

Aus dem Biochemischen Institut  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Rose-John)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Phospholipase D3 (PLD3),  
biochemische Charakterisierung und Bedeutung bei der  
Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
SEBASTIAN JAGDMANN  
aus Hamburg

Kiel 2019

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. P. J. Saftig, Biochemisches Institut

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Karina Reiss, Klinik für Dermatologie,  
Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2020

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 13.11.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Lysosomen.....	1
1.2 Endosomen und Lysosomen.....	2
1.3 Sortierung löslicher und membranständiger lysosomaler Proteine .....	3
1.4 Glykosylierung von Proteinen.....	4
1.5 Morbus Alzheimer: Pathomechanismen aus biochemischer Sicht.....	4
1.6 Superfamilie Phospholipase D (EC 3.1.4.4) .....	6
1.7 Phospholipase D-Aktivität.....	7
1.8 Phospholipase D3.....	9
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>12</b>
<b>3 Material</b> .....	<b>13</b>
3.1 Chemikalien .....	13
3.2 Geräte.....	13
3.3 Enzyme.....	14
3.4 Antikörper.....	15
3.5 Verbrauchsmaterial .....	16
3.6 Kits.....	16
3.7 Zelllinien.....	16
3.8 Software.....	17
<b>4 Methoden</b> .....	<b>18</b>
4.1 Molekularbiologische Methoden .....	18
4.1.1 Erzeugung chemisch kompetenter E.coli.....	18
4.1.2 Chemisch kompetente Transformation.....	18
4.1.3 Plasmidpräparation .....	19
4.1.4 Klonierung.....	19
4.1.5 Gezielte Erzeugung von Mutationen durch gerichtete Mutagenese.....	21

4.2	Zellbiologische Methoden.....	23
4.2.1	Haltung und Passage von Zellkulturen .....	23
4.2.2	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zelllinien.....	23
4.2.3	Transfektion mit PEI (Lipofektion) .....	24
4.2.4	Gewinnung von PLD3-Knockout-MEF .....	24
4.2.5	Gewinnung von Zelllysaten .....	25
4.2.6	Gewinnung von Organextrakten.....	25
4.2.7	Membranfraktionierung .....	25
4.3	Biochemische Methoden .....	26
4.3.1	Proteinbestimmung von Zelllysaten und Organextrakten.....	26
4.3.2	SDS-PAGE und Western Blot .....	26
4.3.3	Deglykosylierung mit PNGase F und Endo H .....	28
4.3.4	Inhibition der lysosomalen Prozessierung von Proteinen.....	29
4.3.5	Inhibition der Dynamin-abhängigen Endozytose.....	29
4.3.6	Phospholipase D – Aktivitätsbestimmung.....	29
4.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz .....	31
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
5.1	Kolokalisation mit bekannten Markerproteinen .....	32
5.2	PLD3 und der Retromer-Komplex .....	35
5.3	Analyse von getaggttem PLD3 im Western Blot .....	36
5.4	Topologische Orientierung von PLD3 .....	37
5.5	PLD3 - Sortierung zum Endosomen/Lysosomen .....	39
5.5.1	Assoziation von PLD3 mit der Plasmamembran.....	40
5.5.2	Validierung der Assoziation mit der Plasmamembran.....	42
5.5.3	Die Rolle des M6P-Rezeptors bezüglich der intrazellulären Sortierung .....	43
5.5.4	Die Rolle des N-terminalen Tyrosin-Motivs von PLD3 bezüglich der intrazellulären Sortierung .....	44
5.6	Pineda anti-PLD3-Antikörper: Gewinnung und Testung .....	46
5.6.1	Charakterisierung von anti-PLD3-Antiseren .....	46
5.6.2	Charakterisierung von anti-PLD3-Antikörpern .....	47



5.7	Anti-PLD3-Antikörper im Vergleich.....	48
5.7.1	Detektion von humanem und murinem PLD3 im Western Blot .....	49
5.7.2	Membranfraktionierung - Trennung der membrangebundenen von der löslichen PLD3-Form.....	51
5.7.3	PLD3-Nachweis in Tritosomen .....	52
5.7.4	Intrazelluläre Lokalisation von PLD3 .....	54
5.7.5	Lysosomale Lokalisation und Topologie .....	55
5.8	Inhibition der lysosomalen Prozessierung von PLD3 .....	57
5.9	Glykosylierung von PLD3 .....	59
5.10	PLD3-Knockout-Maus und -MEF .....	64
5.11	Einfluss von PLD3 auf die Gesamtmenge sowie die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) .....	67
5.11.1	Auswirkungen der Koexpression von mPLD3 mit APP bei transienter APP-Expression .....	67
5.11.2	Auswirkungen der Koexpression von mPLD3 mit APP bei stabiler APP-Expression .....	69
5.11.3	Patientenmutation PLD3-V232M .....	71
5.12	Katalytische Enzymaktivität als Phospholipase D .....	73
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
6.1	Anti-PLD3-Antikörper .....	76
6.2	Lokalisation und Topologie von PLD3 .....	77
6.3	Glykosylierung von PLD3 .....	79
6.4	Sortierung von PLD3 .....	80
6.5	PLD3 und der Retromer-Komplex .....	82
6.6	Proteolytische Prozessierung von PLD3.....	83
6.7	Enzymaktivität als Phospholipase D.....	86
6.8	Einfluss von PLD3 auf die Gesamtmenge sowie die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins.....	88
6.9	PLD3-Knockout-Maus und -MEF.....	90
6.10	PLD3 Patientenmutation -V232M.....	91
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>107</b>

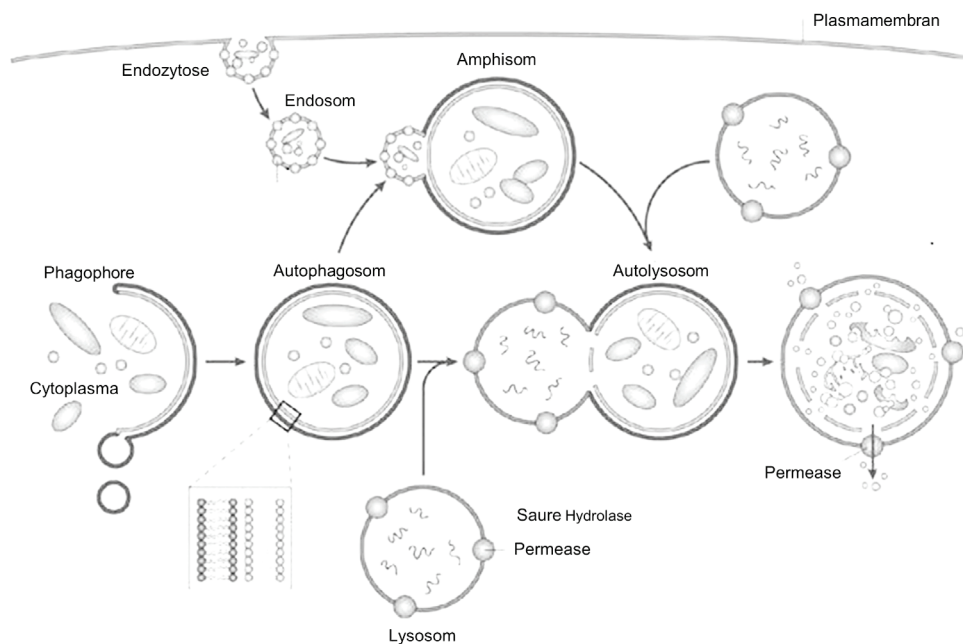
## Abkürzungsverzeichnis

Abeta/A $\beta$	Amyloid-beta
AK	Antikörper
AP	Adapterprotein
APP	Amyloid-Precursor-Protein / Amyloid-Vorläuferprotein
AS	Aminosäure
CTF	C-terminales Fragment
CTSD	Cathepsin D
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FL	„Full Length“, Volllängenprotein
GalNAc4-ST	N-Acetylgalaktosamin-Sulfotransferase
HA	Hämagglutinin
HKD/E	Histidin-Lysin-Asparaginsäure/Glutaminsäure
HU-K4	Humanes K4L-Homolog
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LIMP	Lysosomales Integrales Membranprotein
LOAD	„Late-Onset Alzheimer's disease“ (Spätform)
M6P	Mannose-6-Phosphat
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
MVB	„Multivesicular Body“ / Multivesikuläre Körper
NTF	N-terminales Fragment
PA	„Phosphatidic Acid“ / Phosphatidsäure
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
piRNA	„PIWI-family proteins and their associated small RNAs“
PLD	Phospholipase D
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
RAB	„Ras-related in brain“ der Ras Superfamilie
SAM-9	Schwannom-assoziiertes Protein-9
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“
SorLA	„Sortilin-related receptor“
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
V-ATPase	Vakuolär-Typ-Adenosintriphosphatase
VPS	„Vacuolar protein sorting“
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Lysosomen

Lysosomen sind zelluläre Kompartimente, die von einer einfachen Biomembran umgeben sind. Charakteristisch ist ihr luminaler, saurer pH-Wert bei etwa 4,5-5 (Mindell 2012). Die Größe dieser Organellen variiert etwa zwischen 0,1 und 1,2  $\mu\text{m}$  (Cai et al. 2017). Lysosomen haben in erster Linie die Funktion Makromoleküle abzubauen. Typische Substrate sind verschiedene komplexe Polysaccharide, Proteine und Lipide. Viele dieser zugelieferten Makromoleküle entstammen der Aufnahme von außerhalb der Zelle, je nach Zelltyp z.B. durch Endozytose und Phagozytose, aber auch den Abbau zellinnerer Bestandteile, wie Moleküle aus dem Zytosol oder vollständiger Organellen durch Autophagie (Saffig und Klumperman 2009). Dabei verschmelzen die unterschiedlichen Vesikel wie z.B. Endosomen, Phagosomen und Autophagosomen mit Lysosomen (Abb.1). Dieser Abbau kann auch als Recycling-Mechanismus genutzt werden, um der Zelle Nährstoffe für die Neusynthese zur Verfügung zu stellen.



**Abbildung 1: Die Bildung von Autophagolysosomen.** Abbildung verändert nach Klionsky, 2007

Im lysosomalen Lumen befinden sich Proteasen, Glykosidasen, Phosphatasen, Lipasen, Nukleasen sowie weitere Enzyme und akzessorische Proteine. Diese Enzyme werden als saure Hydrolasen bezeichnet. Sie werden nach der Synthese am rauhen Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Glykosylierung im ER und trans-Golgi-Netzwerk (TGN) durch spezifische Sortierungsmechanismen zu den Endosomen/Lysosomen transportiert. Die

Namensgebung der sauren Hydrolasen liegt darin begründet, dass diese Enzyme im luminalen pH-Milieu der Lysosomen ihr pH-Optimum (etwa 4,5-5) besitzen, also unter diesen Bedingungen katalytisch die höchste Aktivität zeigen. Die Azidifizierung des lysosomalen Lumens ist ein regulierter Vorgang. Maßgeblich ist die V-ATPase daran beteiligt, die unter Energieverbrauch H<sup>+</sup>-Ionen in das Lumen befördert (Mindell 2012; Nelson et al. 2000). Aber auch CIC-7, ein Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter könnte zur Regulation des pH-Wertes beitragen (Ishida et al. 2013). Charakteristische lysosomale Membranproteine sind LAMP-1 (Lysosomen-Assoziiertes-Membran-Protein 1) sowie LAMP-2 (Eskelinen 2006). Zum Schutz der lysosomalen Membranproteine gegenüber den vorliegenden Bedingungen und vor dem Abbau durch die sauren Hydrolasen sind diese Membranproteine auf der luminalen Seite stark glykosyliert. Sind die Lysosomen hinsichtlich ihrer Aktivität und Funktion, dem Abbau von Metaboliten, beeinträchtigt, können sich lysosomale Speichererkrankungen manifestieren (Lieberman et al. 2012; Platt et al. 2012). Entsprechende Substrate der beeinträchtigten Enzyme werden nicht mehr suffizient verstoffwechselt und können intrazellulär sowie extrazellulär akkumulieren. Daneben wird eine gestörte Funktion der Lysosomen auch mit der Entstehung von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Zhang et al. 2009).

## **1.2 Endosomen und Lysosomen**

Der zelluläre Membranen- und Makromolekül-Haushalt stellt in der gesunden Zelle ein natürliches Gleichgewicht dar. Material von außerhalb der Zelle kann durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommen werden. Diese Aufnahme von Molekülen kann, z.B. im Rahmen der Endozytose, nach vorheriger Rezeptorbindung geschehen. Dabei bindet ein Ligand an seinen spezifischen Rezeptor der Plasmamembran. Anschließend wird dieser Ligand-Rezeptor-Komplex internalisiert (Doherty und McMahon 2009; Grant und Donaldson 2009). Die Endozytose von Membranproteinen der Plasmamembran findet dagegen auch rezeptorunabhängig statt. Posttranslational mit Ubiquitin modifizierte Membranproteine können spezifisch reguliert und endozytiert werden (Hicke und Dunn 2003). Im Rahmen der Internalisierung von Proteinen wird ein Teil der Plasmamembran als kleines Vesikel abgeschnürt. An dieser Abschnürung sind verschiedene Proteine, wie AP2 (Adapterprotein 2), Clathrin und Dynamin beteiligt. Man spricht in diesem Stadium, nach erfolgter Vesikeltrennung, von frühen Endosomen. Für diese wurden Markerproteine, wie z.B. RAB5 erkannt und beschrieben (Gorvel et al. 1991). Die frühen Endosomen können zu größeren Vesikeln fusionieren. Folgend kommt es zur Abschnürung weiterer intraluminaler Vesikel und Reifung zu späten Endosomen, auch MVB („Multi-Vesicular-Body“) genannt. Ein Markerprotein für die späten Endosomen ist RAB7 (Rink et al. 2005). In den späten Endosomen besteht bereits luminal ein saures Milieu. Dies ist wichtig für die Sortierung

endosomaler/lysosomaler Enzyme. Zur Entstehung von späten Endosomen und weiterer Formierung zu Lysosomen wurden verschiedene Mechanismen beschrieben. Dazu gehört der ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“) sowie HOPS („homotypic fusion and vacuole protein sorting“) -Komplex. Proteine des ESCRT sind für die Biogenese der Multivesikulären Körper entscheidend. Neben RAB7 ist auch der HOPS-Komplex an der Fusion der späten Endosomen mit Lysosomen beteiligt (Vanlandingham und Ceresa 2009). Charakteristische Proteine dieses Komplexes sind VPS-18 („vakuolar protein sorting“) und VPS-39 (Luzio et al. 2010).

### **1.3 Sortierung löslicher und membranständiger lysosomaler Proteine**

Derzeit sind etwa 50 lösliche sowie über 200 Membranproteine der Lysosomen bekannt (Sleat et al. 2006; Braulke und Bonifacino 2009), die nach Synthese und individueller kotranslationaler Modifikation vom TGN zu den Lysosomen sortiert werden. Dafür sind spezielle Sortierungssignale verantwortlich. Der überwiegende Teil der löslichen sauren Hydrolasen wird M6P-abhängig transportiert (Braulke und Bonifacino 2009). Dabei binden diese Enzyme im TGN mit ihren Mannose-6-Phosphat-Resten spezifisch an M6P-Rezeptoren und werden anschließend Clathrin-vermittelt sowie mit Hilfe von GGA („Golgi localized  $\gamma$ -ear-containing ARF-binding protein“) als Vesikel abgeschnürt (Puertollano et al. 2001; Bonifacino 2004). Diese fusionieren in der Regel mit frühen Endosomen und reifen im Weiteren zu späten Endosomen. In diesen besteht, durch die bereits erfolgte luminale Ansäuerung, ein saures Milieu. Die sauren Hydrolasen dissoziieren von den M6P-Rezeptoren und werden als lösliche Enzyme in das Lumen entlassen. Die M6P-Rezeptoren werden anschließend durch vesikulären Transport zum TGN zurück transportiert. Für diesen retrograden Transport ist der Retromer-Komplex notwendig. Andere lösliche Enzyme und lösliche Proteine werden unabhängig von Mannose-6-Phosphat zu den Lysosomen transportiert. Dies kann durch alternative Rezeptoren wie LIMP-2 („lysosomal integral membrane proteine 2“) oder Sortilin geschehen (Reczek et al. 2007; Lefrancois et al. 2003).

Der Transport der integralen Membranproteine zu den Lysosomen ist unabhängig von M6P-Rezeptoren. Lysosomale Membranproteine tragen oftmals spezielle Sortierungsmotive in ihren cytosolischen Bereichen. Diese Motive basieren überwiegend auf den Dileucin-Signalen DXXLL oder [DE]XXXL[LI] sowie Tyrosin-Signalen (YXX $\emptyset$ , X=beliebige AS,  $\emptyset$ =AS mit hydrophober Seitenkette) (Braulke und Bonifacino 2009). Die Sortierung wird durch ein Zusammenspiel dieser Motive mit Clathrin, GGA's und Adapterproteinen zur Vesikelabschnürung durch Dynamin vermittelt (Bonifacino und Traub 2003).

## 1.4 Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierung von Proteinen zu Glykoproteinen oder Proteoglykanen stellt einen wichtigen Schritt der posttranslationalen Modifikation dar. Dabei wird zwischen verschiedenen Formen der Glykosylierung unterschieden. Diese wird in N-, O-, C-Glykosylierung eingeteilt (Spiro 2002). Sehr viele Proteine von Organismen sind glykosyliert, wobei verschiedene Zucker mit dem eigentlichen Protein verknüpft sind. Dies können Oberflächenproteine, sezernierte/lösliche Proteine oder Membranproteine sein. Die Glykosylierung wird durch eine Reihe von Enzymen katalysiert. Die Glykosylierung erfüllt vielfache Aufgaben. Sie ist für die Proteinkonformation, also die räumliche Integrität und Faltung sowie für Vorgänge der Signalerkennung wichtig. Des Weiteren ist die Proteinfaltung der Proteine auch für die Erfüllung ihrer möglichen katalytischen Funktion, der Verstoffwechslung eines physiologischen Substrats, entscheidend. Die korrekte Glykosylierung lysosomaler Membranproteine schützt diese außerdem vor einer frühzeitigen Degradierung im sauren Milieu der Lysosomen und ermöglicht eine Barrierefunktion der Membranproteine zwischen lysosomalem Lumen und Cytosol (Schwake et al. 2013). Glykosyltransferasen glykosylieren Proteine spezifisch, erkennen dabei bestimmte Aminosäuren des Proteins innerhalb einer Konsensus-Sequenz. Im Fall der N-Glykosylierung lautet diese Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa=beliebige Aminosäure außer Prolin) (Aebi 2013). Die Bindung von Zuckerresten findet hierbei jeweils an Asparagin statt. An diesen können nun N-glykosidisch mannosereiche, nach späterer Modifikation auch Hybrid- oder komplexe Zuckerstrukturen gebunden sein. Diese ersten Schritte der Glykosylierung finden jeweils im ER statt. Bevor die Glykoproteine nun ihre weitere Funktion als sezernierte oder zelluläre Proteine erfüllen, passieren sie den Golgi-Apparat. Hier kommt es teils zur weiteren Modifikation der Zuckerreste, so dass die Glykoproteine letztlich komplexere Zuckerstrukturen tragen (Helenius und Aebi 2001).

## 1.5 Morbus Alzheimer: Pathomechanismen aus biochemischer Sicht

Bisherige Studien bezüglich des APP (Amyloid-Precursor-Protein / Amyloid-Vorläuferprotein) und weiterer Proteine sind oft auf zuvor gefundenen genetischen Assoziationen einiger Varianten mit der vermehrten Entstehung der Alzheimer Erkrankung aufgebaut. Die meist frühe Entwicklung der Alzheimer Demenz, bei Trisomie-21-Patienten durch die zusätzliche Genkopie des Amyloid-Precursor-Protein-Gens (lokalisiert auf dem Chromosom 21q) oder durch Mutationen in diesem Gen bedingt, zeigt eine deutliche Korrelation von APP mit der Alzheimer-Erkrankung. Mutationen in den Präsenilin-1(Chromosom 14q)- und Präsenilin-2(Chromosom 1)-Genen verursachen eine autosomal dominant erbliche Form der Alzheimer-Demenz, die sich häufig vor dem 60. Lebensjahr manifestiert („early-onset Alzheimer disease“) (Hutton und Hardy 1997). Ebenso können

Mutationen im Apolipoprotein E-Gen auf dem Chromosom 19q im fortgeschrittenen Alter zur Manifestation dieser Erkrankung führen. Heterozygotie im APOE- $\epsilon$ 4-Allel erhöht das Risiko dreifach, Homozygotie sogar 15fach im Laufe des Lebens an der Alzheimer-Demenz zu erkranken (Guerreiro et al. 2012; Geller und Potter 1999).

