (Miller et al., 2007). PLXDC2 ist ein Substrat der  $\gamma$ -Sekretase und wird wahrscheinlich durch eine Metalloprotease gesheddet (Hemming et al., 2008). Der Zusammenhang zwischen PLXDC2 und Zellproliferation, Zellalterung, Transformation und Zelltod wurde in einigen Studien gezeigt (Hallstrom et al., 2008; Miller-Delaney et al., 2011; Schwarze et al., 2005). Veränderte Expression von PLXDC2 führt zu verstärkter Proliferation und veränderten Mustern in der Neurogenese, die in einer Verdickung des Neuralrohrs resultieren. Dieser Effekt ist wahrscheinlich allein durch die Ektodomäne vermittelt, da die Überexpression der Ektodomäne alleine suffizient für die Auswirkung auf die Neurogenese ist (Miller-Delaney et al., 2011). PLXDC2 wurde in drei unabhängigen proteomischen Studien als potentiell BACE1-Substrat beschrieben (Hemming et al., 2009; Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012).

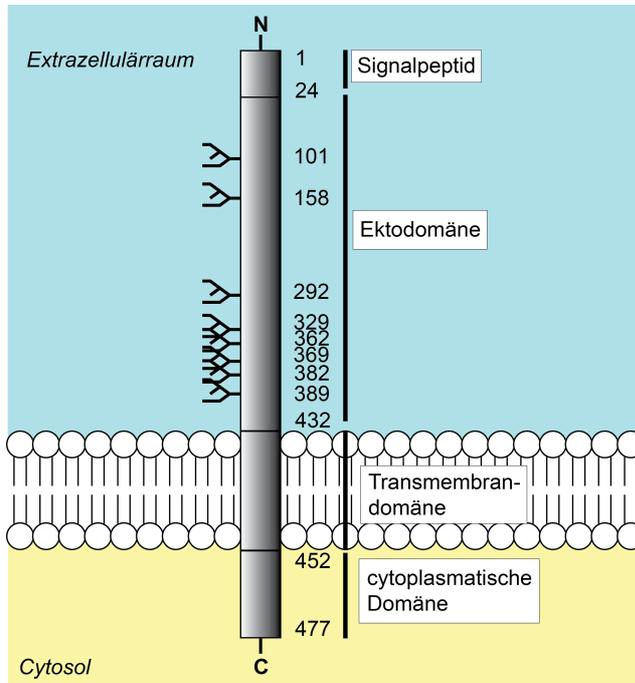


**Abbildung 6: Struktureller Aufbau von PLXDC2.** Schematische Darstellung der Domänenstruktur und der posttranslationalen Modifikationen von PLXDC2. Eine Phosphorylierung (P) an Serin-Aminosäurerest 507 (S507) und N-Glykosylierungs-Stellen an Aminosäureresten 103 und 160 sind durch schematische Zuckerreste dargestellt. Der N-Terminus (N) und der C-Terminus (C) des Proteins sind markiert.

### 2.4.3. Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 5 (ENPP5)

Es handelt sich um ein 477 Aminosäuren langes Typ-1 Transmembranprotein aus der Familie der NPP-Typ-Ektophosphodiesterasen (Stefan et al., 2005). Die Aminosäuren 1-24 bilden das Signalpeptid, Aminosäure 25-431 bilden die Ektodomäne, die Transmembrandomäne umfasst Aminosäuren 432-452, die cytoplasmatische Domäne beinhaltet Aminosäuren 453-477. In der Ektodomäne enthält ENPP5 acht N-Glykosylierungsstellen (Abbildung 7). ENPP5 wird *in vitro* N-glykosyliert, wie Daten aus Deglykosylierungsexperimenten in dieser Arbeit zeigen. Im Gehirn von Ratten liegt ENPP5 als oligomannosidisches Glykoprotein vor (Ohe et al., 2003). Die Familie der NPP-Typ-Ektophosphodiesterasen (NPP) ist eine Familie von Typ-I oder Typ-II Transmembranproteinen die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, aber auch extrazellulär als sezernierte oder gesheddete Enzyme vorkommen. Sie hydrolysieren Pyrophosphat- oder Phosphodiesterbindungen in einer Vielzahl von extrazellulären Strukturen, wie in Nukleotiden, Lysophospholipiden und Cholinphosphatestern. Der katalytische Effekt von NPPs beeinflusst eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie Zellproliferation und Zellmotilität, Angiogenese, Knochenmineralisation und Verdauung. Außerdem werden nicht-katalytische Funktionen für NPP in der Zellkommunikation beschrieben. NPP sind auch an der Pathophysiologie von Tumoren, Insulinresistenz und Kalzifizierungsstörungen beteiligt. NPP haben das vielversprechende Potential als einfach zugängliche Biomarker für verschiedene

Krankheiten zu dienen (Stefan et al., 2005). ENPP5 ist allerdings zur Zeit ohne beschriebene Funktion, es konnte bisher keine Lyso-phospholipase D oder NPP-Aktivität von ENPP5 gezeigt werden. ENPP5 wird im Gehirn und anderen Organen von Ratten exprimiert, außerdem wird es im Gehirn von Mäusen (Allen Brain Atlas) und in primären Neuronen von Mäusen exprimiert (Ohe et al., 2003).



**Abbildung 7: Struktureller Aufbau von ENPP5** Schematische Darstellung der Domänenstruktur und posttranslationalen Modifikationen. N-Glykosylierungs-Stellen an den Aminosäureresten 101, 158, 292, 329, 362, 369, 382 und 389 sind durch schematische Zuckerreste dargestellt. Der N-Terminus (N) und der C-Terminus (C) des Proteins sind markiert

### 3. Problemstellung

Die Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins APP durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 und die Freisetzung von A $\beta$ -Peptiden ist ein zentraler Mechanismus in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit (Yan and Vassar, 2014). Die therapeutische Inhibition von BACE1 ist deshalb ein zentraler Ansatz zur Prävention und Therapie der Alzheimer-Krankheit. In den letzten Jahren wurden verschiedene BACE1-Inhibitoren entwickelt und klinisch erprobt. Es befinden sich darunter vielversprechende Kandidaten, die für eine Therapie oder Prävention der Alzheimer-Krankheit in Frage kommen könnten (Vassar et al., 2014). Allerdings ist die Biologie von BACE1 noch nicht vollständig aufgeklärt. Die komplexen neurologischen Phänotypen von BACE1-Knockout-Mäusen lassen sich nicht vollständig erklären und verdeutlichen die physiologische Bedeutung von BACE1 (Vassar et al., 2014).

Die Analyse von Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinale Flüssigkeit, CSF) ist eine Standardmethode um Biomarker oder Substanzen im ZNS zu messen. Um Biomarker für BACE1-Aktivität zu finden, wurde das CSF von Wildtyp-Mäusen und BACE1-Knockout-Mäusen mittels einer am Lehrstuhl von Prof. Stefan Lichtenthaler neu entwickelten massenspektrometrischen Methode vergleichend quantitativ proteomisch analysiert (Dislich et al., 2015). Hierdurch konnten die bekannten BACE1-Substrate APLP1, APLP2 und die zwei potentiellen BACE1-Substrate PLXDC2 (Kuhn et al., 2012) und PTPRN2 (Stutzer et al., 2013) sowie das bisher unbekannte, potentielle BACE1-Substrat ENPP5 identifiziert werden (Dislich et al., 2015).

In dieser Arbeit sollten die im CSF von Mäusen identifizierten, potentiellen BACE1-Substrate PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 darauf untersucht werden, ob sie ähnlich wie APP, APLP1 und APLP2 von BACE1 proteolytisch prozessiert werden können.

Zuerst sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse des CSF von Mäusen mittels Immunblot reproduzieren ließen. Hierfür sollten CSF-Proben von BACE1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen auf APLP1 und APLP2 quantitativ analysiert werden.

Außerdem sollten APLP1 und APLP2 in mit dem BACE1-Inhibitor C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem) behandelten primären murinen Neuronen analysiert werden,

um zu untersuchen, ob sie durch die proteolytische Aktivität von BACE1 in den Extrazellulärraum sezerniert werden.

Danach sollten die Proteine PLXDC2, PTPRN2 und ENPP5 in HEK293-Zellen exprimiert und die proteolytische Spaltung durch BACE1 analysiert werden. Da die endogene BACE1-Aktivität in HEK293-Zellen gering ist, sollte BACE1 in HEK293-Zellen transient überexprimiert werden. Im Vergleich dazu sollte die proteolytische Aktivität von BACE1 durch den spezifischen BACE1-Inhibitor C3 gehemmt werden und eine vergleichende Immunblot-Analyse der Substrat-Proteine in Zelllysaten und Zellüberständen durchgeführt werden.

Um zu untersuchen, ob die potentiellen Substrate in einem direkten Schnitt durch BACE1 prozessiert werden, sollten diese in einem Protease in-vitro-Assay durch rekombinantes BACE1 proteolytisch gespalten werden. Hierdurch sollte evaluiert werden, ob die potentiellen Substrate direkte Substrate der Protease BACE1 sind oder BACE1 die potentiellen Substrate als Teil einer Proteasen-Kaskade reguliert bzw. der Einfluss von BACE1 auf die potentiellen Substrate durch andere sekundäre Faktoren wie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu erklären ist.

Da die Expression von BACE1 in Neuronen am höchsten ist und in vivo BACE1 und die meisten Substrate im Nervensystem zusammentreffen, sollten die potentiellen Substrate PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 außerdem in primären murinen Neuronen mittels eines lentiviralen Transduktionssystems exprimiert werden und auf eine proteolytische Spaltung analysiert werden. Hierfür sollten stabil transduzierte Neurone mit dem spezifischen BACE1-Inhibitor C3 behandelt werden und anschließend die Zelllysate und Zellüberstände mittels Immunblot vergleichend analysiert werden.

Außerdem sollten, um die endogen exprimierten Substrate analysieren zu können, verfügbare Antikörper charakterisiert werden, die die in primären murinen Neuronen endogen exprimierten potentiellen BACE1-Substrate binden und im Immunblot detektieren können.

In dieser Arbeit sollten die Transmembranproteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 als neue Substrate der Alzheimer-Protease BACE1 in vitro und in vivo validiert werden und damit die Grundlage für eine weitere Charakterisierung der physiologischen Funktionen von BACE1 gelegt werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken

#### 4.1.1. Übersicht über die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide (Primer)

<b>Ausgangs-plasmid</b>	<b>Zielpasmid</b>	<b>Primer-Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (in 5'- 3' Richtung)</b>
pcDNAT3.1_ Zeo(+)-CD5- HA-SLIC- FLAG	pcDNA3.1- Zeo(+)-CD5- HA-ENPP5- FLAG	ENPP5 LHA fw	TCAGGAGCAGGAGGATCAT CGGATCCAGAAGAGCAGAA AGTTCTGG
pcDNAT3.1_ Zeo(+)-CD5- HA-SLIC- FLAG	pcDNA3.1- Zeo(+)-CD5- HA-ENPP5- FLAG	ENPP5 RHA rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAG AGGATAGCTTGGAGTAACG GTTGAGCAAC
pcDNAT3.1_ Zeo(+)-CD5- HA-SLIC-HIS	pcDNAT3.1_Z eo(+)-CD5-HA- ENPP5-HIS	ENPP5 LHA fw	TCAGGAGCAGGAGGATCAT CGGATCCAGAAGAGCAGAA AGTTCTGG
pcDNAT3.1_ Zeo(+)-CD5- HA-SLIC-HIS	pcDNAT3.1_Z eo(+)-CD5-HA- ENPP5-HIS	ENPP5 RHA rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAG AGGATAGCTTGGAGTAACG GTTGAGCAAC
pcDNAT3.1_ Zeo(+)-CD5- HA-SLIC- FLAG	pcDNA3.1- Zeo(+)-CD5- HA-PTPRN2- FLAG	PTPRN2 LHA fw	GAGCAGAAGCTAATCAGTGA GGAAGATCTCGGAGGCGAA GAGGAGACTGCTGGG
pcDNAT3.1_ Zeo(+)-CD5- HA-SLIC- FLAG	pcDNA3.1-HA- PTPRN2- FLAG	PTPRN2 RHA rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAG AGGATGTCCTCTTGCTCTTC CTG

pcDNA3.1- HA-PTPRN2- FLAG	pcDNA3.1-HA- MYC-PTPRN2- FLAG	PTPRN2 MYC TAG fw	GAGCAGAAGCTAATCAGTGA GGAAGATCTCGGAGGCGAG GTCTTGTCTTCAGAAG
pcDNA3.1- HA-PTPRN2- FLAG	pcDNA3.1-HA- MYC-PTPRN2- FLAG	PTPRN2 MYC TAG rev	CTCACTGATTAGCTTCTGCT CTGGCTGCTCTGACTTCTTA ATC
pcDNA3.1- HA-SLIC- FLAG	pcDNA3.1-HA- MYC-PLXDC2- FLAG	PLXDC2-RHA- Fw	TCAGGAGCAGGAGGATCAT CGGATCCTGGACACCATA CAAT
pcDNA3.1- HA-SLIC- FLAG	pcDNA3.1-HA- MYC-PLXDC2- FLAG	PLXDC2-LHA- Rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAG AGGATGCACTGCTCTGATAC AAT
F2KP- 5XUAS-E1b- CD5-HA- SLIC-FLAG	F2KP-5XUAS- E1b-CD5-HA- ENPP5-FLAG	ENPP5 LHA fw	TCAGGAGCAGGAGGATCAT CGGATCCAGAAGAGCAGAA AGTTCTGG
F2KP- 5XUAS-E1b- CD5-HA- SLIC-FLAG	F2KP-5XUAS- E1b-CD5-HA- ENPP5-FLAG	ENPP5 RHA rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAG AGGATAGCTTGGAGTAACG GTTGAGCAAC
F2KP- 5XUAS-E1b- CD5-HA- SLIC-FLAG	F2KP-5XUAS- E1b-CD5-HA- SLIC-FLAG	PTPRN2 LHA fw	GAGCAGAAGCTAATCAGTGA GGAAGATCTCGGAGGCGAA GAGGAGACTGCTGGG
F2KP- 5XUAS-E1b- CD5-HA- SLIC-FLAG	F2KP-5XUAS- E1b-CD5-HA- SLIC-FLAG	PTPRN2 RHA rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAG AGGATGTCCTCTTGCTCTTC CTG
F2KP- 5XUAS-E1b- CD5-HA- PTPRN2- FLAG	F2KP-5XUAS- E1b-CD5-HA- MYC-PTPRN2- FLAG	PTPRN2 MYC TAG fw	GAGCAGAAGCTAATCAGTGA GGAAGATCTCGGAGGCGAG GTCTTGTCTTCAGAAG

F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-PTPRN2-FLAG	F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-MYC-PTPRN2-FLAG	PTPRN2 MYC TAG rev	CTCACTGATTAGCTTCTGCTCTGGCTGCTCTGACTTCTTAATC
F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-SLIC-FLAG	F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-PLXDC2-FLAG	PLXDC2-RHA-Fw	TCAGGAGCAGGAGGATCATCGGATCCTGGACACCATACAAT
F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-SLIC-FLAG	F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-PLXDC2-FLAG	PLXDC2-LHA-Rev	CAAGCCTAACGAGGAGGAGAGGATGCACTGCTCTGATACAAT

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Vektor	cDNS (cDNA)	Bezugsquelle
pcDNA3.1-HA-ENPP5-FLAG	pcDNA3.1-Zeo(+)	Enpp5 Maus cDNA Klon: NM_032003 (Origene)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pcDNA3.1-HA-ENPP5-HIS	pcDNA3.1-Zeo(+)	Plxdc2 Maus cDNA Klon: IRAVp968F0398D (lifesciences source bioscience)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pcDNA3.1-HA-PTPRN2-FLAG	pcDNA3.1-Zeo(+)	PTPRN2 cDNA Klon IRCLp5011D0332D (lifesciences source bioscience)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pcDNA3.1-HA-MYC-PTPRN2-FLAG	pcDNA3.1-Zeo(+)	PTPRN2 cDNA Klon IRCLp5011D0332D	im Rahmen dieser Arbeit erstellt

		(lifesciences source bioscience)	
pcDNA3.1-HA-PLXDC2-FLAG	pcDNA3.1-Zeo(+)	Plxdc2 Maus cDNA Klon: IRAVp968F0398D (lifesciences source bioscience)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-ENPP5-FLAG	F2KP-5XUAS-E1b	Enpp5 Maus cDNA Klon: NM_032003	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-MYC-PTPRN2-FLAG	F2KP-5XUAS-E1b	PTPRN2 cDNA Klon IRCLp5011D0332D (lifesciences source bioscience)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-PLXDC2-FLAG	F2KP-5XUAS-E1b	Plxdc2 Maus cDNA Klon: IRAVp968F0398D (lifesciences source bioscience)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
P12-Linker	Peak 12		S. Lichtenthaler
P12-BACE1	Peak 12		S. Lichtenthaler

#### 4.1.2. Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer findet sich im Abschnitt „Übersicht über die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide“ in Tabelle 1 und 2.

Die Primer wurden in Aqua bidestillata (ddH<sub>2</sub>O; gewonnen durch Verwendung einer MilliQ Plus Filteranlage von Millipore) in eine Konzentration von 100 µM durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Lösung gebracht und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die Arbeitskonzentration der Primer betrug 10µM und wurde durch weitere Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O erlangt.

Ein repräsentatives Pipettierschema für einen PCR Ansatz findet sich in Tabelle 3

Tabelle 3: repräsentativer Ansatz einer PCR

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>finale Konzentration</b>
DNA-Matrize [100ng/ µl]	1 µl	100 ng
Oligonukleotid 1 [10µM]	4 µl	800 nM
Oligonukleotid 2 [10µM]	4 µl	800 nM
dNTPs	1 µl	200 µM
Pwo- Polymerase (1 U/µl)	1 µl	0,02 U/µl
Pwo-Polymerase Puffer komplett	5 µl	1x
ddH <sub>2</sub> O	34 µl	
Summe	50 µl	

Alle Substanzen wurden in 0,2 ml Sarstaedt PCR Gefäße pipettiert, vorsichtig gemischt und auf Eis gekühlt (ca. 4°C) gelagert. Die Pwo-Polymerase wurde als letztes hinzugegeben, um eine frühzeitige Polymerase Aktivität zu vermeiden. Die PCR-Reaktion wurde in einem Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler durchgeführt. Die Pwo- Polymerase wurde aufgrund ihrer 3'-5'-Exonucleaseaktivität für die Amplifizierung der bis zu 2934 Basenpaaren langen Amplikons ausgewählt. Einer primären Denaturierung der Matrizenstränge bei 94°C für 2 min folgten 30 Zyklen, die sich in jeweils 3 Phasen untergliedern lassen:

1. Denaturierung der DNA unter Auftrennen des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge bei 94°C für 15 s.
2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die DNS-Matrizenstränge unter theoretischer (Hybridisierungstemperatur = Schmelztemperatur – 2°C) und empirischer (Verwendung eines Temperaturgradienten im PCR Thermocycler) Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur zwischen 52°C und 70°C für 30 s.
3. Elongation des Amplikons durch die Pwo-Polymerase bei 68°C, wobei die Elongationszeit entsprechend der Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt wurde, bei einer Elongationsgeschwindigkeit von 1500 Basenpaaren pro 1 Minute.

Als finaler Schritt wurde eine verlängerte Elongation bei 68°C für 7 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gelagert bis sie nach Zugabe von 15 µl

Ladepuffer (30% Glycerol, 10mM EDTA, 0,05% Orange G; Sigma) zu einem 50 µl Gesamtansatz in einer Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Hierfür wurde das 1-2% w/v Agarosegel mit 0,5 µg/µl Ethidiumbromid versetzt und in TAE-Puffer gelegt. Anschließend wurden die Proben in Geltaschen geladen und durch eine angelegte Spannung von 120 Volt für 30-45 min aufgetrennt. Als Größenreferenz wurde die 1 Kb Plus DNA Ladder (lifetechnologies) verwendet. Danach wurden die DNA-Fragmente durch die DNA-interkalierende Substanz Ethidiumbromid mit UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) visualisiert, fotodokumentiert, anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen gelagert. Eine Übersicht über die verwendeten Puffer, Substanzen und Materialien findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: verwendete Materialien für die Agarose Gelelektrophorese von PCR Fragmenten

TAE Puffer	40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA (ph 8.0)
DNA Ladepuffer	30% Glycerol, 10 mM EDTA, 0,05% Orange G; Sigma
Ethidiumbromid	Roth
DNA Größenmarker	1 Kb Plus DNA Ladder (lifetechnologies)
Agarose	1-2% w/v; Invitrogen gelöst in TAE-Puffer
Elektrophoresekammer	Owl Separation Systems, Inc.
UV-Schirm	Intas
Drucker	Mitsubishi

#### 4.1.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit von Macherey & Nagel den Anweisungen des Herstellers entsprechend verwendet. Die DNA wurde in 20-30 ml ddH<sub>2</sub>O eluiert und bis auf weitere Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **4.1.4. Subklonierung von cDNA in Expressionsplasmide mit der Gibson Assembly Technik**

Für die Gibson Assembly Klonierungsstrategie wurden die Oligonukleotid Primer zur Amplifizierung des gewünschten Transgens so gewählt, dass der Vorwärts-Primer einen sogenannten „Linken-Homologie-Arm“ enthielt, eine kurze Oligonukleotidsequenz, die homolog zur Subklonierungsstelle des Plasmidvektors ist. Der Rückwärts-Primer enthielt entsprechend einen „Rechten-Homologie-Arm“. So war das in den Expressionsvektor zu klonierende Transgen am 3'- und am 5'-Ende mit einer kurzen Homologiesequenz versehen, die die anschließende Integration des Transgens in den mit EcorV glattschneidend verdauten Vektor ermöglichte. Hierfür wurde zunächst die T5-Exonuklease-Aktivität ausgenutzt, die das Anlagern der Homologie-Arme des Transgens an die Homologiesequenzen des Expressionsvektors ermöglichten. Danach wurden die durch die T5-Exonuklease entfernten Nukleotide durch Aktivität der Phusion-Polymerase neu angelagert. Anschließend fand die Ligation des letzten freien 3'-Hydroxy-Endes und 5'-Phosphat-Endes durch die Taq-Ligase statt. Hierfür wurden für die Gibson Assembly Reaktion 0,15 pM linearisierter Vektor, 0,15 pM PCR amplifiziertes Transgen und 10 µl Gibson Assembly Mastermix (Komponenten: Isothermal reaction buffer, T5 Exonuclease, Phusion DNA Polymerase, Taq Ligase, H<sub>2</sub>O) und 10 µl H<sub>2</sub>O für 60 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation erfolgte für eine anschließende Transformation die Lagerung auf Eis oder eine Lagerung bei -20°C für spätere Verwendung.

#### **4.1.5. Transformation von chemisch kompetenten E. coli vom Stamm DH5-Alpha mit Plasmidvektoren**

Im nächsten Schritt wurde eine Transformation des ligierten Expressionsvektors in chemisch kompetente E. coli vom Stamm DH5-Alpha (NEB) durchgeführt. Hierfür wurden chemisch kompetente E.coli des Stamms DH5-Alpha (NEB) auf Eis aufgetaut und 50 µl der kompetenten Zellen in 1,5 ml Mikrozentrifugen Gefäße transferiert. 2 µl der Gibson-Assembly-Reaktion wurden zu den Bakterien hinzugefügt und nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden durchgeführt, gefolgt von Inkubation auf Eis für weitere 2 Minuten. Danach wurden 950 µl von raumtemperiertem SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 60 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die transformierten Bakterien auf 37°C vorgewärmte Ampicillin-LB-

Agar-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht (ca. 16 h) in einem 37°C Bakterieninkubator kultiviert.

Tabelle 5: Verwendete Medien zur Transformation

LB (lysogeny broth)-Medium	1% Trypton (BD), 0,5% Yeast Extrakt (BD), 0,5% NaCl (Roth) in dH <sub>2</sub> O, (Gesamtlösung pH 7,0). Die Lösung wurde bei 1,2 bar für 20 min autoklaviert
Ampicillin-LB-Medium	100 µg/ml Ampicillin (Sigma) wurden dem LB-Medium zugesetzt
Ampicillin-LB-Agarplatten	100 µg/ml Ampicillin (Sigma) wurden der 50°C warmen Agarlösung zugesetzt
SOC (Super optimal broth with catabolite repression) Medium	Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l), Trypton 2 % (w/v) (20 g/l), Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l), Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l), Magnesiumchlorid 10 mM, Magnesiumsulfat 10 mM, 20 mM Glucose

#### **4.1.6. Präparation von Plasmidvektoren-DNS im kleinen (Mini-Präp) und mittleren (Midi-Präp) Maßstab**

Für eine Mini-Präp wurden Einzelkolonien transformierter E.coli des Stamms DH5-Alpha (NEB) in 5 ml Ampicillin-LB-Medium in 15 ml Falcon-Gefäße überführt und für ca. 16 h bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttel-Inkubator inkubiert. Danach wurden die Kulturen durch Zentrifugation in einer Tischkühlzentrifuge für 10 Minuten bei 5400 x g vom Ampicillin-LB-Medium getrennt und entweder bei -20°C bis auf weitere Verarbeitung gelagert oder der Plasmid-DNA-Präparation zugeführt. Hierfür wurden mit dem Nucleospin Plasmid-Isolierungs-Kit von Machery Nagel nach Herstellerprotokoll die Plasmid-DNA aus den Zell-Pellets gewonnen und einem Kontrollverdau durch spezifische Restriktionsendonukleasen unterzogen (Tabelle 6). Der Kontrollverdau der gewonnenen Plasmid-DNA wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese, wie im Abschnitt „Polymerase Kettenreaktion“ beschrieben, auf die erwarteten Verdauprodukte analysiert.

Tabelle 6: Exemplarischer Kontrollverdau

Protokoll: Zusammenpipettieren von 10µl Probe, 0,5 µl HindIII, 0,5µl Xbal, 0,5 µl BSA (bovines Serumalbumin), 2µl NBA 2 Puffer und 6,5 µl ddH<sub>2</sub>O in ein 0,2 ml Sarstaedt PCR-Gefäß. Anschließende Inkubation für 60 min bei 37°C.

10 µl	Probe
0,5 µl	HindIII
0,5 µl	Xbal
0,5 µl	BSA
2 µl	NBA 2
6,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
20 µl	Gesamtvolumen

Die Zellkolonien, die im Kontrollverdau die Plasmid-DNS mit dem gewünschten subklonierten Gen enthielten, wurden für eine Midi-Präp-Plasmid-Präparation ausgewählt. Hierfür wurde 250 ml Ampicillin-LB-Medium mit einer Zellkolonie angeimpft und für ca. 16 h bei 37°C/200 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit einem Midi-Plasmid-Isolierungs-Kit (Nucleobond Xtra, Machery Nagel) nach Herstellerprotkoll isoliert und die DNS-Konzentration mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer) ermittelt.

#### **4.1.7. Sequenzierung von klonierten cDNA-Konstrukten durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger**

Die neu klonierten Expressionsvektoren wurden nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger von der Firma GATC Biotech sequenziert. Die dafür verwendeten Primer wurden selbst entworfen, bzw. von der Firma GATC Biotech zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden in Form von Chromatogrammen dargestellt und mit der Software CLC Workbench mit den in-silico-Konstrukten verglichen, um eventuelle Mutationen auszuschließen. Es wurde darauf geachtet bei längeren Sequenzen bei Abnahme der Sequenzierungsqualität, Sequenzierungen mit zusätzlichen Primern durchzuführen, um eine zuverlässige Qualität über die gesamte Länge des zu sequenzierenden Bereichs zu gewährleisten.

#### **4.1.8. Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen mittels PCR**

Zellkulturüberstände wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und danach durch kurzes Zentrifugieren von zellulärem Debris befreit. Anschließend wurden die Proben nach Herstellerhinweisen des Mykoplasmen-PCR-Kit (Mycoplasma Detection Kit, VenorGeM) parallel zu mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen mit Oligonukleotid Primern gemischt und eine 39-zyklische PCR-Reaktion wurde durchgeführt. Die Proben wurden daraufhin wie beschrieben in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Mykoplasmen positive Amplikons untersucht.

### **4.2. Zellkultur**

#### **4.2.1. Zelllinien und Kulturmedien**

HEK293T Zellen und MIN6 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, life technologies) kultiviert, welches als Basismedium 10% fetales Kälberserum (FCS, fetal calf serum, life technologies) und 1% Penicillin/Streptomycin (life technologies) enthielt. Zur Selektion von stabil transfizierten HEK293T-Zellen wurden diese im Basismedium kultiviert, welches als Selektionsmedium eine Konzentration von 200 µg/ml Zeocin (life technologies) enthielt. HEK293T-Zellen sind ein Derivat von HEK293-Zellen, die zusätzlich das SV40-large-T-Antigen exprimieren, welches die Transfektionseffizienz der Zellen erhöht. HEK293-Zellen stammen aus humanen fetalen Nierenzellen, die mit einem Adenovirus transformiert wurden (Graham et al., 1977). MIN6 Zellen sind Derivate eines Maus Insulinoms und zeigen Charakteristika von pankreatischen Beta-Zellen, wie Insulinsekretion infolge von Glukosestimulation (Ishihara et al., 1993).

#### **4.2.2. Zellkultivierung**

HEK293T Zellen und MIN6 Zellen wurden in Basismedium in einem Zellinkubator (Hera Cell, Heraeus) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Kultur wurden 10 cm Zellkulturschalen oder 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Filterkappen (Thermo Scientific) verwendet. Die Zellkulturarbeit wurde ausschließlich unter sterilen Arbeitsbedingungen an Sterilwerkbank (Hera Safe, Hereaus) durchgeführt. Sämtliche Arbeitsutensilien wurden vor dem Einführen unter die Sterilwerkbank einer Desinfizierung mit 70% Ethanol (Sigma-Aldrich) unterzogen. Für die Arbeit mit

Volumina bis 1 ml wurden Pipetten (Eppendorf) mit sterilen Plastikpipettenspitzen zur Einmalbenutzung verwendet. Ab Volumina über 1 ml wurde mit 2 ml, 5ml, 10ml und 25 ml serologischen Pipetten (Sarstedt) mithilfe einer akkubetriebenen elektrischen Pipettierhilfe gearbeitet. Die Zellen wurden jeden 2.-3.Tag regelmäßig passagiert und das Medium wurde erneuert. Hierfür wurde in einer 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche das Basismedium mittels steriler Glaspipetten über eine Vakuumpumpe abgesaugt, der Zellrasen mit 3 ml sterilem PBS (phosphate buffered saline, 14 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und mit 1 ml Trypsin (Gibco) bei 37°C für 3 min inkubiert, um den Zellrasen zu lösen. Hierfür wurden die Zellen durch vorsichtige Stöße gegen die Seite der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Basismedium resuspendiert, in 15 ml Reaktionsgefäße (Falcon-Tubes) überführt und für 3 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde daraufhin vorsichtig in Basismedium resuspendiert, die Zellzahl durch Zellzählung mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die gewünschte Zellzahl in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in Basismedium überführt.

#### **4.2.3. Transient liposomale Transfektion mit Plasmidvektoren**

Zur transienten Lipofektion wurden die Zellen entweder konventionell transfiziert durch Zugabe des Transfektionsmix zu den Zellen oder revers transfiziert, indem zum im Zellkulturgefäß vorgelegten Transfektionsmix die Zellen zugefügt wurden. Für Transfektionen in einer 24-Well-Zellkulturplatte (Thermo Scientific) wurden pro Well  $2 \times 10^5$  Zellen, 500ng DNA und 1,0 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) eingesetzt. Die Plasmidvektoren-DNA und das Lipofectamine wurden zunächst separat in Opti-MEM Medium (life technologies) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden beide Mischungen als Transfektionsmix zusammengegeben, vorsichtig resuspendiert und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde für eine konventionelle Transfektion der Transfektionsmix zu den Zellen gegeben oder für eine reverse Transfektion die Zellen zum Transfektionsmix addiert.

#### **4.2.4. Selektion stabil transfizierter Zellpopulationen**

Für die Selektion von stabil transfizierten Zellpopulationen wurden HEK293T-Zellen in 6-Well-Zellkulturgefäßen transient liposomal transfiziert wie beschrieben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in T-175-Zellkulturflaschen in Selektionsmedium passagiert. Für 2 bis 3 Wochen wurden die Zellen nach mikroskopischer Inspektion je

nach Wachstumszustand regelmäßig in Selektionsmedium passagiert und in verschiedene Zellpopulationen aufgeteilt. Nach 2 bis 3 Wochen Selektionsprozess wurden die verschiedenen Zellpopulationen auf die Expression des Transgens mittels Immunblot getestet. Hierfür wurde die Expression des Transgens in den einzelnen stabilen Zellpopulationen quantitativ miteinander verglichen und die Zellpopulation mit der stärksten Expression wurde für weitere Experimente ausgewählt.

#### **4.2.5. Zellkultur primärer muriner corticaler Neurone von Tag 16 Mäuseembryonen**

Am Tag vor der Präparation der Cortices wurden 6-Well-Zellkulturplatten mit Poly-D-Lysin beschichtet. Hierfür wurde in jedes Well 800 µl einer 25 µg/ml Poly-D-Lysin in sterilem Wasser Lösung (Gibco) gegeben und für 2 bis 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Wells zweimal mit sterilem Wasser (Gibco) und einmal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, Gibco) gewaschen. Die gewaschenen Zellkulturplatten wurden dann über Nacht bei 37°C in einem Zellinkubator (Heraeus) inkubiert. Für die Kultur von primären murinen Neuronen wurden E16 Mäuseembryonen von trächtigen C57-BL6-Wt-Mäusen unter einem Biosicherheitsschrank BSC II (Integra Biosciences) aus dem Uterus der getöteten Maus entnommen. Die Köpfe der Mäuseembryonen wurden an der Halswirbelsäule mit einer Schere vom Rumpf abgetrennt und auf Eis in 10cm Zellkulturschalen in kaltes HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Lifetechnologies) überführt. Anschließend wurde unter einem 0.7X-4.5X binokularem Dissektionsmikroskop (Leica) das Cranium mit spitzen Pinzetten eröffnet und das Gehirn mitsamt der Meningen präpariert. Die Meningen wurden vom Hypothalamus ausgehend mit spitzen Pinzetten durch vorsichtiges Einführen der Pinzettenspitze zwischen die Meningen und das Gehirngewebe vorsichtig abgezogen. Danach wurden die Cortices präpariert und in kaltem HBSS auf Eis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach Sammeln aller Cortices wurden diese für 15 bis 20 min in 37°C vortemperiertem Verdauungsmedium bei 37°C inkubiert, woraufhin das Medium abgesaugt und durch Dissoziierungsmedium ersetzt wurde. Dieses wurde dann ebenfalls abgesaugt und erneut durch frisches Dissoziierungsmedium ersetzt, in welchem die Dissoziation durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 2 ml serologisches Pipette durchgeführt wurde. Daraufhin wurden die dissoziierten Neuronen im Dissoziierungsmedium in ein neues 15 ml Gefäß überführt und mit 700 rpm für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau (Roth) in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in einer

Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Well in Passagiermedium in Poly-D-Lysin beschichtete 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Danach wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Zellinkubator (Heraeus) inkubiert und nach 2-3 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Für die weitere Kultur wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und zweimal in der Woche wurde die Hälfte des Kulturmediums gewechselt.

Tabelle 7: Für die primäre Zellkultur verwendete Medien

Medium 1 (Verdauungsmedium)	9,7 ml DMEM, 0,01g L-Cystein, 200 U Papain (300 µl), pH 7,4
Medium 2 (Dissoziierungsmedium)	DMEM+ 10% FBS
Medium 3 (Passagiermedium)	DMEM+ 10% FBS+ 1% Pen/Strep
Medium 4 (Kulturmedium)	9,6 ml Neurobasal + 100ul Glutamine 50 mM + 100 µl Pen/Strep + 200ul B27

#### 4.2.6. Lentivirale Transduktion

##### 4.2.6.1. Abgeschirmtes, zweiteiliges lentivirales Transduktionssystem

Lentivirale Vektoren können zu einer effizienten, stabilen Expression von Transgenen in transduzierten Zielzellen führen. Die verwendeten lentiviralen Partikel der zweiten Generation enthalten strukturelle und enzymale Komponenten des HIV-1 Genoms, sowie Hüllstrukturen des Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Für die Transduktion von primären murinen Neuronen wurde ein in der Arbeitsgruppe Prof. Stefan Lichtenthaler etabliertes, abgeschirmtes zweiteiliges lentivirales Expressionssystem genutzt. Hierbei wurde das Transgen im Vektor F/KP-UAS unter die Kontrolle einer Upstream Activating Sequence (UAS) gesetzt, welche nur durch Binden des Transkriptionsfaktors Gal4-VP16 aktiviert wird und zur Expression des Transgens führt. Die Expression von Gal4-VP16 wird durch eine Cotransduktion der Zielzellen durch den Treibervektor FU/Gal4-VP16 gewährleistet. Durch dieses abgeschirmte Expressionssystem kann eine hohe gesamte Expression des Transgens und eine geringe Interferenz des Transgens beim Prozess der Produktion der lentiviralen Partikel erreicht werden. Insbesondere kann die Interferenz reduziert werden, wenn das Transgen für ein Transmembranprotein kodiert, da diese häufig in den Prozess der Produktion der lentiviralen Partikel interferieren (Nichtveröffentlichte Beobachtungen der

Arbeitsgruppe Prof. Stefan Lichtenthaler). Die Herstellung der lentiviralen Partikel erfolgte in HEK293T-Zellen, welche die Funktion der Verpackungszellen übernahmen. Die Verpackungszellen wurden mit den Expressionsvektoren psPax-2 für die lentiviralen Strukturproteine und pcDNA3.1-VSV-G für die Hüllproteine transient liposomal transfiziert (Kuhn et al., 2010). Gleichzeitig wurden die Verpackungszellen mit dem Plasmid F/KP-UAS, in das das gewünschte Transgen subkloniert wurde, liposomal transfiziert. Dieses Transgen enthielt, die für die retrovirale Integration notwendigen 3'- und 5'- LTRs (Long terminal repeats). Die Verpackungszellen produzierten somit Viren, die eine Vielzahl von Zielzellen infizieren können und die replikationsdefizient sind, da sie keine genetischen Informationen für die viralen Strukturproteine enthalten. Das gewünschte Transgen integriert sich, flankiert von 3'- und 5'- LTRs stabil in das Genom der transduzierten Zielzellen. Wegen des erhöhten biologischen Gefahrenpotentials, wurde für die Produktion der lentiviralen Partikel, sowie die Transduktion von Zielzellen in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 (S2) gearbeitet.

#### **4.2.6.2. Virusproduktion**

Für die Virusproduktion wurden als Verpackungszellen wenig passagierte HEK293T benutzt. Die liposomalen Transfektionen mit den Plasmidvektoren wurden in 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen (Thermo Scientific) wie beschrieben durchgeführt. Für eine 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale wurden 8x10<sup>6</sup> Zellen in 9 ml Opti-MEM (lifetechnologies) ausgesät und mit einem molaren Verhältnis der Plasmide F/KP-UAS: psPax-2: pcDNA3.1-VSV-G von 3,1:2,0:1,1 liposomal transfiziert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Zellinkubator (Heraeus) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium vorsichtig entfernt und durch 8,5 ml Verpackungsmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde zur Purifikation von hochpotenten lentiviralen Partikeln das Verpackungsmedium in 50 ml Gefäßen gesammelt, bei 3000 x g für 15 min zentrifugiert, um zellulären Debris zu entfernen und danach durch 0,45 µm Micron Filter (Millipore) in neue 50 ml Gefäße steril filtriert. Schließlich wurden je 32 ml der steril filtrierten Zellüberstände in dünnwandige SW28 Rotorgefäße (Beckman Coulter) gefüllt. Die SW28 Rotorgefäße wurden gewogen und gegebenenfalls durch ausgleichendes Hinzufügen von Medium balanciert und anschließend in einer Optima™ XPN Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) bei 22000 rpm und 4°C für 2 h zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände vorsichtig entfernt und jeweils 250 µl TBS-5 Puffer zum Pellet hinzugefügt, für 4 h bei 4°C inkubiert und

anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Danach wurden die resuspendierten lentiviralen Partikel bei 4°C für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend die Überstände in Aliquots bei -80°C zur weiteren Lagerung aufbewahrt.

Tabelle 8 TBS-5 Medium zur Suspension lentiviraler Partikel

<b>Für 100 ml TBS-5:</b>	<b>Substanz</b>	<b>finale Konzentration</b>
5 ml	1 M Tris-HCL, pH 7,8	50 mM
2,6 ml	5 M NaCl	130 mM
1 ml	1 M KCl	10 mM
0,5 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>	5 mM
10% BSA (w/v)		

#### **4.2.7. Behandlung von Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3**

Das Medium der Zellen wurde vollständig durch frisches Basismedium ersetzt, in welches der BACE1-Inhibitor C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem) in einer Konzentration von 2  $\mu$ M gemischt wurde (Stachel et al., 2004). Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Bei allen Zellen, die keine C3-Behandlung erhielten, wurde um die Kontrollbedingungen zu optimieren, das Medium ebenfalls vollständig durch frisches Basismedium mit einer des Volumens des Inhibitors C3 entsprechenden Menge DMSO ersetzt, da DMSO als Lösungsmittel von C3 diente.

### **4.3. Biochemische Arbeitstechniken**

#### **4.3.1. Zelllyse**

Nach Sammeln der Zellüberstände wurden die Zellen auf Eis vorsichtig mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Danach wurde für 24-Well-Zellkulturplatten 300  $\mu$ l und für 6-Well-Zellkulturplatten 500  $\mu$ l 4°C gekühlter Standardlysepuffer pro Well oder für die Lyse von primären Neuronen Triton X-100 Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber (Thermo Scientific) vom Zellkulturgefäß abgelöst, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gesammelten Zelllysate wurden dann

bei 4°C und 10000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Zellysate bei -20°C gelagert.

Tabelle 9: Verwendete Zellysepuffer

Standardlysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 1% NP40, 2mM EDTA, Proteaseninhibitoren (Roche)
Triton X-100 Lysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, Proteaseninhibitoren (Roche)

#### 4.3.2. Bicinchoninsäure (BCA)-Test zur quantitativen Proteinbestimmung

Für die Proteinmengenbestimmung in Zellysaten wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Test (BCA Assay Kit, Uptima, Interchim) verwendet. Hierfür wurden je in Duplikaten 5 µl Zellysate in eine 96-Well-Platte pipettiert und das BC Assay Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zum Messen der optischen Dichte (OD) bei 562 nm und zur rechnerischen Bestimmung der Proteinmengenkonzentration wurde ein Mikroplatten-Lesegerät (Infinite 200PRO NanoQuant, Tecan) mit der dazugehörigen Software verwendet. Als Proteinstandards zur Bestimmung der Proteinmengenkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe von 2mg/ml BSA (Uptima, Interchim) verwendet und mittels linearer Regression eine Standardkurve berechnet.

#### 4.3.3. Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von sezernierten HA-Epitop tragenden Proteinen aus Zellüberständen von HEK293-Zellen wurde monoklonale Anti-HA-Agarose verwendet. Normalisiert auf den Proteingehalt der zugehörigen Zellysate wurden 500µl Zellüberstand mit 20 µl monoklonaler Anti-HA-Agarose in 1,5 ml Gefäßen gemischt, auf 700 µl mit PBS aufgefüllt und anschließend in einem Überkopfschüttler (Reax2, Heidolph) bei 4°C für 12h inkubiert. Danach wurden die Gefäße bei 9000 rpm für 2 min zentrifugiert, mit STEN-NaCl-Puffer und anschließend, nach erneuter Zentrifugation, zweimal mit STEN-Puffer gewaschen. Beim letzten Waschgang wurde die letzte Flüssigkeit von der Agarose mit einer Hamilton-Spritze mit einem Spitzendurchmesser von 10 µm abgenommen, 20 µl 4-fach Laemmli-Probenpuffer zugefügt und bei 95°C in einem Heizblock (Thermomixer, Eppendorf) für 5 min erhitzt.

Die Immunpräzipitation von sezernierten HA-Epitop tragenden Proteinen aus den Zellüberständen von primären murinen Neuronen wurde mit dem monoklonalen HA-Antikörper 3F10 durchgeführt. Hierfür wurden 100µl Protein G Sepharose mit 700µl 3F10 Hybridoma Zellüberständen in einem 1,5 ml Gefäß gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die inkubierte Sepharose dreimal mit PBS gewaschen und jeweils für 2 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde 100 µl PBS zugefügt, um eine Lösung der Sepharose herzustellen. Normalisiert auf den Proteingehalt der zugehörigen Zelllysate, wurden dann 500 µl der neuronalen Zellüberstände zu jeweils 20 µl der 3F10 HA-Antikörper gekoppelten Protein G Sepharose Lösung gegeben und in einem Überkopfschüttler bei 4°C für 12 h inkubiert und weiter verfahren wie für die oben beschriebene Immunpräzipitation mit monoklonaler Anti-HA-Agarose.

Tabelle 10: Für die Immunpräzipitation verwendete Antikörper und Sepharose

<b>Substanz</b>	<b>Klonalität/ Hersteller</b>
Anti-HA-Agarose	Monoklonaler Maus Antikörper, Klon HA-7, Sigma-Aldrich
HA3F10 Antikörper	Monoklonaler Ratte Antikörper, Klon 3F10
Protein G Sepharose	Sigma-Aldrich

Tabelle 11: zur Immunpräzipitation verwendete Puffer

STEN-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,5% NP40
STEN-NaCl-Puffer	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,5% NP40

#### 4.3.4. Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) und Western Blot/ Immunblot

Tabelle 12: verwendete Chemikalien für die SDS PAGE

<b>Substanz</b>	<b>Zusammensetzung/ Hersteller</b>
4X Laemmli-Puffer	0,25 M TRIS/HCL pH 6,8, 8 % SDS (v/v), 40 % Glycerin (v/v), 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v), 1 Spatelspitze Bromphenolblau, in dH <sub>2</sub> O
4X Lower TRIS	1,5 M TRIS pH 8,8, 0,4 % SDS (v/v) in dH <sub>2</sub> O
4X Upper TRIS	0,5 M TRIS pH 6,8, 0,4 % SDS (v/v) in dH <sub>2</sub> O
10X TRIS-Glycine	0,24 M TRIS Base, 0,2 M Glycine (v/v) (Roth), dH <sub>2</sub> O ad 5 l (für 10X TRIS-Glycine/SDS, zusätzlich 0,1% SDS (v/v))
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
APS	Ammoniumpersulfat, 10 % (w/v) gelöst in dH <sub>2</sub> O, SigmaAldrich
70% Isopropanol	in dH <sub>2</sub> O, SigmaAldrich
Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein	Biorad

Tabelle 13: verwendete Materialien für Western Blot

<b>Substanz/ Material</b>	<b>Zusammensetzung/ Hersteller</b>
Nitrocellulosemembranen	0,45 $\mu$ m Porengröße, ThermoFisher
PVDF Membranen	0,2 $\mu$ m Porengröße, Biorad
PBS-T	140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCL 1% Tween-20 in dH <sub>2</sub> O, SigmaAldrich
Nichtfette Trockenmilchlösung	5 % Nichtfettes Trockenmilchpulver (SigmaAldrich) gelöst in PBS-T
10x Transferpuffer	0,24 M TRIS, 0,2 M Glycine, in dH <sub>2</sub> O
Mini Trans-Blot Cell Transfersystem	Biorad
Whatman Filterpapier	SigmaAldrich

Image Quant Detektionssystem	CCD- Kamera basiertes Detektionssystem, GE Healthcare
Mini-Protean Minigelsystem	Biorad
Netzteil Powerpac 300	Biorad
Gelständer, -platten und -kämme	Biorad

Zur eindimensionalen elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen in einem diskontinuierlichen Gelsystem wurde Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) benutzt, wodurch die Proteine unter dentaaurierenden oder nativen Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt wurden (Laemmli, 1970). Für die SDS PAGE wurde das Mini-Gelsystem der Firma Biorad verwendet und die ausschließlich verwendeten 1,5 mm dicken Gele wurden nach Angaben des Herstellers selbst angefertigt (siehe Tabelle 14). Die Gele wurden mit 15 Taschen angefertigt, wobei jede Tasche mit maximal 25 µl Probe befüllt wurde. Zur Gelelektrophorese wurde als Laufpuffer TRIS-Glycin/SDS Puffer verwendet.

Tabelle 14: Herstellung von 8% TRIS-Glycin-Polyacrylamidgelen

Zur Herstellung eines Trenngels:

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Acrylamid 40%	7,8 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,2 ml
4x Lower TRIS	4 ml
APS	60 µl
TEMED	30 µl
Gesamtvolumen	16 ml

Zur Herstellung eines Sammelgels:

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Acrylamid 40%	1,3 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,5 ml
4x Upper TRIS	2,5 ml
APS	30 µl

TEMED	30 $\mu$ l
Gesamtvolumen	10,3 ml

Die Herstellung des Trenn- und Sammelgels wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor dem Laden der Proben wurden maximal 25  $\mu$ l Proteinmischung mit einer entsprechenden Menge 4x Laemmli Puffer für 5 min bei 95°C in einem Heizblock (Thermomix, Eppendorf) erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 5  $\mu$ l eines Proteinstandards (Precision Plus Protein, Biorad) verwendet. Nach Laden der Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels, fand das Laufen der Proben in den Trenngelen für 20 min bei 90 V statt und das weitere Laufen im Sammelgel unter einer Spannung von 140 V für bis zu 60 min, bis die Banden im gewünschten Bereich ausreichend aufgetrennt waren. Danach wurden die Gele aus dem Western Blot-System (Mini-Protean, Biorad) gelöst und in einer flachen Schale des Transfersystems (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) in 1x Transferpuffer überführt. Anschließend wurde das sogenannte „Sandwich“ zusammengestellt, hierfür wurde das Gel in der Vorrichtung des Transfersystems (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) auf eine doppelte Schicht Whatman Filterpapier positioniert und eine Nitrocellulose oder in 70% Isopropanol aktivierte PVDF Membran vorsichtig auf das Gel gelegt und behutsam Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt. Zusätzlich wurden eine doppelte Schicht Whatman Filterpapier auf die Membran gelegt und das Zusammengesetzte in eine mit 1x Transferpuffer und einem Eisblock aufgefüllte Transfervorrichtung (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) getaucht und anschließend für 65 min mit einer Stromstärke von 400 mA transferiert. Die transferierte Nitrozellulose- oder PVDF-Membran wurde anschließend mit nichtfetter Trockenmilchlösung für 30 min auf einem Tischschüttler bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde die Membran zweimal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen, der in PBS-T mit 0,5% BSA verdünnte Primärantikörper auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht in einem 4°C Kühlraum auf einem Tischschüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit PBS-T gewaschen und daraufhin wurde die Membran mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden Sekundärantikörper verwendet, die die schwere oder die leichte Kette des Primärantikörpers binden. Daraufhin wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen und mit chemilumineszenten Reagenzien (Amersham ECL/Amersham ECL Prime, GE Healthcare) für 1- 5 min bedeckt und die Chemilumineszenz mit einer

CCD-Kamera (Image Quant, GE Healthcare) detektiert. Die entstandenen Bilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet. Alternativ wurden die Bilder zur Quantifizierung mit dem Programm Fujifilm MultiGauge bearbeitet und analysiert.

Tabelle 15: Verwendete Materialien und Antikörper für Immunblots

<b>Material</b>		<b>Zusammensetzung/ Hersteller</b>	
ECL Reagenzien		Amersham ECL Detektionsreagenzien ECL, ECL Prime (GE Healthcare)	
BSA 5%		Steril filtriertes Bovines Serum Albumin, SigmaAldrich	
PBS-T		140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCL, 1% Tween-20 in dH <sub>2</sub> O, SigmaAldrich	
Bildbearbeitungssoftware		Adobe Photoshop, Fujifilm MultiGauge	
Labor-Schüttler		GFL, Typ 3017	
<b>Primärantikörper</b>	<b>Epitop</b>	<b>Klonalität/ Firma</b>	<b>Herkunft/ Firma</b>
HA.11	YPYDVPDYA	Monoklonal/ Covance	Maus/ Covance
HA3F10	YPYDVPDYA		
FLAG M2	DYKDDDDK	Monoklonal/ Aldrich	Maus/ Sigma
Calnexin	Calnexin	Monoklonal/ Stressgen	Kaninchen/ Stressgen
Beta Actin	Beta Actin	Monoklonal/ Santacruz	Maus/ Santacruz
22C11	N-Terminus von APP	Monoklonal/ zur Verfügung gestellt von K.Beyreuther	Maus/ zur Verfügung gestellt von K.Beyreuther
BACE1 3D5	BACE1	Monoklonal/ zur Verfügung gestellt von R.Vassar	Maus/ zur Verfügung gestellt von R.Vassar

192 wt	sAPP $\beta$ - Schnittstelle von APP	Monoklonal/ Maus/ zur Verügung gestellt von D.Schenk
APLP1(12305- 2-AP)	APLP1 Ektodomäne	Polyklonal/ Kaninchen/ Proteintech
APLP2 (171617)	APLP2 Ektodomäne	Polyklonal/ Kaninchen/ Calbiochem
ENPP5 C128737	ENPP5 Ektodomäne	monoklonale IgG2a/ Maus/ LS Bio
PTPRN2 PAB15812	PTPRN2 Ektodomäne	Polyklonal/ Kaninchen/ Abnova

Alle Primärantikörper wurden in PBS-Tween mit 5% BSA verdünnt

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Epitop, Firma</b>
Anti-Maus-HRP	anti-Maus IgG, DAKO
Anti-Kaninchen-HRP	anti-Kaninchen IgG, DAKO
Anti-Ratte-HRP	anti-Ratten IgG, SantaCruz

Alle Sekundärantikörper wurden in PBS-Tween mit 5% BSA verdünnt

#### 4.3.5. In vitro Deglykosylierung von Glykoproteinen

Zur Deglykosylierung von N-Glykosylierungen wurden Proteingemische mit dem aus *Flavobacterium meningosepticum* purifizierten Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F, NEB) inkubiert. PNGase F hydrolysiert fast alle Typen von N-Glykan Ketten von Glykopeptiden und Glykoproteinen (Maley et al., 1989). Hierfür wurde nach Angaben des Herstellers verfahren und je 20  $\mu$ g Protein in einem 1,5 ml Gefäß und einem totalen Volumen von 20  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l 10 x denaturierenden Glykoprotein Puffer versetzt. Daraufhin wurde eine Denaturierung durch Hitze bei 95°C für 5 min durchgeführt. Danach wurden 2  $\mu$ l 10 x G7 Reaktionspuffer, 2  $\mu$ l 10% NP-40 und 2  $\mu$ l PNGase F hinzugefügt und die Proben für 1 h in einem Thermomixer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder in einer SDS PAGE wie beschrieben aufgetrennt.

Tabelle 16: verwendete Substanzen für die Deglykosylierung von Glykoproteinen

<b>Substanz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
-----------------	------------------------

10X denaturierenden Glykoprotein Puffer	0,5% SDS, 0,4 M DTT
10X G7 Reaktionspuffer	0,5 M Natrium Phosphate (pH 7,5,)
1X NP-40	10% NP-40 in ddH <sub>2</sub> O
Peptide -N-Glykosidase F (PNGase F)	500,000 U/ml

Alle Substanzen stammten von dem Hersteller New England Biolab (NEB)

#### 4.4. Methodische Ergebnisse

##### 4.4.1. BACE1-in-vitro-Assay zur Prozessierung von rekombinanten Proteinen

Die rekombinanten, mit dem HA-Epitop versehenen Proteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 wurden in HEK293-Zellen stabil exprimiert und anschließend aus den Zelllysaten mittels einer Anti-HA-Immunpräzipitation wie beschrieben aufgereinigt. Die Proteine wurden kompetitiv durch das Hinzufügen von 0,1 µg/µl HA Peptid (Sigma) eluiert und anschließend mit 20 ng/µl rekombinantes murines BACE1 (R&D Systems) im Proteasepuffer (50mM Natriumacetat Puffer pH 4,4) für 4 Stunden in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie beschrieben mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurden die Membranen mit dem primären Antikörper HA 3F10 über Nacht bei 4°C inkubiert. Um die Membranen zu entwickeln wurde ein HRP gekoppelter anti-Ratte-Antikörper, ECL-Reagenzien (GE Healthcare) und eine CCD-Kamera basierte Detektion (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare) benutzt.

Tabelle 17: Im BACE1-in-vitro-Assay verwendete Substanzen

Substanz	Zusammensetzung/ Hersteller
Rekombinantes murines BACE1	Hergestellt in einer NS0 abgeleiteten Maus Myelom Zelllinie, Sequenz des murinen BACE1 von Thr22-Thr457, trägt ein C-terminales 10-His Epitop, R&D Systems
Proteasepuffer	50mM Natriumacetat Puffer pH 4,4

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Aminosäuresequenzvergleich tryptischer Peptide von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2

Die Cerebrospinale Flüssigkeit (CSF) von Mäusen wurde vom Kollegen Dr. Bastian Dislich mittels einer kürzlich beschriebenen proteomischen Methode gründlich analysiert und bis zu 715 Proteine konnten aus nur 5µl CSF identifiziert und quantifiziert werden (Dislich et al., 2015). Dafür wurde das Maus CSF in einzelnen Hochflüssigkeitschromatographie Durchläufen in einem Tischmassenspektrometer (Q Exactive, Thermo Scientific) analysiert. Der quantitative Vergleich der proteomischen Analysen des CSF von BACE1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen demonstrierte, dass im CSF von BACE1-Knockout-Mäusen eine Gruppe von 42 Proteinen reduziert vorhanden war. Unter anderem waren die bekannten BACE1-Substrate APP, APLP1, APLP2, CHL1 und CNTN2 reduziert im CSF von BACE1-Knockout-Mäusen vorhanden. Dies war wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass in BACE1-Knockout-Mäusen, die durch BACE1 vermittelte Sekretion der bekannten BACE1-Substrate nicht mehr gegeben war und die Sekretion dieser Proteine nur noch durch andere Sekretasen wie z.B. Metalloproteasen vermittelt wurde. Nach Anwenden einer False Discovery Rate basierten multiplen Hypothesen Testung blieben noch 5 Proteine signifikant vermindert im CSF von BACE1-Knockout-Mäusen: Die bekannten BACE1-Substrate APLP1 und APLP2, sowie die in proteomischen Studien beschriebenen, aber unbestätigten BACE1-Substrate PTPRN2 und PLXDC2, außerdem das Typ-1 Transmembranprotein ENPP5, das hier zum ersten Mal als potentielles BACE1-Substrat beschrieben wurde (Dislich et al., 2015). Diese 5 signifikant verminderten, potentiellen BACE1-Substrate sollten in dieser Arbeit validiert werden. Zunächst wurden die tryptischen Peptide der potentiellen BACE1-Substrate PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 in einer Analyse der massenspektrometrischen Daten aus der BACE1-Knockout-Maus-CSF-Studie von Dislich et al., 2015 identifiziert.

Um zu analysieren aus welchem Teil der Domänenstruktur des Proteins die identifizierten Peptide von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 stammen wurde in dieser Arbeit ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der im CSF identifizierten tryptischen Peptide und der Vollängenproteine von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 durchgeführt. Es sollte durch diese Analyse evaluiert werden, ob die tryptischen

Peptide aus den sezernierten Ektodomänen der jeweiligen Proteine stammen oder ob diese möglicherweise aus apoptotischen Zellen oder den intrazellulären Domänen der Proteine stammen und somit nicht als Produkt des Ektodomänen Shedding der jeweiligen Proteine gewertet werden können.

Von PTPRN2 wurden insgesamt 8 Peptide von einer Länge von 10 bis 21 Aminosäuren im CSF detektiert und alle dieser Peptide ließen sich eindeutig der Extrazellulären Domäne zuordnen (Abbildung 8).

MGPPLPLLLL LLLPPPLPRA LPAPASARGR QLPGR LGCLF EDGLCGSLET  
 CVNDGVFGRC QKVPVMDTYR YEVPPGALLH LKVTLQKLSR TGFTWQDDYT  
 QRVIAQELAN LPKAYLWHGE ASGPASRLQQ NADNEKWFSL EREVALAKTL  
 RRYLPYLELL SQTPTANAHS RIDHETPAK GEDSSPENIL TYVAHTSALT  
 YPPATRAKYP DNLLRPF SRL QPDELSPKVD GDIDKQKLI ALGAYTAQRL  
 PGENDPEPRY LVHGSARAPR FFSATALSOR WPPPPGDAKD SPSMDDDTLL  
 QSLLKDLQCN SEVDRLGPLK EEKADSVAGA IQSDPAEGSQ ESHGRGAEGQ  
 PREQTDAPET MLQDHR SEV DDPVYKEVNR / L SFOLGDLK DYGSPLLPEG  
 PLEKSSREE IKKSEQPEEV LSSEEETAGV EHVRSRTYSK DLFERKPNSE  
 PQPRILEDQF QNRAPELWED EESLKLAAG PPSGGLQLEV QPSEEQQGYI  
 LTGNNPLSPE KKGQLMDQVA HILRVSSFF ADIK / VLGPV TEKVSANIQN  
 MTTADVIKAA ADNKDQLEKA TGLTIQSGI RPKGKLKLLP HQEEQEDSTK  
 FILLTFLSIA CILGVLLASS LAYCL RHNSH YKLDKLSGL GADPSADATE  
 AYQELCRQRM AIRPQDRSEG PHTSRINSVS SQFSDGPMPS PSARSSTSSW  
 SEEPVQSNMD ISTGHMILAY MEDHLKNKNR LEKEWEALCA YQAEPNSSLV  
 AQREENAPKN RSLAVLTYDH SRILLKSQNS HGSSDYINAS PIMDHDPRNP  
 AYIATQGGLP ATVADFWQMV WESGCAVIM LTPLENGVR QCHHYWPDEG  
 SNLYHYVEVN LVSEHIWCQD FLVRSFYLKN LQTNETRTVT QFHFLSWYDQ  
 GVPSTRSLL DFRRKVNKCY RGRSCPIIVH CSDGAGRSGT YVLIDMVLNK  
 MAKGAKEIDI AATLEHLRDQ RPGMVQTKEQ FEFALTAVAE EVNAILKALP  
 Q

Farbkodierung der topologischen Domänen: **Signalpeptid** Extrazelluläre Domäne, detektierte  
**Peptide rot markiert** Transmembrandomäne **Cytoplasmatische Domäne**

**Abbildung 8: Im CSF von Mäusen identifizierte tryptische Peptide von PTPRN2** Abgebildet ist ein Aminosäuresequenzvergleich. Es handelt sich um die Aminosäuresequenz des 1001 Aminosäure langen Typ-1 Transmembranproteins Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 (PTPRN2). Die in Dislich et al., 2015 im CSF von Mäusen detektierten tryptischen Peptide von PTPRN2 sind in der Aminosäuresequenz rot markiert und unterstrichen. Die insgesamt 8 Peptide sind alle in der Extrazellulären Domäne lokalisiert.

Auch die drei 9 bis 17 Aminosäuren langen detektierten Peptide von PLXDC2 ließen sich durch einen Sequenzvergleich der Ektodomäne von PLXDC2 zuordnen (Abbildung 9). Dasselbe Ergebnis konnte auch für ENPP5 gefunden werden, da

sowohl das 18 und als auch das 27 Aminosäuren lange im Maus CSF detektierte Peptid eindeutig aus der Ektodomäne von ENPP5 stammt (Abbildung 10).

MARFRRADLA AAGVMLLCHF LTDRFQFAHG EPGHHTNDWI YEVTNAFPWN  
 EEGVEVDSQA YNHRWKRNVDPFKAVDTNRA SMGQASPEK GFTDLLDDG  
 QDNNTQIEED TDHNYISRI YGPADSASRD LWVNIDQMEK DKVKIHGILS  
 NTHRQAARVN LSFDFPFYGH FLNEVTVATG GFIYTGEVVH RMLTATQYIA  
 PLMANFDPSV SRNSTVRYFD NGTALVVQWD HVHLQDNYNL GSFTFQATLL  
 MDGRIIFGYK EIPVLVQIS STNHPVK/VGL SDAFVVHR/I QQIPNVRRT  
 IYEYHRVELQ MSKITNISAV EMTPLPTCLQ FNGCGPCVSS QIGFNCWCS  
 KLQRCSSGFD RHRQDWVDSG CPEEVQSKEK MCEKTEPGET SQTTSHTT  
 TMQFRVLTST RRAVTSQMPT SLPTEDDTKI ALHLKDSGAS TDDSAEKKG  
 GTLHAGLIVG ILILVLIIAA AILVTVYMYH HPTSAASIFF IERRPSRWPA  
 MKFRRGSGHP AYAEVEPVGE KEGFIVSEQC

Farbkodierung der topologischen Domänen: Signalpeptid Extrazelluläre Domäne, detektierte  
 Peptide rot markiert Transmembrandomäne Cytoplasmatische Domäne

**Abbildung 9: Im CSF von Mäusen identifizierte tryptische Peptide von PLXDC2** Gezeigt ist ein Aminosäuresequenzvergleich der im CSF von Mäusen detektierten tryptischen Peptide und der Aminosäuresequenz des 530 Aminosäuren langen Typ-1 Transmembranprotein Plexin domain-containing protein 2 (PLXDC2). Die drei identifizierten tryptischen Peptide aus Dislich et al., 2015 sind alle in der Extrazellulären Domäne lokalisiert und sind in rot markiert.

MIPEFLLASC TLATLCHSAP FSLQPEEQKV LVVSFDGFRW DYLYKVPTPH  
 FHYIMKNGVH VNQVTNVFIT KTYPNHYTLV TGLFAENHGI VANDMFDPII  
 NKSFSLEHMD IYDSKFWEEA TPIWITNQRA GHASGAAMWP GADVKIHDSE  
 PTYYLPYNES VSFEDRVAKI EWFTAKDPI NLGFLYWEED DDTGHDVGPD  
 SPLMGSVISD VDHKLGYLK MLKRAKLWNN VNLIVTSDHG MTQCCKQRVI  
 ELDRYLDKEH YTLIDHSPVA ALPKEGKFD EVDALAGAH PNLTVYKKEE  
 IPERWHYKHN DRVQPIVAVA DEGWIYLNK SDDFLLGNHG YDNALAEHMP  
 IFLAHGPAFR KNFTKEAMNS TDLYSLLCHL LNLALPHNG SFWNVQDLLS  
 SATPKPIPYT QSTTLGLSD KPGEDEQEESS YPYYIGVSLG SIAMVFFV  
 LKHLIRSQV HTLQYRQVEV AQPLLQA

Farbkodierung der topologischen Domänen: Signalpeptid Extrazelluläre Domäne, detektierte  
 Peptide rot markiert Transmembrandomäne Cytoplasmatische Domäne

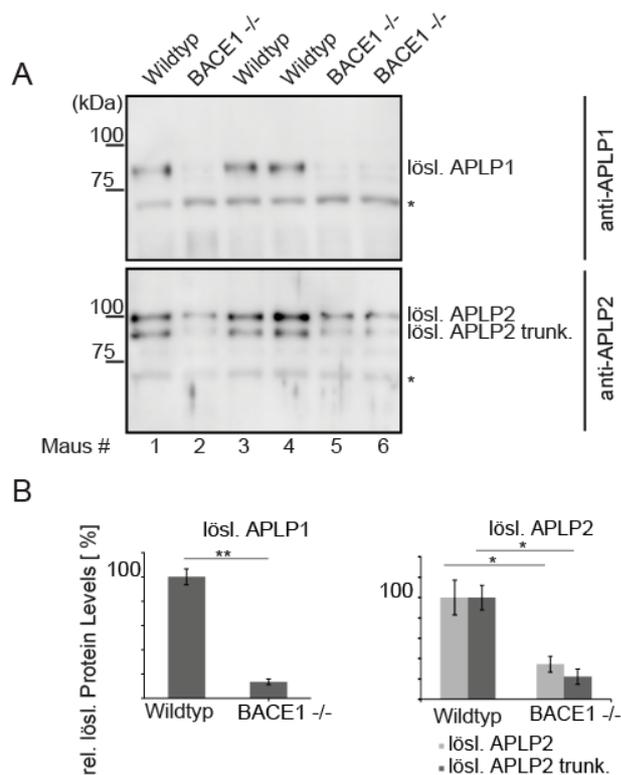
**Abbildung 10: Im CSF von Mäusen identifizierte tryptische Peptide von ENPP5** Gezeigt ist ein Aminosäuresequenzvergleich der im CSF von Mäusen detektierten tryptischen Peptide und der Aminosäuresequenz des 477 Aminosäuren langen Typ-1 Transmembranprotein Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5 (ENPP5). Die zwei identifizierten tryptischen Peptide aus Dislich et al., 2015 sind in der Extrazellulären Domäne lokalisiert und rot markiert.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die verminderte Sekretion der Proteine in BACE1-Knockout-Mäusen ins CSF von BACE1 vermittelter

Ektodomänenspaltung abhängt und die Peptide nicht von z.B. apoptotischen Zellen stammen, da sämtliche detektierten Peptide aus den Ektodomänen des jeweiligen Proteins stammen. Da PLXDC2 und ENPP5 sehr große Ektodomänen im Vergleich zur intrazellulären Domäne haben, ist es für diese Proteine auch wahrscheinlicher Peptide aus der Ektodomäne zu detektieren. Allerdings hat PTPRN2 eine relativ große intrazelluläre Domäne und es wurden auch von diesem Protein ausschließlich Peptide aus der extrazellulären Domäne detektiert.

## **5.2. APLP1 und APLP2 werden BACE1-Knockout-Mäusen weniger ins CSF sezerniert**

Um die in den Daten aus der massenspektrometrischen Studie in CSF von Mäusen identifizierten BACE1-Substrate APLP1 und APLP2 zu validieren, wurden CSF-Proben von drei BACE1-Knockout-Mäusen und 3 Wildtyp-Mäusen in einem unabhängigen Experiment gesammelt und mit spezifischen Antikörpern gegen lösliches APLP1 und lösliches APLP2 mittels Immunblot-Technik analysiert. Ähnlich zu der massenspektrometrischen Analyse waren die löslichen Ektodomänen von APLP1 und APLP2 im CSF von Wildtyp- und BACE1-Knockout-Mäusen nachweisbar und im CSF von BACE1-Knockout-Mäusen deutlich reduziert (siehe Abbildung 11). Die densitometrische Quantifizierung der Reduktion von löslichem APLP1 und löslichem APLP2 im CSF der BACE1-Knockout-Maus ergab eine 7,5-fache Reduktion für APLP1 und eine 3,5-fache Reduktion für APLP2 und korreliert somit mit der Quantifizierung aus der quantitativen massenspektrometrischen Analyse, in der für APLP1 eine 5,4-fache und für APLP2 eine 2,9-fache Reduktion gemessen wurde (Dislich et al., 2015). Da für PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 keine geeigneten Antikörper für eine Immunblot-Analyse zur Verfügung standen, konnten diese nicht im ähnlich wie APLP1 und APLP2 im CSF von Mäusen validiert werden.