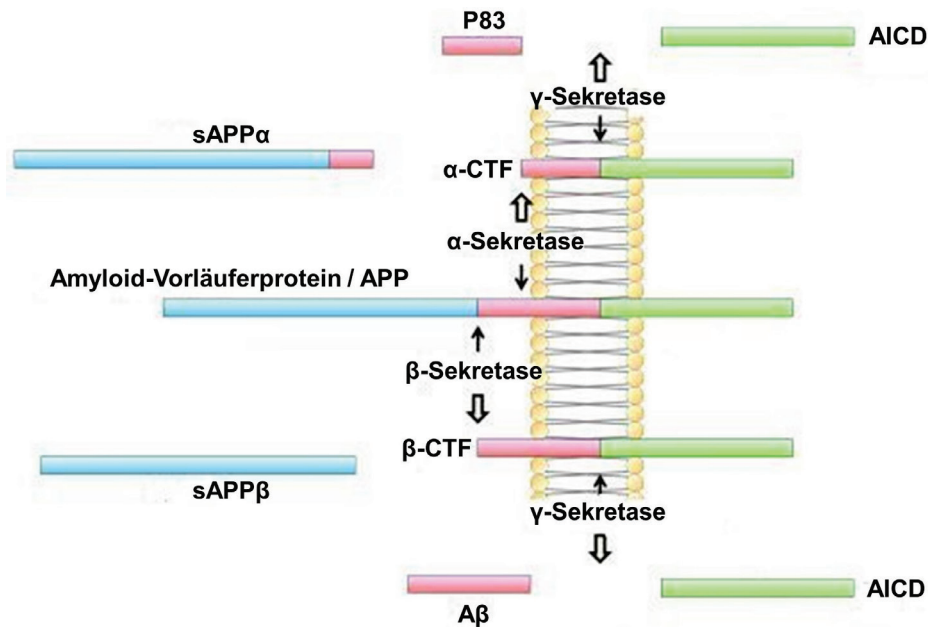
Durch Forschung in den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Hypothesen zur Pathophysiologie der Demenz vom Alzheimer-Typ aufgestellt und Mutationen in Risikogenen gefunden, die das Erkrankungsrisiko erhöhen. Diese Hypothesen beinhalten u.a. die Akkumulation und fehlerhafte Aggregation von Peptiden als Folge der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins (Tauopathien mit neurofibrillären Bündeln), einem mit Mikrotubuli assoziiertem Protein. Des Weiteren werden eine bestimmte Abfolge von Prozessierungsschritten des Amyloid-Vorläufermoleküls APP, mitochondriale Dysfunktionen und Störungen im Cholesterin-Metabolismus mit der Erkrankung in Zusammenhang gebracht (Moreira et al. 2010; Guerreiro et al. 2012).

Ein pathologisches Schlüsselmerkmal der „Beta-Amyloid-Theorie“ ist die Erzeugung und Freisetzung des „toxischen“ Abeta-Peptides nach Proteolyse seines Vorläufermoleküls „Amyloid Precursor Protein“ (APP) in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (Abb.2).

APP wird durch zwei unterschiedliche, konkurrierende Wege proteolytisch prozessiert: Zumeist handelt es sich dabei um den nicht-amyloidogenen Weg, welcher der Formierung von Abeta vorbeugt. Hierbei wird das integrale Typ1-Transmembranprotein APP (plasma-) membranproximal durch eine Alpha-Sekretase (z.B. ADAM-10) geschnitten. Durch diesen ersten Prozessierungsschritt des APP entsteht ein freies lösliches Fragment (sAPP $\alpha$ ) sowie ein kleineres membranständiges Fragment (C83). Die Produkte, die nach der Spaltung des APP durch die Alpha-Sekretase entstehen, haben eher neuroprotektive Wirkungen und einen positiven Einfluss auf die Neuroplastizität (Taylor et al. 2008; Hartl et al. 2013). APP-Moleküle, die nicht durch den besagten nicht-amyloidogenen Weg proteolytisch prozessiert werden, sind dadurch potentielle Substrate der Beta-Sekretase (BACE1; „Beta-site APP-cleaving enzyme“) mit einer im Vergleich zu den Alpha-Sekretasen membrandistalen Schnittstelle. Daraus resultieren das lösliche sAPP $\beta$  und die Freilegung des verbleibenden Fragmentes (C99) mit einer etwas größeren Ektodomäne. Die weitere Spaltung des C99-Fragmentes innerhalb der Membran durch den Gamma-Sekretase-Komplex (Präsenilin-1 oder 2-Homodimer, Nicastrin, APH-1, PEN-2) führt zur Bildung des Abeta-Peptides (Annaert et al. 2000). Die einzelnen entstandenen Abeta-Monomere neigen dazu, extra- sowie intrazellulär unlöslich als sogenannte „senile Plaques“ zu aggregieren. Dadurch werden der Zellmetabolismus sowie die interzelluläre synaptische Kommunikation beeinflusst und ein toxischer Effekt auf Neuronen ausgeübt. Dies führt letztlich zum



Zelluntergang (Benilova et al. 2012; Sakono und Zako 2010). Die Mechanismen zur Regulation und Kontrolle des amyloidogenen Wegs sowie des nicht-amyloidogenen Wegs sind nach wie vor nur unzureichend verstanden.



**Abbildung 2: Prozessierung von APP.** Der Ausgangspunkt der verschiedenen, konkurrierenden APP-Spaltungsschritte beginnt hier bildmässig dargestellt. Der Schnitt durch die Alpha- bzw. Beta-Sekretasen erfolgt innerhalb der N-terminalen Ektodomäne. Der Gamma-Sekretase-Komplex spaltet die jeweils entstandenen Produkte anschließend innerhalb der Membran. Nach Prozessierung des APP durch Beta- sowie Gamma-Sekretase entsteht letztlich u.a. das neurotoxische Aβ (unten dargestellt). AICD=„APP-Intracellular-Domain“. Abbildung verändert nach Zhang et al., 2011.

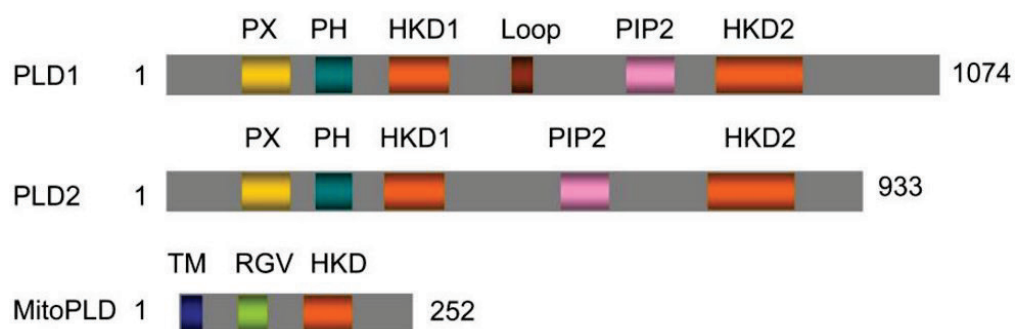
## 1.6 Superfamilie Phospholipase D (EC 3.1.4.4)

Die Phospholipase D3 gehört zur Superfamilie der Typ D-Phospholipasen. Diese Familie setzt sich, neben der PLD3, nach aktuellem Kenntnisstand aus den Mitgliedern Phospholipase D1-D6 zusammen. Die Phospholipasen D charakterisieren und verbinden die Domänen I-IV, welche evolutionär konserviert sind. Dabei scheinen die Motive II und IV von besonderer Bedeutung zu sein, denn sie sind auch zwischen verschiedenen Organismen hoch konserviert (Kolesnikov et al. 2012). Die beiden HKD-Konsensus-Sequenzmotive (HxKxxxD, x=beliebige AS) sind für die potentielle katalytische Enzymaktivität der PLDs essentiell (Abb.3). Entsprechende Gene, die für die jeweiligen Phospholipasen D codieren, finden sich in Pflanzen, Bakterien, Viren und Säugetieren (Jenkins und Frohman 2005). Die Genprodukte zeigen große Sequenhomologien zwischen den verschiedenen Spezies (Banno 2002).

PLD1 und PLD2 sind die bislang am besten untersuchten Familienmitglieder. Sie sind zytoplasmatische Proteine, die über Phosphatidylinositolphosphat (PIP)-bindende Domänen

(PHOX und Pleckstrin) mit Membranen assoziiert sind. Dabei zirkulieren PLD1 und PLD2 zwischen den intrazellulären Kompartimenten. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Phosphatidylcholin, Hauptbestandteil von biologischen Membranen, zu spalten. Es konnte gezeigt werden, dass PLD1 unter „steady-state“-Bedingungen hauptsächlich mit dem Golgi-Apparat, Endosomen/Lysosomen sowie mit Vesikeln des sekretorischen Wegs assoziiert ist. PLD2 ist maßgeblich an der Plasmamembran lokalisiert, wodurch divergierende biologische Funktionen dieser Phospholipasen wahrscheinlich sind (Peng und Frohman 2012). Durch die Generierung von Phosphatidsäure als second-messenger sind sie in wichtigen Zellfunktionen, Signaltransduktionswege und die Vesikelformation involviert. Genetische und biochemische Daten zeigen, dass PLD1 und PLD2 an der Karzinomentwicklung, Neurodegeneration, Thrombozytenaggregation sowie der Gedächtnisbildung beteiligt sind (Su et al. 2009; Saito et al. 2007; Noh et al. 2000; Zhang et al. 2004; Oliveira et al. 2010; Vorland und Holmsen 2008).

PLD6, auch bekannt als mitoPLD, ist mit der äußeren Membran von Mitochondrien assoziiert. Auch PLD6 erfüllt eine katalytische Funktion und hydrolysiert Cardiolipin zur Generierung von Phosphatidsäure und ist damit an der Fusion/Teilung von Mitochondrien sowie an der Spermatogenese beteiligt (Choi et al. 2006; Huang et al. 2011).



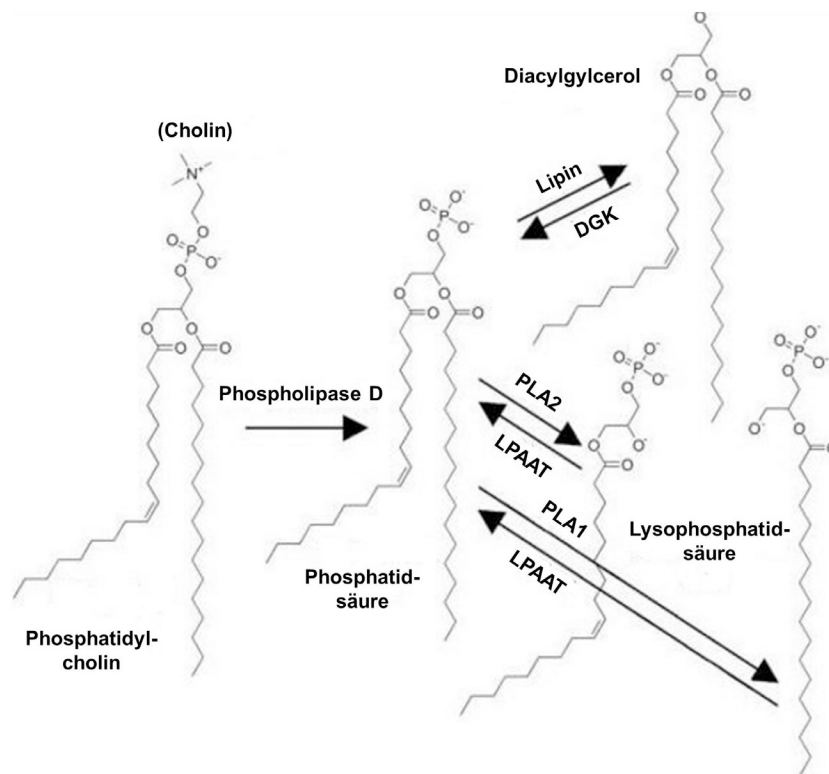
**Abbildung 3: Schematische Darstellung von PLD1, PLD2 und PLD6/MitoPLD.** Ein typisches Charakteristikum aller Mitglieder der PLD-Superfamilie ist das Vorhandensein von HKD-Motiven (HxKxxxxD, x=beliebige AS). Die Bindung von PLD1/PLD2 mit Proteinen und Membranlipiden erfolgt über ihre PX- (PHOX) und PH-Domänen (Pleckstrin). PLD6/MitoPLD ist über eine Transmembrandomäne (TM) mit der äußeren Mitochondrienmembran verankert. Abbildung nach Peng und Frohman, 2012.

Studien bezüglich PLD4 zeigen, dass dieses eine Funktion in der Aktivierung von Mikroglia hat und dadurch deren Phagozytosefunktion beeinflusst. Mikroglia sind in die frühe Entwicklung des ZNS sowie dem Abbau der weißen Substanz unter pathologischen Bedingungen involviert (Otani et al. 2011; Yoshikawa et al. 2010).

## 1.7 Phospholipase D-Aktivität

Um katalytisch als Phospholipasen vom Typ D aktiv zu sein, bedarf es intakter HKD-Motive. Bisher konnte nur für PLD1, PLD2 sowie PLD6 experimentell eine katalytische Aktivität

gezeigt werden (Frohman 2015). Die Hauptreaktion besteht dabei in der Hydrolyse von Phosphatidylcholin, dem häufigsten Phospholipid, zu Phosphatidsäure (PA) sowie freiem Cholin (Abb.4) (Jenkins und Frohman 2005).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung von Phosphatidsäure (PA) durch die Phospholipase D sowie die mögliche enzymatische Konvertierung zu anderen Signallipiden.** Phosphatidylcholin wird durch die PLD zu Phosphatidsäure und freiem Cholin hydrolysiert. Phosphatidsäure kann als Signallipid wirken oder enzymatisch in Diacylglycerol (DAG) und Lysophosphatidsäure (LPA) umgewandelt werden. PLA1/2=Phospholipase A 1/2, DGK=Diacylglycerol-Kinase, LPAAT=Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase. Abbildung verändert nach Frohman, 2015.

H<sub>2</sub>O dient in dieser Reaktion als Nukleophil. In einer alternativen Reaktion können jedoch auch Alkohole dazu genutzt werden, wodurch Phosphatidyl-Alkohole entstehen und die Generierung von PA inhibiert wird (Frohman 2015). PA ist das wesentliche Reaktionsprodukt und Lipid, welches als „second-messenger“ viele weitere Funktionen erfüllt. Die Phosphatidsäure hat eine negativ geladene Kopfgruppe, wodurch Membranen bei hoher lokaler Konzentration in ihrer Krümmung verändert werden können. PA erleichtert dadurch die Fusion von Vesikeln mit ihren jeweiligen Zielmembranen und fördert insgesamt Prozesse der Endozytose/Exozytose (Ammar et al. 2013; Kooijman et al. 2005; Frohman 2015). PA ist an einer Reihe weiterer Signalkaskaden beteiligt und kann als Lipidanker weitere Proteine in diesem Rahmen binden. Beispiele sind die GEF's („guanine nucleotide exchange factor“), SOS und DOCK2, welche wiederum Rac1 und Ras aktivieren (Zhao et al. 2007; Nishikimi et al. 2009; Nishioka et al. 2010). Die Phosphatidsäure ist ein wichtiger Aktivator von mTOR

(„mechanistic/mammalian target of rapamycin“), welches Prozesse der Zellproliferation, Differenzierung und des Zellüberleben reguliert (Foster et al. 2014).

Zur PLD6 wurde eine etwas abweichende chemische Reaktion beschrieben. Zwar entsteht nach enzymatischer Spaltung auch PA, jedoch dient Cardiolipin, Bestandteil der äußeren Mitochondrienmembran, als Substrat. Jüngst wurde auch gezeigt, dass PLD6 als Nuklease von piRNA fungiert (Ipsaro et al. 2012; Nishimasu et al. 2012).

Für PLD3 konnte bislang noch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Osisami et al. 2012).

## 1.8 Phospholipase D3

Die Phospholipase D3 gehört zur Superfamilie der Typ D-Phospholipasen. Das PLD3-Gen, auch als HU-K4 (human) und SAM-9 (murin) synonym beschrieben, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 19 (19q13.2). Es enthält 13 Exons, welche für ein humanes 490-AS (murin 488) großes Glykoprotein, die Phospholipase D3, kodieren. Dabei sind große Abschnitte zwischen verschiedenen Spezies wie Säugetieren, Bakterien und Viren hoch konserviert. Das berechnete Molekulargewicht von h/mPLD3 liegt bei 54 kDa. Genau wie PLD1 und PLD2 beinhaltet die Aminosäuresequenz von PLD3 zwei HxKxxxxD/E (HKD)-Motive mit putativ katalytischer Bedeutung. Eine solche ist bisher für PLD3 jedoch noch nicht beschrieben worden. Eine Studie besagt, dass es sich bei der Phospholipase D3 um ein Typ-2-Transmembranprotein handelt (Munck et al. 2005). Dies bedeutet, dass sich im Falle von PLD3 ein kurzer N-terminaler Abschnitt im Zytosol und der größere C-terminale Teil im Lumen befinden (Abb.5).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der humanen Phospholipase D3. PLD3 ist über eine Transmembran-Region (TM) mit Membranen verankert. Ihre AS-Sequenz beinhaltet zwei charakteristische HKD/E Sequenzmotive, die ihre Familienzugehörigkeit zur Superfamilie der Phospholipasen D begründen.

In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass PLD3 mit Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), einem Marker des ER, kolokalisiert. Daher gilt PLD3 bisher überwiegend als ein Protein, welches maßgeblich im ER lokalisiert ist. In einer weiteren Studie konnten durch M6P(Mannose-6-phosphat)-Rezeptor-Affinitätschromatographie und anschließender Massenspektrometrie mögliche neue lysosomale Proteine identifiziert werden, darunter auch PLD3. Zusätzlich wurde PLD3 mikroskopisch in Kolokalisation mit einem lysosomalen

Markerprotein dargestellt (Sleat et al. 2013). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass die Expression von PLD3 durch einen Transkriptionsfaktor vermittelt wird, welcher die Biogenese und Funktion von Lysosomen reguliert (Palmieri et al. 2011).

Betrachtet man die Expressionslevel der Phospholipase D3 in verschiedenen Organen, so lässt sich feststellen, dass PLD3 in vielen Gewebearten exprimiert wird. Die höchste Expression zeigt sich in neuronalen Zellen (Pedersen et al. 1998; Yoshikawa et al. 2010). PLD3-Gesamt Mengen sind dabei betont in reifen Neuronen des Frontalhirns, außerdem in späten Entwicklungsschritten der Neurogenese der Hippocampusformation sowie des primären somatosensorischen Kortex hochreguliert (Pedersen et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die PLD3-Level in hämatopoetischen Stammzellen hochreguliert sind und PLD3 so an den Mechanismen der Selbsterneuerung beteiligt sein könnte (Kent et al. 2009). Eine funktionelle Rolle von PLD3 in der Myogenese wird zusätzlich diskutiert (Osisami et al. 2012).

In der bislang größten Studie über PLD3 konnte mit Hilfe der Methode des WES („whole exome sequencing“) in der Analyse von 14 unabhängigen LOAD-Familien gezeigt werden, dass genetische Varianten im PLD3-Gen mit der späten Form des Morbus Alzheimer (LOAD) assoziiert sind (Cruchaga et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurden verschiedene entscheidende SNP im PLD3-Gen beschrieben, die zu einem abweichenden Genprodukt führen (u.a. V232M, M6R, A442A). Dabei zeigte sich, dass die Variante PLD3-V232M zur Verdopplung des Risikos, an Morbus Alzheimer zu erkranken, führt. Dies zeigen Daten aus sieben unabhängigen Fall-Kontroll-Studien mit einer Gesamtzahl von über 11.000 Fällen/Kontrollen aus Familien mit überwiegend europäischer Abstammung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von PLD3 die Gesamtmenge sowie die Spaltung von APP und somit extrazelluläre A $\beta$ -Level beeinflusst. Dabei führt die zelluläre PLD3-Überexpression zu einer deutlichen Reduzierung des Amyloid-Precursor-Proteins (Cruchaga et al. 2014). In der Folgezeit erschienen weitere Publikationen, die den Zusammenhang der beschriebenen genetischen Varianten von PLD3 mit der Entstehung der Spätform des M. Alzheimer durch „Next-Generation-Sequencing“ in weltweiten Populationen analysierten. Dabei zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Studien, wobei die Rolle von PLD3-V232M als Alzheimer-Risikofaktor teils bestätigt, teils nicht validiert werden konnte (Zhang et al. 2016; Hooli et al. 2015; van der Lee et al. 2015; Lambert et al. 2015). Eine Studie, die PLD3 im „Neuroimaging“ mittels FDG-PET (F18-Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie) sowie MRT (Magnetresonanztomographie) analysiert, zeigt eine Verbindung von PLD3-Genvarianten mit charakteristischen Veränderungen in der neuronalen Bildgebung beim M. Alzheimer (Wang et al. 2016).

Eine weitere Studie thematisiert die Histopathologie der Gehirne von Alzheimer-Patienten. Dabei konnte akkumuliertes PLD3 als Teil der extrazellulären Amyloid-Plaques neurohistologisch dargestellt werden (Satoh et al. 2014). Eine direkte oder indirekte Funktion von PLD3 in der Regulation von APP, des amyloidogenen Wegs und der damit verbundenen dementiellen Neurodegeneration ist anzunehmen.

## 2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Phospholipase D3 biochemisch zu charakterisieren und den möglichen Einfluss von PLD3 auf das Amyloid-Precursor-Protein zu analysieren. Das initiale Interesse an diesem Protein führte auf eine Publikation zurück, die zeigt, dass genetische Varianten von PLD3 das Risiko der Entstehung der Spätform des M. Alzheimer signifikant erhöhen (Cruchaga et al. 2014). Zu Beginn der Arbeit gab es kaum biochemische oder molekularbiologische Daten bezüglich PLD3. Eine ältere Studie beschreibt PLD3 als Typ2-Transmembranprotein und zeigt eine Assoziation mit dem ER (Munck et al. 2005). Neuere Studien zeigen eine mikroskopische Kollokalisierung mit lysosomalen Markerproteinen und eine Verbindung von PLD3 mit den Mechanismen der lysosomalen Biogenese (Sleat et al. 2013; Palmieri et al. 2011).

Durch weiterführende Experimente sollte die zelluläre Lokalisation in dieser Arbeit beschrieben und PLD3 als lysosomales Protein bestätigt werden. Außerdem sollten erste Erkenntnisse bezüglich der zellulären Sortierung von PLD3 gewonnen und der Glykosylierungsstatus analysiert werden. Zu Beginn der Arbeit gab es noch keine kommerziellen anti-PLD3-Antikörper, daher wurde für die anfänglichen Experimente PLD3 exprimiert, welches zuvor mit unterschiedlichen Fluorezenztags fusioniert wurde. Im späteren Verlauf der Arbeit und zur spezifischen Detektion von PLD3 sollte ein neuer N-terminaler anti-PLD3-Antikörper mehreren Testphasen unterzogen und schlussendlich etabliert werden. In einer weiteren Studie wurde PLD3 in Zusammenhang mit dem Retromer-Komplex gebracht (Breusegem und Seaman 2014). Eine mögliche Verbindung sollte auf mikroskopischer Ebene gezeigt werden, da der Retromer einen potentiellen Interaktionspartner von PLD3 darstellt. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung von PLD3 war ein weiteres Ziel, eine mögliche proteolytische Prozessierung von PLD3 nachzuweisen. Proteolytisch entstandene Fragmente sollten neu beschrieben und weiterhin analysiert werden, welche Proteasen an der Prozessierung von PLD3 beteiligt sein könnten und in welchen Kompartimenten diese lokalisiert ist. PLD1, PLD2 und PLD6 sind als Mitglieder der Superfamilie Phospholipase D enzymatisch aktiv (Frohman 2015). In dieser Arbeit sollte daher ein PLD-Enzymassay etabliert werden, der eine potentielle Aktivität für PLD3 nachweisen kann, wobei eine mögliche pH-Abhängigkeit berücksichtigt wird. Des Weiteren wurde eine PLD3-Knockoutmaus generiert. Es war von Interesse, ob der *PLD3*-Genknockout oder die zelluläre PLD3-Überexpression einen Einfluss auf das Amyloid-Precursor-Protein sowie auf dessen teils zelltoxische Spaltprodukte hat. In diesem Zusammenhang sollte auch die murine Variante der bedeutendsten PLD3-Patientenmutation kloniert und auf mikroskopischer Ebene analysiert werden.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Bei den verwendeten Chemikalien handelt es sich, soweit nicht anders vermerkt, um analysenreine Substanzen der Firma Carl Roth oder Sigma Aldrich.

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
6x DNA-Ladepuffer	Thermo Scientific
Agarose	Lonza
Ampicillin	Melford
Kanamycin	Melford
cOmplete protease inhibitor cocktail	Roche
DMEM	PAA Laboratories GmbH
dNTP-Mix, 2 mM	Fermentas
ECL-Lösung	Lumigen
Fötales Rinder Serum (FBS)	Biochrom GmbH
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
NuPAGE BIS-TRIS Pre-Cast Gel	Thermo Scientific
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Scientific
Mowiol	EMDBioscience
PageRuler Plus Presained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
Pipes	BDH Laboratory Supplies
Polythylenimin PEI Max	Polysciences
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH
G418 Gentamicin (100mg/mL)	InvivoGen
Bafilomycin A	Calbiochem / Merck
Pepstatin A	Non-Vendor
Pepstatin A Methyl-Ester	Non-Vendor
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich
E64D	Enzy Life
NH <sub>4</sub> HCl	Non-Vendor
ZLL-Keton	Sigma-Aldrich
Inhibitor X	Calbiochem / Merck

#### 3.2 Geräte

<b>Gerätename</b>	<b>Funktion</b>	<b>Hersteller</b>
Sub-Cell GT cell	Elektrophoresekammer	BIO RAD
Gel Jet Imager UV	Agarosegel-Kamera	Intas
Heraeus B 6760	Brutschrank	Heraeus Instruments



<b>Gerätename</b>	<b>Funktion</b>	<b>Hersteller</b>
ImageQuant LAS-4000	Kamera-Chemolumineszenz	GE Healthcare
Kern-770	Feinwaage	Kern
L420P	Feinwaage	Sartorius
Multifuge 3 SR+	Zentrifuge	Thermo Scientific
J2 HS	Zentrifuge	Beckman
Fluoview FV1000	Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Olympus
CKX-41	Lichtmikroskop	Olympus
NN-E245W	Mikrowellenherd	Panasonic
Synergy HT Multi Mode	Photometer/Microplate Reader	BioTek
	PCR Cyclers	
Thermal Cycler 2720	PCR Cyclers	Applied Biosystems
FlexCycler2	PCR Cyclers	Analytik Jena
Digital-pH-Meter 646	pH-Meter	Krick
AccuJet Pro	Pipet-Boy	Brand
Pipetman 10/50/1000	Pipette	Gilson
Research Plus 20	Pipette	Eppendorf
MilliQ Plus	Reinstwasseranlage	Millipore
KL2	Schüttler	Edmund Bühler GmbH
Mini Protean II	SDS-PAGE-Kammer	BIO RAD
Herasafe	Sterilbank	Heraeus Instruments
Power Pac 200/300	Stromquelle	BIO RAD
Thermomixer 5436	Thermomixer	Eppendorf
Centrifuge 5415 R	Tisch-Kühlzentrifuge	Eppendorf
Optima TLX	Tisch-Ultrazentrifuge	Beckman
Centrifuge 5415	Tisch-Zentrifuge	Eppendorf
Micor Star 17	Tisch-Zentrifuge	VWR
Universal 32	Tisch-Zentrifuge 15-50 mL	Hettich
RM5	Tischrollator	Karl Hecht KG
Sonifier 450	Ultraschallgerät	Branson
Vortex-Genie	Vortexer	Bender&Hobein
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Semi-Dry Elektrophorese- Kammer	BIO-RAD
Potter	Glashomogenisator	Gemini

### 3.3 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
DpnI	Thermo Scientific
HindIII	Thermo Scientific
N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche
Endoglykosidase H (Endo H)	Roche

Enzym	Firma/Hersteller
Pfu-DNA-Polymerase	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
XbaI	Thermo Scientific
EcoRI	Thermo Scientific
BamHI	Thermo Scientific
BspEI	Thermo Scientific
KpnI	Thermo Scientific

### 3.4 Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Wirtspezies	Hersteller	WB [c]	IF [c]
$\alpha$ -Cathepsin D	KIIS10	Kaninchen	Selbsterst.	1:1000	1:200
$\alpha$ -early endosomal antigen 1	EEA1	Maus	BD BioSciences		1:300
$\alpha$ -FLAG	M2	Maus	Sigma	1:1000	1:500
$\alpha$ -GAPDH	FL-335	Kaninchen	Santa Crus	1:1000	
$\alpha$ -GFP		Maus	Roche	1:2000	
$\alpha$ -Hämagglutinin	3F10	Ratte	Sigma	1:1000	
$\alpha$ -LAMP1 (murin)	1D4B	Ratte	Santa Crus	1:1000	1:50
$\alpha$ -LAMP2 (human)	H4B5	Maus	Santa Crus	1:250	1:50
$\alpha$ -PLD3 N-term	PLD3 T1-3	Kaninchen	PINEDA	1:2000	1:100
$\alpha$ -PLD3 C-term	HPA012800	Kaninchen	SIGMA	1:1000	1:100
$\alpha$ -APP C-term	B63.3	Kaninchen	Selbsterst.	1:1000	
$\alpha$ -BACE-1	D10E5	Kaninchen	Cell Signal.	1:1000	
$\alpha$ -mCherry	ACY24904	Kaninchen	Biovision	1:250	
$\alpha$ -LIMP2	LIMP2 T2	Kaninchen	PINEDA	1:2000	1:500
$\alpha$ -KDEL	10C3	Maus	Abcam		1:200
$\alpha$ -Maus/Ratte/Kaninchen-IgG-Fc	POD	Schaf	Santa Crus	1:10000	
$\alpha$ -Kaninchen-IgG-Fc	Alexa Fluor-488	Ziege	Invitrogen		1:500
$\alpha$ -Maus/Ratte/Kaninchen-IgG-Fc	Alexa Fluor-594	Ziege	Invitrogen		1:500

Zu Beginn der Arbeit wurde ein anti-PLD3-Antikörper gewonnen. Dafür wurde die Firma Pineda beauftragt, im regelmäßigen Abstand von 30 Tagen insgesamt drei Kaninchen mit einem N-terminalen Peptidfragment von mPLD3 zu immunisieren.

30 Tage nach der ersten Immunisierung und anschließend im regelmäßigen Abstand von vier Wochen wurden der AG Damme Seren der drei Kaninchen zugesandt. Diese wurden anschließend auf Qualität und Spezifität der jeweils gebildeten anti-PLD3-Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sowie im Western Blot getestet. Diese Testphase dauerte bis

Tag 180 nach der ersten Immunisierung. Danach wurde den Kaninchen Blut entnommen und anti-PLD3-Antikörper seitens Pineda nach Affinitätsaufreinigung gegen das Immunisierungspeptid gewonnen.

### 3.5 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
13mm Deckgläschen	Assistent
96-well Mikrotiterplatte	Sarstedt
Handschuhe (Latex/Nitril)	Carl Roth
Nitrozellulose Membran	Carl Roth
Objekträger	Menzel-Gläser
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten	Assistent
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5/2,0 mL)	Eppendorf
Schraubdeckel-Röhrchen (15/50 mL)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5/10/25/50 mL)	Sarstedt
Ultrazentrifugen Gefäße 1,5 mL	Beckman Coulter
Whatman-Papier	Schleicher&Schuell
Zellkulturplatten (6well, 6/10 cm)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
96-well Mikrotiterplatte schwarz	Thermo Scientific Nunc

### 3.6 Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
Amplex Red Phospholipase D Assay Kit	Molecular Probes / Invitrogen
Pierce BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific
Gene Jet Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
High Pure PCR Purification Kit	Roche
Pure Yield Plasmid Midiprep System Miniprep	Promega

### 3.7 Zelllinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zelltyp</b>
HeLa	Humane Epithelzellen - Zervixkarzinom (DMSZ Braunschweig)
HEK293T	Humane embryonale Nierengewebszellen (DKFZ, Heidelberg)
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
N2a	Murine Neuroblastoma-Zellen (Olmsted et al. 1970)
MEF PLD3 +/+	Murine embryonale Fibroblasten / eigene Zucht
MEF PLD3 +/-	Murine embryonale Fibroblasten / eigene Zucht

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zelltyp</b>
MEF PLD3 -/-	Murine embryonale Fibroblasten / eigene Zucht
SH-SY5Y	Neuroblastom, human, Subklon von SK-N-SH (Biedler et al. 1973; Ross et al. 1983)
COS-7	Nieren-Fibroblasten, Affe
N2a APP	Murine Neuroblastom-Zellen (Olmsted et al. 1970) stabile Überexpression von Wildtyp-APP
N2a APP SWE	Murine Neuroblastom-Zellen (Olmsted et al. 1970) stabile Überexpression von APP KM670/671NL („swedish“)

### 3.8 Software

<b>Programm</b>	<b>Funktion</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
Fluo View 1000 ASW 3.0	Steuerung konfokales Fluoreszenzmikroskop	Olympus
FinchTV	Basensequenzanalysen	Geospiza
Gen5	Steuerung Multiplate Reader	BioTek
ImageJ	Densitometrische Analyse von Western Blots	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
MS-Office	Datenverarbeitung	Microsoft
Eukaryotic Linear Motif Resource	Sequenzanalyse von Proteinen	<a href="http://elm.eu.org/">http://elm.eu.org/</a>
Universal Protein Resource Database	Sequenzdatenbank	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
Citavi 5	Literaturverwaltung	Swiss Academic Software
GraphPad Prism	Western Blot-Quantifizierung und Statistik	GraphPad Software

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Erzeugung chemisch kompetenter E.coli

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde die Methode der chemisch kompetenten Transformation eingesetzt. Dafür wurden dam(desoxy-adenosin-methylase)-positive E.coli XL1-Blue verwendet. Die vorbereitende Vermehrung der Bakterien gestaltet sich folgend:

Chemisch kompetente E.coli XL1-Blue wurden in 5 mL LB-Medium suspendiert, 20 µg/µL Tetracyclin hinzugegeben und die Bakterien anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 40 mL LB-Medium (+20 µg/µL Tetracyclin) mit 1 mL der über Nacht erzeugten Kulturen beimpft und solange kultiviert, bis nach densitometrischer Messung eine OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 entstanden war. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 15 Minuten bei 5000g in der Kühlzentrifuge (4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in 2 mL der unten beschriebenen CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Es folgte eine weitere einstündige Inkubation auf Eis. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C mit 5000g für 10 Minuten wurde der Überstand erneut verworfen und das verbliebene Pellet wiederum in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einem folgenden, einstündigen Inkubationsschritt auf Eis wurde der Lösung 500 µL 86% Glycerin hinzugefügt. Durch Vortexen wurde die entstandene Suspension gründlich gemischt und nachfolgend zu je 50 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Zur späteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

<b>CaCl<sub>2</sub> Lösung</b>	<b>TBS-Puffer</b>
5 mM Tris-HCl (pH 7,0)	5 mM Tris-HCl (pH 7,0)
5 mM MgCl <sub>2</sub>	5mM MgCl <sub>2</sub>
100 mM CaCl <sub>2</sub>	100 mM NaCl
Sterilisation	Sterilisation

#### 4.1.2 Chemisch kompetente Transformation

Bei -80°C eingefrorene chemisch kompetente E.coli XL1-Blue wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit 5 µL der gewünschten Plasmid-DNA versetzt, behutsam durch Pipettieren gemischt und 30 Minuten von Eis umschlossen inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Reaktionsgefäße bei 42°C für 1 Minute im Schüttler bei leichtem Gang geschüttelt. Danach folgte eine erneute Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Anschließend wurden den Reaktionsgefäßen 300 µL vorgewärmtes LB-Medium

hinzugegeben und 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Kulturschalen ausplattiert. Nach der anschließenden Inkubation im 37°C-Brutschrank über Nacht enthielten die Schalen Einzelkolonien, die für die weitere Mini- oder Midi-Präparationen verwendet werden konnten.

#### 4.1.3 Plasmidpräparation

Zum Erhalt von aufgereinigter Plasmid-DNA im Mini- oder Midi-Maßstab wurden die Plasmide nach der chemisch kompetenten Transformation in E.coli XL1-Blue weiter präpariert. Dazu wurden entsprechende Einzelkolonien der Kulturschalen steril angepickt und anschließend ein LB-Antibiotika-Medium damit beimpft (Minipräp 3 mL im Glasröhrchen; Midipräp 150 mL im Erlenmeyerkolben). Am Folgetag wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA aus dem Pellet mit passenden Kits („GeneJet Plasmid Miniprep Kit / Thermo Scientific“ bzw. „PureYield Plasmid Midiprep Kit / Promega“) den Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt.

#### 4.1.4 Klonierung

Zur Erzeugung von Plasmid-DNA-Konstrukten wurde sich der Methodik der Klonierung von cDNA bedient. Im Folgenden soll diese Methodik exemplarisch anhand des Beispiels der Klonierung von mPLD3 in den Vektor pcDNA 3.1 aus dem Plasmid-DNA-Konstrukt 3xFLAG-mPLD3 (im Vektor pcDNA 4 / aus Vorarbeiten der AG Damme) erläutert werden.

#### Polymerase-Ketten-Reaktion

Um cDNA gezielt amplifizieren zu können, wurde die etablierte Methodik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Generell wurden zur Herstellung der gewünschten humanen und murinen Konstrukte 3xFLAG-mPLD3 sowie hPLD3-crmCherry (freundlich zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Peter Lobel, „Department of Biochemistry and Molecular Biology, Robert Wood Johnson Medical School“, USA) als Matrizen verwendet. Zur Durchführung der PCR und DNA-Amplifikation wurden passende Primer generiert. PCR-Reaktionsansatz sowie Programmierung des PCR-Cyclers waren wie folgt:

<b>PCR-Reaktionsansatz</b>	
ddH <sub>2</sub> O	34 µL
10x Pfu Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> )	5 µL
dNTP-Mix ( 2µM)	4 µL
DMSO	2,5 µL
cDNA (z.B. 3xflag-mPLD3)	20 ng
fwd-Primer (20 µM)	1 µL
rev-Primer (20 µM)	1 µL
Pfu-DNA-Polymerase	0,5 µL

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
mPLD3_EcoRI_C-mCherry	GTATGAATTCATGAAGCCCAAAC
mPLD3_BamHI_C-mCherry	GTAGGGATCCGGAAGCAGGCGGC
mPLD3_BspEI_N-mCherry	GTATTCCGGAATGAAGCCCAAAC
mPLD3_EcoRI_N-mCherry	GTAGGGAATTCGTTAAAGCAGGC
hPLD3_EcoRI_C-mCherry	GTATGAATTCATGAAGCCTAAACTGATGTACCA
hPLD3_BamHI_C-mCherry	GTAGGGATCCGGGAGCAGGCGGCAGGCGTTG CCCA
hPLD3_BspEI_N-mCherry	GTATTCCGGAATGAAGCCTAAACTGATGTACCA
hPLD3_HindIII_N-mCherry	GTAGGAAGCTTCCTCAGAGCAGGCGGCAGGC GTTGC
mPLD3_XbaI_N-HA	GATCTCTAGATCAAAGCAGGCGGCAGGCATT
mPLD3_KpnI_pcDNA3.1_untag	CCGTATGGTACCATGAAGCCCAA
hPLD3_XbaI_N-HA	GATCTCTAGATCAGAGCAGGCGGCAGGCGTT
hPLD3_HindIII_pcDNA3.1_untag	GTATAAGCTTATGAAGCCTAAAC

<b>Reaktionsphase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	94° C	5 min	x1
Denaturierung	94° C	30 sec	x35
Primer-Hybridisierung	55° C	30 sec	
Elongation	72° C	5 min	
Elongation	72° C	7 min	x1
Kühlung	4° C	∞	Stop

Anschließend wurde den PCR-Produkten Ladepuffer hinzugefügt und diese über ein 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht, die Größe durch den Vergleich mit einem Marker identifiziert und die Banden ausgeschnitten. Danach wurden die Produkte über das „High Pure PCR Product Purification Kit“ nach Herstellerangabe isoliert.