**Abbildung 11: APLP1 und APLP2 werden in BACE1-KO-Mäusen weniger ins CSF sezerniert**

A: Das CSF von BACE1-Knockout und Wildtyp-Mäusen wurde mittels Immunblot-Technik auf lösliche APLP1 Ektodomänen (lösl. APLP1) und lösliche APLP2 Ektodomänen (lösl. APLP2) untersucht. Hierfür wurden Antikörper gegen APLP1 (anti-APLP1) und APLP2 (anti-APLP2) verwendet, die spezifisch die Ektodomäne der Proteine detektieren. Für APLP2 wurden eine trunkierte (lösl. APLP2 trunk.) und eine vollständige Form (lösl. APLP2) der maturen Ektodomäne detektiert. Unspezifische Banden, die von beiden Antikörpern detektiert wurden sind mit einem Stern (\*) markiert und zeigen, dass in allen Taschen gleiche Mengen CSF aufgetragen wurden; B: im Balkendiagramm sind die Mittelwerte der quantifizierten Bandenintensitäten mit Standardabweichung dargestellt, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; zweiseitiger t-Test,  $n=3$

### 5.3. Validierung von APLP1 und APLP2 als BACE1 Substrate in primären murinen Neuronen

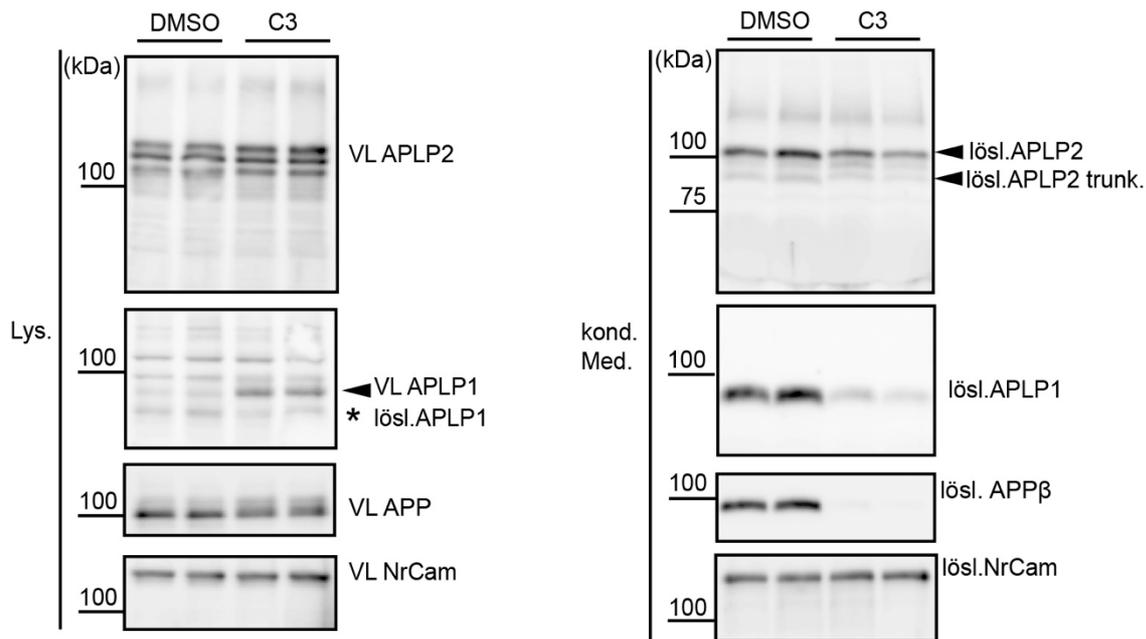
Einige Transmembranproteine unterlaufen den Prozess der Ektodomänenspaltung („ectodomain shedding“), hierbei wird der extrazellulär liegende Teil des Proteins durch einen membranahen Schnitt durch eine Protease abgespalten und anschließend sezerniert oder anderen Prozessen zugeführt (Brown et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2011). Die Daten aus Massenspektrometrie und Immunblot in CSF von Mäusen legen nahe, dass APLP1 und APLP2 durch die Protease BACE1 sezerniert werden: Die Reduktion der detektierbaren löslichen Ektodomänen von

APLP1 und APLP2 im BACE1 Knockout-Mäusen unterstützt die Hypothese, dass diese beiden Proteine in vivo Substrate für BACE1 sind. Allerdings könnte die von der BACE1 Expression abhängige Reduktion auch durch andere Mechanismen als einen fehlenden direkten proteolytischen Schnitt und folgende verminderte Sekretion bewirkt werden. So könnte die Expression von BACE1 einen regulierenden Effekt auf die Expression von APLP1 und APLP2 auf genetischer Ebene bewirken, indem BACE1 als Transkriptionsfaktor agiert oder regulierende RNA Elemente aus dem BACE1 Gen einen Effekt auf die APLP1 und APLP2 Expression haben. Außerdem könnte BACE1 Teil einer Proteasen-Kaskade sein und eine andere Protease aktivieren, die die Ektodomänenspaltung von APLP1 und APLP2 bewirkt. Solche Proteasen-Kaskaden finden sich beispielsweise bei den Faktoren der sekundären Hämostase oder den Proteasen der Apoptose, den Caspasen.

Um einen vom katalytischen Zentrum von BACE1 prozessierten, direkten oder indirekten proteolytischen Schnitt von APLP1 und APLP2 zu zeigen, wurden primäre murine Neurone mit dem spezifischen BACE1-Inhibitor C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem) behandelt, einem kompetitiven „small molecule“ Inhibitor des katalytischen Zentrums von BACE1. Da eine starke APLP1- und APLP2-Expression bereits in einer anderen Studie in primären murinen Neuronen detektiert werden konnte und BACE1 in murinen Neuronen stark exprimiert wird, wurden primäre murine Neurone von 16,5 Tage alten Mäuseembryonen als Zellmodell gewählt (Dislich and Lichtenthaler, 2012; Kuhn et al., 2012) Die gesammelten Zelllysate und die konditionierten Medien wurden mittels Immunblot-Technik in Anwendung spezifischer APLP1- und APLP2-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle diente das neuronal exprimierte und ins CSF sezernierte Zelladhäsionsprotein NrCAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule), das in bisherigen proteomischen Studien als Substrat der Protease ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain-Containing Protein 10) und als nicht von BACE1 prozessiertes Protein beschrieben wurde (Kuhn et al., 2016; Kuhn et al., 2012). In den Zelllysaten und in den konditionierten Medien konnte keine Zu- oder Abnahme von NrCAM beobachtet werden und damit gezeigt werden, dass gleiche Proteinmengen in allen Western Blot-Taschen geladen wurden. Zur Kontrolle der BACE1-Inhibition und zur Validierung der Methode wurde in Zelllysaten das Volllängenprotein APP mit einem für den N-terminus von APP spezifischen Antikörper nachgewiesen und in den konditionierten Medien lösliches APPs $\beta$  mit einem für die  $\beta$ -Schnittstelle von APP spezifischen Antikörper analysiert. Unter einer

effektiven BACE1-Inhibition durch C3 sollte es zu einer deutlichen Reduktion von löslichem APPs $\beta$  in den konditionierten Medien und gegebenenfalls zu einer relativen Anreicherung von APP in den Zelllysaten kommen. Allerdings können andere Proteasen wie die Metalloprotease ADAM10 bei der Inhibition von BACE1 eine kompensatorische Funktion und zusätzliche Ektodomänenspaltung von APP übernehmen (Colombo et al., 2013). Dadurch würde sich APP unter BACE1-Inhibition nicht in den Zelllysaten anreichern. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte APP in den Zelllysaten keine Anreicherung, in den konditionierten Medien kam es jedoch zu einer deutlichen Abnahme der löslichen APPs $\beta$ -Ektodomäne (siehe Abbildung 12). Durch diese Daten konnte gezeigt werden, dass eine effektive BACE1-Inhibition durch die C3-Behandlung der Zellen erzielt werden konnte.

In primären murinen Neuronen konnte das ungefähr 90 kDa schwere Volllängen-Protein, sowie die 90 kDa schwere lösliche Form von APLP1 als spezifische Bande in Zelllysaten und in konditionierten Medien der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). APLP2 konnte in den Zelllysaten als spezifische Banden des 110, 115 und 120 kDa schweren Volllängen-Proteins und in konditionierten Medien als spezifische Banden der 105 kDa schweren, vollständigen und der 90 kDa schweren, trunkierten löslichen Ektodomäne detektiert werden. APLP1 reicherte sich unter BACE1-Inhibition in den Zelllysaten an und die Fraktion des löslichen APLP1 in den Zelllysaten nahm leicht ab, was einen Hinweis darauf gab, dass BACE1 APLP1 bereits intrazellulär spalten kann. In den konditionierten Medien wurde die Sekretion der löslichen Ektodomäne von APLP1 durch BACE1-Inhibition deutlich reduziert. Im Falle von APLP2 ließ sich keine Anreicherung des Volllängen-Proteins in den Zelllysaten nachweisen. Dies ist möglicherweise durch einen ähnlichen Mechanismus wie die kompensatorische Spaltung von APP durch ADAM10 bei BACE1 Inhibition zu erklären (Colombo et al., 2013). In den konditionierten Medien kam es jedoch zu einer Abnahme der Sekretion der löslichen APLP2-Ektodomäne und der trunkierten APLP2-Ektodomäne (siehe Abbildung 12). Somit konnte die direkte Abhängigkeit der Sekretion der löslichen APLP1- und APLP2-Ektodomänen durch die proteolytische Aktivität von BACE1 gezeigt werden. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Daten der CSF Analysen und validiert APLP1 und APLP2 weiterhin als BACE1-Substrate. Außerdem korrelieren diese Ergebnisse mit Daten aus einer vorherigen Studie, in der APLP1 und APLP2 auf gleiche Weise als BACE1-Substrate validiert wurden (Kuhn et al., 2012).



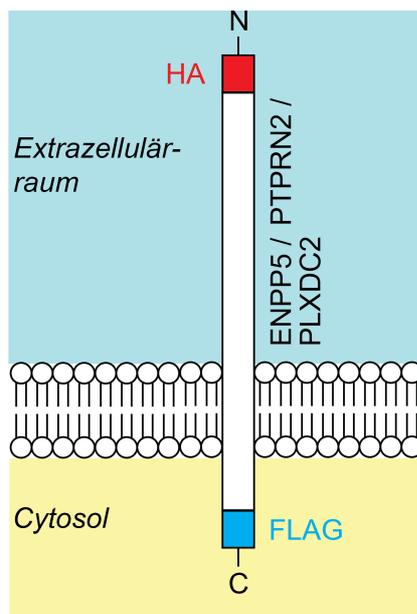
**Abbildung 12: Validierung von APLP1 und APLP2 als Substrate von BACE1 in primären murinen Neuronen.** Abgebildet sind Immunblots der beschriebenen Proteine. Primäre murine Neurone von Tag 16,5 Embryonen wurden für 24 Stunden mit dem BACE1-Inhibitor C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem) (C3) behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt (DMSO). In den Zelllysaten (Lys.) kam es unter C3 Behandlung zu einer Zunahme der Banden von Volllängen APLP2 (VL APLP2) und Volllängen APLP1 (VL APLP1, markiert durch Pfeilkopf). Die lösliche Ektodomäne von APLP1 (lösl. APLP1, durch Stern (\*) markiert) war in den Zelllysaten unter C3 Behandlung vermindert detektierbar. Für Volllängen APP (VL APP) und Volllängen NrCAM (VL NrCam) kam es zu keiner Zu- oder Abnahme in den Zelllysaten. In den konditionierten Medien (kond. Med.) waren unter C3 Behandlung die lösliche APLP2 Ektodomäne (lösl. APLP2) und die trunkierte lösliche APLP2 Ektodomäne (lösl. APLP2 trunk.), sowie die lösliche APLP1 Ektodomäne (lösl. APLP1) deutlich reduziert. Die Banden der löslichen APPs $\beta$  Ektodomäne (lösl. APP $\beta$ ) waren in den C3 behandelten Zellen stark reduziert, das lösliche NrCAM (lösl. NrCam) zeigte weder eine Zu- noch eine Abnahme. Es handelt sich um repräsentative Immunblots aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 5.4. Stabile Expression von HA-ENPP5-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG in humanen embryonalen Nierenzellen 293 (HEK293)

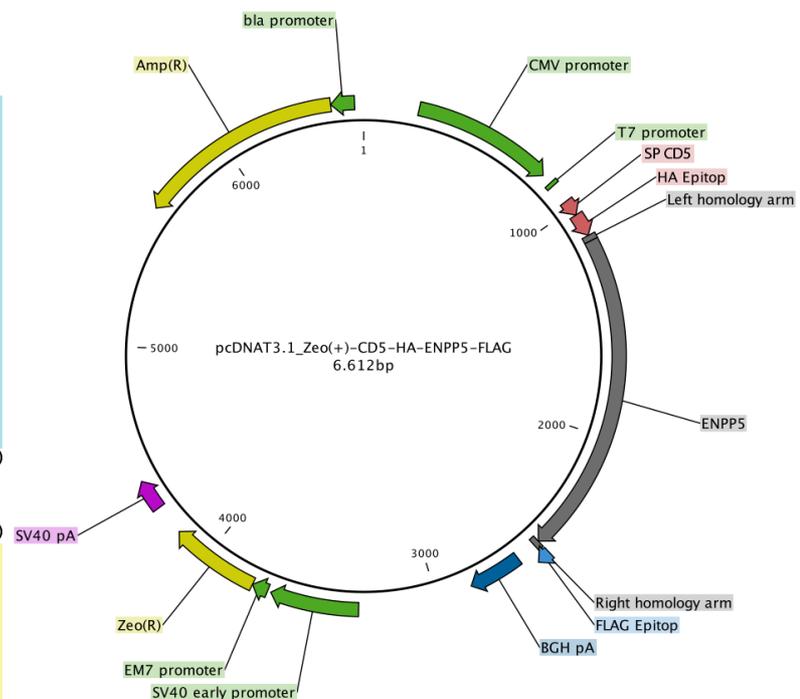
Um die Typ-1- Transmembranproteine PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 als Substrate von BACE1 zu validieren, sollte deren Prozessierung durch BACE1 in Zellen gezeigt werden. Da es keine verfügbaren Antikörper gab, die endogen exprimiertes PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 in primären murinen Neuronen nachweisen können, wurde ein anderes experimentelles Design als für die Validierung von APLP1 und APLP2 in

Zellen verwendet. Um die Proteine und mögliche C-terminale und N-terminale Proteinfragmente unabhängig von verfügbaren Antikörpern nachweisen zu können, wurden pcDNA3.1 Expressionsplasmide kloniert, die für N- und C-terminal mit Epitop-Markierungen versehenes murines PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 kodieren. Am N-Terminus wurde das HA-Epitop (Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) angefügt und am C-Terminus das FLAG-Epitop (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK). Diese rekombinanten Proteine wurden in Humanen embryonalen Nierenzellen 293 (human embryonic kidney 293, HEK293) unter Nutzung des Zeocin-Resistenzgens stabil exprimiert (siehe Abbildung 13).

(A)



(B)

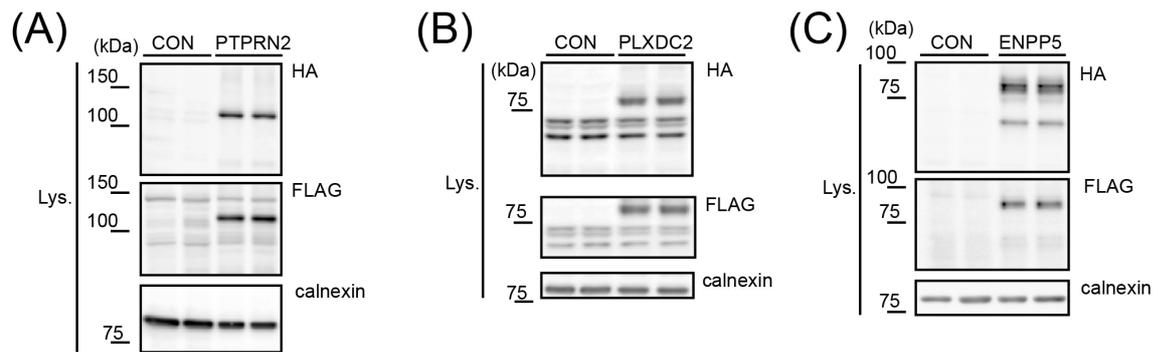


**Abbildung 13: Klonierung von HA-ENPP5-FLAG, HA- PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG kodierenden Plasmiden.** A: Schematische Darstellung der rekombinanten Proteine. Durch Subklonierung von cDNA in pcDNA3.1 Expressionsvektoren unter Anwendung der Gibson Assembly Klonierungsstrategie wurden die N-terminal HA-Epitop (HA, rot) und C-terminal FLAG-Epitop (FLAG, blau) markierten Expressionskonstrukte HA-ENPP5-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG kloniert. Da es sich um Typ-1 Transmembranproteine handelt ist das N-terminale HA-Epitop im Extrazellulärraum oder Vesikellumen und das C-terminale FLAG-Epitop im Cytosol lokalisiert. B: Vektorkarte des Expressionsplasmids HA-ENPP5-FLAG; abgebildet sind die Promotoren (CMV, T7, SV40 early, EM7, Betalaktamase (bla)) Homologiestellen für die Gibson-Assembly Klonierungsstrategie (Left homology arm, Right homology arm) das HA-ENPP5-FLAG Transgen (ENPP5), das CD5

Signalpeptid (SP CD5) und die Ampicillin- und Zeocin- Resistenzgene (Amp (R), Zeo (R)). Das Plasmid wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert.

Die Vollängen-Proteine konnten im Western Blot als spezifische Banden mit einem HA-Epitop-Antikörper und einem FLAG-Epitop-Antikörper mit dem gleichen Molekulargewicht detektiert werden und somit das Molekulargewicht und Western Blot Laufverhalten der rekombinanten Vollängen-Proteine HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG charakterisiert werden (siehe Abbildung 14). Das mature Vollängen-Protein PTPRN2 stellte sich durch gleichartige Detektion mit HA- und FLAG-Antikörper als schmale Bande von einem Molekulargewicht von 110 kDa dar, die in Kontrollzellen, die kein PTPRN2 exprimierten, nicht zu sehen wars. Ebenso ließ sich für das mature Vollängen-Protein von PLXDC2 eine spezifische 90-kDa-Bande mit dem HA- und FLAG-Antikörper identifizieren. Im Falle von ENPP5 ließ sich das Vollängen-Protein als breite spezifische Bande mit HA- und FLAG-Antikörper als ein 80 kDa schweres Protein charakterisieren und eine schmale N-terminale Bande von 70 kDa, die nur mit dem HA-Antikörper zu detektieren war, konnte als Ektodomäne von ENPP5 beschrieben werden. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen Calnexin, ein Lektin des Endoplasmatischen Retikulums, verwendet und es konnte gezeigt werden, dass in allen Western Blot-Taschen gleiche Proteinmengen geladen wurden (siehe Abbildung 14).

Somit konnten die Epitop-Tag markierten Transmembranproteine HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG erfolgreich stabil in HEK293-Zellen exprimiert werden und die Vollängenproteine ließen sich gegen Negativkontrollen als spezifische Banden im Immunblot charakterisieren.

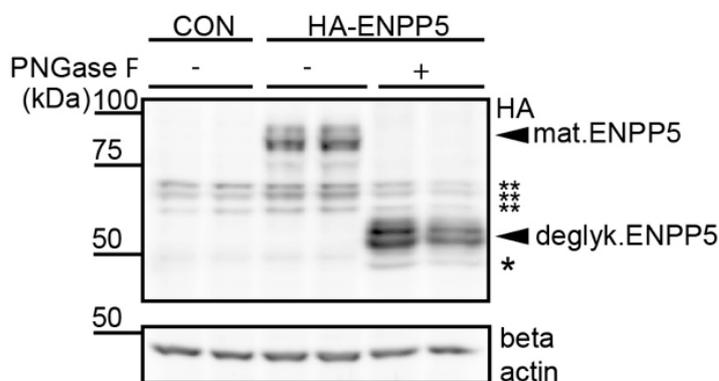


**Abbildung 14: Stabile Expression von HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG in HEK293-Zellen.** Abgebildet sind Immunblots der angegebenen Proteine. Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden mit den Expressionsplasmiden HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG und als Kontrollen mit leeren Expressionplasmiden stabil transfiziert. Die rekombinanten Volllängenproteine HA-PTPRN2-FLAG (A) und HA-PLXDC2-FLAG (C) ließen sich als 110 und 80 kDa schwere Proteine mit dem HA.11 Antikörper (HA) und dem FLAG M2 Antikörper (FLAG) als schmale, in den kontrolltransfizierten Zellen (CON) nicht nachweisbare Bande detektieren (A,C). Das rekombinante Volllängenprotein HA-ENPP5-FLAG ließ sich als 80 kDa schweres Protein mit dem HA.11 Antikörper (HA) und dem FLAG M2 Antikörper (FLAG) als breite, in den kontrolltransfizierten Zellen (CON) nicht nachweisbare Bande detektieren. Außerdem ließ sich die 70 kDa schwere Ektodomäne von HA-ENPP5-FLAG als ein N-terminales Fragment mit dem HA.11 Antikörper nachweisen. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper für Calnexin (calnexin) verwendet. Es handelt sich um repräsentative Immunblots aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 5.4.1. Deglykosylierung von HA-ENPP5-FLAG durch Peptid-N-Glykosidase F

Da das erwartete Molekulargewicht für das 477 Aminosäuren lange HA-ENPP5-FLAG ungefähr 50 kDa beträgt, aber das im Western Blot detektierte rekombinante HA-ENPP5-FLAG ein Molekulargewicht von 80 kDa zeigte, sollte untersucht werden, ob eine hochgradige Glykosylierung zu dieser Differenz im Molekulargewicht führte. Da die Aminosäuresequenz von ENPP5 insgesamt acht N-Glykosylierungsmotive (Asn-Aminosäure-Ser/Thr) enthält, lag nahe, dass posttranslationale N-Glykosylierung zu einer Modifizierung des Molekulargewichts von ENPP5 beitragen könnte. Deshalb wurde HA-ENPP5-FLAG in HEK293-Zellen stabil exprimiert und Zelllysate zur Abspaltung von N-Glykosylierungen mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) inkubiert. PNGase F hydrolysiert fast alle Typen von N-Glykan-Ketten von Glykopeptiden und Glykoproteinen (Maley et al., 1989). Im Immunblot ließen sich in unbehandelten Zelllysaten das mature Volllängen HA-ENPP5-FLAG als eine spezifische 80-kDa-Bande und die mature Ektodomäne als 70-kDa-Protein mit einem

HA-Antikörper (HA.11) identifizieren (siehe Abbildung 15). Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen Beta-Aktin, ein Bestandteil der Aktinfilamente des Zytoskeletts, verwendet und es konnte gezeigt werden, dass in allen Taschen des Western Blot gleiche Proteinmengen geladen wurden. In den mit PNGase F behandelten Zelllysaten ließen sich mit dem HA.11 Antikörper das deglykosylierte Vollängen HA-ENPP5-FLAG als ein 55-kDa-Protein und die deglykosylierte Ektodomäne als eine 45-kDa-Bande identifizieren. Damit konnte gezeigt werden, dass ENPP5 in Zellen posttranslational N-glykosyliert wird und als matures Glykoprotein ein Molekulargewicht von 80 kDa aufweist.

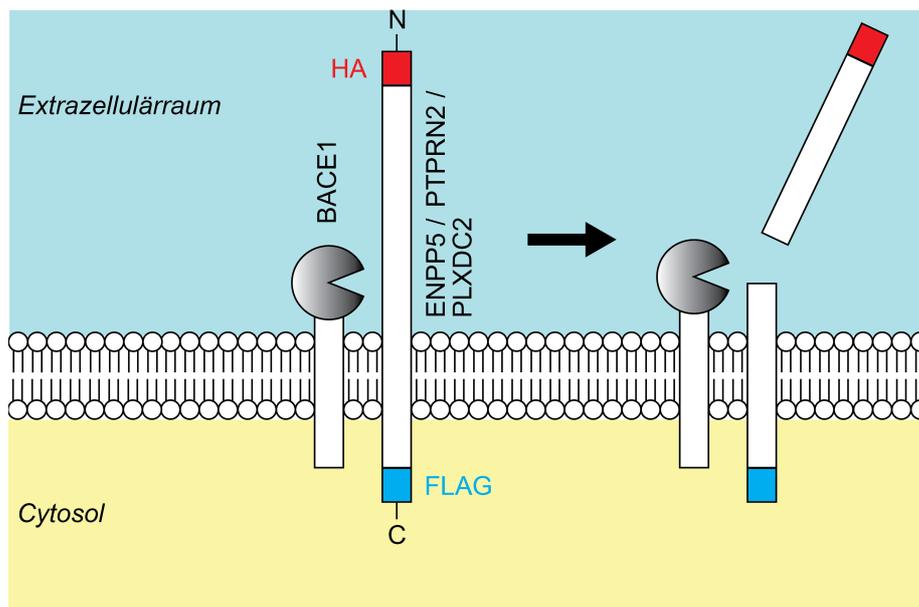


**Abbildung 15: Deglykosylierung von HA-ENPP5-FLAG.** Es handelt sich um Immunblots der angegebenen Proteine. Zelllysate von mit HA-ENPP5-FLAG stabil transfizierten HEK2993 (HA-ENPP5) und Zelllysate von untransfizierten HEK2993-Zellen (CON) wurden ohne (-) oder mit (+) PNGase F inkubiert, durch eine 8% SDS PAGE aufgetrennt und mit dem HA.11 Antikörper (HA) als Immunblot entwickelt. Als Ladekontrolle wurde ein Beta Aktin Antikörper verwendet (beta actin). Das mature Vollängen ENPP5 (mat. ENPP5) ließ sich als 80-kDa-Protein detektieren. Das deglykosylierte Vollängen ENPP5 (deglyk. ENPP5) ließ sich als 55-kDa-Protein und die deglykosylierte ENPP5 Ektodomäne (\*) als 45-kDa-Bande darstellen. Unspezifische Banden, die durch den HA-Antikörper auch in den Kontrollen detektiert wurden sind mit 2 Sternen markiert (\*\*). Dargestellt sind repräsentative Immunblots aus 3 unabhängigen Experimenten.

### 5.5. BACE1 abhängige Ektodomänenspaltung von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 in HEK2993-Zellen

Um die Prozessierung der Epitop markierten rekombinanten Proteine HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG durch BACE1 in Zellen zu untersuchen, wurden diese stabil in HEK2993-Zellen transfiziert und Zelllysate und konditionierte Medien mittels Immunblot auf Vollängen-Proteine und mögliche C-

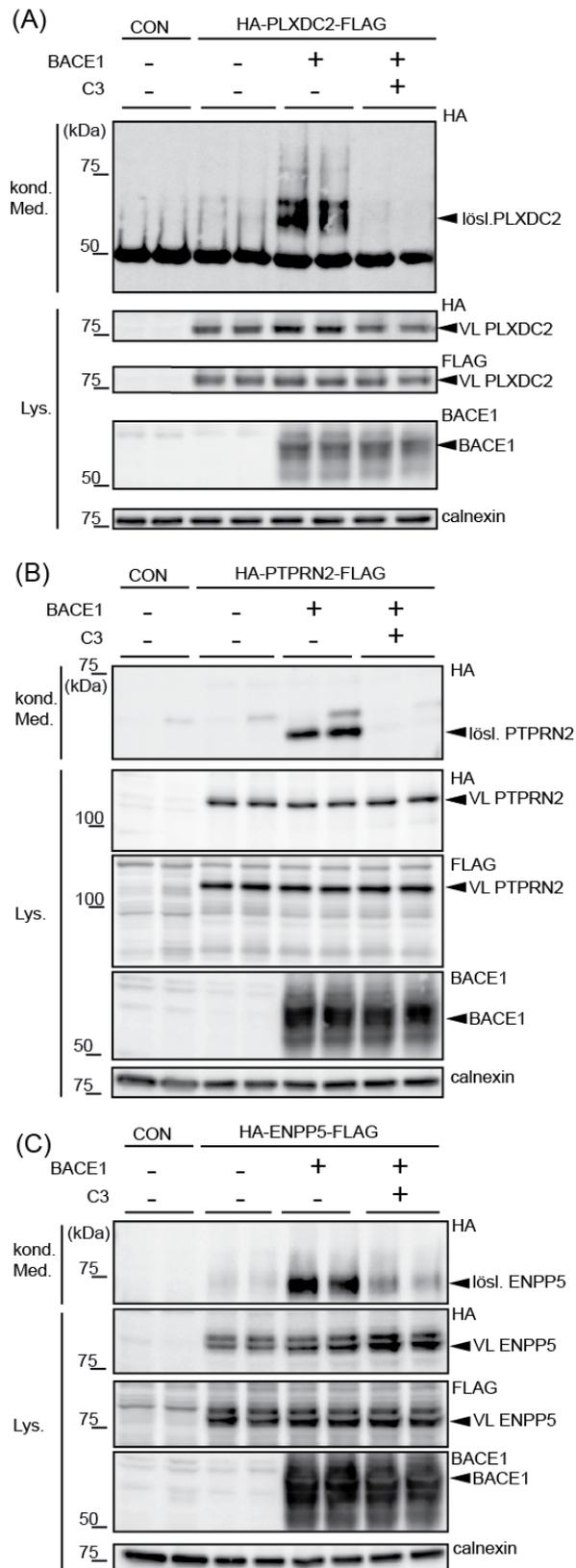
terminale und N-terminale Fragmente untersucht. Zusätzlich wurden HEK293-Zellen als Kontrolle mit einem leeren Expressionsvektor stabil transfiziert. Da die endogene Expression von BACE1 im Nervensystem hoch ist, aber sehr niedrig in nicht-neuronalem Gewebe wie HEK293-Zellen, wurden die stabil transfizierten Zellen transient mit einem BACE1-Plasmid oder einem leeren Kontrollplasmid kotransfiziert (Colombo et al., 2013; Vassar et al., 1999) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Experimentelles Design für die Validierung von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 als BACE1-Substrate in HEK293-Zellen.** Expressionsplasmide für N-terminal HA-Epitop markiertes und C-terminal FLAG-Epitop markiertes PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 wurden kloniert. Die N-terminal HA-Epitop und C-terminal FLAG-Epitop markierten Expressionsplasmide HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG wurden stabil in HEK293-Zellen exprimiert. BACE1 wurde transient kotransfiziert und die entstandenen C- und N-terminalen Proteinfragmente von HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG in Zelllysaten und konditionierten Medien im Immunblot analysiert.

Die Vollängen-Proteine HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG konnten in den Zelllysaten der stabil transfizierten Zellen mit dem HA.11- und dem FLAG-M2-Antikörper als spezifische Banden detektiert werden (siehe Abbildung 17), die mit den in dieser Arbeit vorher charakterisierten spezifischen Banden und dem Molekulargewicht für die Proteine übereinstimmten (siehe im Vergleich Abbildung 14). Außerdem ließen sich diese nicht in den mit dem leeren Expressionsplasmid transfizierten Kontrollen identifizieren (siehe Abbildung 17). In den konditionierten

Medien ließen sich die sezernierten Ektodomänen von HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG allerdings nicht detektieren. Deshalb wurden diese mittels Immunpräzipitation anhand des N-terminal lokalisierten HA-Epitops und in Anwendung monoklonaler Anti-HA-Agarose aus den Zellüberständen angereichert. Nach Anreicherung aus den konditionierten Medien, konnten die sezernierten Ektodomänen im Immunblot als schwache spezifische Banden, die in den Kontrollen abwesend waren, nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen bewirkte die transiente Kotransfektion von BACE1 in den stabil transfizierten Zellen eine deutliche Zunahme der Sekretion der Ektodomänen von HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG. Außerdem blockierte die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen BACE1-Inhibitor C3 die Sekretion der Ektodomänen der drei Proteine (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17 (links): Die Sekretion der Ektodomänen von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 ist direkt abhängig von der Expression und proteolytischen Aktivität der Protease BACE1 in HEK293-Zellen (modifizierte Abbildung publiziert in (Dislich et al., 2015)).** Gezeigt sind Immunblots der angegebenen Proteine. Die rekombinanten Proteine HA-PTPRN2-FLAG (A), HA-PLXDC2-FLAG (B), HA-ENPP5-FLAG (C) oder ein leeres Kontrollplasmid (CON) wurden stabil in HEK293-Zellen exprimiert. Zusätzlich wurden die Zellen transient mit BACE1 (+) oder einem leeren Kontrollvektor (-) kotransfiziert. Außerdem wurden die Zellen entweder mit dem BACE1-Inhibitor C3 (+) oder DMSO (-) behandelt. Die rekombinanten Vollängenproteine von PTPRN2 (VL PTPRN2), PLXDC2 (VL PLXDC2) und ENPP5 (VL ENPP5) wurden in den Zelllysaten (Lys.) mit dem N-terminal bindenden HA-Antikörper (HA) und dem C-terminal bindenden FLAG-Antikörper (FLAG) detektiert (durch Pfeilspitzen markiert). Die löslichen Ektodomänen von PTPRN2 (lösli. PTPRN2), PLXDC2 (lösli. PLXDC2) und ENPP5 (lösli. ENPP5) wurden aus den konditionierten Medien (kond. Med.) mit monoklonaler Anti-HA-Agarose immunpräzipitiert und mit dem HA-Antikörper detektiert (durch Pfeilspitzen markiert). Als Ladekontrolle wurde ein Calnexin Antikörper verwendet (calnexin) und BACE1 (durch Pfeilspitze markiert) wurde mit dem 3D5 Antikörper (BACE1) detektiert. Gezeigt sind repräsentative Immunblots aus 3 unabhängigen Experimenten.

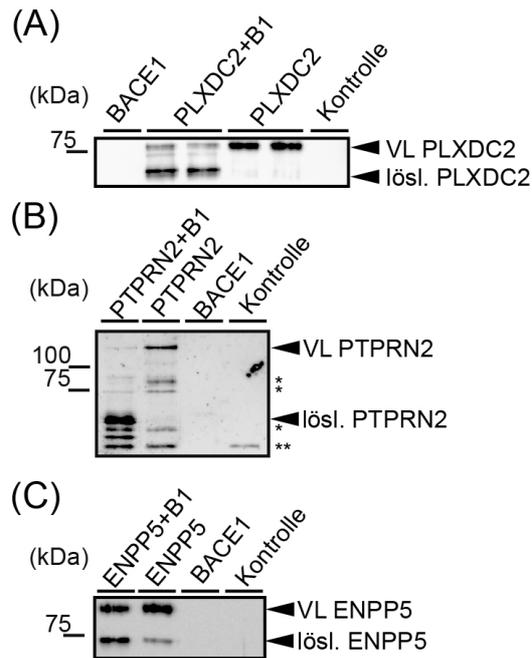
Diese Ergebnisse zeigten, dass die proteolytische Prozessierung und Sekretion der Ektodomänen von HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG in HEK293-Zellen direkt abhängig von der Expression und der proteolytischen Aktivität von BACE1 ist.

### **5.6. PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 können von BACE1 direkt proteolytisch gespalten werden**

Die direkte Abhängigkeit der proteolytischen Prozessierung und Sekretion von HA-PTPRN2-FLAG, HA-PLXDC2-FLAG und HA-ENPP5-FLAG von der Expression und proteolytischen Aktivität von BACE1 in HEK293-Zellen wurde in Kapitel 5.5. gezeigt. Es wurde dadurch aber noch nicht bewiesen, dass diese drei Proteine direkte proteolytische Substrate von BACE1 sind, da sie z.B. Teil einer Protease-Kaskade sein oder im Rahmen anderer sekundärer Mechanismen reguliert sein könnten. Um zu evaluieren, ob PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 in einem direkten proteolytischen Schnitt von BACE1 prozessiert werden, wurden die drei rekombinanten Proteine in einem isolierten Protease-in-vitro-Assay analysiert. Hierfür wurden die rekombinanten Proteine aus stabil transfizierten HEK293-Zellen anhand des N-terminalen HA-Epitops mittels monoklonaler Anti-HA-Agarose immunpräzipitiert, durch synthetische HA-Peptide kompetitiv eluiert und anschließend mit rekombinantem murinem BACE1 bei dem pH-Optimum (pH 4,4) für die proteolytische Aktivität von BACE1 in einem in-vitro-Assay inkubiert und anschließend im Immunblot mit einem HA-Antikörper analysiert. Als Ergebnis dieses in-vitro-Assays sollte BACE1 dieselben löslichen Ektodomänen der rekombinanten Proteine wie in den Experimenten in HEK293-Zellen (siehe Abbildung 17) generieren. Im Immunblot ließ sich ohne Inkubation mit BACE1 das 80 kDa Volllängenprotein PLXDC2 detektieren (siehe Abbildung 18 A). Durch zusätzliche Inkubation mit rekombinantem BACE1 war die Bande des 80 kDa Volllängenprotein PLXDC2 stark reduziert und die geschnittene lösliche 60 kDa PLXDC2-Ektodomäne konnte detektiert werden. Das Molekulargewicht des Volllängenproteins und der Ektodomäne korrelierte mit den Daten aus den Experimenten mit HEK293-Zellen (siehe im Vergleich Abbildung 17) und zeigte damit, dass PLXDC2 auf ähnliche Weise wie in den HEK293-Zellen durch BACE1 in einem direkten proteolytischen Schnitt gespalten wird. Als Kontrollen wurden weder das Volllängenprotein, noch die lösliche Ektodomäne von PLXDC2 in Abwesenheit von rekombinantem PLXDC2 oder in alleiniger Anwesenheit von rekombinantem BACE1 detektiert. Da das rekombinante BACE1 ein Molekulargewicht von 60 kDa hat und damit dasselbe Molekulargewicht wie die PLXDC2-Ektodomäne, kam dieser Kontrolle eine wichtige Bedeutung zu. Ähnliche Ergebnisse konnten für PTPRN2 und ENPP5 erzielt werden (siehe Abbildung 18 B, C).

Das Volllängenprotein von PTPRN2 ließ sich konform mit den Daten aus den HEK293-Zellen als 110-kDa-Bande detektieren, welche nicht in den Kontrollen zu sehen war. Außerdem ließen sich 55 kDa, 80 kDa und 90 kDa schwere, trunkierte Formen oder Degradationsprodukte von PTPRN2 detektieren, die nicht in den Kontrollen zu identifizieren waren (siehe Abbildung 12 B). Durch die Koinkubation mit rekombinantem BACE1 war die Bande des 110 kDa Volllängen-Proteins und die 80 kDa und 90-kDa-Banden stark vermindert zu sehen und die lösliche Ektodomäne von PTPRN2 ließ sich als deutliche spezifische 60-kDa-Bande und schwächere 50-kDa-Bande mit dem HA3F10-Anti-HA-Antikörper detektieren. Diese Banden ließen sich nicht in den Kontrollen beobachten, aber eine unspezifische 45-kDa-Bande konnte detektiert werden. Das Molekulargewicht des 110 kDa Volllängenprotein PTPRN2 und der 60 kDa Ektodomäne von PTPRN2 war in Übereinstimmung mit den Daten aus den Experimenten mit HEK293-Zellen (siehe Abbildung 17) und zeigte, dass PTPRN2 in HEK293-Zellen auf ähnliche Weise von BACE1 durch einen direkten Schnitt prozessiert wird wie im in-vitro-Assay.

Das Volllängenprotein von ENPP5 konnte als 80-kDa-Bande und die lösliche Ektodomäne von ENPP5 als 70-kDa-Bande identifiziert werden (siehe Abbildung 18 C). Dass die lösliche Ektodomäne bereits ohne Koinkubation mit BACE1 gesehen werden konnte, lässt sich dadurch erklären, dass diese bereits in den HEK293-Zellen durch endogen exprimiertes BACE1 oder andere Sheddasen, wie z.B. die Familie der Metalloproteasen, prozessiert wurde, anschließend durch die N-terminale Immunpräzipitation anhand des HA-Epitops mitangereichert und folglich im in-vitro-Assay als Teil des Ausgangsmaterials vorhanden war. Durch zusätzliche Inkubation des Immunpräzipitats des rekombinanten ENPP5 mit rekombinantem BACE1 kam es zu einer Abnahme der Bande des Volllängenproteins und einer Zunahme der Bande der Ektodomäne. Auch die Banden des Volllängenproteins und der Ektodomäne von ENPP5 stimmten mit den Banden aus den Experimenten mit HEK293-Zellen (siehe Abbildung 17) überein und zeigten damit, dass ENPP5 ein Substrat von BACE1 ist und in Zellen auf ähnliche Weise wie im in-vitro-Assay durch einen direkten proteolytischen Schnitt prozessiert wird.



**Abbildung 18: PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 werden in einem BACE1-in-vitro-Assay durch BACE1 proteolytisch gespalten.** Gezeigt werden Immunblots der angegebenen Proteine. Rekombinantes HA-PLXDC2-FLAG (A), HA-PTPRN2-FLAG (B) und HA-ENPP5-FLAG (C) wurden aus Zelllysaten stabil transfizierter HEK293-Zellen immunpräzipitiert und mit oder ohne rekombinantes BACE1 (B1) in einem in-vitro-Assay inkubiert. Die Vollängenproteine (VL, durch Pfeilköpfe markiert) und die löslichen Ektodomänen (lösl., durch Pfeilköpfe markiert) der Proteine wurden mit dem HA3F10 Anti-HA-Antikörper detektiert. Kontrolle: Anti-HA Immunpräzipitation aus Zelllysaten von mit einem Leervektor stabil transfizierten HEK293-Zellen. BACE1: rekombinantes BACE1 wurde ohne immunpräzipitiertes Substratprotein geladen. Es handelt sich um repräsentative Immunblots aus drei unabhängigen Experimenten. \*: trunkierte Formen oder Degradationsprodukte von PTPRN2. \*\*: unspezifische Bande.

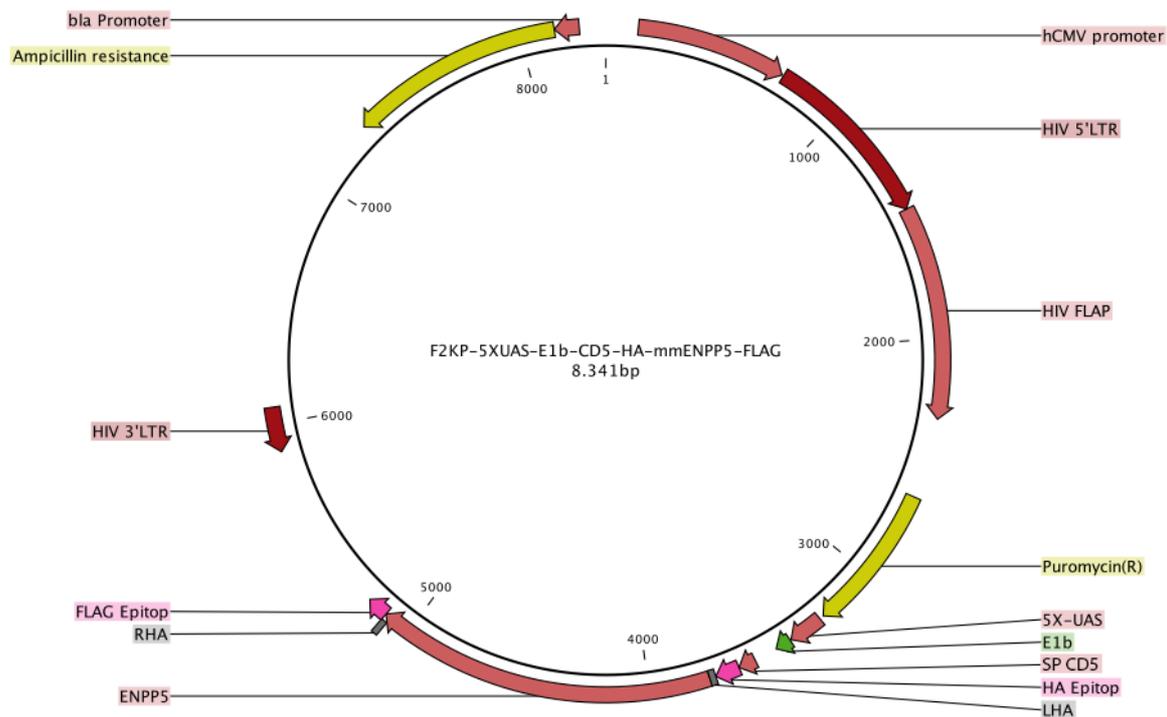
Durch diese Experimente konnten die Transmembranproteine PTPRN2, PLXCD2 und ENPP5 in einem in dieser Arbeit etablierten BACE1-in-vitro-Assay (siehe Kapitel 4.4. Methodische Ergebnisse) als direkte proteolytische Substrate von BACE1 in Zellen validiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass PTPRN2, PLXCD2 und ENPP5 in vivo und in vitro direkte Substrate von BACE1 sind und eine Rolle in der physiologischen Funktion von BACE1 spielen.

### **5.7. ENPP5 wird durch endogen exprimiertes BACE1 in Neuronen geschnitten und sezerniert.**

Die endogene Expression von BACE1 ist im zentralen Nervensystem sehr hoch, in anderen Geweben ist die Expression von BACE1 allerdings nur sehr gering (Vassar et al., 1999). Deshalb musste BACE1 in HEK293-Zellen transient transfiziert werden, um die proteolytische Prozessierung der Substratkandidaten zu charakterisieren (siehe Abbildung 16, Kapitel 5.5.). Es kann bei Überexpression einer Protease allerdings dazu kommen, dass diese Substrate schneidet, die physiologischerweise keine Substrate sind und die bei endogener Expression der Protease nicht prozessiert würden. Dies kann zum Beispiel der Fall sein, wenn die Protease durch massive Überexpression bereits in subzellulären Kompartimenten aktiv ist, in denen sie normalerweise inaktiv ist. So schneidet BACE1 physiologischerweise seine Substrate in einem sauren pH Optimum (pH 4,4) und könnte durch Überexpression bereits im sekretorischen Pfad Substrate schneiden, die unter physiologischen Bedingungen nicht zum Substratspektrum zählen (Vassar et al., 2014).

Deshalb sollte untersucht werden, ob im Nervensystem endogen exprimiertes BACE1 das in dieser Arbeit erstmalig identifizierte und in HEK293-Zellen validierte BACE1-Substrat ENPP5 schneidet.

Als neuronales Zellmodell wurden primäre murine Neurone von 16,5 Tage alten Embryonen gewählt, da in diesen eine hohe endogene Expression von BACE1 vorhanden ist (Willem et al., 2006). Da keine validierten Antikörper verfügbar waren um neuronal endogen exprimiertes ENPP5 im Western Blot zu detektieren, sollte, wie in den Validierungsstudien in HEK295-Zellen (siehe Kapitel 5.5), ein durch ein Epitop markiertes Expressionskonstrukt verwendet werden. Primäre murine Neuronen lassen sich nicht mit konventionellen Expressionsplasmiden transfizieren, da die durch transiente Transfektion entstehende Toxizität die empfindlichen primären murinen Nervenzellen abtötet. Um die Toxizität zu verringern und eine stabile Expression von ENPP5 zu gewährleisten wurde deshalb ein lentivirales Expressionssystem verwendet. Hierfür wurde ein lentivirales Expressionsplasmid kloniert, das für N-terminal mit dem HA-Epitop und C-terminal mit dem FLAG-Epitop markiertes ENPP5 kodiert (siehe Abbildung 19).

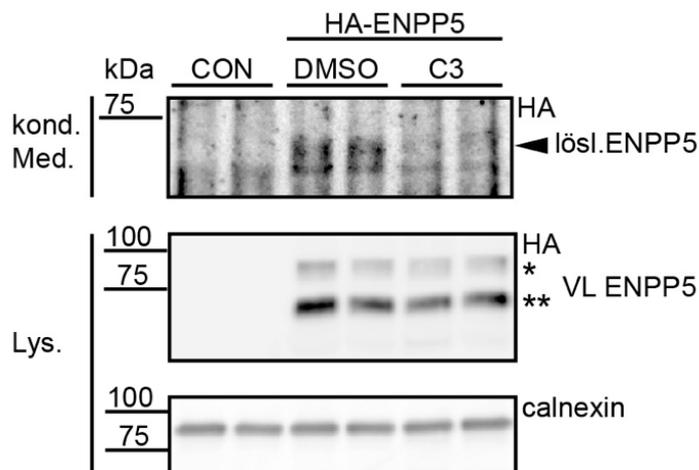


**Abbildung 19: Lentivirales Expressionsplasmid kodierend für HA-ENPP5-FLAG.** Abgebildet ist die Vektorkarte des lentiviralen Expressionsplasmids F2KP-5XUAS-E1b-CD5-HA-ENPP5-FLAG. Schematisch eingezeichnet sind die Bereiche der Promotoren (5X-UAS (Upstream Activating Sequence), E1b, hCMV promoter, bla promoter), Antibiotikaresistenzgene (Puromycin (R), Ampicillin resistance), lentivirale 5' und 3' LTR (HIV 3' LTR, HIV 5'LTR), das HA-ENPP5-FLAG Transgen (HA-Epitop, ENPP5, FLAG-Epitop), Signalpeptid (SP CD5) und die Homologiesequenzen für die Gibson-Assembly Klonierungsstrategie (LHA, RHA). Das Plasmid wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert.

HEK293T-Zellen wurden zur Virusproduktion mit für Bestandteile der lentiviralen Partikel kodierenden Plasmiden kotransfiziert und die gewonnenen lentiviralen Partikel dienten zur Transduktion der primären murinen Neuronen mit dem Transgen HA-ENPP5-FLAG. Die Expression des rekombinanten Proteins HA-ENPP5-FLAG in den primären murinen Neuronen ließ sich im Immunblot in Zelllysaten mit dem 3F10-Anti-HA-Antikörper als eine spezifische 70-kDa- und eine spezifische 80-kDa-Bande detektieren (siehe Abbildung 20). Diese Banden waren in den Kontroll-Zelllysaten nicht transduzierter Neuronen nicht zu sehen. Durch Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 ließ sich weder eine Zu- noch eine Abnahme der ENPP5 Bandenintensität in den Lysaten beobachten. Die lösliche Ektodomäne von ENPP5 ließ sich im Direktauftrag

der konditionierten Medien im Western Blot nicht detektieren. Deshalb wurden die rekombinanten Ektodomänen mit einer Immunpräzipitation aus den konditionierten Medien purifiziert. Hierfür wurde das N-terminal lokalisierte HA-Epitop für eine Immunpräzipitation mit einer 3F10 Anti-HA-Antikörper inkubierten, Protein G gekoppelten Sepharose genutzt. In den Immunpräzipitaten der konditionierten Medien ließ sich im Immunblot mit dem 3F10 Anti-HA-Antikörper eine spezifische 70 kDa schwere Bande der löslichen Ektodomäne von ENPP5 detektieren (siehe Abbildung 20). Diese ließ sich nicht in den untransduzierten Neuronen nachweisen und entsprach dem Molekulargewicht der in HEK293-Zellen identifizierten löslichen Ektodomäne von ENPP5 (siehe im Vergleich Abbildung 17). Durch eine Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 nahm die Intensität dieser Bande deutlich ab. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen Calnexin verwendet und es konnte demonstriert werden, dass in allen Taschen des Western Blot gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass das BACE1-Substrat ENPP5 in primären murinen Neuronen durch die proteolytische Aktivität von endogen exprimiertem BACE1 sezerniert wird.



**Abbildung 20: In primären murinen Neuronen endogen exprimiertes BACE1 schneidet ENPP5.** Abgebildet sind Immunblots der angezeigten Proteine. Für HA-ENPP5-FLAG kodierende lentivirale Partikel wurden in HEK293T Zellen produziert. Primäre murine Neuronen von E16,5 Embryonen wurden entweder damit transduziert (HA-ENPP5) oder als Kontrollen nicht transduziert (CON). Zusätzlich wurden die Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 (C3) oder als Kontrolle mit DMSO (DMSO) behandelt. In den Zelllysaten (Lys.) konnten für Vollängen ENPP5 (VL ENPP5) eine 80-kDa-Bande (\*) und eine truncierte 60-kDa-Bande (\*\*) nachgewiesen werden. Diese zeigten durch Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 (C3) keine Zu- oder Abnahme im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO (DMSO). Aus den konditionierten Medien wurden mit einer Anti-HA Immunpräzipitation in Anwendung mit 3F10 HA-Antikörper inkubierter Protein G gekoppelter Sepharose die N-terminalen Fragmente von ENPP5

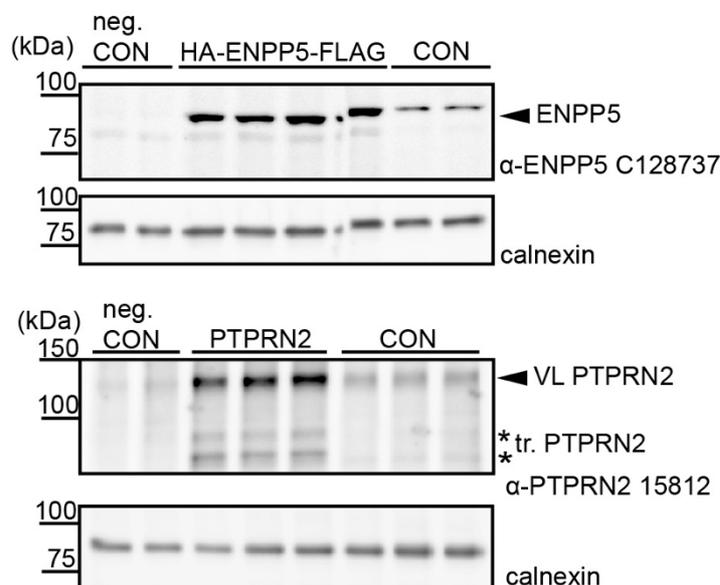
purifiziert (kond. Med.). In den Immunpräzipitaten ließ sich die lösliche Ektodomäne von ENPP5 (lösl. ENPP5, durch Pfeilspitze markiert) als spezifische 70-kDa-Bande nachweisen. Durch Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 (C3) kam es zu einer deutlichen Abnahme der Bandenintensität. Es handelt sich um repräsentative Immunblots aus 3 unabhängigen Experimenten.

### **5.8. Charakterisierung von Antikörpern gegen murines ENPP5 und PTPRN2 in primären murinen Neuronen**

Um die Biologie von endogen exprimiertem ENPP5 und PTPRN2 weiterhin studieren zu können, sollten Antikörper charakterisiert werden, die die endogenen Proteine binden und diese im Immunblot detektieren können. ENPP5 und PTPRN2 werden im zentralen Nervensystem stark exprimiert (Ohe et al., 2003; Wasmeier and Hutton, 1996). Deshalb sollten die endogen exprimierten Proteine in primären murinen Neuronen mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen werden. Um eine Positivkontrolle für die ENPP5 und PTPRN2 Expression und deren Laufverhalten im Western Blot zu haben wurden lentivirale Partikel kodierend für N-terminal HA-Epitop markiertes und C-terminal FLAG-Epitop markiertes HA-ENPP5-FLAG und HA-PTPRN2-FLAG in HEK293-Zellen hergestellt. Diese wurden zur Transduktion von primären murinen Neuronen von Tag 16 Embryonen verwendet. Als Negativkontrolle dienten Zelllysate von HEK293-Zellen, in denen nur eine schwache Expression von ENPP5 und PTPRN2 berichtet wird (BioGPS Datenbank, 2015). Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen das endoplasmatische Protein Calnexin und es konnte gezeigt werden, dass gleiche Proteinmengen in alle Taschen des Western Blot geladen wurden. Zur Detektion der Proteine in den Zelllysaten wurden verschiedene kommerzielle und von anderen Arbeitsgruppen verfügbare Antikörper getestet. Der in Mäusen produzierte monoklonale IgG2a Antikörper C128737 (LS Bio) wurde gegen einen Teil der Ektodomäne von humanem ENPP5 (Aminosäure 25 bis 174) immunisiert. Mit diesem Antikörper konnte das endogen exprimierte Vollängen-Protein ENPP5 in Zelllysaten von primären murinen Neuronen als spezifische 90-kDa-Bande identifiziert werden (siehe Abbildung 21). Diese war in den Negativkontrollen nicht und in den mit HA-ENPP5-FLAG transduzierten Neuronen mit höherer Intensität zu detektieren. Ähnliche Ergebnisse konnten für einen Anti-PTPRN2-Antikörper erzielt werden. Der in Kaninchen produzierte polyklonale Antikörper PAB15812 (Abnova) wurde gegen einen 192 Aminosäuren langen Teil der murinen PTPRN2-Ektodomäne immunisiert. In

Zelllysaten von primären murinen Neuronen ließen sich mit diesem Antikörper spezifische Banden für PTPRN2 von einem Molekulargewicht von 130 kDa, 80 kDa und 60 kDa identifizieren, die in Lysaten von mit HA-PTPRN2-FLAG transduzierten Zellen vermehrt und in den HEK293-Zelllysaten vermindert detektierbar waren (siehe Abbildung 21).

Mit diesen Experimenten konnten für ENPP5 und PTPRN2 Antikörper identifiziert und charakterisiert werden, die die endogen exprimierten Proteine binden und im Immunblot detektieren können. Diese eignen sich sehr gut, um die Biologie der Ektodomänen der beiden Proteine zu analysieren, da beide Antikörper gegen einen Teil der extrazellulären Domäne des jeweiligen Proteins gerichtet sind.



**Abbildung 21: Charakterisierung von Antikörpern die in primären murinen Neuronen endogen exprimiertes ENPP5 und PTPRN2 detektieren.** Abgebildet sind Immunblots der beschriebenen Proteine. Primäre murine Neurone von E16 Embryonen wurden mit den lentiviralen Partikeln HA-ENPP5-FLAG und HA-PTPRN2-FLAG (PTPRN2) transduziert oder nicht transduziert (CON). Unbehandelte HEK293-Zellen (neg.CON) dienten als Kontrolle. In den Zelllysaten konnte mit dem Anti-ENPP5 Antikörper C128737 ( $\alpha$ -ENPP5 C128737) eine spezifische ENPP5 Bande (ENPP5, durch Pfeilkopf markiert) in den transduzierten (HA-ENPP5-FLAG) und in den nicht transduzierten Neuronen (CON) nachgewiesen werden, die in den Lysaten der HEK293-Zellen (neg.CON) nicht nachweisbar war. Mit dem Anti-PTPRN2 Antikörper 15812 ( $\alpha$ -PTPRN2 15812) konnten in den transduzierten (HA-PTPRN2-FLAG) und den nicht transduzierten Neuronen (CON) eine spezifische Bande für das Volllängen PTPRN2 (VL PTPRN2, durch Pfeilkopf markiert) und zwei Banden für trunkierte Formen von PTPRN2 (tr. PTPRN2, durch Stern markiert) identifiziert werden. Als Ladekontrolle diente ein Calnexin Antikörper. Es handelt sich um repräsentative Western Blots aus 3 unabhängigen Experimenten.

## 6. Diskussion

Die APP schneidende  $\beta$ -Sekretase BACE1 ist ein Schlüsselenzym in der Generierung von pathogenen A $\beta$ -Peptiden, den Bestandteilen der Amyloid-Plaques und ist deshalb ein zentraler medikamentöser Angriffspunkt für die Therapie der Alzheimer-Krankheit. Die BACE1-Knockout-Maus zeigt einen komplexen neuropsychiatrischen Phänotyp und demonstriert, dass die Biologie von BACE1 eine Rolle im zentralen und peripheren Nervensystem einnimmt. Um diese zu erklären und potentielle Nebenwirkungen von BACE1-Inhibitoren zu erkennen, müssen die Substrate von BACE1 gefunden und charakterisiert werden, da die Funktion einer Protease über ihre Substrate definiert ist. Zahlreiche Substrate wurden bereits identifiziert und validiert, einige durch gezielte Untersuchung von Substrat-Kandidaten wie Neuregulin 1 Typ III, andere, wie CHL1 oder die Sez6 Proteine, durch Entdeckung in proteomischen Screenings und folgende Charakterisierung (Kuhn et al., 2012; Willem et al., 2006; Zhou et al., 2012). In Studien konnten physiologische Funktionen der identifizierten BACE1-Substrate gezeigt werden, die Teile des BACE1-Knockout-Maus-Phänotyps, wie die Hypomyelinisierung durch fehlende Prozessierung des Substrats Neuregulin 1 Typ III, erklären, jedoch konnte bisher keine vollständige Erklärung des BACE1-Knockout-Maus-Phänotyps gefunden werden. Deshalb ist es wichtig weitere Substrate von BACE1 zu identifizieren und deren Funktion zu verstehen (Vassar et al., 2014). Die Analyse von CSF ist eine essentielle Methode um Biomarker im ZNS von Patienten nachzuweisen und ist auch für die Entwicklung und Validierung der zentralnervös wirksamen BACE1-Inhibitoren relevant (Lehtinen et al., 2013). Kürzlich konnten in unserem Labor im Rahmen einer proteomischen Studie in einer massenspektrometrischen Analyse die bekannten BACE1-Substrate APP, APLP1 und APLP2 und die neuen potentiellen BACE1 Substrate PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 im CSF von BACE1 Knockout-Mäusen identifiziert werden (Dislich et al., 2015). Diese konnten in dieser Arbeit validiert und bestätigt werden: APLP1 und APLP2 konnten als BACE1-Substrate im CSF von Mäusen mit einer unabhängigen Methode identifiziert werden und in primären Zellen als BACE1 Substrate bestätigt werden. PTPRN2 wurde vorher in einer proteomischen Analyse und PLXDC2 wurde bereits in drei proteomischen Analysen als potentielles BACE1-Substrat beschrieben (Hemming et al., 2009; Kuhn et al., 2012; Stutzer et al., 2013; Zhou et al., 2012). In vorliegender Arbeit konnten die beiden Proteine als BACE1-Substrate in vitro und in Zellen validiert und bestätigt werden.

Außerdem konnte ENPP5 als neues BACE1-Substrat im CSF von Mäusen identifiziert und *in vitro* und in Zellen validiert und bestätigt werden (Dislich et al., 2015). Mit den in dieser Arbeit validierten BACE1-Substraten im CSF von Mäusen steht eine neue Auswahl von zusätzlichen, potentiellen Biomarkern zur Verfügung anhand derer die proteolytische Aktivität von BACE1 in Versuchstieren und Patienten gemessen werden kann. Die hier validierten Substrate könnten bei der Entwicklung von BACE1-Inhibitoren in klinischen Studien helfen und außerdem durch ihre Eigenschaft als routinemäßig im CSF bestimmbare, physiologische Substrate von BACE1 zur Evaluierung des Ansprechens auf die Medikation von Patienten, die eine BACE1-Inhibitor Therapie erhalten dienen. Dadurch könnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Entwicklung einer modernen Therapie der Alzheimer-Krankheit unterstützen.

### **6.1. Die tryptischen Peptide von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 aus den Daten der massenspektrometrischen Analyse von CSF von BACE1 Knockout-Mäusen sind in den Ektodomänen der Proteine lokalisiert**

Es konnte durch Aminosäuresequenzvergleiche im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die im CSF von BACE1-Knockout Mäusen vermindert vorhandenen Peptide von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 aus den Ektodomänen der jeweiligen Proteine stammen. Dadurch konnte die Hypothese unterstützt werden, dass die identifizierten Proteine durch BACE1-vermittelte Ektodomänenspaltung in das CSF sezerniert werden. Die cytoplasmatischen Domänen von ENPP5 und PLXDC2 machen nur den kleinsten Teil des jeweiligen Proteins aus und es ist deshalb wahrscheinlicher die zufällig generierten tryptischen Peptide aus der extrazellulären Domäne zu finden. So sind nur ca. 5% der Aminosäuresequenz von ENPP5 und ca. 10% der Aminosäuresequenz von PLXDC2 cytoplasmatisch lokalisiert. Dagegen sind ca. 40% der Aminosäuresequenz von PTPRN2 cytoplasmatisch lokalisiert und auch für dieses Protein wurden ausschließlich Peptide aus der Ektodomäne identifiziert. Dies zeigte, dass es sich bei der Detektion der Peptide der Ektodomänen der einzelnen Proteine nicht um einen statistischen Effekt handelt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden die tryptischen Peptide 15 anderer im CSF detektierter und in BACE1 Knockout-Mäusen signifikant regulierter Proteine in Anwendung des „Quantitative Analysis of Regulated Intramembrane Proteolysis“ (QARIP)-Web-Servers als Teil der Ektodomänen der jeweiligen Proteine identifiziert und somit für alle

diese Proteine gezeigt, dass sie wahrscheinlich durch Ektodomänenspaltung sezerniert wurden. Darunter waren auch die bekannten BACE1 Substrate APP, APLP1 und APLP2 (Dislich et al., 2015; Ivankov et al., 2013)

## **6.2. Die Sekretion von APLP1 und APLP2 ins CSF von Mäusen wird durch die Protease BACE1 vermittelt**

Es konnte in dieser Arbeit mittels quantitativen Immunblot-Analysen gezeigt werden, dass die Sekretion von APLP1 und APLP2 in das CSF von Mäusen von der Protease BACE1 vermittelt wird. Daten aus einer massenspektrometrischen Analyse des CSF von Mäusen konnten damit mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden (Dislich et al., 2015). Außerdem sind die Ergebnisse konsistent mit den Daten aus zwei unabhängigen massenspektrometrischen Analysen des Sekretoms primärer muriner Neurone, die mit einem BACE1-Inhibitor behandelt wurden (Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Die quantitative Analyse der Immunblots zeigte, dass im CSF von BACE1 Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen APLP1 ca. 7,5-fach und APLP2 ca. 3,5-fach reduziert war. Dies ist in quantitativer Übereinstimmung mit Daten aus der massenspektrometrischen Studie im CSF von Mäusen und validiert diese Methode als quantitativ akkurat (Dislich et al., 2015). Auch die quantitativen Daten aus den massenspektrometrischen Analysen von primären murinen Neuronen korrelierten mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, auch dort ist die Sekretion von APLP1 stark und die von APLP2 weniger stark reduziert (Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Dass die Sekretion von APLP1 in Abhängigkeit vom Knockout von BACE1 fast vollständig und die Sekretion von APLP2 etwas weniger deutlich reduziert wurde, ist vermutlich auf die Aktivität alternativer Sheddasen zurückzuführen die APLP1 und vermehrt APLP2 prozessieren und zur Ektodomänenspaltung und Sekretion von APLP1 und APLP2 führen. Für die  $\alpha$ -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 wurde berichtet, dass sie APLP2 prozessieren können und auch für APLP1 werden alternative Sheddasen diskutiert, die zur Ektodomänenspaltung führen können (Eggert et al., 2004; Endres et al., 2005; Höggl et al., 2011). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass APLP1 und APLP2 in Abhängigkeit von BACE1 in die cerebrospinale Flüssigkeit von Mäusen sezerniert werden und scheinbar alternative Sheddasen an der Sekretion dieser Proteine beteiligt sind.

### **6.3. APLP1 und APLP2 sind Substrate von endogen exprimiertem BACE1 in primären murinen Neuronen**

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass APLP1 und APLP2 Substrate von endogen exprimiertem BACE1 in primären murinen Neuronen sind. Diese Daten bestätigen vorherige Analysen aus Überexpressionsstudien von APLP1 und APLP2 in HEK293-, HeLa -, COS- (Fibroblasten-ähnliche Zelllinie aus Nierengewebe von Affen) und SH-SY5Y- (humane Neuroblastom Zelllinie) Zellen (Eggert et al., 2004; Li and Sudhof, 2004). Endogen exprimiertes APLP1 und APLP2 wurden in einer massenspektrometrischen Studie in transient BACE1 überexprimierenden HeLa-Zellen als Substrate identifiziert (Hemming et al., 2009). In primären murinen Neuronen wurden endogen exprimiertes APLP1 und APLP2 in zwei unabhängigen massenspektrometrischen Analysen als Substrate für endogen exprimiertes BACE1 identifiziert (Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Zusätzlich wurden APLP1 und APLP2 mittels Immunblot-Analysen als Substrate von endogen exprimiertem BACE1 in primären murinen Neuronen charakterisiert (Hoggl et al., 2011; Kuhn et al., 2012). In einer anderen Studie wurde APLP2 als BACE1 Substrat in vivo in BACE1-Knockout Mäusen charakterisiert (Pastorino et al., 2004). Außerdem wurde APLP1 $\beta$ , ein durch BACE1 proteolytisch geschnittenes und sezerniertes Fragment von APLP1, im CSF von Menschen nachgewiesen (Yanagida et al., 2009). Die proteolytische Schnittstelle von APLP2 durch BACE1 wurde durch Überexpression in HEK293-Zellen in einer massenspektrometrischen Analyse ermittelt (Hoggl et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde der heutige Wissenstand bestätigt und APLP1 und APLP2 konnten in primären murinen Neuronen, die mit einem BACE1-Inhibitor behandelt wurden, als BACE1 Substrate identifiziert werden. Außerdem konnte die Inhibition der proteolytischen Aktivität von BACE1 durch Behandlung der Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 anhand der Proteine APP, APLP1 und APLP2 validiert werden (Stachel et al., 2004). Der BACE1-Inhibitor C3 wurde aufgrund dieser Ergebnisse für alle weiteren Experimente verwendet. Die Sekretion von APLP1 wurde durch die Inhibition von BACE1 drastischer reduziert als die Sekretion von APLP2, jedoch wurde die Sekretion beider Proteine nicht vollständig unterdrückt. Dies unterstützt die Hypothese, dass beide Proteine in Neuronen durch zusätzliche Sheddasen geschnitten werden und APLP2 in größerem Ausmaß von alternativen Sheddasen prozessiert wird als APLP1.