### **Restriktionsverdau**

Um DNA-Doppelstränge an den gewünschten Stellen zusammenfügen zu können, müssen die PCR-Produkte und eingesetzten Vektoren zuvor durch einen Restriktionsverdau durch Endonukleasen an palindromischen Sequenzabschnitten geschnitten werden. Der Reaktionsansatz war dabei wie folgt:

<b>Reaktionsansatz</b>	<b><i>mPLD3</i></b>	<b><i>pcDNA 3.1 / +Hygro</i></b>
<b>PCR-Produkt</b>	45 µL	-
<b>Vektor</b>	-	3 µg
<b>XbaI</b>	2 µL	2 µL
<b>KpnI</b>	2 µL	2 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	0,5 µL	18,5 µL
<b>Puffer BamHI</b>	6 µL	3 µL

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C für zwei Stunden inkubiert und verdaut. Danach folgte die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze über ein 1,5% Agarosegel. Unter UV-Durchleuchtung wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und anschließend wie beschrieben isoliert. Der jeweilige DNA-Gehalt wurde folgend am Microplate Reader bei 280 nm photometrisch quantifiziert.

### **Ligation**

In diesem Folgeschritt wurde die cDNA des gewünschten Proteins mit dem Vektor ligiert. Dabei werden die komplementären Einzelstrang-Überhänge über Bildungen von Phosphodiester verbunden. Zur Katalyse dieser Reaktion wurde die T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Reaktionsansatz gestaltete sich folgendermaßen: Insgesamt wurden 40 ng Vektor (Restriktionsverdau-Produkt) eingesetzt und diesem das entsprechende „Insert“ (mPLD3, siehe oben) im molaren Verhältnis von 1:3 hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung mit 1 µL Ligase-Puffer sowie 1 µL T4 DNA-Ligase versetzt. Die folgende Inkubation fand bei 16 °C über Nacht im Wasserbad statt. Am Folgetag wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten deaktiviert und 4 µL des Ligationsproduktes, wie methodisch beschrieben, in chemisch kompetente E.coli XL1-Blue transformiert. Das bakteriell amplifizierte Plasmid-DNA-Konstrukt wurde aus den Einzelkolonien isoliert und die korrekte Ligation/Generierung des gewünschten Konstrukts durch die Sequenzierung mit passenden Primern (z.B. T7, BGH) bestätigt.

#### **4.1.5 Gezielte Erzeugung von Mutationen durch gerichtete Mutagenese**

Zur gezielten Genmutation mit Biosynthese der gewünschten Proteine (z.B. mPLD3-Y7A, mPLD3-V230M) wurden Mutagenese-PCR durchgeführt. Dafür wurden passende Mutagenese-Primer kreiert und eingesetzt. Als DNA-Matrize/„Template“ dienten mPLD3 sowie mPLD3-mCherry. Der PCR-Reaktionsansatz und die Cycler-Programmierung gestalteten sich wie folgt:



---

**PCR-Reaktionsansatz**

---

10x Pfu-Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> )	5 µL
2 mM dNTP-Mix	6,25 µL
DMSO	2,5 µL
DNA-Matrize	80 ng
20 µM fwd-Primer (20 µM Lösung, 250 ng)	1 µL
20 µM rev-Primer (20 µM Lösung, 250 ng)	1 µL
Pfu-Polymerase	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	32 µL

---

---

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
mPLD3-N97A_fwd	GTTGCTCGTGGTGGCAGCGGGAAACTCCAGACCC
mPLD3-N97A_rev	GGGTCTGGAGTTTCCCGCTGCCACCACGAGCAAC
mPLD3-N102A_fwd	GGCTAGTGGAGGGGGCGCTCGTGGTGGCAT
mPLD3-N102A_rev	ATGCCACCACGAGCGCCCCCTCCACTAGCC
mPLD3-N132A_fwd	CTTGCGTGTGGGTGTCAGCATTGTGAGGGTCCAGTAGAA
mPLD3-N132A_rev	TTCTACTGGACCCTGACAAATGCTGACACCCACACGCAAG
mPLD3-N234A_fwd	GCGAGGCAGCTGCAGGCGTACATGACCACGCC
mPLD3-N234A_rev	GGCGTGGTCATGTACGCCTGCAGCTGCCTCGC
mPLD3-N385A_fwd	ATGTCGGAGTGAGTATGGGCGTCATGAAGTGCAGCCAG
mPLD3-N385A_rev	CTGGCTGCACTTCATGACGCCATACTCACTCCGACAT
mPLD3-Y7A_fwd	GCACCTTCAGCTCCTGGGCCATCAGTTTGGGCTTCA
mPLD3-Y7A_rev	TGAAGCCCAAAGTATGGCCAGGAGCTGAAGGTGC
mPLD3-V230M_fwd	CAGTTGTACATGACCATGCCAGCTCCTTGACC
mPLD3-V230M_rev	GGTCAAGGAGCTGGGCATGGTCATGTACAAGTGC

---

---

<b>Reaktionsphase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	94° C	3 min	x1
Denaturierung	94° C	1 min	 x12
Primer-Hybridisierung	55° C	1 min	
Elongation	68° C	15 min	
Kühlung	4° C	∞	Stop

---

Nach der PCR wurde die DNA mit dem „High Pure PCR Purification Kit“ der Firma Roche aufgereinigt und das Produkt in chemisch kompetente Bakterien transformiert. Am Folgetag wurde die amplifizierte DNA (z.B. mPLD3-V230M im Vektor pcDNA3.1/+Hygro) durch eine „Minipräp“ aus Einzelkolonien isoliert und die Nukleotidsequenz mittels Sequenzierung durch die Firma „GATC Biotech“ ausgelesen. Nach der elektronischen Übermittlung wurden die Sequenzen analysiert und geprüft, ob die gerichtete Mutagenese erfolgreich war.

## 4.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Haltung und Passage von Zellkulturen

Die Zelllinien wurden in Zellkultur-Petrischalen, welche DMEM-Zellkulturmedium enthielten, im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) kultiviert. Zur Passage und zur Entfernung von Mediumresten wurden die Zelllinien mit 5 mL Phosphatpuffer gewaschen. Zur Ablösung der adhären Zellen vom Boden der Petrischale wurden diese mit 1 mL Trypsin/EDTA versetzt und ca. 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Je nach gewünschter Teilung wurde ein entsprechendes, zellhaltiges Volumen in frisches Zellkulturmedium gegeben und in neue Petrischalen ausgesät. Einzig die N2a-Zellen, welche APP-WT / APP-K670M/N671L stabil exprimieren, wurden zur Selektion zusätzlich mit G418 (100mg/mL) in der Konzentration 2 µL/mL Medium versetzt.

<b>Zellkulturmedium</b>	<b>Phosphatpuffer (PBS)</b>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	137 mM NaCl
1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	2,7 mM KCl
10 % (v/v) Fötale Rinderserum (FBS)	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	dH <sub>2</sub> O (pH 7,4)

### 4.2.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zelllinien

Zum Kryokonservieren der Zellkulturen wurden diese mit Trypsin/EDTA abgelöst, in 15 mL Spitzröhrchen passagiert und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in Einfriermedium resuspendiert, in Kryogefäße überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Kryogefäße in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zur Reaktivierung von eingefrorenen Zellen wurden diese zügig in vorgewärmtem Zellkulturmedium durch Pipettieren aufgetaut. Die Zellen wurden danach in 15 mL Spitzröhrchen überführt, welche mit warmem Zellkulturmedium (10 mL) befüllt waren. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 g. Das erhaltene Pellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen in Zellkultur-Petrischalen ausgesät.

<b>Einfriermedium</b>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin
20 % (v/v) Fötale Rinderserum (FBS)
10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

### 4.2.3 Transfektion mit PEI (Lipofektion)

Die Zellen wurden in der Petrischale bis zu einer Konflueszenz von 70% kultiviert. Das zur Transfektion ausgewählte Plasmid wurde in DMEM gelöst und mit einem entsprechenden Volumen Polyethylenimin (PEI, 1 µg/µL in ddH<sub>2</sub>O) versetzt. Nach Mischung durch Pipettieren wurde die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, mit frischem Zellkulturmedium versehen und das Transfektionsgemisch hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen im CO<sub>2</sub>-Brutschrank für 24-48 Stunden inkubiert. Danach wurden Zelllysate gewonnen oder die Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendet.

	DMEM	Plasmid-DNA	PEI
6-well-Platte	100 µL	1 µg	2,5 µg
10 cm Petrischale	300 µL	4 µg	10 µg

### 4.2.4 Gewinnung von PLD3-Knockout-MEF

Zur Gewinnung von PLD3-Knockout-MEF (Murine Embryonale Fibroblasten) wurden im Vorwege Mäuse vom Genotyp PLD3 +/- durch die AG Damme gekreuzt. Dem zu erwartenden Erbgang folgend sollten Embryonen der Genotypen PLD3 +/+, PLD3 +/- und PLD3 -/- entstehen.

Nach Entnahme der Embryonen wurden diese in 6 cm Petrischalen gegeben, mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und präpariert. Dabei wurden die Köpfe für eine spätere Genotypisierung in 1,5 mL Reaktionsgefäße auf Eis gegeben. Die Körper wurden in 3 cm - Petrischalen gelegt und bestmöglich manuell zerkleinert. Anschließend wurden die Körper mit 2 mL Trypsin/EDTA bedeckt und für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Folgend wurde das Gewebe in 15 mL Spitzröhrchen überführt, in welche bereits 12 mL vorgewärmtes Zellkulturmedium (DMEM, 10%FCS, Penicillin / Streptomycin) vorgelegt wurde. Danach wurden die Röhrchen für drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (200 g). Die Überstände wurden verworfen, die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend zur Kultivierung in 10 cm Petrischalen ausgesät. Nach einigen Passagen wurden die Zellen durch die Transfektion mit SV40 T-Antigen immortalisiert.

Insgesamt wurden Zellen aus 12 Embryonen gewonnen und deren Genotypen durch die AG Damme bestimmt. Die Zellen wurden eingefroren und zusätzlich jeweils eine Zelllinie MEF PLD3 +/+, MEF PLD3 +/- sowie vier weitere MEF PLD3-Knockout-Zelllinien für nachfolgende Experimente kultiviert.

#### 4.2.5 Gewinnung von Zelllysaten

Das Zellkulturmedium wurde dekantiert und die Zellen zweifach mit kaltem PBS, auf Eis gelagert, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS / „cOmplete Protease Inhibitor“ benetzt und mit einem Zellschaber von ihrem Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde danach in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert (1000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig, je nach Größe, mit 50-100 µL Lysepuffer versetzt. Es folgte die Sonifikation (jeweils 3 Mal für 20 Sekunden) der Zellen und eine anschließende Inkubation für eine Stunde auf Eis. Durch Zentrifugation bei 4°C und 15000 g mit einer Dauer von 15 Minuten wurde der Zelldetritus pelletiert und der proteinhaltige Überstand sorgfältig in einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß gesammelt.

---

##### Lysepuffer

---

Phosphatpuffer (PBS)

cOmplete Protease Inhibitor Cocktail

1% (v/v) Triton-X100

---

#### 4.2.6 Gewinnung von Organextrakten

Zur Analyse von Organen, wie z.B. der PLD3-Knockoutmaus-Gehirne, im Western Blot mussten diese nach Entnahme homogenisiert und weiter verarbeitet werden. Nach dem Abwiegen der Organe wurde diesen jeweils 9 (v/w) TBS / „cOmplete Protease Inhibitor“ hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend, auf Eis lagernd, mit dem Potter homogenisiert und mit Triton X-100 bis zu einer Konzentration von 1% versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit zwischenzeitlichem Vortexen. Danach wurden die Proben drei Mal für 20 Sekunden auf Eis sonifiziert, in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (14000 rpm). Der Überstand wurde gesammelt, der Proteingehalt photometrisch quantifiziert und die Proben bei -20°C eingefroren oder direkt für weitere Analysen eingesetzt.

#### 4.2.7 Membranfraktionierung

Durch die Membranfraktionierung werden lösliche Proteine und Membranproteine voneinander separiert. Nach der Fraktionierung können die entsprechenden Fraktionen im Western Blot analysiert werden.

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden die HeLa-Zellen, nach dem Lösen von den Zellkulturschalen, mit einem Puffer versetzt, der wie folgt zusammengesetzt war:

---

**Pufferzusammensetzung**

---

25 mM Tris-HCl (pH 7,8)

0,5 mM EDTA

cOmplete Proteaseinhibitor (1 Tbl./50 mL)

---

Zur Zelllyse wurden die, im Puffer gelösten, Zellen 4-mal abwechselnd in Trockeneis gefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen für 10 Sekunden sonifiziert. Danach folgte eine Zentrifugation (4°C, 1000 g) mit einer Dauer von 10 Minuten. Vom Überstand (=Lysat) wurden 100 µL entnommen und mit Triton X-100 (Endkonzentration 1%) versetzt. Der restliche Überstand wurde anschließend in der gekühlten Ultrazentrifuge bei 186 000 g für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entnommen. Dieser stellt die lösliche Proteinfraction dar und wurde ebenfalls, analog zum Lysat, mit Triton X-100 versetzt. In dem verbliebenen Pellet befinden sich die Zellorganellen / Membranproteine. Zur noch gründlicheren Fraktionierung wurde das Pellet in Puffer gelöst und folgend erneut für eine Stunde bei 186 000 g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in Puffer gelöst und ebenfalls mit Triton X-100 (Endkonzentration 1%) versetzt. Nach Proteinquantifizierung, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting wurden die Proben analysiert.

### **4.3 Biochemische Methoden**

#### **4.3.1 Proteinbestimmung von Zelllysaten und Organextrakten**

Die Zelllysate und Organextrakte wurden je nach optischer Dichte im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt, um photometrisch im optimalen Bereich detektiert werden zu können. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ von „Thermo Scientific“ durchgeführt. Als Standard diente eine Eichreihe, die Albumin (BSA) in unterschiedlicher, bekannter Konzentration beinhaltet. 10 µL der verdünnten Proben wurden in Doppelbestimmungen mit dem Reaktionsreagenz gemischt und anschließend für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Reaktion zeigt sich in einem Umschlag des Indikatorfarbstoffs, wobei die Farbintensität von der Proteinkonzentration der Proben abhängig ist. Die Extinktion wurde photometrisch im Microplate-Reader bei 562 nm gemessen. Im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Standardwerten konnte der Proteingehalt der Proben quantifiziert werden.

#### **4.3.2 SDS-PAGE und Western Blot**

Zur Auftrennung von Zelllysaten bzw. Organextrakten wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Diese erfolgt in einem

diskontinuierlichen SDS-Gel. Zu Beginn wurde ein Trenngel in eine passende Halterung gegossen und dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und der obere Rand mit dH<sub>2</sub>O kurz gespült. Anschließend wurde eine Sammelgel-Schicht über dem Trenngel gegossen und Kämme in das System gesteckt, um nach der Sammelgel-Polymerisation Taschen für die Proben zu erhalten. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit dem „Mini-Protein SDS-PAGE System“ von „BioRad“ in SDS-PAGE Laufpuffer durchgeführt.

Die unverdünnten Proben wurden mit der entsprechenden Menge 5x-Probenpuffer (Lämmli) versehen und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 20 µg Proteine der jeweiligen Lysate für die Separierung eingesetzt. Anschließend wurden die Proben und der Marker in die Taschen des Sammelgels pipettiert und die Auftrennung bei 80 V gestartet. Nachdem die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Auftrennung bei 120 V fortgeführt.

<b>Reagenzien</b>	<b>12,5 % Trenngel (1x = 10 mL)</b>	<b>5 % Sammelgel (2x = 5 mL)</b>
ddH <sub>2</sub> O	3,1 mL	3,425 mL
Trenn- / Sammelgelpuffer	2,6 mL	0,675 mL
30% Polyacrylamid	4,2 mL	0,875 mL
10 % APS	60 µL	30 µL
TEMED	30 µL	15 µL

<b>Trenngelpuffer</b>	<b>Sammelgelpuffer</b>	<b>10x SDS-PAGE Laufpuffer</b>	<b>5x-Probenpuffer (Lämmli)</b>
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	500 mM Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM Tris-HCl	625 mM Tris-HCl (pH 6,8)
0,4 % (w/v) SDS	0,4 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	10 % (w/v) SDS
		1,92 M Glycin	50 % (v/v) Glycerol
			5 % (v/v) 2- Mercaptoethanol
			Bromphenol-Blau

Für einige Experimente wurden zur besseren Auftrennung von Fragmenten mit geringem Molekulargewicht „NuPAGE Bis-Tris Pre-Cast Gele (4-12%)“ mit passendem „NuPAGE“ Puffer, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet. Nach der Auftrennung der Proben im Gel fand die Übertragung („Blotting“) der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran statt. Die Gele und Membranen wurden dazu in „Semi-Dry“ Elektrophorese-Kammern bei 65 mA/Membran für 2 Stunden geblottet. Danach wurden die Membranen für 60 Minuten in Blotto inkubiert und zur Detektion der Proteine mit dem gewünschten Primär-Antikörper in Blotto über Nacht im Kühlraum (4°C) inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen dreifach

mit TBS-T gewaschen, Peroxidase-konjugiertem Sekundär-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut eine Stunde in TBS-T zur Entfernung von überschüssigem Sekundär-Antikörper gewaschen. Die Sichtbarmachung und Digitalisierung der Western Blot-Signale erfolgte mit „enhanced-chemoluminescence“-Lösung (ECL) an einer Chemolumineszenz-Kamera mit gekoppelter PC-Einheit.

10x TBS-T	Blotto	10x Tank-Blot Puffer	1x Tank-Blot Puffer	ECL
325 mM Tris-HCl (ph 7,5) 10 mM EDTA	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T	250 mM Tris-HCl 2 M Glycin	15 % (v/v) 10x Tank-Blot Puffer 20 % (v/v) Methanol	1 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) mit 0,25 mg/ml Luminol 100 µL 1,1 mg/ml p-Coumarinsäure in DMSO
1,4 M NaCl			65 % (v/v) ddH <sub>2</sub> O	100 µL Lumigen TMA-6 Solution A
1 % (v/v) Tween-20				100 µL Lumigen TMA-6 Solution B

#### 4.3.3 Deglykosylierung mit PNGase F und Endo H

Die Deglykosylierung dient zur Identifikation potentieller Glykoproteine. Die Zelllysate werden mit den Enzymen Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H) behandelt und das Laufverhalten im SDS-Gel / Western Blot untersucht. Eine Deglykosylierung verringert das Molekulargewicht des behandelten Proteins, was zu einer Bandenverschiebung im Western Blot führt. Der methodische Ablauf besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen.

Die Proben wurden nach der Proteinbestimmung mit PBS auf eine Konzentration von 2 µg/µL und ein Volumen von 10 µL eingestellt. Anschließend wurden die Proben jeweils mit 2,5 µL 2%-SDS sowie 2,5 µL 1M 2-Mercaptoethanol versetzt und danach für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung der Proben wurden diesen PNGase F- oder Endo H-Lösung hinzugegeben.