#### **6.4. Stabile Expression der rekombinanten Proteine HA-ENPP5-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG**

Die rekombinanten Proteine HA-ENPP5-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG und HA-PLXDC2-FLAG konnten in Rahmen dieser Arbeit stabil in HEK293-Zellen exprimiert und im Western-Blot charakterisiert werden. Durch transiente Expression von Proteinen kann es zu zahlreichen unerwünschten Interaktionen und unphysiologischen Effekten in der Zelle unter anderem zur Verletzung der balancierten Gendosis, Beeinflussung der Proteinfaltung, Komplexzusammensetzung und Downstream-Regulierung kommen (Gibson et al., 2013). Deshalb stellt die stabile Expression von Proteinen ein besseres Konzept zum Studium von rekombinanten Proteinen dar und wurde in dieser Arbeit verwendet. Es wurde in dieser Arbeit in Lysaten von stabil HA-PTPRN2-FLAG exprimierenden HEK293-Zellen eine spezifische 110-kDa-Bande von PTPRN2 identifiziert, die dem Volllängen-Protein entspricht. Das 100- bis 120-kDa-Volllängen-Pro-PTPRN2 wird durch Prohormonkonvertasen zu einem verkürzten 60 bis 64 kDa schweren Protein prozessiert (Kawakami et al., 2007). So wurden in einer Studie spezifische 60- und 64-kDa-Banden für PTPRN2 in murinen pankreatischen Inseln, Insulinomzellen und Gehirnen von Mäusen im Western Blot identifiziert (Wasmeier and Hutton, 1996). Nach der Prozessierung durch die Prohormonkonvertase wird das N-terminale HA-Epitop von dem in dieser Arbeit analysiertem HA-PTPRN2-FLAG abgespalten. Es ist wahrscheinlich, dass deshalb das verkürzte 60 bis 64 kDa schwere PTPRN2 in den Experimenten dieser Arbeit nicht mit dem HA-Antikörper detektierbar war. Da das 60 bis 64 kDa verkürzte PTPRN2 allerdings auch nicht mit dem FLAG-Antikörper nachweisbar war, scheint dieses in HEK293-Zellen nicht oder nur zu sehr geringem Ausmaß vorzukommen. In einer anderen Studie wurden die 60- und 64-kDa-Banden in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien nicht detektiert, aber es wurden ca. 100- bis 120-kDa-Banden als Pro-Isoformen von PTPRN2 identifiziert (Sorokin et al., 2015). Möglicherweise bewirkt die stabile Überexpression von PTPRN2 in HEK293-Zellen, ähnlich wie in Brustkrebs-Zelllinien, dass die Proteinverkürzung durch Prohormon-Konvertasen beeinträchtigt wird (Sorokin et al., 2015).

ENPP5 wurde bereits in einer Studie im Western Blot dargestellt und ist dort in den Triton X-100 löslichen Fraktionen aus Zellmembranen aus Gehirnen von Ratten als eine 50-kDa-Bande identifizierbar (Ohe et al., 2003). Es besteht eine Diskrepanz zu den spezifischen Banden für ENPP5, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, da das

mature Vollängenprotein hier als 80-kDa-Bande und das mit N-Glykosidase F behandelte deglykosylierte Protein als 55-kDa-Bande beschrieben wurde. Möglicherweise handelt es sich in der in Ohe et al., 2013 detektierten Bande in Rattengehirnen um eine nicht hochgradig glykosylierte Form von ENPP5 und das niedrigere Laufverhalten im Western Blot ist dadurch zu erklären. Eine in Ohe et al., 2013 durchgeführte Deglykosylierung von ENPP5 führte zu keiner mit den Daten dieser Arbeit vergleichbaren Veränderung im Molekulargewicht von ENPP5, da das mature ENPP5 als 50-kDa-Bande und das deglykosylierte Protein als ca. 45- bis 50-kDa-Bande dargestellt wurde.

Das in Lysaten von HA-PLXDC2-FLAG stabil exprimierenden HEK293-Zellen in dieser Arbeit nachgewiesene Vollängen-Protein PLXDC2 ist als ca. 80-kDa-Bande identifizierbar und bestätigt somit vorherige Beschreibungen (Hemming et al., 2008).

#### **6.5. Die Sekretion der Ektodomänen von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 ist direkt abhängig von der proteolytischen Aktivität von BACE1**

Die im CSF von BACE1 Knockout-Mäusen vermindert detektierten Proteine sind potentielle proteolytische Substrate der  $\beta$ -Sekretase BACE1. Es handelt sich jedoch nicht um validierte Substrate, da es noch andere Gründe gibt, warum diese vermindert im CSF vorliegen könnten. So könnte BACE1 im Zusammenhang der im CSF vermindert identifizierten Proteine Teil einer Proteasen-Kaskade sein und nicht selbst durch einen proteolytischen Schnitt die Sekretion der Proteine vermitteln. In Protease-Kaskaden werden bestimmte Proteasen durch eine Kaskade von proteolytischen Spaltungen mehrerer beteiligter Proteasen aktiviert, wie bei der sekundären Hämostase die Blutgerinnungsfaktoren und bei der Apoptose die Caspasen (McIlwain et al., 2015; Schenone et al., 2004). Außerdem können durch Proteasen aus einem Substrat abgespaltene Polypeptide als Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Expression eines anderen Proteins haben. BACE1 oder ein BACE1 entstammendes Polypeptid könnten in der CSF-Studie als Transkriptionsfaktor einen Einfluss auf die Expression der vermindert detektierten Proteine gehabt haben. Um zu zeigen, dass es sich bei PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 um proteolytische Substrate von BACE1 handelt und keiner der oben genannten sekundären Effekte einen Einfluss auf diese hat, wurden die drei Proteine in Zellen als BACE1 Substrate validiert. Hierfür wurden

HEK293-Zellen mit den Substrat-Kandidaten stabil transfiziert. Die höchste endogene Expression von BACE1 wird im zentralen Nervensystem beobachtet (Vassar et al., 1999). Im Vergleich dazu ist die Expression von BACE1 in HEK293-Zellen nur sehr gering (Colombo et al., 2013). Deshalb wurde BACE1 transient in stabil transfizierten HEK293-Zellen überexprimiert. Durch dieses experimentelle Vorgehen wurden in früheren Studien anderer Wissenschaftler unter anderem APLP1, APLP2, das Protein P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL1) und der Interleukin-1 Rezeptor II als BACE1 Substrate validiert (Kuhn et al., 2007; Li and Sudhof, 2004; Lichtenthaler et al., 2003). Um die Abhängigkeit der Sekretion der Substrat-Kandidaten PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 von der proteolytischen Aktivität von BACE1 zu zeigen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem BACE1-Inhibitor C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem) behandelt (Stachel et al., 2004). Auf diese Weise wurden in HEK293-Zellen in einer anderen Studie bereits die Transmembranproteine Leucine-rich Repeats And Immunoglobulin-like Domains Protein 2 (LRIG2), Leucine-rich Repeats And Immunoglobulin-like Domains Protein 3 (LRIG3) und Cation-independent Mannose-6-phosphate Receptor (IGF2R) als BACE1 Substrate validiert (Hemming et al., 2009). Für die Validierung von APLP1 und APLP2 als BACE1 Substrate in dieser Arbeit, wurde ebenfalls der Inhibitor C3 verwendet und es konnte gezeigt werden, dass eine effektive Inhibition der proteolytischen Aktivität von BACE1 in Zellen erreicht werden kann (siehe Kapitel 6.3.). Durch dieses experimentelle Design konnte für PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 gezeigt werden, dass sie in direkter Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von BACE1 in den Extrazellulärraum sezerniert werden können: Durch Kotransfektion von BACE1 wurden die Ektodomänen der Substrate vermehrt sezerniert und durch gleichzeitige Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 nahm die Sekretion wieder deutlich ab. Die Sekretion der Ektodomänen von ENPP5 ließen sich durch die Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 nicht auf das Ausmaß der Sekretion der ENPP5-transfizierten Zellen ohne BACE1-Kotransfektion reduzieren. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass ENPP5 als BACE1-Substrat Wechselwirkungen mit dem Inhibitor C3 eingeht und dessen Wirkung abschwächt, wie es für sehr affine BACE1-Substrate beschrieben wurde (Yamakawa et al., 2010). PLXDC2 wurde bereits in drei anderen Studien, einmal in HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und zweimal in primären murinen Neuronen als potentiell BACE1 Substrat beschrieben (Hemming et al., 2009; Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). PTPRN2 wurde bereits in einer weiteren Studie in

murinen pankreatischen  $\beta$ -Zellen als potentielles BACE1-Substrat identifiziert (Stutzer et al., 2013).

Die löslichen Ektodomänen der Substrate mussten, um sie mittels Immunblot analysieren zu können, aus den konditionierten Medien immunpräzipitiert werden. Dies legte nahe, dass die drei Proteine nicht zu sehr großem Ausmaß in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Die identifizierten Ektodomänen der drei Proteine entsprachen dem Molekulargewicht, das für die juxtamembranös geschnittenen Proteine zu erwarten war. In den Zellysaten ließ sich für die drei Proteine entgegen der primären Annahmen weder eine Zu- oder Abnahme der Bandenintensität der Vollängenproteine in den BACE1-kotransfizierten oder den C3 behandelten Zellen beobachten. Es bleibt offen, warum dies der Fall ist. Möglicherweise beeinflusst die Kotransfektion durch BACE1 die Expression des stabil transfizierten Substrat-Proteins und führt somit zu einer kompensatorischen Zunahme der Substrat-Protein-Expression.

#### **6.6. ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 werden von BACE1 in einem in-vitro-Assay proteolytisch geschnitten**

Da durch die Studien an den rekombinanten Proteinen in HEK293-Zellen die Möglichkeit, dass BACE1 diese als Bestandteil einer Protease-Kaskade beeinflusst nicht ausgeschlossen wurde, sollte in-vitro in einem isolierten Experiment demonstriert werden, dass BACE1 die Substrate in einem direkten proteolytischen Schnitt prozessiert. Dies konnte in einem in dieser Arbeit etablierten BACE1-in-vitro-Assay für ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 gezeigt werden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über gängige BACE1 in-vitro-Assays gegeben werden. Diese werden primär dafür genutzt, um die proteolytische Aktivität der Protease zu analysieren. Hierfür werden in den meisten Studien Förster-Resonanzenergietransfer-Assays (FRET-Assays) verwendet, in denen BACE1 den Schnitt eines Peptides katalysiert, das eine fluoreszierende und eine fluoreszenzlöschende Gruppe enthält (Andrau et al., 2003; Gruninger-Leitch et al., 2000; Lammich et al., 2004; Saric et al., 2013). In einer anderen Studie wurden kurze synthetische Peptide mit purifiziertem rekombinantem BACE2 inkubiert und die Fragment-Peptide massenspektrometrisch analysiert, in der Annahme, dass BACE2 ein ähnliches Substratspektrum aufweist wie BACE1 (Kuhn et

al., 2007). Neben den peptidverdauenden BACE1-in-vitro-Assays wurden Assays beschrieben, in denen rekombinante Substrate verdaut werden. So wurde das rekombinante Substrat P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) durch eine BACE1 enthaltende Membranpreparation geschnitten und mittels Western Blot analysiert (Lichtenthaler et al., 2003). In einem anderen experimentellen Design wurde ein rekombinantes Fusionsprotein des Substrats  $\beta$ -Galactoside  $\alpha$ 2 6-Sialyltransferase (ST6Gal1) mit purifiziertem rekombinatem BACE1 inkubiert und anschließend im Western-Blot analysiert (Kitazume et al., 2001). Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte BACE1-in-vitro-Assay, stellt eine methodische Neuerung im Bereich der Transmembranprotein-in-vitro-Assays dar: Es wurden purifizierte rekombinante Vollängen-Substrat-Proteine mit proteolytisch aktivem, löslichem, rekombinatem BACE1 inkubiert. Im Vergleich zu herkömmlichen Assays in denen Peptide geschnitten werden, stellt die Prozessierung von Vollängen-Proteinen eine Situation dar, die den physiologischen Vorgängen in Zellen näherkommt. Beim Einsatz von Peptiden können z.B. auch solche Peptide durch BACE1 geschnitten werden, die in der Zelle nicht mit BACE1 in Kontakt kommen würden, da sie zu weit von der Membran entfernt lokalisiert sind oder durch die Tertiärstruktur des Proteins verdeckt werden. Die Vollängen-Proteine von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 konnten im in dieser Arbeit etablierten in-vitro-Assay durch rekombinantes BACE1 gespalten werden (Dislich et al., 2015). Die Vollängenproteine ließen sich nicht vollständig durch BACE1 in Spaltprodukte umsetzen. Vor allem das ENPP5-Vollängenprotein und das PLXDC2-Vollängenprotein waren nach der Inkubation mit rekombinatem BACE1 noch deutlich im Immunblot detektierbar. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass ENPP5 und PLXDC2 relativ langsam durch das rekombinante BACE1 umgesetzt werden und durch eine längere Inkubation vermehrt umgesetzt werden könnten. Die N-terminalen Spaltprodukte, die im BACE1-in-vitro-Assay entstanden, entsprachen dem Molekulargewicht der in HEK293-Zellen detektierten löslichen Ektodomänen von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5. Damit konnte gezeigt werden, dass die im in-vitro-Assay stattgefundenen proteolytischen Schnitte der Prozessierung der Substrate durch BACE1 in HEK293-Zellen ähnlich sind. Möglicherweise wurden die Substrate an derselben Peptidbindung wie in den Zellen geschnitten.

Diese Ergebnisse validieren PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 zusätzlich in vitro als Substrate der Protease BACE1.

### **6.7. ENPP5 wird in primären murinen Neuronen von endogen exprimiertem BACE1 proteolytisch geschnitten**

Die Überexpression von Substrat und Protease in HEK293-Zellen kann dazu führen, dass falsch-positive Substrate identifiziert werden, die physiologischerweise keine Substrate sind. In einer Studie wurde BACE1 in HeLa-Zellen überexprimiert und es wurden 68 potentielle BACE1-Substrate identifiziert (Hemming et al., 2009). In einer anderen Studie wurde in primären murinen Neuronen durch Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 endogen exprimiertes BACE1 inhibiert und es konnten auf diese Weise nur noch 34 potentielle BACE1 Substrate detektiert werden (Kuhn et al., 2012). Diese beiden Studien identifizierten acht gemeinsame potentielle BACE1-Substrate. Der Großteil der potentiellen Substrate aus der Überexpressions-Studie konnte nicht in der Studie in Neuronen identifiziert werden. Einige der in der BACE1-Überexpressions-Studie identifizierten potentiellen Substrate konnten in primären murinen Neuronen nachgewiesen werden, waren aber nicht statistisch signifikant verändert und sind wahrscheinlich falsch-positive Entdeckungen, die durch artifizielle Prozessierung durch überexprimiertes BACE1 zustande kamen. Im Vergleich der Überexpressions-Studie zu einer zweiten Studie in der primäre murine Neuronen mit einem BACE1-Inhibitor behandelt wurden und potentielle BACE1-Substrate analysiert wurden, lassen sich ähnliche Beobachtungen machen (Zhou et al., 2012).

Um artifizielle Spaltung durch überexprimiertes BACE1 auszuschließen, wurde das kürzlich im Labor von Prof. Stefan Lichtenthaler erstmals im CSF identifizierte und im Rahmen dieser Arbeit validierte BACE1-Substrat ENPP5 unter endogener BACE1-Expression in primären murinen Neuronen als BACE1-Substrat bestätigt. Die höchste endogene Expression von BACE1 ist im zentralen Nervensystem vorhanden (Vassar et al., 1999). Deshalb wurden primäre murine Neuronen als Zellmodell gewählt. Diese wurden mit dem BACE1-Inhibitor C3 behandelt. Die BACE1 Substrate APLP1 und APLP2 (siehe Kapitel 6.3.), Seizure Protein 6 (Sez6), Contactin-2, Neural Cell Adhesion Molecule L1-like Protein (CHL1) und Neural Cell Adhesion Molecule L1 (NCAM-L1) konnten bereits auf diese Weise in dieser und anderen Arbeiten in primären murinen Neuronen validiert werden (Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012). Da keine Antikörper zur Verfügung standen, die das murine, neuronal endogen exprimierte ENPP5 oder PTPRN2 im Immunblot detektieren können, wurde HA-ENPP5-FLAG und HA-PTPRN2-FLAG in primären murinen Neuronen überexprimiert.

Hierfür wurde ein lentivirales Expressionssystem genutzt, das für die Expression von Transmembranproteinen optimiert wurde, da bei konventionellen Transfektionen in primären murinen Neuronen eine hohe Toxizität und geringe Transfektionseffizienz beobachtet wird.

Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes HA-ENPP5-FLAG durch endogen exprimiertes BACE1 in primären murinen Neuronen in den Extrazellulärraum sezerniert wird. Das Volllängen-Protein und die lösliche Ektodomäne entsprachen dem Molekulargewicht der in HEK293-Zellen charakterisierten Fragmente und legten damit nahe, dass ENPP5 auf ähnliche Weise in Neuronen wie in HEK293-Zellen prozessiert wird.

Dagegen ließ sich das in den Extrazellulärraum sezernierte lösliche PTPRN2 nicht nachweisen, sondern lediglich das Volllängen-Protein von PTPRN2 in den Zelllysaten. Da auch HA-ENPP5-FLAG erst nach Anreicherung durch eine Immunpräzipitation aus den konditionierten Medien im Immunblot detektierbar war, ist es wahrscheinlich, dass weder das rekombinante ENPP5, noch das rekombinante PTPRN2 in primären murinen Neuronen in großem Maße stabil im Extrazellulärraum vorhanden sind. Diese Beobachtung wurde für die beiden rekombinanten Proteine auch bei der Expression in HEK293-Zellen gemacht (siehe Kapitel 6.5.). Dies würde auch erklären warum die beiden Proteine in den Daten der beiden früheren proteomischen Analysen von primären murinen Neuronen, die mit BACE1-Inhibitoren behandelt wurden, nicht vorhanden waren, da in massenspektrometrischen Studien höher abundante Proteine häufig die Detektion von weniger abundanten Proteinen erschweren (Kuhn et al., 2012; Zhou et al., 2012).

### **6.8. Charakterisierung von Antikörpern die endogenes ENPP5 und PTPRN2 in Neuronen detektieren können**

Um ENPP5 und PTPRN2 weiter erforschen zu können, konnten in dieser Arbeit Antikörper charakterisiert werden, die endogen exprimiertes ENPP5 und PTPRN2 im Immunblot detektieren können.

ENPP5 wurde erstmals in Gehirnen von Ratten entdeckt und als neuronales oligomannosidisches Glykoprotein charakterisiert (Ohe et al., 2003). In der Datenbank

„Allen Mouse Brain Atlas“ ist ENPP5 im Gehirn von adulten Mäusen primär in Cortex, Hippocampus und Cerebellum exprimiert. Der Allen Mouse Brain Atlas ist eine umfassende genomweite Karte des Gehirns von adulten Mäusen und zeigt welches Gen an welcher Stelle im Gehirn exprimiert wird (<http://www.brain-map.org>). Die Expression von PTPRN2 ist in Gehirnen von Mäusen hoch. Dies ergaben Northern-Blot Analysen der PTPRN2-RNA und Western Blot-Analysen der PTPRN2-Proteinmengen (Chiang and Flanagan, 1996; Kawakami et al., 2007; Wasmeier and Hutton, 1996). Auch Daten aus dem „Allen Mouse Brain Atlas“ bestätigen die Expression von PTPRN2 in Cortex, Hippocampus und Cerebellum der adulten Maus (<http://www.brain-map.org.de>). Da beide Proteine stark in murinen Neuronen exprimiert werden, wurden die verfügbaren Antikörper in Zelllysaten von primären murinen Neuronen für die Immunblot-Anwendung validiert. Als Positivkontrollen wurden die beiden Proteine mittels eines lentiviralen Expressionssystems in primären murinen Neuronen exprimiert.

Der in Mäusen produzierte monoklonale IgG2a Antikörper C128737 (LS Bio) konnte als ein das neuronal, endogen exprimierte ENPP5 detektierender Antikörper charakterisiert werden. Das detektierte Vollängen-Protein ENPP5 entsprach dem Molekulargewicht des in dieser Arbeit detektierten Proteins. Da der Antikörper ein Epitop der ENPP5-Ektodomäne bindet, ist er geeignet in zukünftigen Studien die Ektodomänenspaltung von ENPP5 und die Biologie der ENPP5-Ektodomäne zu analysieren.

Als ein das in Neuronen endogen exprimierte PTPRN2 detektierender Antikörper konnte der in Kaninchen produzierte polyklonale Antikörper PAB15812 (Abnova) charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser das 110 kDa Vollängenprotein PTPRN2 detektiert, das mit dem in dieser Arbeit beobachteten Molekulargewicht von rekombinantem PTPRN2 in HEK293-Zellen übereinstimmt. Zusätzlich konnten 2 Banden von ca. 60 und 80 kDa detektiert werden, welche der verkürzten, maturen Form von PTPRN2 entsprechen. Dieses wird durch die Prohormonkonvertasen PC1 und PC3 oder PC2 anhand einer dibasischen Konsensussequenz nach Aminosäure 426 gespalten und somit verkürzt (Kawakami et al., 2007). Da der Antikörper ein Epitop aus der Ektodomäne bindet, konnte somit gezeigt werden, dass der Antikörper PAB15812 (Abnova) ein Epitop der Ektodomäne

des maturen, verkürzten PTPRN2 bindet und zu weiteren Analysen der PTPRN2 Ektodomäne in künftigen Studien verwendet werden kann.

Allerdings ließen sich beide Proteine nicht in neuronalen Zellüberständen oder Immunpräzipitaten der Zellüberstände mit den charakterisierten Antikörpern nachweisen. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen aus den vorherigen Experimenten dieser Arbeit, dass ENPP5 und PTPRN2 in Zellen nur zu geringem Ausmaß im Extrazellulärraum vorhanden sind.

### **6.9. Ausblick**

Die medikamentöse Inhibition von BACE1 ist aktuell ein vielversprechender Ansatz für die Prävention oder Therapie der Alzheimer-Krankheit und BACE1-Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien. Deshalb ist es wichtig die Substrate und physiologischen Funktionen von BACE1 zu erforschen, um mögliche Nebenwirkungen oder potentielle Biomarker einer medikamentösen BACE1-Inhibition zu identifizieren.

Um die drei Proteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 weiterhin als Substrate von BACE1 zu validieren, sollten in künftigen Studien die endogen exprimierten Proteine in Neuronen analysiert werden. Mithilfe der in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper für ENPP5 und PTPRN2 könnte dies, auf gleiche Weise wie die Validierung von APLP1 und APLP2 in dieser Arbeit, durch Behandlung von primären murinen Neuronen mit dem BACE1-Inhibitor C3 getestet werden. Um das endogene exprimierte PLXDC2 als BACE1-Substrat in Neuronen zu validieren, sollte ein Antikörper charakterisiert werden, der die Ektodomäne des endogenen PLXDC2 im Western Blot detektieren kann. Mit geeigneten Antikörpern könnte auch die Kollokalisierung von BACE1 und ENPP5, PLXDC2, PTPRN2 in Neuronen und im Gehirn von Mäusen mittels Immunfluoreszenz bestimmt werden.

Um herauszufinden an welcher Stelle der Aminosäuresequenz von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 der proteolytische Schnitt durch BACE1 stattfindet, könnten in Zukunft massenspektrometrische Analysen dienen. So könnten kurze Peptide, die die vermutete Schnittstelle beinhalten in dem in dieser Arbeit etablierten BACE1-in-vitro-Assay prozessiert und die entstandenen Fragment-Peptide anschließend massenspektrometrisch analysiert werden. Anhand der Sequenzen der analysierten

Fragment-Peptide könnten so die Schnittstellen festgestellt werden. Dieses Konzept wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits für Peptide von ENPP5 getestet und lieferte vielversprechende Ergebnisse. Alternativ könnten TEV (Tobacco Etch Virus Epitop: ENLYFQS)-FLAG Expressionskonstrukte hergestellt werden, die für die Substrat-Proteine mit einem TEV-FLAG-Epitop in der membrannahen Domäne kodieren und durch Abspaltung der übrigen Ektodomäne durch die TEV-Protease kurze, massenspektrometrisch analysierbare Peptide aus BACE1 überexprimierenden Zellen gewonnen werden. So könnte exakt ermittelt werden welche Peptidbindungen von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 durch BACE1 gespalten werden (Hogl et al., 2011).

Es wäre außerdem interessant zu untersuchen, ob ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 ähnlich wie APP durch eine komplexe, regulierte Intramembranproteolyse prozessiert werden und welche anderen Sheddasen diese schneiden können. PLXDC2 wurde als Substrat der  $\gamma$ -Sekretase und einer unbekanntenen Metalloprotease beschrieben (Hemming et al., 2008). In dieser Arbeit nicht gezeigte Daten, legen nahe, dass auch ENPP5 und PTPRN2 Substrate von Metalloproteasen sein können, da durch Behandlung von Zellen mit dem Metalloproteaseninhibitor TAPI-1 (Calbiochem) die Sekretion der beiden Proteine vermindert war. Durch spezifischen Knockdown von relevanten Metalloproteasen wie ADAM10 und ADAM17 durch siRNA (small interfering RNA) oder shRNA (short hairpin RNA) in Zellen oder durch Behandlung von Zellen mit spezifischen Metalloprotease-Inhibitoren könnten die relevante  $\alpha$ -Sekretasen von ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 ermittelt werden.

Um ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 als klinische Biomarker für die proteolytische Aktivität von BACE1 und als Parameter für die Wirksamkeit von BACE1-Inhibitoren in Patienten zu etablieren, sollten diese in künftigen Studien im CSF von Patienten gemessen und analysiert werden. Eine quantitative Korrelation der Proteinmengen von ENPP5, PLXDC2 und PTPRN2 im CSF von Mäusen mit der BACE1-Aktivität könnte die Grundlage für eine potentielle Rolle der drei Proteine als Biomarker für BACE1-Aktivität in vivo legen. Falls sich eine Korrelation der Proteinmengen im CSF und der BACE1-Aktivität in Proben von menschlichen Patienten bestätigen lässt, könnten die drei Proteine in Zukunft als Biomarker in klinischen Studien von BACE1-Inhibitoren eingeschlossen werden und als diagnostische und therapeutische Parameter dienen. Da die Relevanz der Alzheimer-Krankheit in unserer alternden

Bevölkerung zunimmt, ist die weitere Erforschung der BACE1-Substrate PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 auch von großer klinischer und gesellschaftlicher Bedeutung.

Außerdem könnte die funktionelle Charakterisierung der löslichen Ektodomänen der Proteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 dazu beitragen die Biologie von BACE1 weiter zu entschlüsseln und in Zusammenhang mit dem komplexen Phänotyp der BACE1-Knockout-Maus bringen.

So wurde für PLXDC2 eine Rolle in der Zellproliferation und Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn von Mäusen beobachtet. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne für diese Effekte suffizient ist (Miller-Delaney et al., 2011). Es sollte in Zukunft untersucht werden, ob es sich bei dieser extrazellulären Domäne um die von BACE1 prozessierte Ektodomäne von PLXDC2 handelt. Als nächstes sollten PLXDC2-KO-Mäuse generiert werden, um zu untersuchen, ob diese den Phänotyp von BACE1-Knockout-Mäusen kopieren und so ein direkter Zusammenhang zum Phänotyp der BACE1-Knockout-Maus hergestellt werden kann.

PTPRN2 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des sekretorischen Stoffwechselweges von neuroendokrinen Zellen, inklusive der pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Kubosaki et al., 2006; Nishimura et al., 2009). Außerdem ist es eines der Hauptautoantigene für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 und spielt eine Rolle in der Glukosetoleranz und der Glukose-responsiven Insulinsekretion (Torii, 2009). Es wäre in zukünftigen Studien interessant herauszufinden, ob BACE1 einen Einfluss auf die bekannten Funktionen von PTPRN2 haben kann und ob eine therapeutische Inhibition von BACE1 einen Einfluss auf die Funktion von neuroendokrinen Zellen oder die Entstehung von Typ-1 Diabetes mellitus haben kann.

Für ENPP5 sind bisher keine katalytischen oder nicht-katalytischen Funktionen bekannt, aber für das verwandte ENPP2 wurde eine Rolle in der Regulierung der Zellproliferation beschrieben durch dessen Fähigkeit Lysophosphatidsäure (LPA) zu generieren (Stefan et al., 2005). Es sollte in künftigen Studien in funktionellen Assays untersucht werden, ob für ENPP5 eine katalytische Funktion festgestellt werden kann. Außerdem sollten künftig die nicht-katalytischen Funktionen der von BACE1 prozessierte Ektodomäne von ENPP5 in Zellen untersucht werden.

Interessanterweise zeigen die drei Proteine ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 jeweils Funktionen im Bereich der Tumorzellbiologie. So wurde der Zusammenhang zwischen PLXDC2 und Zellproliferation, Zellseneszenz, Transformation und Zelltod in zahlreichen Studien erwähnt (Hallstrom et al., 2008; Miller-Delaney et al., 2011; Schwarze et al., 2005). PTPRN2 spielt eine Rolle im Wachstum der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und in der Zellproliferation (Rhodes, 2005; Terauchi et al., 2007; Torii et al., 2009). Außerdem wurde in zahlreichen Brustkrebs-Tumorzelllinien eine aberrante Expression von Vollängen-PTPRN2 festgestellt und diese in Zusammenhang mit Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Apoptose gestellt (Sorokin et al., 2015). Das ENPP5-Gen wurde kürzlich als Angiogenese-assoziiertes Gen in pädiatrischen Gliomen identifiziert (Smith et al., 2012). Es sollte in Zukunft untersucht werden, ob BACE1 einen Einfluss auf die proliferativen und antiproliferativen Effekte der Substrate ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 haben kann und damit eine Rolle in der Tumorzellbiologie einnimmt. Für die Entwicklung von BACE1-Inhibitoren könnte dies von großer Relevanz sein und möglicherweise neue Perspektiven für Indikationen von BACE1-Inhibitoren in der Onkologie eröffnen.

## 7. Zusammenfassung

Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 ist ein zentraler medikamentöser Angriffspunkt für die Therapie der Alzheimer-Krankheit. In einer proteomischen Analyse von Liquor cerebrospinalis von Mäusen konnten die bekannten BACE1-Substrate APP, APLP1 und APLP2 und außerdem die drei potentiell neuen BACE1-Substrate ENPP5, PTPRN2 und PLXDC2 identifiziert werden (Dislich et al., 2015). In dieser Arbeit sollte in Experimenten mit Zellkulturen und in einem Protease-in-vitro-Assay untersucht werden, ob PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 Substrate für BACE1 sind.

Die bekannten BACE1-Substrate APLP1 und APLP2 konnten mittels Immunblot im Liquor cerebrospinalis von BACE1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen vergleichend analysiert werden. In den BACE1-Knockout-Mäusen wurden APLP1 und APLP2 vermindert in den Liquor cerebrospinalis sezerniert und die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse von BACE1-Knockout-Mäusen von Dislich et al., 2015 konnten dadurch mit einer anderen Methode reproduziert werden. Außerdem wurden die bekannten BACE1-Substrate APP, APLP1 und APLP2 in primären murinen Neuronen darauf untersucht, ob sie durch BACE1 in die Extrazellulärflüssigkeit sezerniert werden. Hierfür wurden primäre murine Neurone mit dem BACE1-Inhibitor C3 behandelt und es konnte gezeigt werden, dass APP, APLP1 und APLP2 in primären murinen Neuronen unter BACE1-Inhibition vermindert und folglich in direkter Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von BACE1 sezerniert werden. Mit diesen Ergebnissen konnten APP, APLP1 und APLP2 als BACE1-Substrate bestätigt werden.

Um PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 weiterhin als BACE1-Substrate zu validieren, wurden die Proteine in HEK293-Zellen stabil exprimiert und die proteolytische Spaltung durch BACE1 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die löslichen Ektodomänen von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 bei Überexpression von BACE1 vermehrt sezerniert werden. Außerdem wurden die Zellen mit dem spezifischen BACE1-Inhibitor C3 behandelt und es konnte gezeigt werden, dass die Ektodomänen von PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 daraufhin vermindert sezerniert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 Substrate von BACE1 sind.

Um zu zeigen, dass die potentiellen Substrate durch einen direkten Schnitt von BACE1 prozessiert werden, wurden diese in einem, in dieser Arbeit etablierten Protease-in-vitro-Assay durch rekombinantes BACE1 proteolytisch gespalten. Es konnte gezeigt werden, dass PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 in vitro durch rekombinantes BACE1 proteolytisch gespalten werden.

Zusammen mit den Ergebnissen aus den Experimenten der überexprimierten Substrate in HEK293-Zellen wurden PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 als Substrate für BACE1 validiert.

Durch Überexpression einer Protease kann es zu unphysiologischen Aktivitäten dieser kommen und Substrate geschnitten werden, die physiologisch keine Substrate der Protease sind. Die endogene physiologische Expression von BACE1 und der Substrat-Kandidaten PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 ist in Neuronen am höchsten (Ohe et al., 2003; Vassar et al., 1999; Wasmeier and Hutton, 1996). Daher sollte gezeigt werden, dass die Substrate in primären murinen Neuronen von BACE1 prozessiert werden können. Dies konnte mittels lentiviraler Expression von ENPP5 in primären murinen Neuronen für das Substrat ENPP5 gezeigt werden, da die lösliche Ektodomäne von neuronal exprimiertem ENPP5 durch die Behandlung der Neuronen mit dem BACE-Inhibitor C3 vermindert in den Extrazellulärraum sezerniert wurde.

Zur weiteren Erforschung der endogen exprimierten Proteine ENPP5 und PTPRN2, sollten verfügbare Antikörper charakterisiert werden, die die in primären murinen Neuronen endogen exprimierten Proteine binden und im Immunblot detektieren können. Es konnten durch lentivirale Expression von ENPP5 und PTPRN2 in primären murinen Neuronen Antikörper charakterisiert werden, die das überexprimierte, sowie das endogen exprimierte Protein binden und im Immunblot detektieren können.

In dieser Arbeit konnten PTPRN2, PLXDC2 und ENPP5 in vitro und in Zellen als neue Substrate der Protease BACE1 validiert und bestätigt werden. Diese Ergebnisse helfen die physiologischen Funktionen von BACE1 zu charakterisieren und dienen als Grundlage für künftige funktionelle Studien der Substrate. Außerdem stellen die im CSF von Mäusen detektierten und in dieser Arbeit erstmalig validierten und bestätigten BACE1-Substrate potentielle Biomarker für eine Therapie von Patienten mit BACE1-Inhibitoren dar und könnten bei der Entwicklung und klinischen Testung von BACE1-Inhibitoren dienen. Der Einsatz von BACE1-Inhibitoren stellt derzeit einen

vielversprechenden Ansatz für eine Therapie oder Prävention der Alzheimer-Krankheit dar (Yan and Vassar, 2014). Deshalb könnten die Ergebnisse dieser Arbeit bei der Entwicklung und Verbesserung einer modernen Therapie der Alzheimer-Krankheit helfen.

## 8. Aminosäurecode

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

## 9. Literaturverzeichnis

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med.* **64**, 146–148

Abduljaleel, Z., Al-Allaf, F.A., Khan, W., Athar, M., Shahzad, N., Taher, M.M., Elrobb, M., Alanazi, M.S., and El-Huneidi, W. (2014). Evidence of trem2 variant associated with triple risk of Alzheimer's disease. *PLoS One* **9**, e92648.

Andrau, D., Dumanchin-Njock, C., Ayrat, E., Vizzavona, J., Farzan, M., Boisbrun, M., Fulcrand, P., Hernandez, J.F., Martinez, J., Lefranc-Jullien, S., *et al.* (2003). BACE1- and BACE2-expressing human cells: characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 25859-25866.

Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., *et al.* (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **367**, 795-804.

Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisodia, S., Checler, F., *et al.* (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* **276**, 10879-10887.

Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.C., Citron, M., and Vassar, R. (2000). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* **275**, 37712-37717.

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 131-144.

Bodendorf, U., Fischer, F., Bodian, D., Multhaup, G., and Paganetti, P. (2001). A splice variant of beta-secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **276**, 12019-12023.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.

Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-398.

Budd Haeberlein, S., O'Gorman, J., Chiao, P., Bussiere, T., von Rosenstiel, P., Tian, Y., Zhu, Y., von Hehn, C., Gheuens, S., Skordos, L., *et al.* (2017). Clinical Development of Aducanumab, an Anti-Abeta Human Monoclonal Antibody Being Investigated for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *The journal of prevention of Alzheimer's disease* **4**, 255-263.

- Bunch, T.A., Helsten, T.L., Kendall, T.L., Shirahatti, N., Mahadevan, D., Shattil, S.J., and Brower, D.L. (2006). Amino acid changes in Drosophila alphaPS2betaPS integrins that affect ligand affinity. *J Biol Chem* 281, 5050-5057.
- Cabrejo, L., Guyant-Marechal, L., Laquerriere, A., Vercelletto, M., De la Fourniere, F., Thomas-Anterion, C., Verny, C., Letournel, F., Pasquier, F., Vital, A., *et al.* (2006). Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain* 129, 2966-2976.
- Cacace, R., Slegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733-748.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., and Wong, P.C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234.
- Cai, T., Hirai, H., Zhang, G., Zhang, M., Takahashi, N., Kasai, H., Satin, L.S., Leapman, R.D., and Notkins, A.L. (2011). Deletion of Ia-2 and/or Ia-2beta in mice decreases insulin secretion by reducing the number of dense core vesicles. *Diabetologia* 54, 2347-2357.
- Caromile, L.A., Oganessian, A., Coats, S.A., Seifert, R.A., and Bowen-Pope, D.F. (2010). The neurosecretory vesicle protein phogrin functions as a phosphatidylinositol phosphatase to regulate insulin secretion. *J Biol Chem* 285, 10487-10496.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., *et al.* (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Science translational medicine* 3, 89ra57.
- Cheret, C., Willem, M., Fricker, F.R., Wende, H., Wulf-Goldenberg, A., Tahirovic, S., Nave, K.A., Saftig, P., Haass, C., Garratt, A.N., *et al.* (2013). Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *EMBO J* 32, 2015-2028.
- Chiang, M.K., and Flanagan, J.G. (1996). PTP-NP, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family, implicated in development of nervous system and pancreatic endocrine cells. *Development* 122, 2239-2250.
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 9, 387-398.
- Colombo, A., Wang, H., Kuhn, P.H., Page, R., Kremmer, E., Dempsey, P.J., Crawford, H.C., and Lichtenthaler, S.F. (2013). Constitutive alpha- and beta-secretase cleavages of the amyloid precursor protein are partially coupled in neurons, but not in frequently used cell lines. *Neurobiol Dis* 49, 137-147.
- Costantini, C., Ko, M.H., Jonas, M.C., and Puglielli, L. (2007). A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J* 407, 383-395.
- Cummings, J.L. (2004). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351, 56-67.

- Cunningham, R., Jany, P., Messing, A., and Li, L. (2013). Protein changes in immunodepleted cerebrospinal fluid from a transgenic mouse model of Alexander disease detected using mass spectrometry. *J Proteome Res* 12, 719-728.
- De Strooper, B., and Chavez Gutierrez, L. (2015). Learning by failing: ideas and concepts to tackle gamma-secretases in Alzheimer's disease and beyond. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55, 419-437.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.
- Di Fede, G., Catania, M., Morbin, M., Rossi, G., Suardi, S., Mazzoleni, G., Merlin, M., Giovagnoli, A.R., Prioni, S., Erbetta, A., *et al.* (2009). A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* 323, 1473-1477.
- Dislich, B., and Lichtenthaler, S.F. (2012). The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol* 3, 8.
- Dislich, B., Wohlrab, F., Bachhuber, T., Mueller, S., Kuhn, P.H., Hogg, S., Meyer-Luehmann, M., and Lichtenthaler, S.F. (2015). Label-free quantitative proteomics of mouse cerebrospinal fluid detects BACE1 protease substrates in vivo. *Mol Cell Proteomics*.
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C.L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279, 18146-18156.
- Eehalt, R., Michel, B., De Pietri Tonelli, D., Zacchetti, D., Simons, K., and Keller, P. (2002). Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 30-37.
- Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., and Fahrenholz, F. (2005). Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J* 272, 5808-5820.
- Fagan, A.M., Watson, M., Parsadanian, M., Bales, K.R., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2002). Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 9, 305-318.
- Fleck, D., van Bebber, F., Colombo, A., Galante, C., Schwenk, B.M., Rabe, L., Hampel, H., Novak, B., Kremmer, E., Tahirovic, S., *et al.* (2013). Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling. *J Neurosci* 33, 7856-7869.
- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59, 1381-1389.

- Geldenhuys, W.J., and Darvesh, A.S. (2015). Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends. *Expert Rev Neurother* 15, 3-5.
- Gibson, T.J., Seiler, M., and Veitia, R.A. (2013). The transience of transient overexpression. *Nat Methods* 10, 715-721.
- Glenner, 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.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Gruninger-Leitch, F., Berndt, P., Langen, H., Nelboeck, P., and Dobeli, H. (2000). Identification of beta-secretase-like activity using a mass spectrometry-based assay system. *Nat Biotechnol* 18, 66-70.
- Gruninger-Leitch, F., Schlatter, D., Kung, E., Nelboeck, P., and Dobeli, H. (2002). Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem* 277, 4687-4693.
- Gu, L., and Guo, Z. (2013). Alzheimer's Abeta42 and Abeta40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem* 126, 305-311.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S., Younkin, S., *et al.* (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368, 117-127.
- Gustavsson, A., Brinck, P., Bergvall, N., Kolasa, K., Wimo, A., Winblad, B., and Jonsson, L. (2011). Predictors of costs of care in Alzheimer's disease: a multinational sample of 1222 patients. *Alzheimers Dement* 7, 318-327.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.
- Hallstrom, T.C., Mori, S., and Nevins, J.R. (2008). An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* 13, 11-22.
- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E.A., Fuller, J., Hui, J.O., Bennett, B.D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., *et al.* (2000). Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem* 275, 21099-21106.
- Harada, H., Tamaoka, A., Ishii, K., Shoji, S., Kametaka, S., Kametani, F., Saito, Y., and Murayama, S. (2006). Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Res* 54, 24-29.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.

- Hawkes, N. (2017). Merck ends trial of potential Alzheimer's drug verubecestat. *BMJ (Clinical research ed)* 356, j845.
- He, X., Chang, W.P., Koelsch, G., and Tang, J. (2002). Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS Lett* 524, 183-187.
- He, X., Li, F., Chang, W.P., and Tang, J. (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem* 280, 11696-11703.
- He, X., Zhu, G., Koelsch, G., Rodgers, K.K., Zhang, X.C., and Tang, J. (2003). Biochemical and structural characterization of the interaction of memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain with the VHS domain of GGA proteins. *Biochemistry* 42, 12174-12180.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol* 6, e257.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2009). Identification of beta-secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One* 4, e8477.
- Hermel, J.M., Dirkx, R., Jr., and Solimena, M. (1999). Post-translational modifications of ICA512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein of secretory granules. *Eur J Neurosci* 11, 2609-2620.
- Hoggl, S., Kuhn, P.H., Colombo, A., and Lichtenthaler, S.F. (2011). Determination of the proteolytic cleavage sites of the amyloid precursor-like protein 2 by the proteases ADAM10, BACE1 and gamma-secretase. *PLoS One* 6, e21337.
- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Evin, G. (2002). Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51, 783-786.
- Hudry, E., Dashkoff, J., Roe, A.D., Takeda, S., Koffie, R.M., Hashimoto, T., Scheel, M., Spires-Jones, T., Arbel-Ornath, M., Betensky, R., *et al.* (2013). Gene transfer of human Apoe isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain. *Science translational medicine* 5, 212ra161.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., *et al.* (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427.
- Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C.X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., *et al.* (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 198-210.
- Irizarry, M.C., Locascio, J.J., and Hyman, B.T. (2001). beta-site APP cleaving enzyme mRNA expression in APP transgenic mice: anatomical overlap with transgene expression and static levels with aging. *Am J Pathol* 158, 173-177.
- Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J.I., and Oka, Y. (1993). Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits

characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36, 1139-1145.

Iltner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., *et al.* (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387-397.

Ivankov, D.N., Bogatyreva, N.S., Honigschmid, P., Dislich, B., Hogg, S., Kuhn, P.H., Frishman, D., and Lichtenthaler, S.F. (2013). QARIP: a web server for quantitative proteomic analysis of regulated intramembrane proteolysis. *Nucleic Acids Res* 41, W459-464.

Jawhar, S., Wirths, O., and Bayer, T.A. (2011). Pyroglutamate amyloid-beta (A $\beta$ ): a hatchet man in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286, 38825-38832.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., *et al.* (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96-99.

Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., *et al.* (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368, 107-116.

Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., *et al.* (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 30, 4833-4844.

Kang, E.L., Cameron, A.N., Piazza, F., Walker, K.R., and Tesco, G. (2010). Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem* 285, 24108-24119.

Kawakami, T., Saeki, K., Takeyama, N., Wu, G., Sakudo, A., Matsumoto, Y., Hayashi, T., and Onodera, T. (2007). Detection of proteolytic cleavages of diabetes-associated protein IA-2 beta in the pancreas and the brain using novel anti-IA-2 beta monoclonal antibodies. *Int J Mol Med* 20, 177-185.

Kennedy, M.E., Stamford, A.W., Chen, X., Cox, K., Cumming, J.N., Dockendorf, M.F., Egan, M., Ereshefsky, L., Hodgson, R.A., Hyde, L.A., *et al.* (2016). The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS beta-amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Science translational medicine* 8, 363ra150.

Kim, S.M., Theilig, F., Qin, Y., Cai, T., Mizel, D., Faulhaber-Walter, R., Hirai, H., Bachmann, S., Briggs, J.P., Notkins, A.L., *et al.* (2009). Dense-core vesicle proteins IA-2 and IA-2 $\beta$  affect renin synthesis and secretion through the  $\beta$ -adrenergic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F382-389.

Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6382-6387.

- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13554-13559.
- Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J.M., Geuze, H.J., and Arvan, P. (1998). Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J Cell Biol* 141, 359-371.
- Knopman, D.S., Parisi, J.E., Salviati, A., Floriach-Robert, M., Boeve, B.F., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Dickson, D.W., Johnson, K.A., Petersen, L.E., *et al.* (2003). Neuropathology of cognitively normal elderly. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62, 1087-1095.
- Ko, M.H., and Puglielli, L. (2009). Two endoplasmic reticulum (ER)/ER Golgi intermediate compartment-based lysine acetyltransferases post-translationally regulate BACE1 levels. *J Biol Chem* 284, 2482-2492.
- Kubosaki, A., Nakamura, S., Clark, A., Morris, J.F., and Notkins, A.L. (2006). Disruption of the transmembrane dense core vesicle proteins IA-2 and IA-2beta causes female infertility. *Endocrinology* 147, 811-815.
- Kuhn, P.H., Colombo, A.V., Schusser, B., Dreymueller, D., Wetzel, S., Schepers, U., Herber, J., Ludwig, A., Kremmer, E., Montag, D., *et al.* (2016). Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. *Elife* 5.
- Kuhn, P.H., Koroniak, K., Hogl, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., *et al.* (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J* 31, 3157-3168.
- Kuhn, P.H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S.F. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem* 282, 11982-11995.
- Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020-3032.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahiri, D.K., Maloney, B., Long, J.M., and Greig, N.H. (2014). Lessons from a BACE1 inhibitor trial: off-site but not off base. *Alzheimers Dement* 10, S411-419.
- Laird, F.M., Cai, H., Savonenko, A.V., Farah, M.H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H.C., Xu, G., Koliatsos, V.E., *et al.* (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25, 11693-11709.

- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A.K., Lichtenthaler, S.F., and Haass, C. (2004). Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep* 5, 620-625.
- Lehtinen, M.K., Bjornsson, C.S., Dymecki, S.M., Gilbertson, R.J., Holtzman, D.M., and Monuki, E.S. (2013). The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *J Neurosci* 33, 17553-17559.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., *et al.* (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Li, Q., and Sudhof, T.C. (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem* 279, 10542-10550.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., *et al.* (2004). Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3632-3637.
- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278, 48713-48719.
- Lichtenthaler, S.F., Haass, C., and Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem* 117, 779-796.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456-1460.
- Lu, Y., Liu, W., and Wang, X. (2015). TREM2 variants and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci* 36, 1881-1888.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., *et al.* (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4, 231-232.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., and Plummer, T.H., Jr. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* 180, 195-204.
- May, P.C., Willis, B.A., Lowe, S.L., Dean, R.A., Monk, S.A., Cocke, P.J., Audia, J.E., Boggs, L.N., Borders, A.R., Brier, R.A., *et al.* (2015). The potent BACE1 inhibitor

- LY2886721 elicits robust central Abeta pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans. *J Neurosci* 35, 1199-1210.
- Mayeux, R., and Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2015). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Miller, S.F., Summerhurst, K., Runker, A.E., Kerjan, G., Friedel, R.H., Chedotal, A., Murphy, P., and Mitchell, K.J. (2007). Expression of Plxdc2/TEM7R in the developing nervous system of the mouse. *Gene Expr Patterns* 7, 635-644.
- Miller-Delaney, S.F., Lieberam, I., Murphy, P., and Mitchell, K.J. (2011). Plxdc2 is a mitogen for neural progenitors. *PLoS One* 6, e14565.
- Mould, A.P., Travis, M.A., Barton, S.J., Hamilton, J.A., Askari, J.A., Craig, S.E., Macdonald, P.R., Kammerer, R.A., Buckley, P.A., and Humphries, M.J. (2005). Evidence that monoclonal antibodies directed against the integrin beta subunit plexin/semaphorin/integrin domain stimulate function by inducing receptor extension. *J Biol Chem* 280, 4238-4246.
- Mowrer, K.R., and Wolfe, M.S. (2008). Promotion of BACE1 mRNA alternative splicing reduces amyloid beta-peptide production. *J Biol Chem* 283, 18694-18701.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-347.
- Mullard, A. (2017). BACE inhibitor bust in Alzheimer trial. *Nat Rev Drug Discov* 16, 155.
- Musiek, E.S., and Holtzman, D.M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci* 18, 800-806.
- Nishimura, T., Kubosaki, A., Ito, Y., and Notkins, A.L. (2009). Disturbances in the secretion of neurotransmitters in IA-2/IA-2beta null mice: changes in behavior, learning and lifespan. *Neuroscience* 159, 427-437.
- Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348, 1356-1364.
- Ohe, Y., Ohnishi, H., Okazawa, H., Tomizawa, K., Kobayashi, H., Okawa, K., and Matozaki, T. (2003). Characterization of nucleotide pyrophosphatase-5 as an oligomannosidic glycoprotein in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 719-725.
- Olson, M.I., and Shaw, C.M. (1969). Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* 92, 147-156.
- Pastorino, L., Ikin, A.F., Lampranou, S., Vacaressa, N., Revelli, J.P., Platt, K., Paganetti, P., Mathews, P.M., Harroch, S., and Buxbaum, J.D. (2004). BACE (beta-

secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol Cell Neurosci* 25, 642-649.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., *et al.* (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113, 1456-1464.

Prasher, V.P., Farrer, M.J., Kessling, A.M., Fisher, E.M., West, R.J., Barber, P.C., and Butler, A.C. (1998). Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol* 43, 380-383.

Price, J.L., and Morris, J.C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45, 358-368.

Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362, 329-344.

Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380-384.

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

Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.Q., *et al.* (2011). Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31, 700-711.

Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A., Vercelletto, M., *et al.* (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38, 24-26.

Sacks, C.A., Avorn, J., and Kesselheim, A.S. (2017). The Failure of Solanezumab - How the FDA Saved Taxpayers Billions. *N Engl J Med* 376, 1706-1708.

Saeki, K., Zhu, M., Kubosaki, A., Xie, J., Lan, M.S., and Notkins, A.L. (2002). Targeted disruption of the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alterations in glucose tolerance tests and insulin secretion. *Diabetes* 51, 1842-1850.

Saric, A., Brugge, L., Muller-Pompalla, D., Rysiok, T., Ousson, S., Permanne, B., Quattropiani, A., Busch, M., Beher, D., and Hussain, I. (2013). Development and characterization of a novel membrane assay for full-length BACE-1 at pH 6.0. *Journal of biomolecular screening* 18, 277-285.

Savonenko, A.V., Melnikova, T., Laird, F.M., Stewart, K.A., Price, D.L., and Wong, P.C. (2008). Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5585-5590.

- Schaller, S., Mauskopf, J., Kriza, C., Wahlster, P., and Kolominsky-Rabas, P.L. (2015). The main cost drivers in dementia: a systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry* 30, 111-129.
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E., *et al.* (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668-671.
- Schenone, M., Furie, B.C., and Furie, B. (2004). The blood coagulation cascade. *Current opinion in hematology* 11, 272-277.
- Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., *et al.* (2008). Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14, 1106-1111.
- Schmechel, A., Strauss, M., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Haass, C., Bayer, T.A., and Multhaup, G. (2004). Human BACE forms dimers and colocalizes with APP. *J Biol Chem* 279, 39710-39717.
- Schwarze, S.R., Fu, V.X., Desotelle, J.A., Kenowski, M.L., and Jarrard, D.F. (2005). The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* 7, 816-823.
- Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-498.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016a). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595-608.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016b). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* 8, 595-608.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., *et al.* (2016). The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537, 50-56.
- Shimizu, H., Tosaki, A., Kaneko, K., Hisano, T., Sakurai, T., and Nukina, N. (2008). Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production. *Mol Cell Biol* 28, 3663-3671.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., *et al.* (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sleegers, K., Brouwers, N., Gijssels, I., Theuns, J., Goossens, D., Wauters, J., Del-Favero, J., Cruts, M., van Duijn, C.M., and Van Broeckhoven, C. (2006). APP

duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 129, 2977-2983.

Smith, J.S., Angel, T.E., Chavkin, C., Orton, D.J., Moore, R.J., and Smith, R.D. (2014). Characterization of individual mouse cerebrospinal fluid proteomes. *Proteomics* 14, 1102-1106.

Smith, S.J., Tilly, H., Ward, J.H., Macarthur, D.C., Lowe, J., Coyle, B., and Grundy, R.G. (2012). CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol* 124, 99-110.

Solimena, M., Dirx, R., Jr., Hermel, J.M., Pleasic-Williams, S., Shapiro, J.A., Caron, L., and Rabin, D.U. (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J* 15, 2102-2114.

Sorokin, A.V., Nair, B.C., Wei, Y., Aziz, K.E., Evdokimova, V., Hung, M.C., and Chen, J. (2015). Aberrant Expression of proPTPRN2 in Cancer Cells Confers Resistance to Apoptosis. *Cancer Res* 75, 1846-1858.

Stachel, S.J., Coburn, C.A., Steele, T.G., Jones, K.G., Loutzenhiser, E.F., Grego, A.R., Rajapakse, H.A., Lai, M.T., Crouthamel, M.C., Xu, M., *et al.* (2004). Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem* 47, 6447-6450.

Stefan, C., Jansen, S., and Bollen, M. (2005). NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30, 542-550.

Stutzer, I., Selevsek, N., Esterhazy, D., Schmidt, A., Aebersold, R., and Stoffel, M. (2013). Systematic proteomic analysis identifies beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 288, 10536-10547.

Takeyama, N., Ano, Y., Wu, G., Kubota, N., Saeki, K., Sakudo, A., Momotani, E., Sugiura, K., Yukawa, M., and Onodera, T. (2009). Localization of insulinoma associated protein 2, IA-2 in mouse neuroendocrine tissues using two novel monoclonal antibodies. *Life Sci* 84, 678-687.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., *et al.* (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117, 246-257.

Tong, G., Castaneda, L., Wang, J.S., Sverdlov, O., Huang, S.P., Slemmon, R., Gu, H., Wong, O., Li, H., Berman, R.M., *et al.* (2012). Effects of single doses of avagacestat (BMS-708163) on cerebrospinal fluid Abeta levels in healthy young men. *Clin Drug Investig* 32, 761-769.

Torii, S. (2009). Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases. *Endocr J* 56, 639-648.

Torii, S., Saito, N., Kawano, A., Hou, N., Ueki, K., Kulkarni, R.N., and Takeuchi, T. (2009). Gene silencing of phogrin unveils its essential role in glucose-responsive pancreatic beta-cell growth. *Diabetes* 58, 682-692.

Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70, 1-32.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Vassar, R., Kuhn, P.H., Haass, C., Kennedy, M.E., Rajendran, L., Wong, P.C., and Lichtenthaler, S.F. (2014). Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J Neurochem* 130, 4-28.

Vemuri, P., Wiste, H.J., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Aisen, P.S., Weiner, M., Petersen, R.C., and Jack, C.R., Jr. (2010). Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 67, 308-316.

Verghese, P.B., Castellano, J.M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., Bu, G., Frieden, C., and Holtzman, D.M. (2013). ApoE influences amyloid-beta (A $\beta$ ) clearance despite minimal apoE/A $\beta$  association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1807-1816.

Verghese, P.B., Castellano, J.M., and Holtzman, D.M. (2011). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 10, 241-252.

Verheijen, J.H., Huisman, L.G., van Lent, N., Neumann, U., Paganetti, P., Hack, C.E., Bouwman, F., Lindeman, J., Bollen, E.L., and Hanemaaijer, R. (2006). Detection of a soluble form of BACE-1 in human cerebrospinal fluid by a sensitive activity assay. *Clin Chem* 52, 1168-1174.

Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoek, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., *et al.* (2013). Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357-367.

von Arnim, C.A., Spoelgen, R., Peltan, I.D., Deng, M., Courchesne, S., Koker, M., Matsui, T., Kowa, H., Lichtenthaler, S.F., Irizarry, M.C., *et al.* (2006). GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing. *J Neurosci* 26, 9913-9922.

von Arnim, C.A., Tangredi, M.M., Peltan, I.D., Lee, B.M., Irizarry, M.C., Kinoshita, A., and Hyman, B.T. (2004). Demonstration of BACE (beta-secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy. *Journal of cell science* 117, 5437-5445.

Vos, S.J., Xiong, C., Visser, P.J., Jasielec, M.S., Hassenstab, J., Grant, E.A., Cairns, N.J., Morris, J.C., Holtzman, D.M., and Fagan, A.M. (2013). Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol* 12, 957-965.

Wahle, T., Prager, K., Raffler, N., Haass, C., Famulok, M., and Walter, J. (2005). GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol Cell Neurosci* 29, 453-461.

- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172-1184.
- Wasmeier, C., Bright, N.A., and Hutton, J.C. (2002). The luminal domain of the integral membrane protein phogrin mediates targeting to secretory granules. *Traffic* 3, 654-665.
- Wasmeier, C., Burgos, P.V., Trudeau, T., Davidson, H.W., and Hutton, J.C. (2005). An extended tyrosine-targeting motif for endocytosis and recycling of the dense-core vesicle membrane protein phogrin. *Traffic* 6, 474-487.
- Wasmeier, C., and Hutton, J.C. (1996). Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 271, 18161-18170.
- Westmeyer, G.G., Willem, M., Lichtenthaler, S.F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., and Haass, C. (2004). Dimerization of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem* 279, 53205-53212.
- Willem, M. (2016). Proteolytic processing of Neuregulin-1. *Brain Res Bull* 126, 178-182.
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M.A., Ovsepian, S.V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L.D., Moore, S., Daria, A., *et al.* (2015). eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*.
- Wiseman, F.K., Al-Janabi, T., Hardy, J., Karmiloff-Smith, A., Nizetic, D., Tybulewicz, V.L., Fisher, E.M., and Strydom, A. (2015). A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nature reviews Neuroscience* 16, 564-574.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 280, 23009-23017.
- Yamakawa, H., Yagishita, S., Futai, E., and Ishiura, S. (2010). beta-Secretase inhibitor potency is decreased by aberrant beta-cleavage location of the "Swedish mutant" amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 285, 1634-1642.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., *et al.* (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.

- Yan, R., Fan, Q., Zhou, J., and Vassar, R. (2016). Inhibiting BACE1 to reverse synaptic dysfunctions in Alzheimer's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 65, 326-340.
- Yan, R., and Vassar, R. (2014). Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* 13, 319-329.
- Yanagida, K., Okochi, M., Tagami, S., Nakayama, T., Kodama, T.S., Nishitomi, K., Jiang, J., Mori, K., Tatsumi, S., Arai, T., *et al.* (2009). The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med* 1, 223-235.
- Yang, L.B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., *et al.* (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9, 3-4.
- Zang, Q., and Springer, T.A. (2001). Amino acid residues in the PSI domain and cysteine-rich repeats of the integrin beta2 subunit that restrain activation of the integrin alpha(X)beta(2). *J Biol Chem* 276, 6922-6929.
- Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., *et al.* (2007). Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 27, 3639-3649.
- Zhou, L., Barao, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijssen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaert, K., *et al.* (2012). The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *J Biol Chem* 287, 25927-25940.

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Felix Wieland Ricardo Wohlrab

Geboren am 24.06.1990

In Heidelberg

### **Schulische Bildung:**

1996-2000: Mönchhof-Grundschule Heidelberg

2000-2009: St.Raphael Gymnasium Heidelberg

### **Zivildienst:**

2009-2010: Universitätsklinikum Heidelberg, Pathologisches Institut

### **Studium:**

2010-2012: Studium der Humanmedizin, Vorklinik an der Ludwigs-Maximilians-Universität München

August 2012: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2012-2017: Studium der Humanmedizin, Klinischer Abschnitt an der Technischen Universität München, Universität Bern und University College London

2013-2016: Teilnahme am Promotionsprogramm Translationale Medizin der Technischen Universität München

Januar 2018: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt

### **Stipendien:**

2013-2016: Stipendium des Promotionsprogramms Translationale Medizin der Technischen Universität München

## 11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler für das Überlassen dieses interessanten Promotionsprojektes und die Möglichkeit in seinem exzellenten Labor lernen und arbeiten zu dürfen. Während meines Forschungsprojekts fühlte ich mich von ihm jederzeit sehr gut betreut und beraten. Er fand immer die richtigen Worte und konnte besonders in schwierigen Phasen des Promotionsvorhabens sehr gute Lösungsvorschläge geben. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Günter Höglinger und Herrn Prof. Dr. Achim Krüger dafür danken mein Promotionsprojekt mitbetreut zu haben und danke ihnen für ihre konstruktive Kritik und anregenden Vorschläge. Ich danke Herrn Prof. Dr. Dirk Busch, Frau Dr. Katrin Offe und Frau Dr. Heike Blaudzun für die Aufnahme in das Promotionsprogramm Translationale Medizin und die gute Unterstützung und Betreuung im Rahmen dessen.

Außerdem gilt mein Dank meinen Kollegen im Labor insbesondere für das Beibringen der verschiedenen Arbeitstechniken und die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Frau Katrin Moschke, Herrn Dr. Alessio Colombo, Herrn Dr. Peer-Hendrik Kuhn, Herrn Dr. Stephan Müller und Herrn Dr. Bastian Dislich.

Ich danke meinen Freunden und meiner Freundin, die während meines Promotionsprojekts immer für mich da waren.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre Hilfe das Medizinstudium ermöglichten und mich in meinem Promotionsprojekt stets unterstützten und förderten.

## 12. Schriftenverzeichnis

- Dislich, B., Wohlrab, F., Bachhuber, T., Mueller, S., Kuhn, P.H., Hogl, S., Meyer-Luehmann, M., and Lichtenthaler, S.F. (2015). **Label-free quantitative proteomics of mouse cerebrospinal fluid detects BACE1 protease substrates in vivo.** Mol Cell Proteomics.

## **13. Publikationen**

# Label-free Quantitative Proteomics of Mouse Cerebrospinal Fluid Detects $\beta$ -Site APP Cleaving Enzyme (BACE1) Protease Substrates In Vivo<sup>§</sup>

Bastian Dislich<sup>‡¶¶</sup>, Felix Wohlrab<sup>‡¶¶</sup>, Teresa Bachhuber<sup>¶</sup>, Stephan A. Müller<sup>‡§</sup>, Peer-Hendrik Kuhn<sup>§\*\*</sup>, Sebastian Höggl<sup>‡§</sup>, Melanie Meyer-Luehmann<sup>||</sup>, and Stefan F. Lichtenthaler<sup>‡§\*\*‡§§</sup>

Analysis of murine cerebrospinal fluid (CSF) by quantitative mass spectrometry is challenging because of low CSF volume, low total protein concentration, and the presence of highly abundant proteins such as albumin. We demonstrate that the CSF proteome of individual mice can be analyzed in a quantitative manner to a depth of several hundred proteins in a robust and simple workflow consisting of single ultra HPLC runs on a benchtop mass spectrometer. The workflow is validated by a comparative analysis of BACE1<sup>-/-</sup> and wild-type mice using label-free quantification. The protease BACE1 cleaves the amyloid precursor protein (APP) as well as several other substrates and is a major drug target in Alzheimer's disease. We identified a total of 715 proteins with at least 2 unique peptides and quantified 522 of those proteins in CSF from BACE1<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Several proteins, including the known BACE1 substrates APP, APLP1, CHL1 and contactin-2 showed lower abundance in the CSF of BACE1<sup>-/-</sup> mice, demonstrating that BACE1 substrate identification is possible from CSF. Additionally, ecto-

nucleotide pyrophosphatase 5 was identified as a novel BACE1 substrate and validated in cells using immunoblots and by an *in vitro* BACE1 protease assay. Likewise, receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 and plexin domain-containing 2 were confirmed as BACE1 substrates by *in vitro* assays. Taken together, our study shows the deepest characterization of the mouse CSF proteome to date and the first quantitative analysis of the CSF proteome of individual mice. The BACE1 substrates identified in CSF may serve as biomarkers to monitor BACE1 activity in Alzheimer patients treated with BACE inhibitors. *Molecular & Cellular Proteomics* 14: 10.1074/mcp.M114.041533, 2550–2563, 2015.

Cerebrospinal fluid (CSF)<sup>1</sup> consists of interstitial fluid that is in continuous exchange with the central nervous system and the peripheral blood system. It represents the only body fluid in humans that is in direct contact with brain tissue and accessible in a routine clinical setting. Thus, the easy accessibility from the periphery renders CSF perfectly suited to study pathologic neurological processes (1). Human CSF has a relatively low protein content (~ 0.4 mg/ml), but features a highly diverse proteome. It is thus increasingly studied by modern mass spectrometry based proteomics (2). The proteomic analysis of human CSF typically involves various protein concentration and fractionation steps as well as the depletion of highly abundant proteins, such as serum albumin. This allows the identification of several hundred up to 2600 proteins from several milliliters of human CSF (3).

Mice are the most popular animal model in preclinical research, because of their similarity to humans in genetics and physiology, their unlimited supply and their ease of genetic engineering. The study of their CSF can provide valuable insights into disease mechanisms and biomarker discovery

From the ‡German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany; §Neuroproteomics, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany; ¶Adolf Butenandt Institute, Ludwig-Maximilians University, Munich Biochemistry, Munich Germany; ||Neurocenter, Department of Neurology, University of Freiburg, Freiburg, Germany, \*\*Institute for Advanced Study, Technische Universität München, Garching, Germany; ‡‡Munich Center for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany

Received May 29, 2015, and in revised form, June 17, 2015  
 Published, MCP Papers in Press, July 2, 2015, DOI 10.1074/mcp.M114.041533

Author Contributions: The manuscript was written by Bastian Dislich and Stefan F. Lichtenthaler. The study was guided and planned by Bastian Dislich, Sebastian Höggl, Melanie Meyer-Luehmann and Stefan F. Lichtenthaler. Bastian Dislich established the mass spectrometry of murine CSF and performed the proteomic analysis of the BACE1<sup>-/-</sup> CSF. Felix Wohlrab performed all other experiments, except for the CSF extraction, which was performed by Teresa Bachhuber, and the analysis of human CSF, which was carried out by Stephan Müller. Peer-Hendrik Kuhn developed the expression vectors/plasmids that were used in this study. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: CSF, cerebrospinal fluid; APP, amyloid precursor protein; BACE1,  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1; FASP, filter aided sample preparation; FDR, false discovery rate; iBAQ, intensity based absolute quantification; LFQ, label-free quantification.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

and may allow the rapid translation of preclinical findings into human patients. However, the proteomic study of murine CSF has been limited because of several shortcomings. The low total CSF volume of  $\sim 30 \mu\text{l}$  and an average yield of only  $\sim 10 \mu\text{l}$  blood-free CSF pose a challenge for various protein concentration and depletion steps that are routinely applied to human CSF, where the sample volume is up to 1,000-fold more (4, 5). One study reported the identification of 289 proteins and the quantification of 103 proteins using pooled immunodepleted CSF from 10–12 mice per sample (6). A second study reported the identification of 566 proteins in murine CSF of individual mice, relying on time consuming fractionation by two dimensional liquid chromatography tandem MS (2D-LC-MS/MS) (7).

Here we show that label-free quantitative proteomics in murine CSF can be achieved in unprecedented depth in individual animals using single ultra HPLC runs on the benchtop Q Exactive mass spectrometer. We demonstrate the feasibility of our approach by comparing the CSF of BACE1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein (APP) cleaving enzyme 1)  $-/-$  mice with their wild-type littermates.

BACE1 is a membrane bound aspartyl protease that is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. It is the rate-limiting enzyme in a proteolytic cascade leading to the liberation of the neurotoxic  $A\beta$  peptide from the much larger amyloid precursor protein (APP) into the extracellular space (8, 9). Inhibition of BACE1 abolishes  $A\beta$  generation, rendering BACE1 a prime drug target for the therapy of Alzheimer's disease (10). Besides APP, BACE1 processes numerous other substrates *in vivo* and *in vitro*, which raises concerns about mechanism based side effects on the therapeutic inhibition of this protease (11). Although BACE1 expression levels are the highest in the brain, it is currently unknown whether BACE1 substrate levels besides APP can be monitored in the CSF as a read-out of BACE1 activity. This would be desirable, as it would allow the longitudinal monitoring of BACE1 substrate levels on therapeutic inhibition of BACE1 in humans and thus an effective screening for possible adverse effects.

Our approach allows the accurate identification and quantification of several hundred proteins in as little as  $2 \mu\text{l}$  of murine CSF in  $\sim 4.5$  h per sample, at a much greater speed and proteomic depth than in previous studies, despite using lower sample amounts (6, 7). Overall, 715 proteins were identified with at least two unique peptides and 522 proteins were quantified in at least three biological replicates of both BACE1  $-/-$  and wild-type mice. We provide evidence that BACE1 activity is reflected in the composition of the CSF, as the secreted ectodomains of well-known BACE1 substrates were reduced in BACE1  $-/-$  animals. In addition, we identified and validated a previously unknown BACE1 substrate candidate and confirmed two recently described novel BACE1 substrates. The three proteins may represent novel prognostic or diagnostic biomarkers and may aid in the development of APP-specific BACE1 inhibitors.