PNGase F	Endo H
2,5 µL 1 M Tris HCl / 100 mM EDTA (ph 8,0)	2,5 µL NaAc (pH 5,5)
2,5 µL 10 mM PMSF	2,5 µL PMSF
2,5 µL 10% CHAPS	2,5 µL 1 % CHAPS
1 µL PNGase F	1 µL Endo H

Die Proben wurden über Nacht bei 37°C mit den jeweiligen Enzymen inkubiert. Am Folgetag wurde der Endo H-Verdau durch eine 5-minütige Inkubation bei 100°C abgestoppt. Die

Proben konnten durch anschließende SDS-PAGE und Western Blotting weiterführend analysiert werden.

#### 4.3.4 Inhibition der lysosomalen Prozessierung von Proteinen

Zur Inhibition der lysosomalen Proteasen wurden die Zelllinien bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert und anschließend mit den gewünschten Plasmiden (z.B. hPLD3 im Vektor pcDNA 3.1) transfiziert. Nach 4,5 Stunden erfolgte die Erneuerung des Zellkulturmediums (DMEM, FCS 10%, Penicillin/Streptomycin). Diesem wurde der jeweilige Inhibitor in folgender Konzentration hinzugefügt:

Inhibitor	Lösungsmittel	Zielkonzentration
Bafilomycin A	DMSO	30 nM
Pepstatin A	DMSO	0,5 µM
Pepstatin A Methyl-Ester	DMSO	0,5 µM
Chloroquin	H <sub>2</sub> O	40 µM
Leupeptin*	H <sub>2</sub> O	100 µM
E 64 D*	H <sub>2</sub> O	40 µM
NH <sub>4</sub> HCl*	H <sub>2</sub> O	25 mM
ZLL-Keton*	DMSO	10 µM
Inhibitor X*	DMSO	1 µM

Im Falle der Behandlung der Zellen mit „\*-markierten Inhibitoren fand nach sechsstündiger Inkubationszeit ein erneuter Mediumwechsel (ohne Inhibitor-Zugabe) statt. Am Folgetag wurden Zelllysate gewonnen und diese nach SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

#### 4.3.5 Inhibition der Dynamin-abhängigen Endozytose

Dynasore diente als GTPase-Inhibitor zur Blockade der Dynamin-abhängigen Endozytose und entsprechender Abschnürung von Endosomen. Hela-Zellen wurden mit der cDNA von mACP2-HA oder mPLD3-mCherry transfiziert. Nach 5,5 Stunden wurde das Zellkulturmedium erneuert und dieses mit DMSO (Lösungsmittel des Inhibitors/Negativkontrolle) oder mit Dynasore (80 µM in DMSO) versehen. Weitere 9 Stunden später wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und mit Paraformaldehyd fixiert. Die weiteren Arbeitsschritte zur Herstellung mikroskopischer Präparate erfolgten wie in „4.3.7“ beschrieben. Die Aufnahmen der hergestellten Präparate wurden am konfokalen Lasermikroskop digitalisiert und analysiert.

#### 4.3.6 Phospholipase D – Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Phospholipase D-Aktivität auf endogenem Level und unter Überexpressionsbedingungen wurde das „Amplex Red Phospholipase D Assay Kit“ der Firma „Molecular Probes / Invitrogen“ verwendet. Es handelt es sich um einen Assay, bei



welchem nach Zugabe von Lecithin (Phosphatidylcholin) über mehrere Reaktionen, die durch die Phospholipase D-Aktivität katalysiert werden, ein Fluoreszenzfarbstoff (Resorufin) entsteht. Die Farbintensität von Resorufin ist dabei von der Phospholipase D-Aktivität abhängig und kann durch photometrische Messungen quantifiziert werden. Die Messungen fanden im neutralen sowie im sauren pH-Bereich statt, um die physiologischen Bedingungen bestmöglich zu imitieren. Bei der Durchführung des Enzymassays wurde sich an die Angaben des Herstellers gehalten und ein entsprechendes Protokoll verwendet.

Zur Messung unter Überexpressionsbedingungen wurden HeLa-Zellen mit cDNA der entsprechenden Phospholipase D-Familienmitglieder transfiziert. Nach der Proteinexpression wurden die Zellen gewaschen und Zelllysate hergestellt. Die Zelllysate von PLD3 +/+ - und PLD3 -/- -Mäusegehirnen wurden durch Organextraktionen mit anschließender Homogenisierung sowie Zelllyse gewonnen. Die Proteinmengen der Lysate wurden quantifiziert, jeweils 60 µg der Proben für die Analysen eingesetzt und die Messungen in jeweiligen Doppelbestimmungen durchgeführt. Besonders die Messungen im sauren Bereich mussten experimentell ausgetüfelt und, wie vom Hersteller angeraten, dem eigenen Versuchsaufbau entsprechend modifiziert werden. Dies betrifft vor allem den Reagenzienpuffer und die jeweiligen Inkubationszeiten. Der Ansatz für die Aktivitätsbestimmung im sauren- unterscheidet sich von dem im neutralen- pH-Bereich dadurch, dass es einen zusätzlichen Reaktionsschritt gibt und ein spezieller Puffer angesetzt und erprobt werden muss. Dieser Puffer muss dabei so konzentriert sein, dass die katalytische Umsetzung von Phosphatidylcholin durch die Phospholipasen vom Typ D im sauren Milieu stattfinden kann. Nach Zugabe der weiteren Reagenzien („Amplex Red“) muss sich der pH-Wert anschließend im pH-Bereich zwischen 7 und 8 einstellen, da hier das photometrische Emissionsoptimum des entstandenen Fluoreszenzfarbstoffs liegt. Diese Bedingungen wurden durch den Ansatz des folgend genannten Puffers geschaffen und durch Proben-Messungen mit pH-Streifen überprüft.

<b>Pufferansatz pH 5,2 (für 100 mL)</b>	<b>Volumina</b>
Citronensäure 0,1 M	46,4 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M	53,6 mL

Damit der beschriebene pH-Umschlag von 5,2 auf 7-8 funktioniert, wurde der angesetzte Puffer mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:13 gemischt und die Proben darin gelöst.

Die Proben wurden im neutralen Milieu zusammen mit dem Substrat und den weiteren Reagenzien für 60 Minuten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Zur Messung im sauren pH-Bereich wurden die Proben im entsprechenden Puffer (pH = 5,2) für etwa 180 Minuten mit

dem Substrat vorinkubiert. Dieser Zeitrahmen hat sich in Vortestungen als passend erwiesen. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die Reaktion und der entstandene Fluoreszenzfarbstoff, identisch zur Analyse der Proben im neutralen Milieu, nach einem weiteren Inkubationsschritt (37°C, 60 Minuten) am Photometer gemessen. Da es sich nicht um eine Endpunktbestimmung, sondern um einen kontinuierlichen Assay handelt, empfiehlt der Hersteller, entsprechend der Reaktionskinetik zu verschiedenen Zeitpunkten zu messen. Die Messung nach einer Stunde Inkubation hat sich dabei, nach vorherigen Testungen, als ein stabiler und repräsentativer Zeitpunkt erwiesen. Die Fluoreszenzmessungen der Proben fanden in schwarzen 96-well-Mikrotiterplatten am „Microplate Reader-Photometer“ statt.

#### **4.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz**

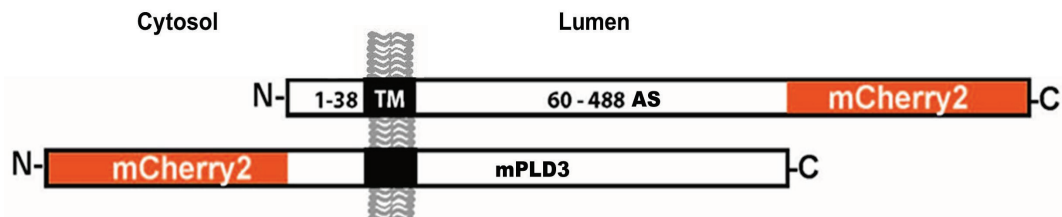
Zur mikroskopischen, zellulären Lokalisationsbestimmung von Proteinen wurden Zellen in 6-well-Platten auf 13 mm Deckgläschen ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert und, je nach Fragestellung, transfiziert oder untransfiziert belassen. Nach 24-48 Stunden wurden die Zellen in den 6-well-Platten dreifach mit PBS (pH 7,4) gewaschen und für 20 Minuten mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Danach folgten das erneute, dreifache Waschen der Zellen mit PBS sowie die anschließende Permeabilisation für 5 Minuten mit S-PBS (0,2 % (w/v) Saponin in PBS). Zum Quenchen von nukleärer Autofluoreszenz wurden die Zellen für 10 Minuten mit 0,12 % (w/v) Glycin in S-PBS inkubiert und nachfolgend mit S-PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren, folgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit 10% (v/v) FBS in S-PBS. Nach diesem Schritt wurden die bewachsenen Deckgläschen aus den 6-well-Platten entnommen und mit 50 µL Primär-Antikörperlösung (gelöst in 10% FBS mit S-PBS) benetzt. Die lichtgeschützte Inkubation fand über Nacht im Kühlraum (4°C) statt.

Am Folgetag wurden die Zellen / Deckgläschen vierfach mit S-PBS gewaschen und anschließend für 90 Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern (Alexa-Fluor 488/594, gelöst in 10% FBS mit S-PBS) lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten vierfachen S-PBS- und zweifachen dH<sub>2</sub>O-Waschschritt wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit einer Mischung aus Mowiol / Dabco / DAPI eingedeckelt. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) lagert sich als Fluoreszenzfarbstoff bevorzugt an AT-reiche Bereiche doppelsträngiger DNA und diente, nach Anregung durch UV-Licht, in allen abgebildeten, mikroskopischen Aufnahmen als Kernfarbstoff. Die angefertigten Präparate wurden bis zur mikroskopischen Auswertung am konfokalen Lasermikroskop lichtgeschützt in Objektträgermappen aufbewahrt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kolokalisation mit bekannten Markerproteinen

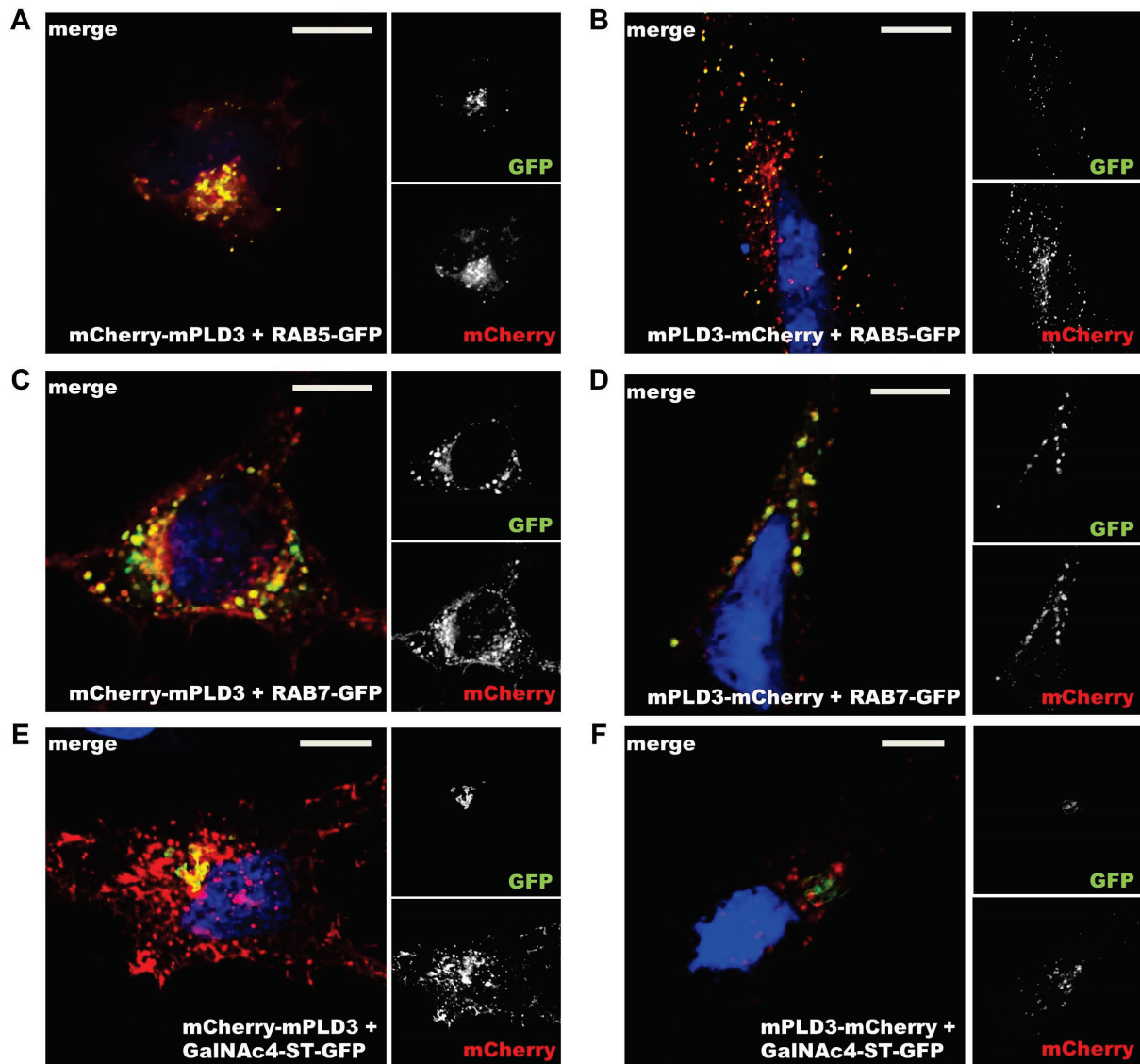
Zu Beginn der Arbeit stand noch kein anti-PLD3-Antikörper zur Verfügung. Daher wurden zunächst PLD3-cDNA-Konstrukte generiert, die sowohl N- als auch C-terminal mit einem mCherry-Fluoreszenz-Tag fusioniert wurden (Abb.6).



**Abbildung 6:** Beispielhafte Darstellung von mPLD3, konjugiert mit N- sowie C-terminalem mCherry-Fluoreszenz-Tag. TM = Transmembrandomäne, AS = Aminosäure

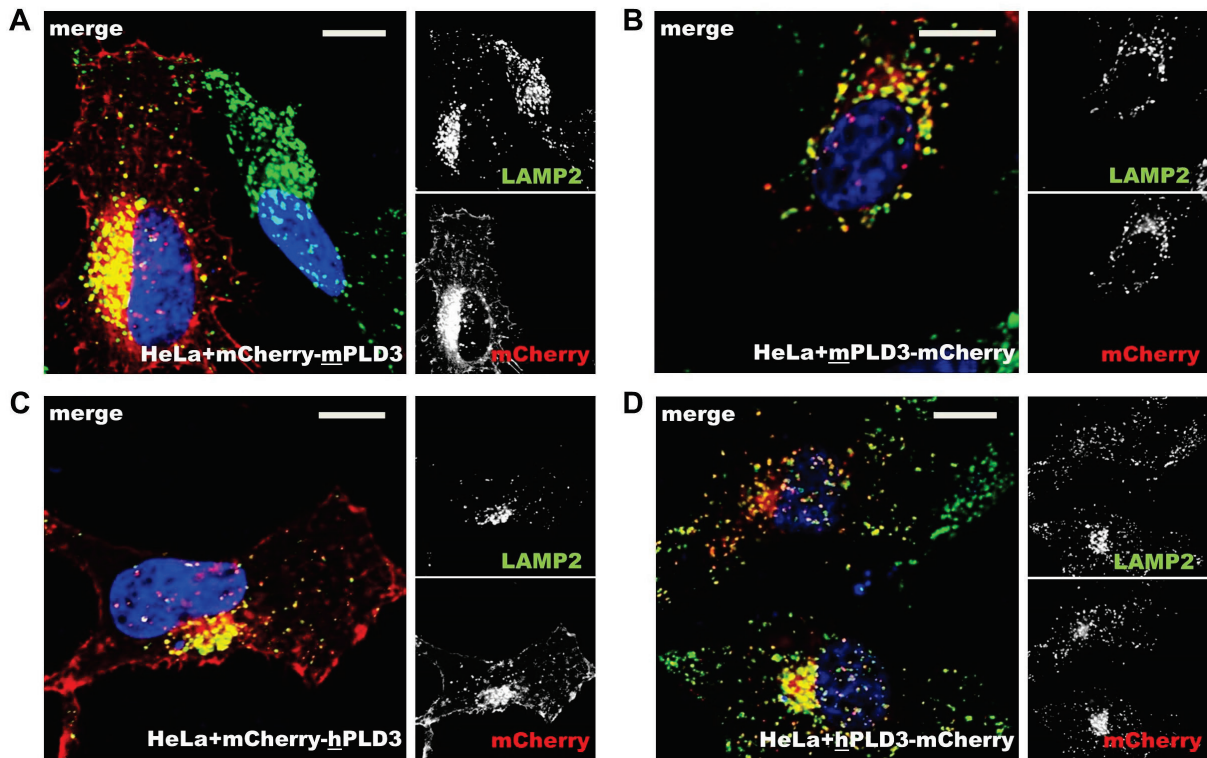
Mit den folgenden Experimenten sollten erste Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation von PLD3 gewonnen werden. HeLa Zellen wurden mit der jeweiligen cDNA von mCherry-mPLD3, mPLD3-mCherry, mCherry-hPLD3, hPLD3-mCherry transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen für dieses Experiment (Abb. 7) mit Markern für frühe Endosomen (RAB5), späte Endosomen (RAB7) und dem Golgi (GalNac4-ST), die jeweils mit dem grün fluoreszierenden GFP-Tag fusioniert waren, kotransfiziert. In Abbildung 8 sind die genannten humanen sowie murinen PLD3-Konstrukte in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt und gleichzeitig wurde das lysosomale Markerprotein LAMP2 gegengefärbt.

In der Abbildung 7 ist zu erkennen, dass sich mCherry-fusioniertes PLD3 intrazellulär überwiegend als vesikuläre Struktur in HeLa-Zellen darstellt. Diese Feststellung gilt sowohl für die N- als auch die C-terminale Variante (Abb.7, A-D). Allerdings werden auch Unterschiede bezüglich der Lokalisationen der Varianten sichtbar. Dabei lassen sich im Falle der N-terminal getaggten mPLD3 zusätzlich Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran detektieren. Das C-terminal getaggte mPLD3 befindet sich vorwiegend in vesikulären Strukturen. Die Signale der Markerproteine überlagern sich mit den Signalen von mPLD3. Dies gilt für N- als auch die C-terminal getaggtes mPLD3. Beide Varianten zeigen eine intrazelluläre Kolokalisation mit den Markern für frühe Endosomen, späte Endosomen sowie für den Golgi-Apparat. Es lässt sich außerdem beobachten, dass sämtliche Signale der Markerproteine mit Signalen von mPLD3-mCherry kolokalisieren. Jedoch lässt sich mCherry-mPLD3 zusätzlich in RAB5/7-negativen Vesikeln darstellen.



**Abbildung 7: Kolokalisation mit bekannten Markerproteinen.** HeLa-Zellen wurden mit mCherry-mPLD3 (A, C, E) / mPLD3-mCherry (B, D, F) und RAB5-GFP/RAB7-GFP/GalNAc4-ST-GFP (Marker für frühe Endosomen, späte Endosomen und Golgi) kotransfiziert. Die mCherry- oder GFP-Tags der jeweiligen Proteine zeigen sich jeweils durch rote/grüne Fluoreszenzsignalgebungen. Die Aufnahmen wurden am konfokalen Lasermikroskop gemacht. Die Maßstabsbalken indizieren 10 µm.

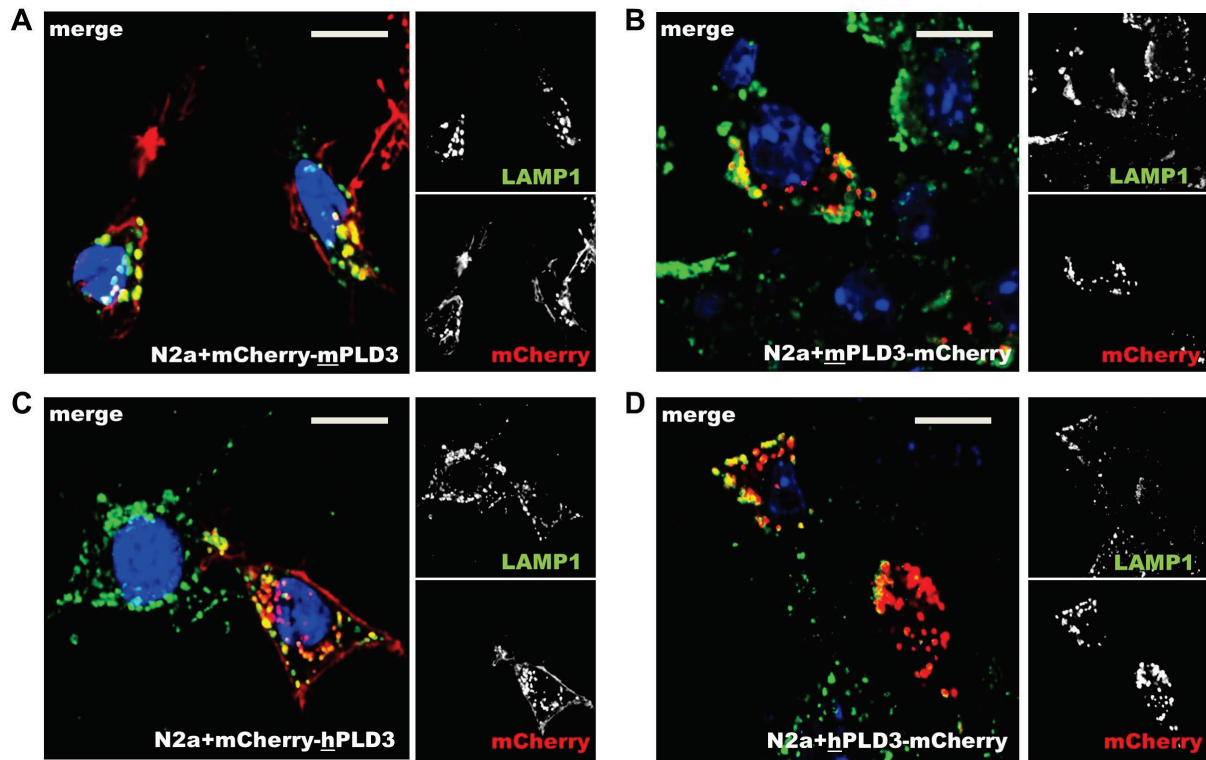
In Abbildung 8 ist die intrazelluläre Lokalisation der mCherry-fusionierten humanen sowie der murinen Phospholipase D3 dargestellt. Endogenes LAMP2 ist zusätzlich als Lysosomenmarker angefärbt. Auch in diesem Experiment stellt sich PLD3 in vesikulären Strukturen dar. Dabei zeigt sich die humane Variante im Vergleich zur murinen Variante in der Signalgebung identisch. Es fällt erneut auf, dass sich N-terminal mCherry-getaggetes PLD3 zusätzlich deutlich in Assoziation mit der Plasmamembran darstellen lassen (Abb.8, A, C). Sowohl N- als auch die C-terminal getaggetes m/hPLD3 kolokalisiert großteils mit LAMP2. PLD3 ist zusätzlich auch in LAMP2-negativen Vesikeln zu erkennen.



**Abbildung 8: PLD3 kolokalisiert mit LAMP2.** Dargestellt sind HeLa-Zellen, die jeweils humane (C, D) oder murine (A, B) Varianten von N- oder C-terminal mCherry-fusioniertem PLD3 überexprimieren (rot dargestellt). Als lysosomales Membranprotein wurde endogenes LAMP2 gefärbt (grün dargestellt). Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu\text{m}$ .

Nachdem überexprimiertes PLD3 in HeLa-Zellen mikroskopisch dargestellt werden konnte, sollten die zuvor verwendeten PLD3-Konstrukte auch in Neuronen-artigen Neuroblastom-Zellen getestet werden. Dafür wurden murine, neuronale N2a-Zellen mit der cDNA von mCherry-fusioniertem m/hPLD3 transfiziert. Abbildung 9 zeigt die intrazelluläre Lokalisation von PLD3 in dieser Zelllinie. Das lysosomale Membranprotein LAMP1 wurde auf endogenem Expressionslevel zur Markierung von Lysosomen zusätzlich gefärbt.

In Analogie zu den vorigen Experimenten stellt sich PLD3 maßgeblich in Vesikeln dar. Dabei zeigt sich eine deutliche zelluläre Kolokalisation von mCherry-m/hPLD3 und m/hPLD3-mCherry mit dem lysosomalen Marker LAMP1. N-terminal getaggetes PLD3 ist zusätzlich an der Plasmamembran lokalisiert (Abb.9, A, C).



**Abbildung 9: Überexpression von PLD3-Plasmid-Konstrukten in N2a-Zellen.** Dargestellt sind N2a-Zellen (murines Neuroblastom), die jeweils humanes (C, D) oder murines (A, B) N- oder C-terminal mCherry-getaggttes PLD3 überexprimieren. Endogenes LAMP1 ist zusätzlich in Grün dargestellt. Die Aufnahmen entstanden am konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m.

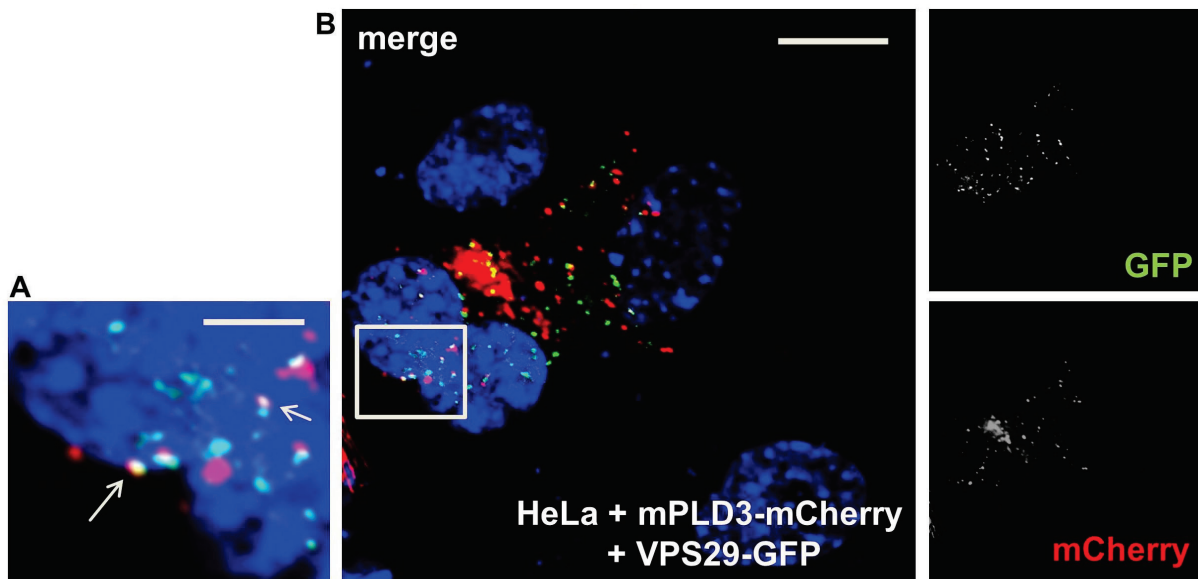
## 5.2 PLD3 und der Retromer-Komplex

Der Retromer ist ein Recycling- sowie Transportkomplex. Dabei hat der Retromer-Komplex die Aufgabe, den retrograden Transport von Membranproteinen von den Endosomen zum Golgi zu vermitteln (Seaman 2012). Ende des Jahres 2014 konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der Knockdown von PLD3 den retrograden Transport stört (Breusegem und Seaman 2014). Um zu überprüfen, ob Retromer und PLD3 zellulär kolokalisieren, wurden HeLa-Zellen mit mPLD3-mCherry- sowie GFP-getaggtter VPS29-cDNA, einer der essentiellen Retromer-Untereinheiten, transfiziert.

VPS29 sowie PLD3 stellen sich als Teil von vesikulären Strukturen dar. Die jeweiligen Fluoreszenzsignale überlagern sich stellenweise (Abb.10, A, Pfeilmarkierungen). VPS29 und PLD3 kolokalisieren damit intrazellulär partiell. Die Proteine zeigen sich zusätzlich voneinander unabhängig lokalisiert.

Die Ergebnisse dieses Experimentes weisen auf eine Kolokalisation der Phospholipase D3 mit dem Retromer-Komplex und stützen die oben genannte Annahme einer möglichen Interaktion.

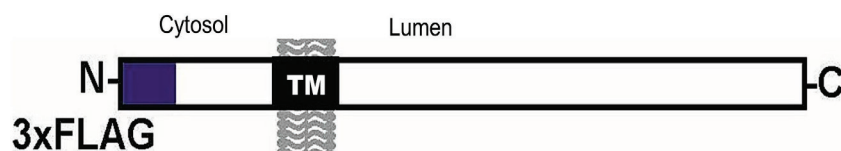




**Abbildung 10: Koexpression von mPLD3-mCherry und VPS29-GFP.** Dargestellt sind HeLa-Zellen, die mit der cDNA von mPLD3-mCherry und VPS29-GFP (Teil des Retromer-VPS-Trimers) kotransfiziert wurden. Die jeweiligen Fusionsproteine zeigen sich mit entsprechender Fluoreszenzsignalgebung in Rot (mCherry) und Grün (GFP). Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Lasermikroskop. Die Pfeilmarkierungen deuten exemplarisch auf Protein-Kolokalisationen. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu\text{m}$  (B)/ 3  $\mu\text{m}$  (A, vergrößerter Bildausschnitt aus B).

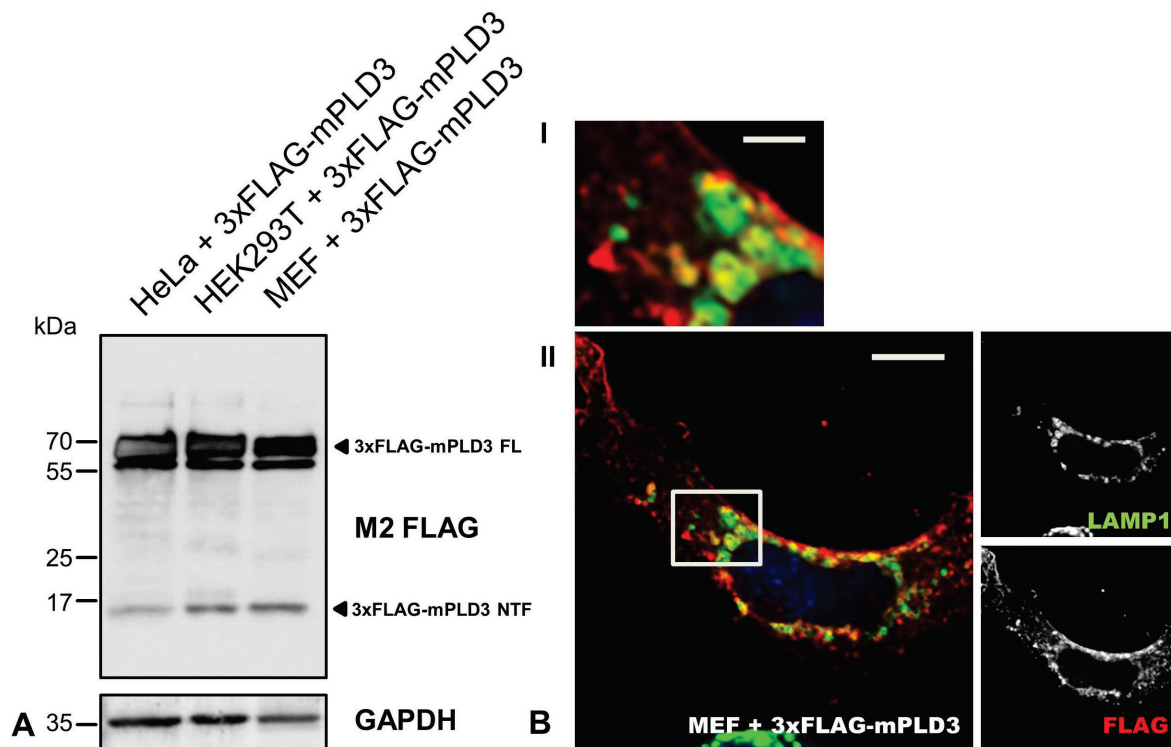
### 5.3 Analyse von getaggetem PLD3 im Western Blot

Für erste Darstellungen von PLD3 im Western Blot wurde mit einem N-terminal Flag-getaggeten PLD3-Konstrukt gearbeitet (Abb.11). PLD3 hat ein bioinformatisch berechnetes Molekulargewicht von ungefähr 54 kDa. Das Fusionsprotein hat ein zusätzliches molekulares Gewicht von etwa 3 kDa (23 AS). Zudem ist PLD3 glykosyliert (Sleat et al. 2013; Munck et al. 2005). Konjugierte Zuckerreste sind im berechneten Molekulargewicht nicht berücksichtigt.



**Abbildung 11: 3xFLAG-mPLD3 in der exemplarischen Darstellung.** TM = Transmembrandomäne.

HeLa-, HEK293T- sowie MEF-Zellen wurden mit der cDNA von 3xFLAG-mPLD3 transfiziert. Das exprimierte Fusionsprotein wurde mit dem M2-FLAG Primärantikörper detektiert. Dieser Antikörper eignet sich im Western Blot sowie in der Fluoreszenzmikroskopie zur Proteindarstellung. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente in dem dargestellten Western Blot (Abb.12, A) als Ladekontrolle. Abbildung 12 (B) zeigt das exprimierte Fusionsprotein zusammen mit endogenem LAMP1 (Lysosomenmarker) mikroskopisch in MEF-Zellen.



**Abbildung 12: Überexpression von 3xFLAG-mPLD3 in HeLa-Zellen und weiteren Zelllinien.** **A** Der Western Blot zeigt die Auftrennung der Lysate von HeLa-, HEK293T- und MEF-Zellen, welche zuvor jeweils mit der cDNA von 3xFLAG-mPLD3 transfiziert wurden. Das FLAG-Fusionsprotein wurde durch  $\alpha$ -FLAG-M2 nachgewiesen. GAPDH dient als Ladekontrolle. FL=„full length“, NTF=N-Terminales-Fragment. **B** MEF-Zellen wurden mit der cDNA von 3xFLAG-mPLD3 transfiziert und das Fusionsprotein nach Expression durch einen  $\alpha$ -FLAG-M2-Antikörper spezifisch gefärbt (Rot). LAMP1 wurde zur Markierung von Lysosomen grün gefärbt. Die Proteine wurden am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Der Maßstabsbalken in B-I (Ausschnittsvergrößerung aus II) indiziert 3  $\mu$ m, B-II 10  $\mu$ m.

Im Western Blot (Abb.12, A) wird 3xFLAG-mPLD3 als Volllängenprotein als Doppelbande bei etwa 68 kDa detektiert. Zusätzlich wird eine Bande in allen Spuren bei ca. 15 kDa gefärbt, welche als N-terminales Fragment des 3xFLAG-mPLD3 beschriftet ist. In der mikroskopischen Immunfluoreszenz-Aufnahme (Abb.12, B) sind 3xFLAG-mPLD3 im roten und LAMP1 im grünen Fluoreszenzfarbton zu erkennen. Das FLAG-mPLD3-Fusionsprotein ist in vesikulären Strukturen sowie an der Zellmembran lokalisiert. LAMP1 markiert Lysosomen, teilweise sind vollständige Ringstrukturen zu erkennen. Das FLAG-mPLD3-Fusionsprotein kolokalisiert mit LAMP1. In kleineren Vesikeln zeigt sich eine vollständige Überlagerung der Signale, in größeren Lysosomen markiert 3xFLAG-mPLD3 lysosomale Membranen. Es zeigen sich zusätzlich kleinere, separate PLD3-positive Vesikel, die LAMP1-negativ sind.

#### 5.4 Topologische Orientierung von PLD3

Es konnte gezeigt werden, dass mCherry-getaggetes mPLD3 in HeLa-Zellen mit dem Lysosomenmarker LAMP2 kolokalisiert (Abb.8). Die Überexpression integraler lysosomaler Proteine, z.B. LIMP-2 (Lysosomales integrales Membran-Protein Typ-2 / LGP85), kann zu

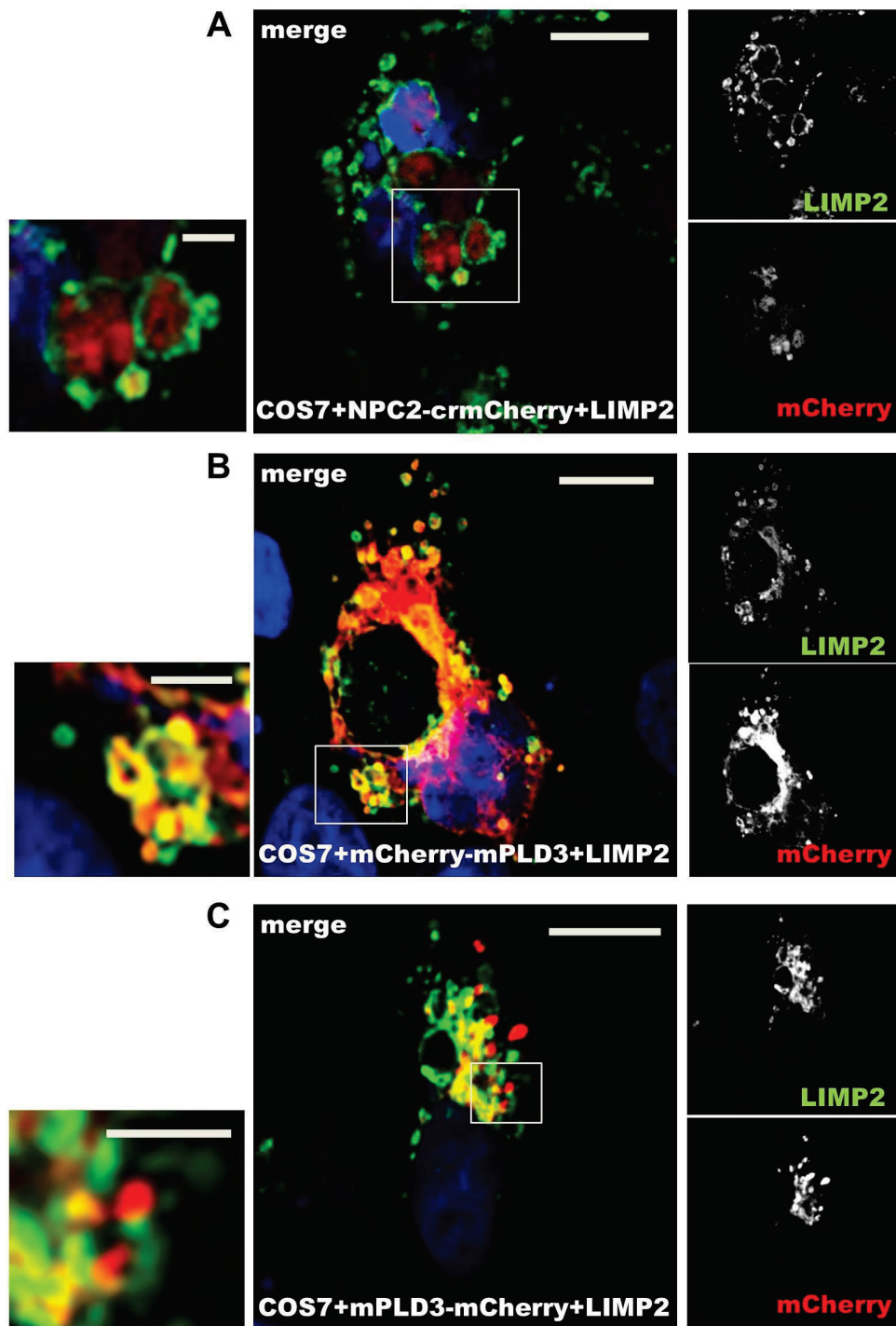


einer Vergrößerung der Endosomen/Lysosomen führen (Kuronita et al. 2002). Die LIMP-2-Expression sollte damit theoretisch zu einer deutlicheren mikroskopischen Darstellung von Lysosomen führen und wurde für den folgenden Versuch genutzt. Es wurde untersucht, ob die topologische Orientierung von PLD3 analysiert und mögliche Unterschiede in den Darstellungen der N- und C-terminal mCherry-fusionierten PLD3-Konstrukte nachgewiesen werden können. Des Weiteren sollte getestet werden, ob PLD3 maßgeblich membrangebunden oder auch als lösliches, lysosomales Protein besteht, welches z.B. nach limitierter Proteolyse freigesetzt wird.