**Materials**—The following antibodies were used: pAb APLP1 antibody (Proteintech, Chicago, IL; 12305–2-AP), pAb APLP2 antibody (Calbiochem; 171617), mouse mAb HA.11 (Covance, Emeryville, CA), rat mAb HA 3F10 (Roche, Rotkreutz, Switzerland), mouse mAb FLAG M2 (Sigma, St. Louis, MO), mouse mAb 3D5 (specific for BACE1, kind gift of R. Vassar)(12), rabbit pAb calnexin (Stressgen, Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany), HRP- coupled anti-rabbit and anti-mouse antibody (DAKO, Glostrup, Denmark), HRP coupled anti- rat antibody (Santa Cruz, Dallas, TX). The following reagents were used: Acetonitrile, water, formic acid (all LC-MS/MS grade), dithiothreitol and iodoacetamide were purchased from Sigma-Aldrich. BACE Inhibitor C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem)(13), Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

**Mouse Strains**—BACE1  $-/-$  mice that are commercially available from the Jackson Laboratory ([www.jax.org](http://www.jax.org), strain B6.129-Bace1tm1Pcw/J) were maintained according to the European community council directive (86/609/ECC). Wild-type and BACE1  $-/-$  mice were both on a C57BL/6 background and obtained from BACE1  $\pm$  x BACE1  $\pm$  matings. Animals were kept under a 12/12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. All animal procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and with an animal protocol approved by the Ludwigs-Maximilians-University Munich and the government of Upper Bavaria.

**Immunoblots**—For the analysis of murine CSF,  $7 \mu\text{l}$  of CSF plus  $2.3 \mu\text{l}$  of 4x Laemmli buffer per sample were incubated at  $95^\circ\text{C}$  for 5 min and loaded on 8% acrylamide gels for immunoblot analysis and detection of APLP1 and APLP2. PVDF membranes (Millipore) were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Blots were developed using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and the ECL chemiluminescence system (Millipore). Immunoblots were quantified using the LAS-4000 Fujifilm chemiluminescence camera and software (Fuji Film, Inc.) and quantification was based on three independent replicates. For analysis of HEK293T cell lysates and conditioned media, samples were boiled in reducing Laemmli buffer for 5 min at  $95^\circ\text{C}$  and subsequently applied to 8% SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis. Nitrocellulose membranes pore size  $0.45 \mu\text{m}$  were used for transfer, emulsified nonfat dry milk for blocking. Primary antibodies were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The full-length proteins were detected with HA.11 antibody and FLAG M2 antibody. The soluble proteins were detected with HA 3F10 antibody. Blots were developed and quantified as described above for the CSF samples. Full-length and soluble protein levels were normalized to the protein levels of calnexin, which was used as a loading control. Six independent experiments were included for the statistical analysis, applying a one-way ANOVA test.

**CSF Collection From Adult Mice**—The CSF was isolated from the cisterna magna of 4 month old animals according to the protocol from DeMattos *et al.* (4). Mice were anesthetized via intraperitoneal injection of a mixture containing ketamine (Bayer, 100 mg/kg body weight) and Rompun (Ratiopharm, 10 mg/kg body weight). A dorsal excision along the base of the skull to the dorsal thorax up to Th1 was made. The musculature was displaced and the meninges on top of the cisterna magna were exposed. The area was cleaned using cotton swabs. The cisterna magna was punctuated and the CSF collected using glass micropipettes (Stoelting, Wood Dale, IL, #50614). CSF samples were subjected to centrifugation on a benchtop centrifuge and visually inspected for the presence of blood in the form of pelleted residual erythrocytes. A total of  $5\text{--}20 \mu\text{l}$  of blood-free CSF was collected from each animal and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The animals were sacrificed afterward. Samples affected by visible blood contamination were excluded from the analysis. Overall, five BACE1  $-/-$  and eight wild-type mice (males and females) were used for the analysis.

**Human CSF Samples**—Human CSF samples were provided by the Karolinska University Hospital & Institute, Dept. of Clinical Neuroscience, Neuroimmunology Unit. The ethical review board of the Karolinska Institute approved the study (Diary Number: 2009/2107–31-2) and written informed consent was obtained from all patients. Six human CSF samples of patients with minor symptoms were chosen for the analysis.

**In-solution Digestion and Peptide Purification**—The in-solution digestion was performed according to Olsen *et al.* (14). All steps were performed at room temperature. Briefly, 5  $\mu$ l of CSF were solubilized in denaturation buffer (6 M urea (Sigma, U5128) in 10 mM HEPES pH 8.0, sample to buffer ratio 1:10) in low protein binding tubes (Eppendorf). 1  $\mu$ l of reduction buffer (10 mM dithiothreitol in 0.05 M ammonium bicarbonate) was added for 10  $\mu$ l of digestion buffer, followed by incubation for 30 min. Then, 1  $\mu$ l of iodoacetamide solution for 10  $\mu$ l of digestion buffer was added, followed by incubation for 20 min. 0.5  $\mu$ g Lys-C solution (Promega, Life Technologies, Darmstadt, Germany) was added and incubated for 4 h. The sample was diluted 4-fold with 50 mM ammonium bicarbonate, 0.4  $\mu$ g trypsin (Promega, Life Technologies, Darmstadt, Germany) was added and incubated for 16 h. The digestion reaction was stopped using 1  $\mu$ l of 100% trifluoroacetic acid. Homemade C18 STAGE Tips were used for purification of the in-solution digested samples. Cleanup was done according to Rappsilber *et al.* (15). The eluted peptides from one digestion reaction (5  $\mu$ l of CSF) were split into two aliquots and processed on individual STAGE Tips, each representing one technical replicate. Peptides were eluted in 60% acetonitrile, dried by speed-vac, resuspended in 10  $\mu$ l 0.1% trifluoroacetic acid in water and loaded onto the autosampler. 8  $\mu$ l of the peptide solution was injected per run. Thus, each technical replicate contained the peptides of 2  $\mu$ l of digested CSF.

**Comparison of In-solution Digestion and Filter Aided Sample Preparation (FASP)**—Pooled human CSF from six individuals was used to test the efficiency and reproducibility of in-solution digestion and FASP. Three replicates, 5  $\mu$ l human CSF each, was digested with the in-solution digestion protocol described above and with FASP according to Wisniewski *et al.* (16). A double digestion with 0.1  $\mu$ g LysC and 0.1  $\mu$ g trypsin was performed.

**Mass Spectrometry**—Samples were analyzed by LC-MS/MS, coupling an Easy nLC1000 nanoflow HPLC system to the Q Exactive benchtop mass spectrometer (both Thermo Fisher Scientific). A two-column setup was used. The pre-column (Acclaim Pep Map 100, 75  $\mu$ m  $\times$  2 cm, nano Viper C18, 3  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific), waste line and the analytical column (Pep Map RSLC, C18, 2  $\mu$ m, 75  $\mu$ m  $\times$  50 cm, Thermo Fisher Scientific) were interconnected using a three way tee connector. Peptides were eluted in a trilinear gradient at 50  $^{\circ}$ C at a maximum pressure of 800 bar. The aqueous solvent (solvent A) consisted of HPLC grade 0.1% formic acid in water, whereas the organic solvent was pure HPLC grade acetonitrile (solvent B) (both Sigma). The column was equilibrated with at least 10 column volumes of solvent A, followed by loading of the sample at maximum pressure of 800 bar (in solvent A). The trilinear gradient consisted of the following linear increases in solvent B: 5–25% 175 min, 25–35% 45 min, 35–60% 20 min. The layout of the gradient was provided by Nagarjuna Nagaraj (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany). At the end of the gradient, the column was washed with at least 10 column volumes of 95% solvent B in order to avoid sample carryover. The analysis of BACE1<sup>-/-</sup> and wild-type samples was alternated.

Online electrospray of the eluting peptides into the Q Exactive mass spectrometer was achieved with the Easy Spray ion source (Thermo Fisher Scientific). Full MS spectra were recorded at a resolution of 70,000 over a mass range between *m/z* 400–1800. The automatic gain control target was set to  $3 \times 10^6$  and a maximum

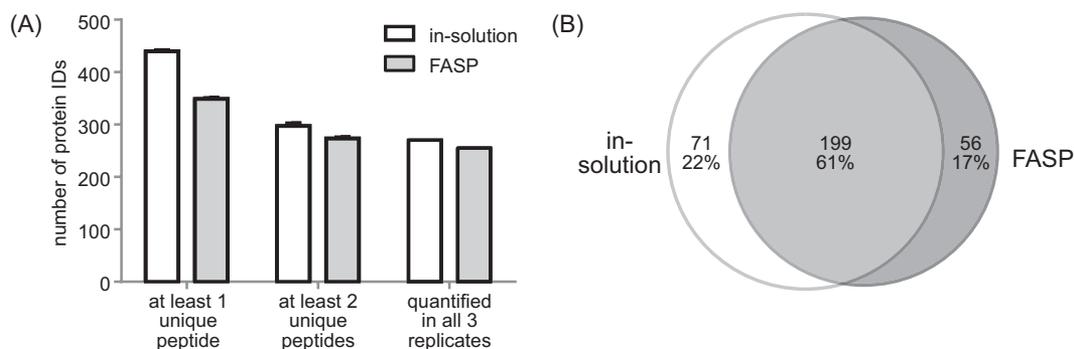
injection time of 50 ms was allowed. The 10 most intense peptide ions were chosen for fragmentation. The MS/MS spectra were recorded at a resolution of 17,500 with the automatic gain control target set to 100,000 and a maximum injection time of 50 ms. A mass window of 2.0 *m/z* was applied to precursor selection. Normalized collisional energy for the higher-energy collision-induced dissociation fragmentation was set to 25%. A dynamic exclusion with a time window of 40 s was applied. Singly charged molecules were not selected for fragmentation and the monoisotopic precursor selection was enabled. The underfill ratio (minimum percentage of the estimated target value at maximum fill time) was set to 0.1%.

**Data Analysis**—Overall, 26 LC-MS/MS files (five BACE1<sup>-/-</sup> and eight wild-type CSF samples with two technical replicates each) were subjected to data analysis using the MaxQuant software environment (version 1.3.0.5). The implemented Andromeda search engine was used for matching the peak lists against a concatenated forward and reverse database including the complete UniProt-SwissProt mouse database (release 2012–08, with a total of 59345 database entries) and the standard MaxQuant contaminant database. The following settings were chosen for the MaxQuant software environment: Oxidation of methionines and N-terminal acetylation were set as variable modifications. Mass deviation was set to 20 ppm for the first and 6 ppm for the main search. The maximum number of peptide modifications was set to 5, the maximum number of missed cleavages was set to 2. Peptide and site false discovery rate (FDR) were set to 0.01. The search for co-fragmented peptides in the MS/MS spectra was enabled (“second peptides” option). Quantification was achieved using the LFQ (Label-Free Quantification) and iBAQ (intensity Based Absolute Quantification) algorithms (17, 18). Razor and unique peptides were used for LFQ quantification. Reproducibility of retention times was checked manually. According to this inspection the match between runs option was enabled, allowing a time window of 2 min to search for already identified peptides in all obtained chromatograms. Human CSF samples were searched with the same settings against a human database including all known isoforms from UniProt (reference database, release 2014–04–14).

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the data set identifier PXD001514 (19). Annotated MS/MS spectra are available at the UCSF MS-Viewer (20) (<http://prospector2.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msviewer>) under following search key: “sxmp8fxdhm.”

Statistical evaluation of the data was performed with the freely available Perseus statistics software (version 1.2.0.17) and Microsoft Excel. Common contaminants and reverse decoy matches were removed from the protein identification list. At least 2 unique peptides per protein were required for a protein identification. Only proteins that were identified and quantifiable in at least one technical of at least three biological replicates in each group were used for relative quantification. The arithmetic mean was used to obtain the average LFQ intensity within each biological group. For statistical evaluation a two-sided *t* test was used. The *p* value was corrected using false discovery rate (FDR) based multiple hypothesis testing. Both *t* test and FDR based multiple hypothesis testing were carried out with the default settings of the Perseus statistics software.

**Plasmids** pcDNA3.1-CD5-SLIC-FLAG was generated by exchanging RHA-MBP (EcoRV/Not1) of pcDNA3.1-CD5-SLIC-MBP for the PCR product RHA-FLAG amplified with CMV-F and RHA FLAG Not1 rev RHA FLAG Not1 C-terminal from pcDNA3.1-CD5-SLIC-MBP. Subsequently, pcDNA3.1-CD5-HA-SLIC-FLAG was generated by exchanging CD5-LHA in between (HindIII/EcoRV) of pcDNA3.1-CD5-SLIC-FLAG for 5'UTR-CD5-HA-SLIC generated with CMV-F and CD5-HA-LHA rev from pcDNA3.1-HA-IL1R2-FLAG template (21). pcDNA3.1-CD5-HA-SLIC-FLAG-ENPP5, pcDNA3.1-CD5-



**FIG. 1. Comparison of in-solution digestion with FASP.** *A*, Comparison of identified and quantified proteins in human CSF. Identifications with one or two unique peptides are shown as average values of three replicates with standard deviation error bars. The third comparison shows proteins that were quantified in three out of three replicates. *B*, Comparison of the overlap of quantified proteins in all replicates. 61% of the proteins were quantified with both methods, whereas 22 and 17% were only quantified by in-solution digestion or FASP, respectively.

HA-SLIC-FLAG-PTPRN2 and pcDNA3.1-HA-CD5-SLIC-FLAG-PLXDC2 were generated by cloning PCR products of murine ENPP5, PTPRN2, and PLXDC2 lacking the respective signal peptide and containing the left homology arm (LHA) and the right homology arm (RHA) into EcoRV linearized pcDNA3.1-CD5-HA-SLIC-FLAG vector via Gibson assembly. The resulting plasmids are coding for respectively PLXDC2, PTPRN2 and ENPP5 with an HA epitope tag (YPYD-VPDYA) at the N terminus and a FLAG (DYKDDDDK) epitope tag at the C terminus. The generation of peak12-BACE1 and peak12-control vectors has been described (22).

**Cell Culture, Transfections, Treatments**—Human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS/Gibco) and 1% Penicillin/Streptomycin (P/S). Transfections of HEK293T cells were done with Lipofectamine 2000. Selection was achieved with Zeocin (Invitrogen) at a concentration of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 2 days after transient BACE1 transfection the medium was replaced with either BACE1 inhibitor C3 (2  $\mu\text{M}$ ) containing selection medium or DMSO containing selection medium as a control. After 48 h of treatment, conditioned media and cell lysates (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, protease inhibitor mixture from Roche) were collected. Protein measurement assay was performed and volumes for immunoprecipitation and immunoblotting were calculated accordingly. To enrich the secreted ectodomains from the supernatants immunoprecipitation using HA.7 agarose (Sigma) was performed overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ .

**BACE1 In Vitro Assay**—Recombinant proteins HA-PLXDC2-FLAG, HA-PTPRN2-FLAG, and HA-ENPP5-FLAG were purified from cell lysates of stably expressing HEK293T cells using anti-HA-agarose (Sigma). Proteins were eluted by adding 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  HPLC purified HA peptide (Sigma). The eluted proteins were incubated with recombinant mouse BACE1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) in 50 mM  $\text{Na}^+$  acetate buffer pH 4.4 from 4 to 16 h as described (22). The samples were boiled in reducing Laemmli buffer and applied to Western blot analysis as described above.

## RESULTS

For the quantitative proteomic analysis of murine CSF from adult mice, we first evaluated the performance of in-solution digestion *versus* FASP (16, 23). Given that the amount of blood-free CSF ranged between 10–15  $\mu\text{l}$  per mouse, we used human CSF for the initial comparison of in-solution digestion and FASP. Human CSF has a similar protein concentration as murine CSF, but is available in milliliter quanti-

ties. Five  $\mu\text{l}$  each of a pooled human CSF sample were used in three replicates for in-solution digestion and FASP. Results were analyzed independently with MaxQuant. In-solution digestion gave slightly better results than FASP regarding the number of identified and quantified proteins (Fig. 1A). On average, 297 and 273 proteins were identified by at least two unique peptides with in-solution digestion and FASP, respectively. The number of quantified proteins in three out of three replicates was 270 for in-solution digestion and 255 for FASP. The Venn diagram (Fig. 1B) shows that FASP is rather complementary to in-solution digestion as the overlap of quantified proteins was only 61%. We also tested the reproducibility of protein quantification using the LFQ intensity values. Both methods performed equally well with an average correlation coefficient  $R$  better than 0.99 for log10 transformed LFQ intensities.

For the quantitative analysis of adult mouse CSF, we chose in-solution digestion because it is less time consuming and gave slightly better results compared with FASP. Five four month old BACE1 $^{-/-}$  mice and eight four month old wild-type mice were analyzed. Five  $\mu\text{l}$  CSF of each mouse was used for LC-MS/MS analysis. The resulting peptides were split into 2 aliquots, representing one technical replicate each, and were analyzed by LC-MS/MS. Subsequent protein identification and label-free quantification of the raw data was performed in the MaxQuant software environment (Fig. 2).

Chromatographic conditions between the different runs were highly reproducible, resulting in a high degree of correlation of label-free quantification (LFQ) intensities between technical and biological replicates (Fig. 3A, supplemental Tables S1, S2). Overall, 817 proteins were identified at a false discovery rate of under 1% at the peptide and protein level. 715 proteins were identified with at least 2 unique peptides (Fig. 3B and supplemental Table S1). Five hundred twenty-two of those proteins were quantifiable in at least three BACE1 $^{-/-}$  and at least three wild-type mice. Thus, our method allows the accurate identification and quantification of more than 500 proteins in the CSF of individual mice (Fig. 3B). The majority of

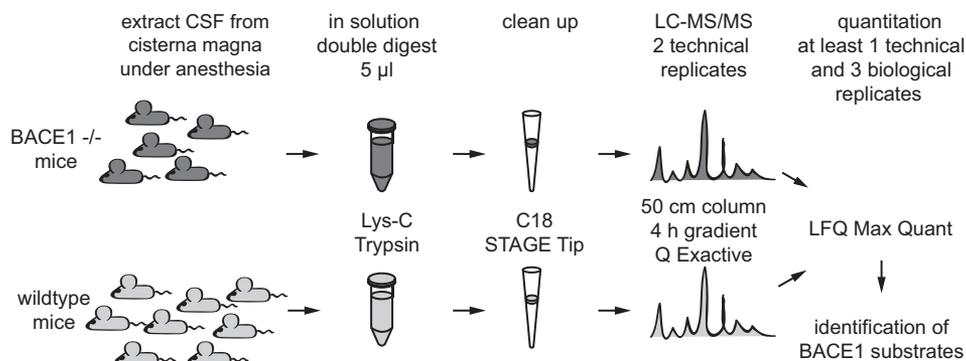


FIG. 2. **Workflow for the analysis of individual BACE1<sup>-/-</sup> and wild-type CSF proteomes.** The CSF of BACE1<sup>-/-</sup> mice and wild-type littermates was obtained from the cisterna magna. CSF was digested with Lys-C and trypsin in-solution. Peptides were collected and purified on C18 STAGE Tips. Samples were measured on a 50 cm column using 4 h gradients in two technical replicates on the Q Exactive mass spectrometer, followed by label-free analysis using the MaxQuant algorithm.

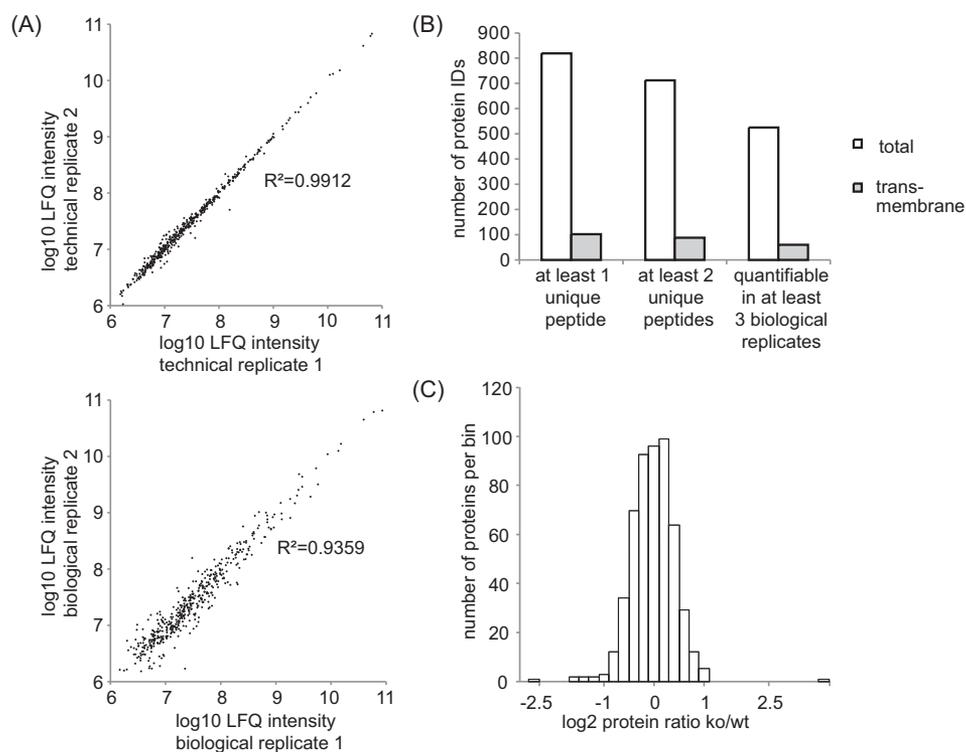
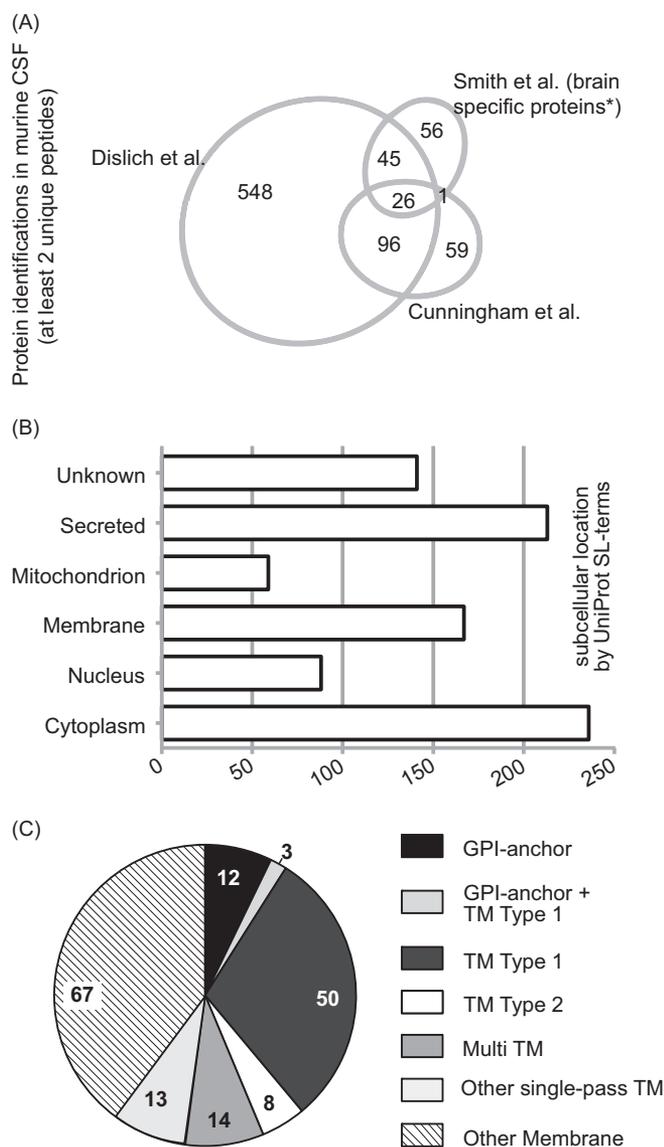


FIG. 3. **Quality control of the label-free comparative CSF analysis of BACE1<sup>-/-</sup> mice.** A, Upper panel: The log<sub>10</sub> LFQ intensities of two selected technical replicates are plotted against each other. Lower panel: The log<sub>10</sub> LFQ intensities of two selected biological replicates (two individual BACE1<sup>-/-</sup> mice) are plotted against each other. Note the high correlation for both biological and technical replicates as indicated by the coefficient of determination being close to 1. B, Number of identified proteins that were detected by at least 1 unique peptide, at least 2 unique peptides and at least 2 unique peptides that were quantifiable in 3 or more biological replicates. LFQ: label-free quantification. ID: protein identification. C, Histogram displaying the relative protein abundances in the BACE1<sup>-/-</sup> CSF. The log<sub>2</sub> fold change of the mean BACE1<sup>-/-</sup> : wild-type ratio is shown on the x axis. The bin size for the log<sub>2</sub> fold change is 0.2. The vast majority of all quantified proteins remained unchanged. Ko: BACE1<sup>-/-</sup>. Wt: wild type.

proteins quantified in the CSF did not show a gross change in their relative abundance between BACE1<sup>-/-</sup> and wild-type mice (Fig. 3C). The difference in protein levels was less than twofold for 95% of all quantified proteins and the majority of them clustered around zero (changes in the protein levels is expressed as the log<sub>2</sub> fold ratio of BACE1<sup>-/-</sup> over wild-type samples, Fig. 3C). Therefore, the absence of BACE1 does not

lead to major changes in the composition of murine CSF, which is an important finding for the BACE-inhibitors currently under development as a therapeutic approach for Alzheimer's disease.

The usage of in-solution digestion with a long gradient for LC separation of peptides was superior compared with previous mouse CSF studies and identified more than 2.5 times

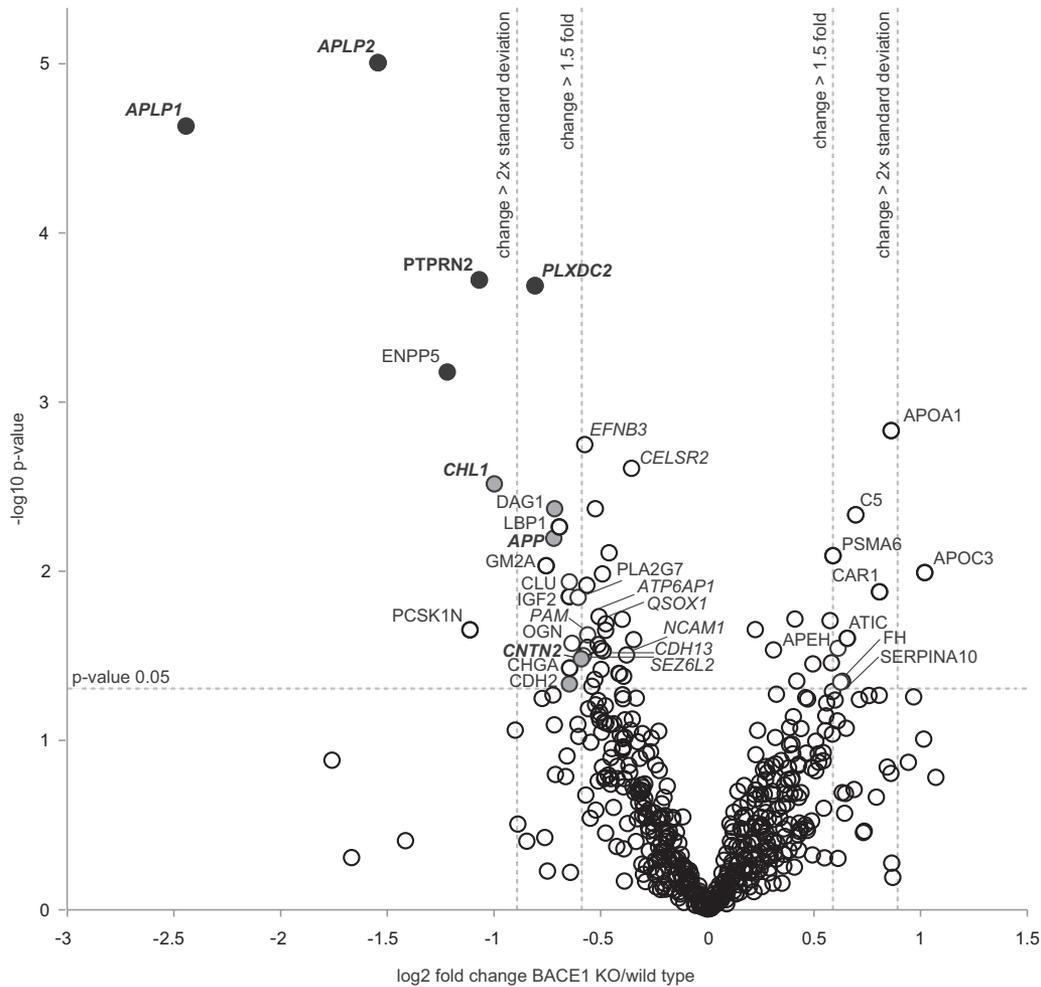


**FIG. 4. Comparison and distribution of protein identifications with at least 2 unique peptides.** A, An area-proportional Venn diagram displays the number of protein identifications of our and two recent murine CSF analyses (6, 7). \* Smith *et al.* identified a total of 261 proteins with at least two unique peptides. One hundred twenty-eight of them were previously found in mouse brain. Only those proteins were used for this Venn diagram, as the other non brain-specific proteins were not supplied in the supplementary table of their manuscript. B, UniProt Keyword subcellular location analysis for cellular components of proteins identified by at least two unique peptides. C, Subanalysis of annotated membrane proteins to GPI-anchored, or transmembrane (TM) type 1 or 2 and multipass according to UniProt subcellular location.

as many proteins as in previous studies (6, 7) (Fig. 4A), thus providing the most comprehensive list of the murine CSF proteome to date. Our data was analyzed according to UniProt subcellular location terms. Among the 715 identified proteins, 213 (33%) are annotated as secreted and 236 (33%) as cytoplasmic proteins (Fig. 4B), whereas a smaller number

are annotated as nuclear (88; 12%) or mitochondrial (59; 6%) proteins. A similar percentage of nuclear (10%) and mitochondrial (2%) proteins has been detected in human CSF and may be partially explained by exosomal secretion, apoptosis of ependymal cells or contamination during CSF extraction (3). One hundred sixty-seven proteins were annotated as membrane proteins (Fig. 4C), with 100 of them being integral membrane proteins (either transmembrane or GPI-anchored). Integral membrane proteins may not only be released as intact membrane proteins by one of the mechanisms above, but alternatively may undergo ectodomain shedding, which is a general physiological process, in which the ectodomain of membrane proteins is proteolytically released from cells for the purpose of cell-cell communication (24). To test this possibility, we analyzed the identified peptides from all 100 integral membrane proteins with our recently developed QARIP (Quantitative Analysis of Regulated Intramembrane Proteolysis) web server (25). QARIP maps all identified peptides of an intrinsic membrane protein to its intracellular-, extracellular- or transmembrane domains. For the majority of proteins annotated as transmembrane or GPI anchored by UniProt (87 out of 100) the peptides mapped exclusively to the extracellular domains (supplemental Table S3–S5). As the majority of proteins feature large extracellular domains and rather small intracellular domains, the discovery of ectodomain derived peptides is statistically more likely. However, also for proteins such as PTPRN2 or NCAM1, where the intracellular domain makes up 39 and 35% of the entire protein (supplemental Table S3), only ectodomain-derived peptides were identified, speaking against a statistical effect. In conclusion, our data suggests that the presence of integral or GPI-anchored protein fragments in the CSF is dependent on proteolytic shedding and not simply because of the release of full-length proteins.

One of the proteases contributing to the ectodomain shedding of transmembrane proteins is BACE1. The BACE1 active-site resides on the extracellular part of the protease, which results in the proteolytic release (shedding) of the substrate ectodomain into the extracellular compartment (11, 24). We therefore assumed that membrane protein ectodomains that are released into the CSF by BACE1 should be less abundant in the CSF of BACE1<sup>-/-</sup> mice and that these differences should be quantifiable. Fig. 5 shows a volcano plot with the mean fold change of all biological replicates (expressed as the log<sub>2</sub> fold change of the BACE1<sup>-/-</sup> : wild-type ratio) plotted against their corresponding *p* values. Fifty-eight proteins had a *p* value ≤ 0.05 and are above the horizontal line. This included 42 proteins with reduced protein levels and 16 proteins with increased levels in the BACE1<sup>-/-</sup> CSF. Proteins with increased levels include several lipoproteins, such as ApoA1 and ApoC3, which may indicate a role of BACE1 activity in lipid metabolism. However, given that they are soluble proteins and that their levels are increased in BACE1<sup>-/-</sup> CSF, they are unlikely to be direct BACE1 sub-



**Fig. 5. Identification and validation of putative BACE1 substrates in mouse CSF.** Each circle represents a protein that was quantifiable in at least three biological replicates. The  $\log_2$  fold change of the mean BACE1<sup>-/-</sup> : wild-type ratio is plotted against the  $-\log_{10}$  of the  $p$  value. The vertical bars mark a fold change of at least 1.5 and greater than the twofold standard deviation (corresponding to a reduction of 1.86-fold). The horizontal bar shows the cutoff for statistical significance ( $p$  value 0.05 or below). Proteins above this line have a  $p$  value  $< 0.05$ . Proteins shown as black and gray filled circles are regarded putative BACE1 substrates, as they are decreased in the absence of BACE1 and are annotated as membrane proteins. Gene names in “bold” mark previously known BACE1 substrates. The circle filled in black indicates that this protein remains significantly changed after a false discovery rate based multiple hypothesis testing. Gene names in regular font show proteins that are significantly decreased or up-regulated in the CSF of BACE1<sup>-/-</sup> mice by at least 1.5-fold. Gene names in “italic” show integral or GPI-anchored membrane proteins that are significantly decreased in the CSF of BACE1<sup>-/-</sup> mice, but show a fold change below 1.5. One non-significant outlier is not shown in Fig. 3 in order to save space for visualizing the data (UniProt ID P05063; -3.39, 0.71).

strates. Only membrane proteins that show reduced levels of their ectodomains in the CSF of BACE1<sup>-/-</sup> compared with wild-type mice are considered possible BACE1 substrates. Altogether, 100 transmembrane or GPI-anchored proteins were identified in the entire data set (Fig. 4C). Eighteen of them are among the 42 significantly reduced proteins in the BACE1<sup>-/-</sup> CSF and thus may be candidate BACE1 substrates (Table I). All 168 peptides detected from these proteins strictly mapped to their extracellular domains (Table I), which indicates that their release is because of ectodomain shedding (e.g. by BACE1) and not because of the release of the full-length transmembrane proteins. 10 of the 18 membrane proteins showed a significant ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) reduction in CSF of more than 1.5-fold (APLP1, APLP2, ENPP5, PTPRN2,

CHL1, PLXDC2, APP, DAG1, CDH2, CNTN2), with five of them (APLP1, APLP2, ENPP5, PTPRN2, CHL1) being reduced by even more than twofold (Fig. 5). Ten of the 18 proteins represent previously identified BACE1 substrates or substrate candidates (APP, APLP1, APLP2, CHL1, CNTN2, NCAM1, PLXDC2, PAM, PTPRN2, Sez6L2) (26–30). CELSR2 represents a G-protein coupled receptor with seven transmembrane domains, featuring a topology that is rather unusual for a BACE1 substrate. However, a previous study identified several G-protein coupled receptors (Letrophilin 1–3) as putative BACE1 substrates in primary cortical neurons (27). The additional membrane proteins (ENPP5, DAG1, CDH2, EFNB3, ATP6AP1, CDH13, and QSOX1) may be novel BACE1 substrate candidates. Among the 18 membrane proteins, the well-known

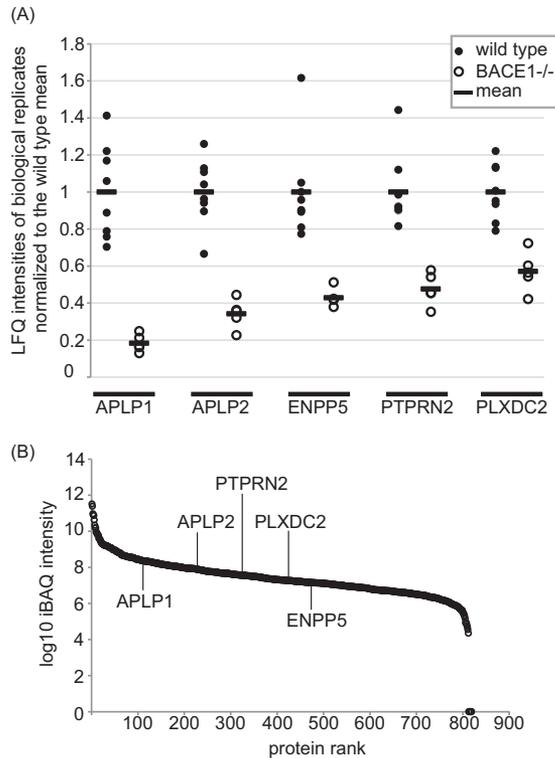
TABLE I

Summary of all integral or GPI-anchored membrane proteins that are significantly decreased in the CSF of BACE1<sup>-/-</sup> mice. Proteins are ranked by their fold change (mean of BACE1<sup>-/-</sup> to wild-type ratio), thus displaying the proteins with the strongest reduction in the BACE1<sup>-/-</sup> CSF on top. Proteins shown on dark grey background remain significant after a false discovery based multiple hypothesis testing. Proteins that are shown on light and dark grey background show at least a 1.5-fold reduction in the BACE1<sup>-/-</sup> CSF. Previously identified: These proteins have been identified as BACE1 substrates or BACE1 substrate candidates in previous studies. a) p value: All proteins shown have a p value <0.05 according to a Student's t-test comparing at least three biological replicates of wild type and BACE1<sup>-/-</sup> mice b) Topology: Protein topology as predicted by the PHOEBIUS web server. c) Peptide distribution: Shown is the graphical output of the QARIP web server. A schematic of each protein is shown, that shows the distribution of the different topological regions and the identified peptides within the corresponding protein. Peptides that were detected during LC-MS/MS measurements are shown in black. The individual protein domains are shown in brown (signal peptide), blue (extracellular domain), yellow (transmembrane domain) and green (intracellular domain). All detected peptides originate from the extracellular domains, suggesting that they are released into the CSF via ectodomain shedding

Protein Name; Gene Name	Mean	p-value <sup>a)</sup>	Topo- logy <sup>b)</sup>	Previously identified	Peptide distribution <sup>c)</sup>
Amyloid-like protein 1; APLP1	0.18	2.3E-05	type I	yes	
Amyloid-like protein 2; APLP2	0.34	9.9E-06	type I	yes	
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5; ENPP5	0.43	0.0007	type I	no	
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2; PTPRN2	0.48	0.0002	type I	no	
Neural cell adhesion molecule L1-like protein; CHL1	0.50	0.003	type I	yes	
Plexin domain-containing protein 2; PLXDC2	0.57	0.0002	type I	yes	
Amyloid beta A4 protein; APP	0.61	0.006	type I	yes	
Dystroglycan; DAG1	0.61	0.004	type I	no	
Cadherin-2; CDH2	0.64	0.046	type I	no	
Contactin-2; CNTN2	0.66	0.033	GPI	yes	
Seizure 6-like protein 2; SEZ6L2	0.67	0.032	type I	yes	
Ephrin-B3; EFNB3	0.67	0.002	type I	no	
Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase; PAM	0.68	0.024	type I	yes	
V-type proton ATPase subunit S1; ATP6AP1	0.7	0.019	type I	no	
Cadherin-13; CDH13	0.71	0.030	type I	no	
Sulfhydryl oxidase 1; QSOX1	0.72	0.020	type I	no	
Neural cell adhesion molecule 1; NCAM1	0.77	0.031	type I	yes	
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2; CELSR2	0.78	0.002	multi-pass	no	

BACE1 substrates APLP1 and APLP2 (27, 30–35) showed the strongest decrease (5.4- and 2.9-fold respectively) (Fig. 5). The known BACE1 substrates CHL1, APP and CNTN2 were also

significantly decreased, although to a lesser extent (2-, 1.7-, and 1.5-fold respectively). Taken together, these results demonstrate a) that BACE1-dependent release of soluble ectodomains

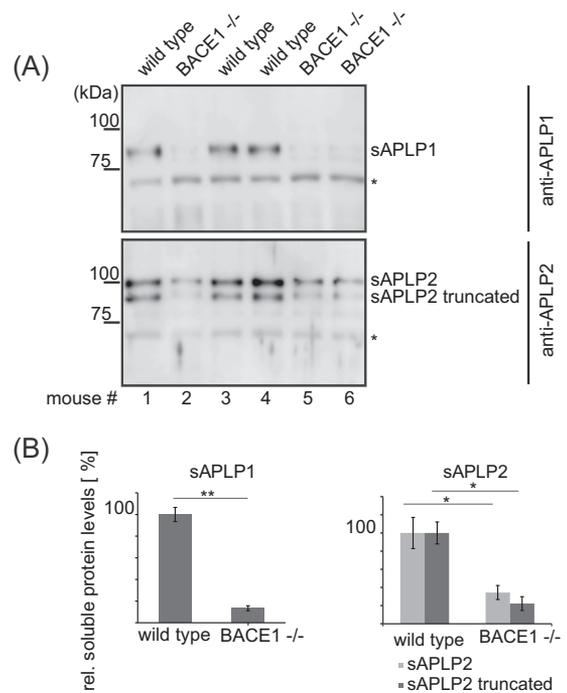


**FIG. 6. Top 5 proteins that are decreased in the BACE1<sup>-/-</sup> CSF.** A, The LFQ values of the top 5 significantly regulated proteins are shown for each biological replicate. LFQ values are normalized to the wild-type mean of all biological replicates (set to 1) for a given protein. B, Relative abundance of all observed proteins relative to each other as calculated by the iBAQ algorithm. Each protein identified in the CSF data set is displayed as a black circle and ranked by its relative abundance in the CSF. The iBAQ (intensity Based Absolute Quantification) score is calculated by dividing the total ion intensity of all observed peptides by the theoretical number of all observable peptides of a protein (18). The iBAQ score thus ranks the proteins in a data set by their approximate abundance, the proteins of highest abundance on top. LFQ: label-free quantification.

can be monitored in the CSF and b) that BACE1 substrates can be identified from mouse CSF (Fig. 5).

After applying a false discovery rate-based multiple hypothesis testing, five proteins (APLP1, APLP2, PTPRN2, PLXDC2, ENPP5) remained significantly decreased in BACE1<sup>-/-</sup> mice in comparison to their wild-type littermates (Fig. 5 and Table I). These five proteins, which are all type I membrane proteins, comprise the known BACE1 substrates APLP1 and APLP2 as well as the recently described BACE1 substrates PLXDC2 and PTPRN2 (26–28). In addition the type I membrane protein ENPP5 (ectonucleotide pyrophosphatase 5) was significantly reduced in BACE1<sup>-/-</sup> CSF, making ENPP5 a novel BACE1 substrate candidate (Fig. 5 and Table I).

The individual LFQ intensities measured for these top five proteins are shown in Fig. 6, as well as their relative abundance in the entire data set expressed by their iBAQ score (18). The iBAQ intensities of all quantified proteins ranged over seven orders of magnitude, with the top 5 BACE1 substrates

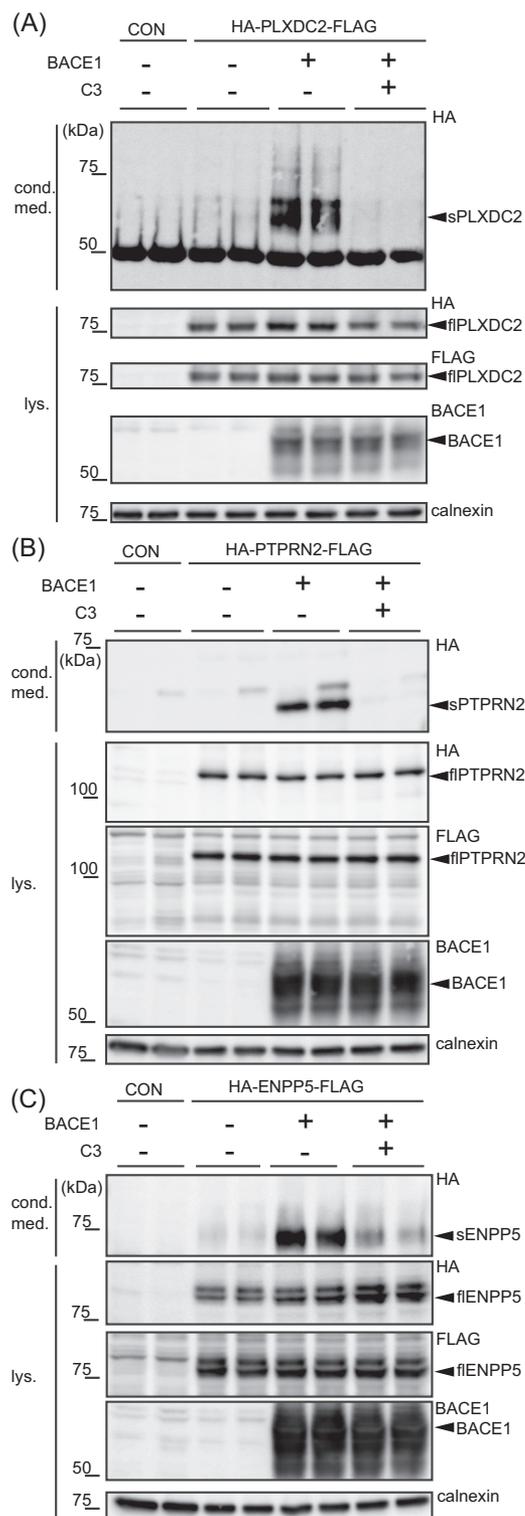


**FIG. 7. Western blot analysis of APLP1 and APLP2 in murine CSF.** A, The CSF of individual mice of an independent set of animals was subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Antibodies against APLP1 and APLP2 were raised against the extracellular domains of these proteins and detect the secreted ectodomains (sAPLP1 and sAPLP2) in the CSF. Two bands are detected for APLP2, one of them is considered to be a truncated form of mature APLP2 (35). Unspecific bands detected by both antibodies are marked with an asterisk (\*) and show that equal amounts of CSF were loaded per lane. B, Densitometric quantitation of the Western blot shown in A) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; two-tailed Student's t-Test,  $n = 3$ ).

distributed in the middle of this range. This indicates that our workflow allows accurate quantification of BACE1 substrates despite the presence of proteins which are  $10^3$ – $10^4$  times more abundant. Notably, the relative protein abundances, as determined by the IBAQ scores, were similar to the protein abundances in human CSF (supplemental Fig. S1, supplemental Table S6), which was analyzed using the same workflow as the murine CSF.

To further validate our findings and methodology, we obtained CSF from an independent set of three BACE1<sup>-/-</sup> and three wild-type mice. First, we validated our mass spectrometric data for the known BACE1 substrates APLP1 and APLP2. To this aim, the CSF was subjected to Western blotting. Similar to our mass spectrometry-based results, the ectodomains of both proteins were strongly reduced in BACE1<sup>-/-</sup> mouse CSF (Fig. 7A). Moreover, the densitometric quantification of the secreted ectodomains demonstrated a confirmatory correlation with our label-free quantification results, with a 7.5-fold reduction for APLP1 and a 3.5-fold reduction for APLP2 (Fig. 7B).

Next we studied the three additional proteins PLXDC2, PTPRN2 and ENPP5 in order to further confirm the mass

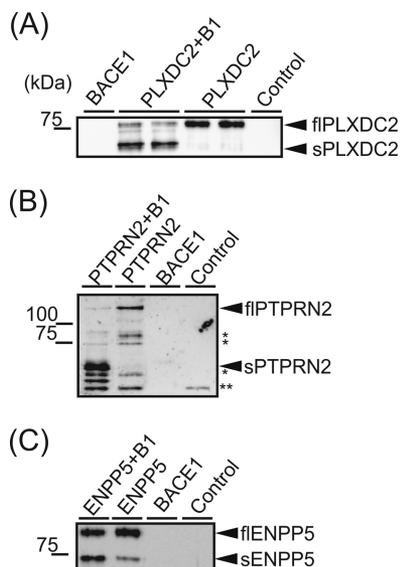


**FIG. 8. BACE1 increases shedding of PLXDC2, PTPRN2 and ENPP5.** Shown are immunoblots of the indicated proteins. Human embryonic kidney HEK293T cells were stably transfected with HA and FLAG epitope-tagged proteins (HA-PLXDC2-FLAG (A), HA-PTPRN2-FLAG (B), HA-ENPP5-FLAG (C) or the empty pcDNA3.1 vector as control (CON). Additionally, the stable cells were transiently transfected with BACE1 or empty peak12 vector as indicated. Additionally

spectrometric data. In contrast to APLP1 and APLP2 no antibody was available allowing successful detection of the proteins' ectodomains in mouse CSF. Thus, an HA epitope tag was added to the N terminus of the ectodomains and additionally a FLAG epitope tag to the C terminus of the full-length proteins. The recombinant proteins were stably expressed in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells and their processing by BACE1 was analyzed. The shed ectodomains were detected by immunoblot as faint bands in the supernatant. The full-length proteins were seen in the cell lysate and showed specific bands at their predicted apparent molecular weights (Fig. 8A–8C). As a control, these protein bands were not seen in the lysate or supernatant of cells transfected with the empty vector. Because endogenous BACE1 is highly expressed in the nervous system, but at very low levels in non-neuronal tissue (36), the HEK293 cells were additionally transiently transfected with a BACE1 or a control plasmid. Compared with the control transfected cells, transfection of BACE1 strongly increased the shedding of the ectodomains into the conditioned medium for all three proteins, PLXDC2, PTPRN2 and ENPP5 (Fig. 8). Addition of the specific BACE1 inhibitor C3 (13) largely blocked this increase in substrate ectodomain shedding, demonstrating that the proteolytic activity of BACE1 was required for the increased cleavage of the three proteins.

To further demonstrate that the increased cleavage is because of a direct cleavage by BACE1 and not merely because of secondary effects, the epitope-tagged proteins were immunoprecipitated from the cell lysates using an antibody against the HA-tag and subject to an *in vitro* cleavage assay by purified, recombinant BACE1. As a result of this assay, BACE1 cleavage should increase the generation of the same shed ectodomain, which was also seen in the supernatant of the transfected HEK293 cells. Indeed, in the absence of BACE1 in the *in vitro* assay, only full-length PLXDC2 was detected (Fig. 9A). When BACE1 was added to the assay, the intensity of the full-length band was reduced and a cleaved PLXDC2 ectodomain was detected using the HA antibody for detection. Importantly, the cleaved PLXDC2 had the same apparent molecular weight as the shed PLXDC2 ectodomain in the supernatant of the transfected HEK293 cells (Fig. 9A compare with Fig. 8A), demonstrating that PLXDC2 cleavage in the cells occurs in the same way as in the *in vitro* assay. As

the cells were treated with either the BACE1 inhibitor C3 or DMSO. The recombinant full-length (fl) proteins PLXDC2, PTPRN2 and ENPP5 were detected in the cell lysate (lys) using the N-terminally binding HA antibody and the C-terminally binding FLAG antibody (indicated by arrowheads). The soluble (s) ectodomains sPLXDC2, sPTPRN2, sENPP5 were immunoprecipitated from the conditioned medium with the HA.7 monoclonal antibody and detected using the HA monoclonal antibody 3F10 (indicated by arrowheads). Calnexin served as a loading control. BACE1 was detected by 3D5 antibody. Shown are representative immunoblots from three independent experiments.



**FIG. 9. BACE1 *in vitro* assay.** Recombinant HA-PLXDC2-FLAG (A), HA-PTPRN2-FLAG (B), HA-ENPP5-FLAG (C) were purified from cell lysates of stably transfected HEK293T cells by immunoprecipitation (using antibody HA.7) and digested with or without BACE1 (B1) *in vitro*. Detection of full-length proteins and their N-terminal, soluble ectodomains (resulting from BACE1 cleavage) was done using the HA 3F10 antibody. Control: immunoprecipitation from HEK293T cells stably expressing the empty vector. The full-length (fl) proteins flPLXDC2, flPTPRN2 and flENPP5 (indicated by arrowheads) and the soluble (s) ectodomains sPLXDC2, sPTPRN2 and sENPP5 (indicated by arrowheads) were detected using the HA 3F10 monoclonal antibody. BACE1: recombinant BACE1 was loaded without any purified substrate protein. Shown is a representative blot of three independent experiments. \*: PTPRN2 degradation product. \*\*: unspecific band.

controls, both the full-length protein and the shed ectodomain were not detected, when the assay was performed in the absence of PLXDC2 expression (Control) or when only recombinant BACE1 was loaded (BACE1).

Similar results were obtained for PTPRN2 and ENPP5. In the absence of BACE1, full-length PTPRN2 (arrowhead, flPTPRN2) as well as several presumed degradation products were detected. In the presence of BACE1 the full-length protein was reduced and a 65 kDa fragment was generated as well as a less intensive 55 kDa fragment (Fig. 9B). The 65 kDa fragment corresponds exactly to the shed PTPRN2 ectodomain observed in the conditioned medium of HEK293 cells (Fig. 9B).

For ENPP5, in the absence of BACE1 the full-length protein at 80 kDa was detected as well as a smaller fragment of around 70 kDa (Fig. 9C). After addition of BACE1 the full-length protein levels were reduced, whereas the 70 kDa fragment was strongly increased, which has the same apparent molecular weight as the shed ectodomain in HEK293 cells (Fig. 8C). Given the low levels of the 70 kDa fragment in the absence of BACE1 it is likely that ENPP5 is efficiently cleaved by BACE1 in cells, such that the purification of full-length ENPP5 with the HA antibody copurified lower levels of the BACE1-generated ENPP5 ectodomain.

Taken together, the HEK293 cell experiments and the *in vitro* assays validate ENPP5 and confirm PTPRN2 and PLXDC2 as BACE1 substrates and demonstrate their direct cleavage by BACE1 in the *in vitro* assay and their cleavage by BACE1 in cells.

#### DISCUSSION

In this study we show for the first time that the CSF proteome of individual mice can be analyzed in a quantitative manner. Our simple workflow allows the in-depth investigation of murine CSF of individual mice with low sample volumes in ~4.5 h per sample. It combines the simplicity of an in-solution digestion with ultra-long analytical HPLC columns in conjunction with a mass spectrometer providing fast scan speed while maintaining a high resolution. It avoids the time and sample consuming protein concentration, depletion and fractionation steps that were required for the analysis of murine CSF in the past. Additionally, we compared in-solution digestion with FASP. In-solution digestion showed to be superior to FASP with regards to the number of protein identifications as well as quantifications. However, FASP seems to be a complementary method to in-solution digestion, as the overlap of proteins identified by both methods was only 61%.

Moreover, our workflow increases proteomic depth, as the number of protein identifications were two- to threefold higher compared with previous studies (6, 7). This is a clear step forward toward the goal of determining the whole mouse CSF proteome. Additionally, 55–67% of previously identified proteins in murine CSF were confirmed in our study (Fig. 4A). Some of the previously identified proteins might only be detectable in murine CSF on previous immunodepletion or extensive fractionation, because of their low expression levels or the presence of highly abundant proteins such as albumin. This could explain why the overlap between the different studies is not complete and why some well-known BACE1 substrates such as seizure protein 6 were not quantified in our analysis (27, 28). Our simplified workflow minimizes the variance during sample processing, which is helpful for the accuracy of label-free quantification. The quantitative results of the top two BACE1 substrates in this data set were validated by Western blot analysis and demonstrate high correlation of protein levels between our mass spectrometry based methodology and immunoblotting. In our hands label-free quantification is currently the best strategy to investigate murine CSF, as SILAC labeling of entire mice is extremely expensive and time consuming, whereas chemical labeling of the small sample amounts may increase variation between samples. As our method only requires 5  $\mu$ l of CSF from one mouse (for two technical replicates), the longitudinal CSF sampling of mice is possible, as up to 8  $\mu$ l of CSF can be harvested from an adult mouse every 2–3 months (37). Mice are the most common animal model in clinical research, including a large variety of neurological diseases (38). Therefore, our method will be of great value for investigating the CSF of those mice. Addition-

ally, preclinical findings in the CSF can be rapidly transferred to the clinic. For example, the identified BACE1 substrates may be used for monitoring the response to BACE inhibitors during clinical inhibition studies as we found the great majority of them to be also detectable in human CSF.

Analysis with the QARIP webserver revealed that a significant number of proteins detected in murine CSF are derived from ectodomain shedding, which has also been suggested by a previous study analyzing the human CSF peptidome and proteome (39). Thus, mouse CSF, for example from wild-type and protease-deficient mice, is generally well suited for the identification of protease substrates *in vivo*.

This is the first proteomic analysis of the CSF of the BACE1<sup>-/-</sup> mouse model and demonstrates that the activity of the BACE1 protease can be monitored by quantifying the amount of released BACE1 substrate ectodomains into this body fluid. Our data suggests that BACE1 is not an exclusive sheddase for many of the proteins released into the CSF, as their shedding is not completely abolished in the absence of BACE1. This was also confirmed on analysis by Western blotting. Although APLP1 was almost absent in CSF, APLP2 was reduced less drastically, which is in agreement with our previous proteomics study of primary cortical neurons treated with a BACE1 inhibitor (27). This is most likely because of the compensatory or parallel proteolysis by alternative sheddases.

BACE1 is the rate-limiting enzyme of A $\beta$  production and is a major drug target for the therapy of Alzheimer's disease (40). The interest in BACE1 is because of two reasons: On the one hand, orally available BACE1 inhibitors have recently shown their A $\beta$ -lowering potential in humans and non-human primates (41, 42). On the other hand, an increasing number of BACE1 substrates is described, together with the elucidation of a complex phenotype in BACE1<sup>-/-</sup> mice, raising concerns about mechanism-based side effects (11). Our study validates previously identified BACE1 substrates in the CSF. In addition, we identify ENPP5 as a novel BACE1 substrate. Moreover, we confirm the recently described substrates PLXDC2 and PTPRN2 (26–28) *in vitro* and in cell culture. ENPP5 belongs to the family of nucleotide pyrophosphatases and is highly expressed in rat brain. However, in contrast to other nucleotide pyrophosphatase members, its catalytic activity could not be demonstrated so far and no other physiological function has been described (43, 44).

PLXDC2 has been identified as a BACE1 substrate by two independent proteomic studies, where the pharmacologic inhibition of BACE1 led to a decrease of detectable PLXDC2 in the conditioned media of HEK293 cell and cultivated primary neurons (26, 29). It has been shown to regulate neuronal cell fate and proliferation. Interestingly, the ectodomain itself is sufficient for the observed effects on neurogenesis (45). BACE1 could thus control the function of this protein by regulating its cell surface levels as well as the amount and distribution of soluble, functional ectodomains.

PTPRN2 has been first described as a BACE1 substrate in the murine endocrine pancreas. This was demonstrated by a reduction of PTPRN2 protein levels in the conditioned media and the according increase of protein levels in the cell lysate of BACE1 deficient islets using SRM/MRM-based mass spectrometry (28). In addition, PTPRN2 has been shown to regulate insulin secretion (46). It is expressed throughout the CNS, however its role in the nervous system has not been investigated so far (47). The functional analysis of these proteins in future studies may broaden our understanding of the complex phenotype of BACE1<sup>-/-</sup> mice as well as mechanism-based side effects on therapeutic inhibition of BACE1. Furthermore, the expanding panel of physiologic BACE1 substrates in the CSF may aid in the development of prognostic and diagnostic biomarkers and drug development. Our methodology is well-suited to also analyze CSF samples derived from non-human primates or patients treated with BACE1 inhibitors in drug development and clinical studies, respectively. This may allow the determination of which membrane proteins are predominant BACE1 substrates in humans. Such substrates may also lead to the development of APP-specific BACE inhibitors that spare other substrates, as it has been described for Notch-sparing  $\gamma$ -secretase inhibitors (48). Furthermore, a panel of physiological substrates that can routinely be monitored in the CSF will aid in evaluating the drug response in individual patients undergoing therapy and improving personalized medicine approaches for the treatment of Alzheimer's disease.

**Acknowledgments**—We thank Katrin Moschke for excellent technical support. We also thank Prof. Tomas Olsson (Karolinska University Hospital & Institute, Dept. of Clinical Neuroscience, Neuroimmunology Unit) and Franziska Hoffmann (Institute for Clinical Neuroimmunology, University Hospital LMU Munich, Max-Planck-Institute) for providing us the human CSF samples.

\* This work was supported by the DFG (SyNergy), the BMBF (RiMOD-FTD), the Verum Foundation, IWT, the Breuer Foundation Research Prize, and the TUM School of Medicine.

§ This article contains [supplemental Fig. S1 and Tables S1 to S6](#).

§§ To whom correspondence should be addressed: German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, and Technische Universität München, Feodor-Lynen-Strasse 17, 81377 Munich, Germany. Tel.: +49.89.4400-46425; E-mail: stefan.lichtenthaler@dzne.de.

¶¶ Both authors contributed equally to this study.

#### REFERENCES

- Romeo, M. J., Espina, V., Lowenthal, M., Espina, B. H., Petricoin, E. F., 3rd, and Liotta, L. A. (2005) CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev. Proteomics* **2**, 57–70
- Craft, G. E., Chen, A., and Nairn, A. C. (2013) Recent advances in quantitative neuroproteomics. *Methods* **61**, 186–218
- Schutzer, S. E., Liu, T., Natelson, B. H., Angel, T. E., Schepmoes, A. A., Purvine, S. O., Hixson, K. K., Lipton, M. S., Camp, D. G., Coyle, P. K., Smith, R. D., and Bergquist, J. (2010) Establishing the proteome of normal human cerebrospinal fluid. *PLoS ONE* **5**, e10980
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Parsadanian, M., O'Dell, M. A., Foss, E. M., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2002) Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (A $\beta$ ) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **81**, 229–236
- Rudick, R. A., Zirretta, D. K., and Herndon, R. M. (1982) Clearance of albumin from mouse subarachnoid space: a measure of CSF bulk flow.

- J. Neurosci. Meth.* **6**, 253–259
6. Cunningham, R., Jany, P., Messing, A., and Li, L. (2013) Protein changes in immunodepleted cerebrospinal fluid from a transgenic mouse model of Alzheimer disease detected using mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **12**, 719–728
  7. Smith, J. S., Angel, T. E., Chavkin, C., Orton, D. J., Moore, R. J., and Smith, R. D. (2014) Characterization of individual mouse cerebrospinal fluid proteomes. *Proteomics* **14**, 1102–1106
  8. Dislich, B., and Lichtenthaler, S. F. (2012) The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front. Physiol.* **3**, 8
  9. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112
  10. Ghosh, A. K., and Osswald, H. L. (2014) BACE1 (beta-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6765–6813
  11. Vassar, R., Kuhn, P. H., Haass, C., Kennedy, M. E., Rajendran, L., Wong, P. C., and Lichtenthaler, S. F. (2014) Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J. Neurochem.* **130**, 4–28
  12. Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., Binder, L., and Vassar, R. (2007) Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* **27**, 3639–3649
  13. Stachel, S. J., Coburn, C. A., Steele, T. G., Jones, K. G., Loutzenhiser, E. F., Grego, A. R., Rajapakse, H. A., Lai, M. T., Crouthamel, M. C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J. E., Pietrak, B. L., Espeseth, A. S., Shi, X. P., Chen-Dodson, E., Holloway, M. K., Munshi, S., Simon, A. J., Kuo, L., and Vacca, J. P. (2004) Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J. Med. Chem.* **47**, 6447–6450
  14. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–648
  15. Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2**, 1896–1906
  16. Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**, 359–362
  17. Lubner, C. A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keefe, M., and Mann, M. (2010) Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* **32**, 279–289
  18. Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342
  19. Vizcaino, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H. J., Albar, J. P., Martinez-Bartolomé, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R., and Hermjakob, H. (2014) ProteomeX-change provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* **32**, 223–226
  20. Baker, P. R., and Chalkley, R. J. (2014) MS-Viewer: A Web-based Spectral Viewer for Proteomics Results. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1392–1396
  21. Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S. F. (2007) Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **282**, 11982–11995
  22. Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J. Biol. Chem.* **278**, 48713–48719
  23. Wiśniewski, J. R., Ostasiewicz, P., and Mann, M. (2011) High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *J. Proteome Res.* **10**, 3040–3049
  24. Lichtenthaler, S. F., Haass, C., and Steiner, H. (2011) Regulated intramembrane proteolysis—lessons from amyloid precursor protein processing. *J. Neurochem.* **117**, 779–796
  25. Ivankov, D. N., Bogatyreva, N. S., Hönigschmid, P., Dislich, B., Höggl, S., Kuhn, P. H., Frishman, D., and Lichtenthaler, S. F. (2013) QARIP: a web server for quantitative proteomic analysis of regulated intramembrane proteolysis. *Nucleic Acids Res.* **41**, W459–W464
  26. Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., and Selkoe, D. J. (2009) Identification of  $\beta$ -Secretase (BACE1) Substrates Using Quantitative Proteomics. *PLoS ONE* **4**, e8477
  27. Kuhn, P. H., Koroniak, K., Höggl, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., Haass, C., Roßner, S., Bräse, S., and Lichtenthaler, S. F. (2012) Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J.* **31**, 3157–3168
  28. Stützer, I., Selevsek, N., Esterházy, D., Schmidt, A., Aebbersold, R., and Stoffel, M. (2013) Systematic proteomic analysis identifies beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 10536–10547
  29. Zhou, L., Barão, S., Laga, M., Bockstaal, K., Borgers, M., Gijzen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaert, K., and De Strooper, B. (2012) The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *J. Biol. Chem.* **287**, 25927–25940
  30. Höggl, S., van Bebber, F., Dislich, B., Kuhn, P. H., Haass, C., Schmid, B., and Lichtenthaler, S. F. (2013) Label-free quantitative analysis of the membrane proteome of Bace1 protease knock-out zebrafish brains. *Proteomics* **13**, 1519–1527
  31. Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 18146–18156
  32. Li, Q., and Südhof, T. C. (2004) Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 10542–10550
  33. Pastorino, L., Ikin, A. F., Lamprinou, S., Vacaressa, N., Revelli, J. P., Platt, K., Paganetti, P., Mathews, P. M., Harroch, S., and Buxbaum, J. D. (2004) BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol Cell Neurosci* **25**, 642–649
  34. Sala Frigerio, C., Fadeeva, J. V., Minogue, A. M., Citron, M., Van Leuven, F., Staufenbiel, M., Paganetti, P., Selkoe, D. J., and Walsh, D. M. (2010) beta-Secretase cleavage is not required for generation of the intracellular C-terminal domain of the amyloid precursor family of proteins. *FEBS J.* **277**, 1503–1518
  35. Höggl, S., Kuhn, P. H., Colombo, A., and Lichtenthaler, S. F. (2011) Determination of the proteolytic cleavage sites of the amyloid precursor-like protein 2 by the proteases ADAM10, BACE1 and gamma-secretase. *PLoS ONE* **6**, e21337
  36. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–741
  37. Liu, L., and Duff, K. (2008) A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *J. Vis. Exp.* **21**, 960
  38. Chesselet, M. F., and Carmichael, S. T. (2012) Animal models of neurological disorders. *Neurotherapeutics* **9**, 241–244
  39. Zougman, A., Pilch, B., Podtelejnikov, A., Kiehnopf, M., Schnabel, C., Kumar, C., and Mann, M. (2008) Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J. Proteome Res.* **7**, 386–399
  40. Yan, R., and Vassar, R. (2014) Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol.* **13**, 319–329
  41. May, P. C., Dean, R. A., Lowe, S. L., Martenyi, F., Sheehan, S. M., Boggs, L. N., Monk, S. A., Mathes, B. M., Mergott, D. J., Watson, B. M., Stout, S. L., Timm, D. E., Smith Labell, E., Gonzales, C. R., Nakano, M., Jhee, S. S., Yen, M., Ereshefsky, L., Lindstrom, T. D., Calligaro, D. O., Cocke, P. J., Greg Hall, D., Friedrich, S., Citron, M., and Audia, J. E. (2011) Robust central reduction of amyloid-beta in humans with an orally available, non-peptidic beta-secretase inhibitor. *J. Neurosci.* **31**, 16507–16516

42. Sankaranarayanan, S., Holahan, M. A., Colussi, D., Crouthamel, M. C., Devanarayan, V., Ellis, J., Espeseth, A., Gates, A. T., Graham, S. L., Gregro, A. R., Hazuda, D., Hochman, J. H., Holloway, K., Jin, L., Kahana, J., Lai, M. T., Lineberger, J., McGaughey, G., Moore, K. P., Nantermet, P., Pietrak, B., Price, E. A., Rajapakse, H., Stauffer, S., Steinbeiser, M. A., Seabrook, G., Selnick, H. G., Shi, X. P., Stanton, M. G., Swestock, J., Tugusheva, K., Tyler, K. X., Vacca, J. P., Wong, J., Wu, G., Xu, M., Cook, J. J., and Simon, A. J. (2009) First demonstration of cerebrospinal fluid and plasma A beta lowering with oral administration of a beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 inhibitor in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 131–140
43. Massé, K., Bhamra, S., Allsop, G., Dale, N., and Jones, E. A. (2010) Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 181–193
44. Ohe, Y., Ohnishi, H., Okazawa, H., Tomizawa, K., Kobayashi, H., Okawa, K., and Matozaki, T. (2003) Characterization of nucleotide pyrophosphatase-5 as an oligomannosidic glycoprotein in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 719–725
45. Miller, S. F., Summerhurst, K., Rünker, A. E., Kerjan, G., Friedel, R. H., Chédotal, A., Murphy, P., and Mitchell, K. J. (2007) Expression of Plxdc2/TEM7R in the developing nervous system of the mouse. *Gene Expression Patterns* **7**, 635–644
46. Caromile, L. A., Oganessian, A., Coats, S. A., Seifert, R. A., and Bowen-Pope, D. F. (2010) The neurosecretory vesicle protein phogrin functions as a phosphatidylinositol phosphatase to regulate insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **285**, 10487–10496
47. Wasmeier, C., and Hutton, J. C. (1996) Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 18161–18170
48. Augelli-Szafran, C. E., Wei, H. X., Lu, D., Zhang, J., Gu, Y., Yang, T., Osenkowski, P., Ye, W., and Wolfe, M. S. (2010) Discovery of notch-sparing gamma-secretase inhibitors. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 207–209