COS7-Zellen wurden mit der cDNA von LIMP-2 sowie mCherry-mPLD3/mPLD3-mCherry kotransfiziert. Die Überexpression von LIMP-2 diente dabei der Generierung von vergrößerten Endosomen/Lysosomen und LIMP-2 gleichzeitig als lysosomaler Marker. Als Kontrolle der Methodik wurden COS7-Zellen mit der cDNA des Membranproteins LIMP-2 sowie mit cDNA des bekannten, löslich-lysosomalen Proteins NPC2-crmCherry (NPC=Niemann-Pick Erkrankung Protein Typ-C2) kotransfiziert.

In Abbildung 13 ist N-terminal mCherry-fusioniertes mPLD3 in Rot und LIMP-2 in Grün zu erkennen. LIMP-2 zeigt sich in allen mikroskopischen Aufnahmen als Bestandteil von Vesikeln und markiert damit lysosomale Membranen. Es zeigen sich teils deutlich vergrößerte Lysosomen mit einer Größe bis etwa 3 µm. Diese sind durch die Anfärbung von LIMP-2 als Ringstrukturen zu erkennen. Die Kontrolle NPC2-crmCherry zeigt, passend zur wissenschaftlichen Literatur, eine luminal Lokalisation mit Signalgebung innerhalb der Lysosomen (Abb.13, A). Das mPLD3-mCherry-Fusionsprotein wird durch rote Fluoreszenz-Signale dargestellt. Sowohl N-, als auch C-terminal getaggetes mPLD3 markiert Vesikel. Beide Fusionsproteine kolokalisieren mit dem Lysosomenmarker LIMP-2. Es zeigen sich jedoch auch Unterschiede in der Signalgebung. In vergrößerten Lysosomen lässt sich mCherry-mPLD3 (N-term) deutlich als Bestandteil der lysosomalen Membran darstellen (Abb.13, B). Dabei kolokalisiert es in diesen Vesikeln mit LIMP-2. Im mikroskopischen Bild, in welchem mPLD3-mCherry (C-term) dargestellt ist, zeigen sich die Lysosomen nur gering vergrößert (Abb.13, C). Das mPLD3-mCherry kolokalisiert mit LIMP-2 in Vesikeln, wobei mPLD3-mCherry nicht die Lysosomenmembran markiert. Es ist zu erkennen, dass unter Überexpressionsbedingungen beide mCherry-PLD3-Fusionsproteine vollständig mit LIMP-2-positiven Vesikeln kolokalisieren. Gleichzeitig werden durch LIMP-2 Lysosomen dargestellt, die PLD3-negativ sind.

Der Versuch gibt einen Anhalt dafür, dass PLD3 in membrangebundener sowie in löslicher, proteolytisch prozessierter Form in Lysosomen besteht.

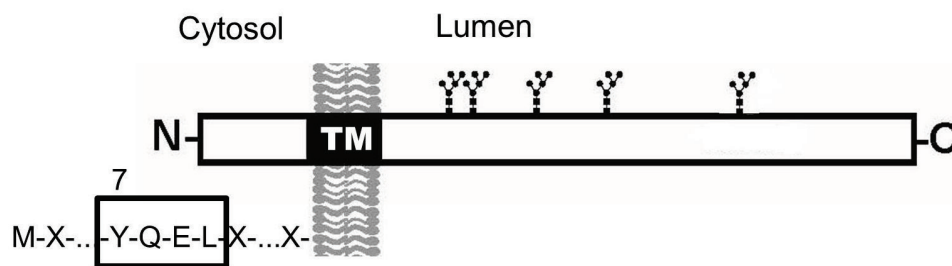


**Abbildung 13: Koexpression von mPLD3-mCherry und LIMP-2.** COS7-Zellen wurden zur Erzeugung vergrößerter Endosomen/Lysosomen mit der cDNA des lysosomalen Membranproteins LIMP-2 transfiziert. Zur Doppeltransfektion wurde dabei jeweils zusätzlich die cDNA des löslichen, lysosomalen Proteins NPC2-crmCherry (A), mCherry-mPLD3 (B) oder mPLD3-mCherry (C) eingesetzt. Der mCherry-Tag zeigt ein rotes Fluoreszenzsignal. LIMP2 wurde durch Anfärbung mit einem spezifischen  $\alpha$ -LIMP2-Antikörper in Grün dargestellt. Die Aufnahmen entstanden am konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m (in den vergrößerten Bildausschnitten jeweils 3  $\mu$ m).

## 5.5 PLD3 - Sortierung zum Endosomen/Lysosomen

Es gibt verschiedene Wege und Routen, wie lysosomale Proteine vom Trans-Golgi-Netzwerk zu ihrer Destination, den Endosomen/Lysosomen, gelangen können. Dabei gibt es

Unterschiede zwischen den Sortierungsmechanismen der lysosomalen Membranproteine und der löslichen, luminalen Proteine. Lysosomale Membranproteine werden direkt oder indirekt zu den Lysosomen sortiert. Die indirekte Sortierung beinhaltet die zwischenzeitliche Assoziation der Proteine mit der Plasmamembran und eine folgende Internalisierung. Der Transport von lysosomalen Membranproteinen zu den Endosomen/Lysosomen kann über cytosolische Sortierungssignale wie YXXØ- oder [DE]XXXL[LI]-Domänen vermittelt werden (Braulke und Bonifacino 2009). Die Aminosäuresequenz von PLD3 beinhaltet ein potentielles YXXØ (Tyrosin)-Sortierungs-Motiv im relativ kurzen N-Terminus (Abb.14).



**Abbildung 14: Schematische Darstellung von PLD3 und des potentiellen Tyrosin-Sortierungsmotivs.** Gezeigt ist das YXXØ-Motiv im cytosolischen N-Terminus von PLD3, beginnend in Position 7 der AS-Sequenz. Außerdem sind C-terminal fünf Bereiche dargestellt, die durch ihre jeweilige Sequenzcharakteristik N-glykosidisch mit Mannose-6-Phosphat-reichen oder komplexeren Zuckerresten konjugiert sein könnten. TM=Transmembrandomäne.

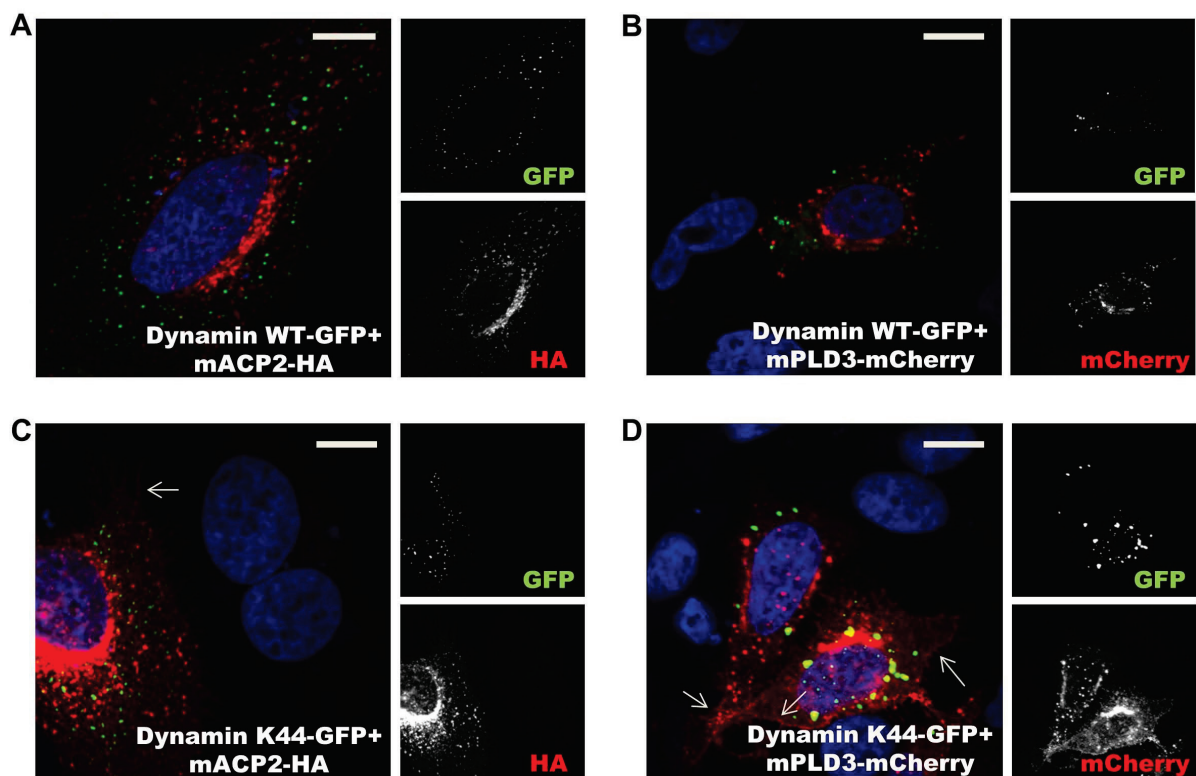
### 5.5.1 Assoziation von PLD3 mit der Plasmamembran

Zur Untersuchung der Rolle der Plasmamembran, als zwischenzeitliche Lokalisation einer möglichen indirekten Sortierung von PLD3 zu den Endosomen/Lysosomen, gestaltete sich der entsprechende Versuchsaufbau wie folgt:

HeLa-Zellen wurden entweder mit Dynamin-GFP oder Dynamin K44A-GFP sowie mPLD3-mCherry, bzw. mACP2-HA kotransfiziert. Dynamin selbst spielt als GTPase eine entscheidende Rolle im Rahmen der Clathrin-vermittelten Endozytose durch die Abschnürung von Vesikeln (Henley et al. 1999). Dabei ist die Dynamin K44A-Mutation als katalytisch inaktiv beschrieben worden (Wang et al. 2010). Es sollte untersucht werden, ob durch die Transfektion von cDNA der katalytisch inaktiven Dynamin-Mutante eine mögliche Internalisierung von PLD3 inhibiert werden kann. Im Falle einer indirekten lysosomalen Sortierung von PLD3 über die Plasmamembran könnte diese dort akkumulieren. Die Transfektion der cDNA von mACP2-HA diente dabei als Positiv-Kontrolle. Das Enzym ACP2 („acid phosphatase 2“, lysosomal) wird über den indirekten Sortierungsweg zu den Lysosomen transportiert (Sosa et al. 1993).

In Abbildung 15 sind Wildtyp-Dynamin und mACP2 jeweils als punktförmige Signale zu erkennen, welche eher gering bis kaum kolokalisieren. Durch Überexpression der Dynamin-Mutante K44A mit mACP2 zeigt sich letzteres in seiner Sortierung beeinträchtigt. Dynamin-

K44A sowie mACP2 markieren Vesikel und kolokalisieren stellenweise. Abweichend zur Koexpression mit Wildtyp-Dynamin, werden durch die Expression der Mutante perinukleäre Strukturen durch mACP2-HA intensiv dargestellt. Zusätzlich zeigt sich auch eine mäßige Assoziation von mACP2-HA mit der Plasmamembran (Abb.15, C, Pfeilmarkierung). Die Darstellungen von mPLD3-mCherry zeigen vergleichbare Unterschiede hinsichtlich einer veränderten Sortierung durch die Dynamin-K44A-Expression. Auch mPLD3-mCherry ist als Bestandteil von Vesikeln zu erkennen. Es kolokalisiert kaum mit Dynamin-WT-GFP. In Zellen, welche die Dynamin-Mutante exprimieren, zeigt sich der mPLD3-mCherry-Transport beeinträchtigt. PLD3 zeigt, vergleichbar mit der Positivkontrolle, eine deutliche Assoziation mit perinukleären Kompartimenten. Weiterhin markiert mPLD3-mCherry die Plasmamembran (Abb.15, D, Pfeilmarkierungen). Es zeigen sich vereinzelt PLD3-positive Vesikel, die mit Dynamin-K44A kolokalisieren.

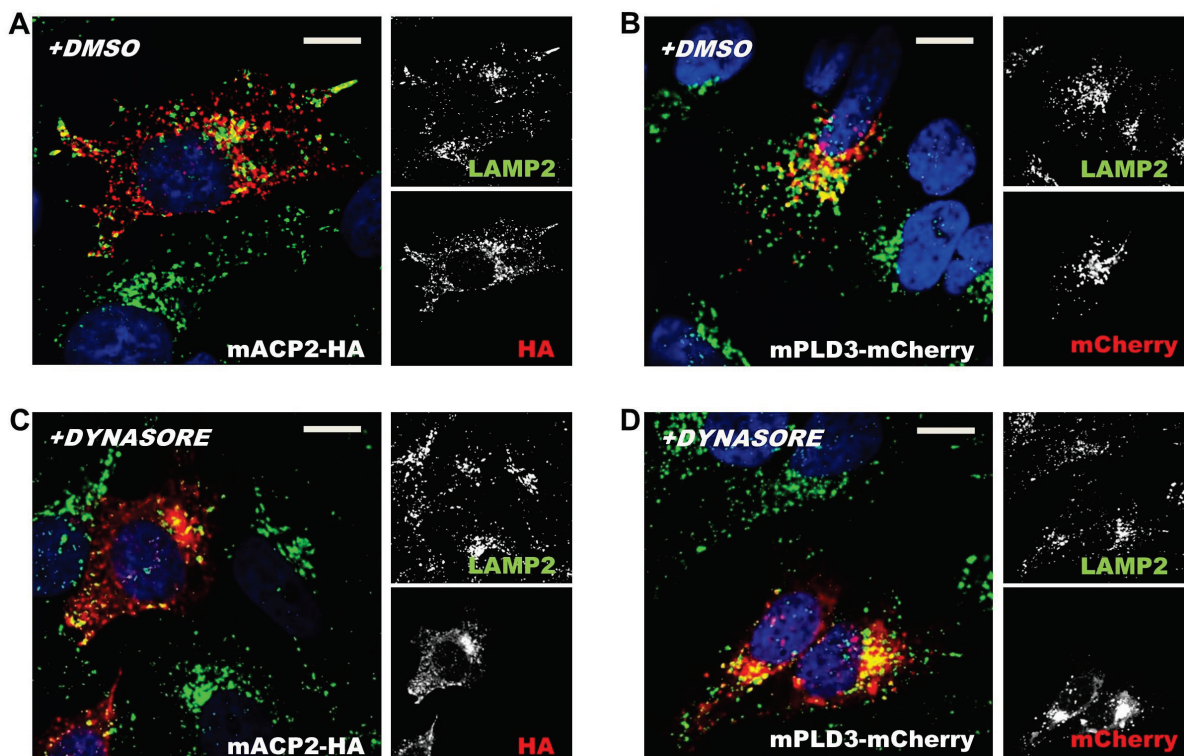


**Abbildung 15: Koexpression von mPLD3-mCherry mit Wildtyp-Dynamin oder einer katalytisch inaktiven Dynamin-Mutante.** Hela-Zellen wurden mit der cDNA von Dynamin-GFP (A, B) oder der katalytisch inaktiven Mutante Dynamin-K44A-GFP (C, D) sowie mit der cDNA von mPLD3-mCherry, bzw. mACP2-HA (Positivkontrolle) kotransfiziert. Zur Darstellung des HA-Tags wurde ein spezifischer  $\alpha$ -HA-Antikörper (3F10) eingesetzt. Die Pfeile markieren Darstellungen der Plasmamembran. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m.

Der Versuch gibt insgesamt Hinweise darauf, dass PLD3 entlang der Transportroute vom Golgi zu den Lysosomen zwischenzeitlich mit der Plasmamembran assoziiert sein könnte.

### 5.5.2 Validierung der Assoziation mit der Plasmamembran

Um die gezeigten Ergebnisse aus 5.5.1 zu validieren, wurde die Fragestellung in einem weiteren Experiment aufgegriffen, welches abweichend aufgebaut ist. Im folgenden Versuch diente Dynasore als GTPase-Inhibitor zur Blockade der Dynamin-abhängigen Endozytose und entsprechender Abschnürung endozytärer Vesikel (Preta et al. 2015). Es sollte mikroskopisch analysiert werden, ob die Sortierungen von mPLD3-mCherry sowie der Positiv-Kontrolle mACP2-HA durch die Hemmung von Dynamin in einer vergleichbaren Weise beeinträchtigt werden, wie durch die Koexpression einer katalytisch inaktiven Dynamin-Mutante. HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mACP2-HA oder mPLD3-mCherry transfiziert und mit Dynasore behandelt (Abb.16). Um sicher zu gehen, dass etwaige Einflüsse durch die Behandlung mit Dynasore spezifisch sind, wurden die Zellen, die nicht mit dem GTPase-Inhibitor behandelt wurden, mit DMSO (Lösungsmittel des Inhibitors) versetzt. Zur Markierung von Lysosomen wurde LAMP2 gefärbt.



**Abbildung 16: Inhibition der Endozytose mit Dynasore.** HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mACP-HA (Positiv-Kontrolle in A, C) oder mPLD3-mCherry (B, D) transfiziert. 5,5 Stunden später erfolgten jeweils die Erneuerung des Zellkulturmediums und die Behandlung mit Dynasore oder DMSO (Lösungsmittel des Inhibitors). Der Fluoreszenztag mCherry sowie HA sind in Rot dargestellt. Als Lysosomenmarker wurde LAMP2 in Grün gegengefärbt. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m.

Sowohl mACP2-HA als auch mPLD3-mCherry markieren in den Zellkulturen, welche mit DMSO versetzt wurden, deutlich LAMP2-positive Vesikel (Abb.16, A, B). Die Kolokalisation mit LAMP2 zeigt sich, jeweils in vermindertem Ausmaß, auch in den mit Dynasore behandelten Zellkulturen (Abb.16, C, D). Die zellulären Sortierungen von mPLD3-mCherry

sowie der Positiv-Kontrolle zeigen sich insgesamt beeinflusst. Bei genauer Betrachtung sind mPLD3-mCherry und mACP2-HA stellenweise in Assoziation mit der Plasmamembran zu erkennen. Die Darstellung der Verbindung der Proteine mit der Plasmamembran ist jedoch durch die Behandlung mit dem Dynamin-Inhibitor deutlich geringer ausgeprägt, als im Vergleich mit der Koexpression der katalytisch inaktiven Dynamin-Mutante.

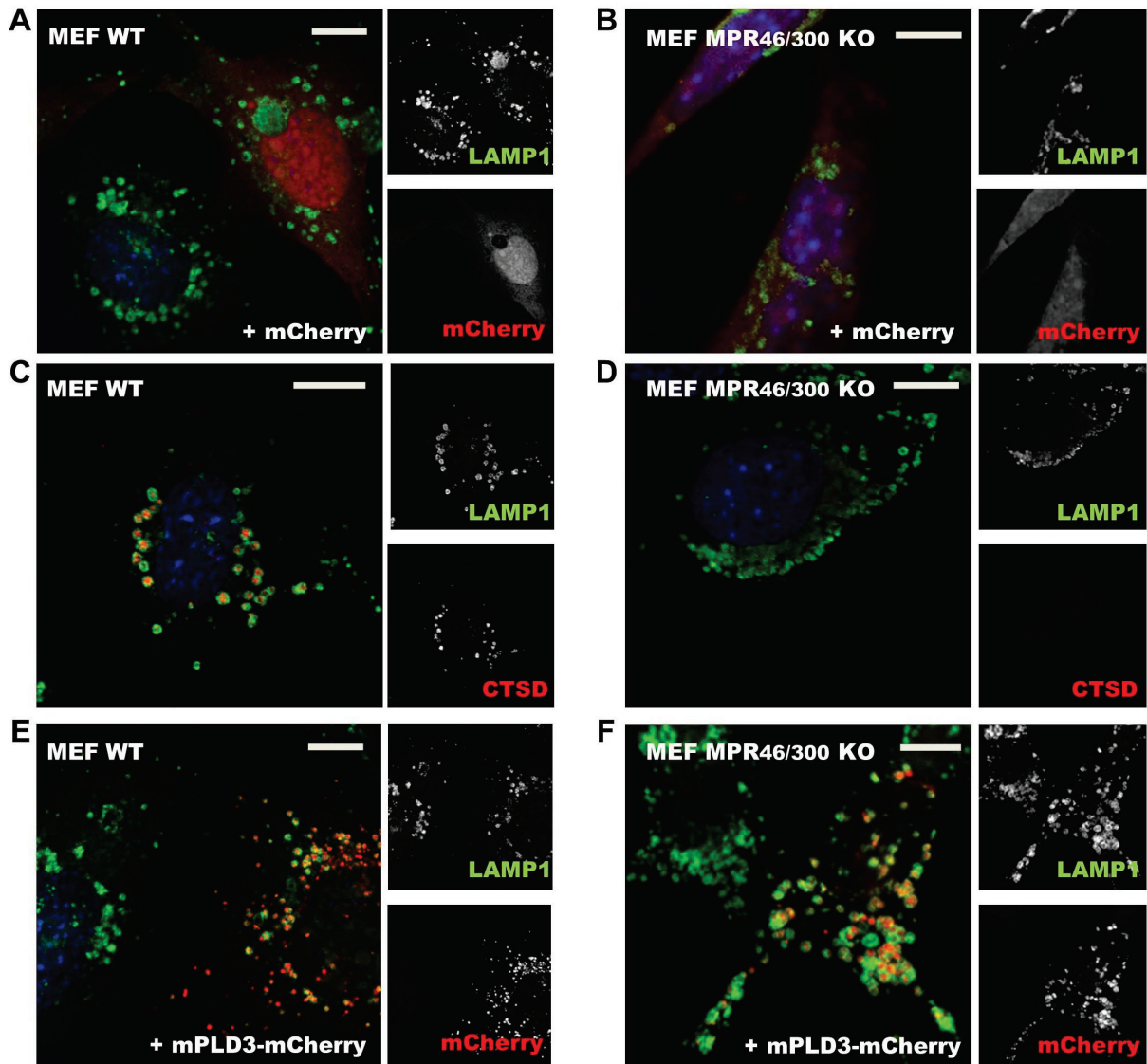
### **5.5.3 Die Rolle des M6P-Rezeptors bezüglich der intrazellulären Sortierung**

Eine Sortierung von Membranproteinen vom TGN zu den Endosomen/Lysosomen über die Bindung von Mannose-6-Phosphat-Resten an entsprechende Rezeptoren wurde bislang nicht beschrieben. Dieser Sortierungsmechanismus ist eher typisch für lösliche, lysosomale Proteasen. Jedoch konnte PLD3 durch die M6P-Rezeptor-Affinitätschromatographie und anschließender Massenspektrometrie als mögliches, neues lysosomales Protein identifiziert werden (Sleat et al. 2013). Im folgenden Experiment sollte analysiert werden, ob mögliche M6P-Reste die Sortierung von PLD3 beeinflussen. Dafür wurde eine MEF (Murine-Embryonale-Fibroblasten)-Zelllinie kultiviert, welche eine Defizienz beider M6P-Rezeptortypen (CI-MPR/CD-MPR) aufweist und dementsprechend diese Transportroute zur Sortierung lysosomaler Proteine nicht mehr nutzen kann (Bräulke und Bonifacino 2009; Dittmer et al. 1997). MEF-Wildtyp- und MEF MPR<sub>46/300</sub>-Knockout-Zellen wurden jeweils mit der cDNA von mPLD3-mCherry oder Vektor-mCherry transfiziert. Des Weiteren wurde endogenes Cathepsin D in Zellen nachgewiesen, die nicht transfiziert wurden. Cathepsin D wird als saure Hydrolase über die Bindung an M6P-Rezeptoren vom TGN zu den Endosomen/Lysosomen transportiert (Bräulke und Bonifacino 2009). Cathepsin D und mCherry dienten in diesem Experiment als Kontrollen der Methodik. Durch die Färbung von endogenem LAMP1 wurden lysosomale Membranen dargestellt.

In Abbildung 17 ist das mCherry-Fluoreszenzprotein im Nukleus und Cytosol der Zelle zu erkennen. Diese zelluläre Verteilung zeigt sich dabei in beiden MEF-Zelllinien identisch. Cathepsin D lässt sich lysosomal-luminal in den WT-MEF-Zellen darstellen (Abb.17, C). In den MPR-defizienten MEF-Zellen zeigt sich ein wesentlich unterschiedliches Bild. Cathepsin D ist in den MEF-MPR-Knockout-Zellen nicht mehr nachweisbar (Abb.17, D). mPLD3-mCherry kolokalisiert in den MEF-Wildtyp Zellen mit dem lysosomalen Marker LAMP1 (Abb.17, E). Auch in den MPR-defizienten MEF-Zellen ist mPLD3-mCherry in LAMP1-positiven Vesikeln lokalisiert und weist eine vergleichbare Verteilung im Vergleich zur PLD3-Expression in Wildtypzellen auf. Das mPLD3-mCherry wird dabei ebenfalls betont innerhalb von lysosomalen Lumina dargestellt (Abb.17, F).

Der Versuch zeigt, dass PLD3 unabhängig von M6P-Rezeptoren zu Lysosomen transportiert wird.



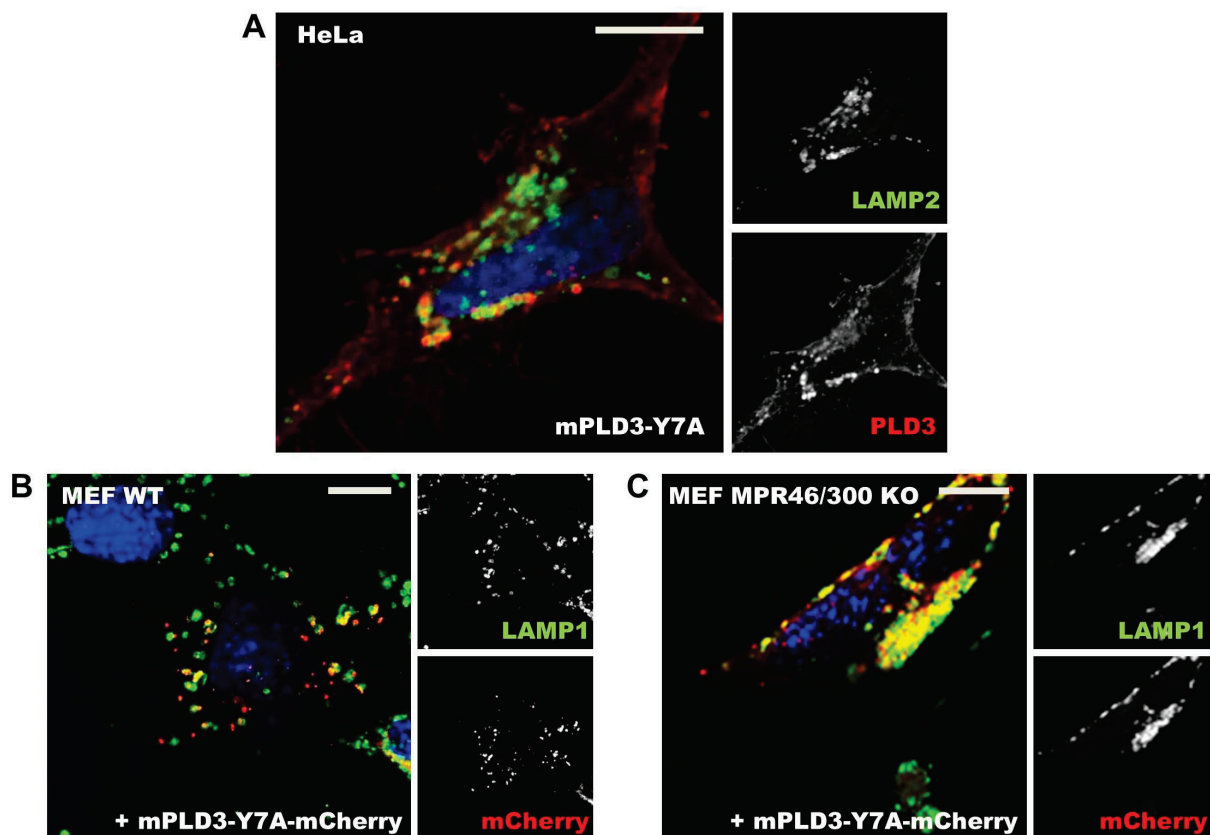


**Abbildung 17: Sortierung von mPLD3-mCherry in MPR-defizienten MEF.** MEF-Wildtyp-(A, C, E) und MEF-MPR<sub>46/300</sub>-KO-Zellen (B, D, F) wurden jeweils mit der cDNA von mCherry (A, B) oder mPLD3-mCherry (E, F) transfiziert. Endogenes Cathepsin D (CTSD) wurde in Zellen nachgewiesen, die nicht transfiziert wurden (C, D). Cathepsin D und mCherry dienen in dem Versuchsaufbau als Kontrollen. LAMP1 ist jeweils als lysosomales Membranprotein in Grün dargestellt. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten am konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m.

#### 5.5.4 Die Rolle des N-terminalen Tyrosin-Motivs von PLD3 bezüglich der intrazellulären Sortierung

Die kurze, cytosolische N-terminale Domäne von PLD3 beinhaltet ein potentiell YXX $\emptyset$  („Tyrosin“-)Sortierungssignal, welches eine Rolle bei dessen der Sortierung in Lysosomen spielen könnte. Durch gerichtete Mutagenese wurde das Tyrosin in Position 7 der Aminosäuresequenz von PLD3 gegen Alanin ausgetauscht, um eine mögliche Funktion des Sortierungsmotivs zu unterbinden. Für den Versuch wurden zwei verschiedene PLD3-Mutanten, mPLD3-Y7A und mPLD3-Y7a-mCherry, generiert und mikroskopisch analysiert.

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3-Y7A transfiziert. Zusätzlich wurden Wildtyp-MEF- sowie MEF-MPR<sub>46/300</sub>-Knockout-Zellen mit der cDNA von mPLD3-Y7A-mCherry transfiziert. PLD3-Y7A wurde durch die indirekte Immunfluoreszenz mit dem anti-PLD3-Antikörper (5.7), der spezifisch an einen kurzen Bereich des cytosolischen N-Terminus bindet, nachgewiesen. Zum Aufzeigen möglicher Kolo-kalisationen mit lysosomalen Markerproteinen wurden in diesem Versuchsaufbau LAMP1/ LAMP2 gegengefärbt.



**Abbildung 18: Einfluss der YXXØ-Domäne auf die Sortierung von PLD3.** A HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3-Y7A transfiziert. PLD3 wurde durch den  $\alpha$ -PLD3-Antikörper (N-term) detektiert und in Rot dargestellt. LAMP2 (grün) dient als lysosomales Markerprotein. B/C Wildtyp-MEF und MPR-defiziente MEF wurden mit der cDNA von mPLD3-Y7A-mCherry transfiziert. Das überexprimierte Protein ist in Rot dargestellt. Als lysosomaler Marker wurde LAMP1 in Grün gefärbt. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten am konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m.

Die in Abbildung 18 (A) gezeigten HeLa-Zellen, welche mPLD3-Y7A exprimieren, zeigen eine Anfärbung der PLD3-Mutante an der Plasmamembran. Durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper wird die PLD3-Mutante zusätzlich in LAMP2-positiven Vesikeln dargestellt. Auch das, in MEF-Wildtyp-Zellen (Abb.18, B) und MEF-MPR<sub>46/300</sub>-KO-Zellen exprimierte (Abb.18, C) mPLD3-Y7A-mCherry kolo-kalisiert in Vesikeln mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP1. mPLD3-Y7A sowie mPLD3-Y7A-mCherry werden zusätzlich in LAMP1/2-negativen Vesikeln dargestellt. Exprimiertes mPLD3-Y7A-mCherry zeigt lichtmikroskopisch keine Assoziation mit der Plasmamembran (Abb.18, B/C). In Zusammenschau mit den Ergebnissen von „5.5.3“ kann abgeleitet werden, dass die

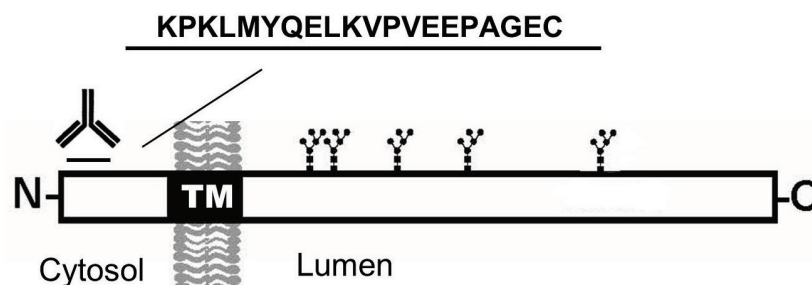


lysosomale Sortierung von PLD3 im Wesentlichen unabhängig von Mannose-6-Phosphat sowie der YXXØ-Domäne erfolgt.

## 5.6 Pineda anti-PLD3-Antikörper: Gewinnung und Testung

### 5.6.1 Charakterisierung von anti-PLD3-Antiseren

Zu Beginn der Arbeit wurden, zur Generierung eines anti-PLD3-Antikörpers, drei Kaninchen durch die Firma Pineda mit einem PLD3-Peptidfragment (Abb.19) immunisiert und im Folgezeitraum Serum gewonnen.

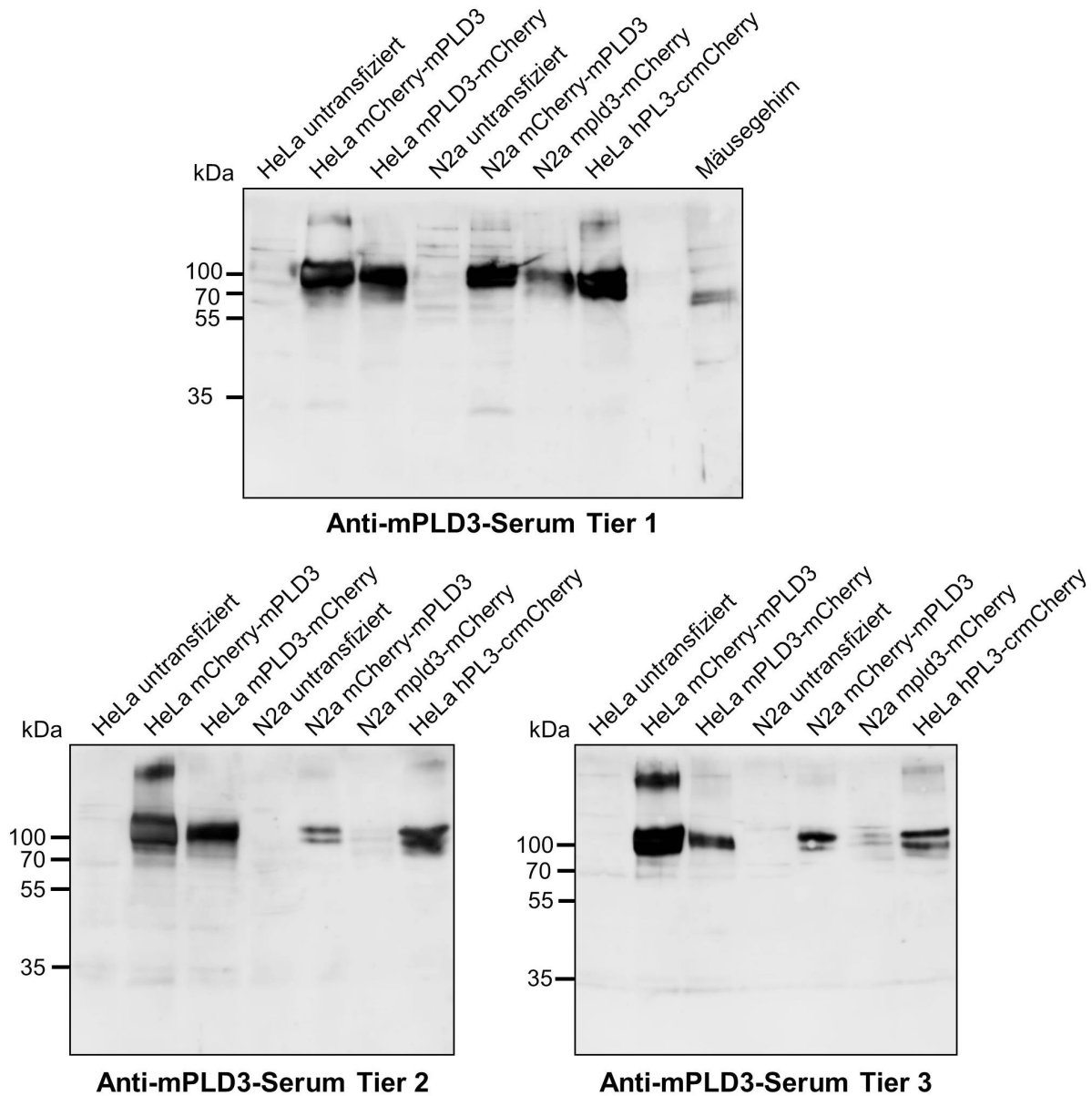


**Abbildung 19:** Bindung des Pineda anti-PLD3-Antikörper am cytosolischen N-Terminus. Das Peptidfragment, welches von dem N-terminalen Pineda anti-PLD3-Antikörper spezifisch detektiert wird, ist unterstrichen (mPLD3, Aminosäure 2-21). TM = Transmembrandomäne.

Zur Testung der Antikörper wurden HeLa- und N2a-Zellen mit der cDNA von mCherry-mPLD3, mPLD3-mCherry oder hPLD3-crmCherry transfiziert und Western Blots erstellt. PLD3 wurde anschließend durch die jeweiligen anti-PLD3-Antiseren detektiert. Untransfizierte Zellen dienten in diesem Versuch als Spezifitäts-Kontrollen. Der Western Blot, welcher mit dem Antiserum von Kaninchen 1 behandelt wurde, enthält zusätzlich eine Spur, auf der Mäusegehirn-Homogenat geblottet wurde. Das Molekulargewicht des fusionierten mCherry-Fluoreszenzproteins beträgt etwa 29 kDa.

Alle Antiseren zeigen spezifische Signale in den Spuren, die Proteine der Zellen enthalten, welche mCherry-getaggtetes mPLD3 exprimieren (Abb.20). Auch die Spuren der Lysate der untransfizierten Zellen zeigen verschiedene Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten in den abgebildeten Western Blots. Die anti-PLD3-Antiseren detektieren die humane sowie die murine Phospholipase D3. Vergleicht man die Proteinfärbung durch die jeweiligen Testseren miteinander, so zeigt sich ein nahezu identisches Bild. Eine deutliche (Doppel-)Bande ist jeweils bei ~100 kDa sichtbar. Diese zeigt sich in allen Spuren der Zellen, welche h/mPLD3-(cr)mCherry exprimieren. Die Expression von mPLD3-mCherry fällt in den N2a-Zellen durch eine geringere effiziente Transfektion schwächer aus. Im Western Blot, der mit dem Antiserum von Tier 1 behandelt wurde, ist in der Spur, welche geblottete Mäusegehirn-Proteine enthält, ein deutliches Signal bei etwa 65 kDa zu erkennen.

Auch die untransfizierten HeLa- und N2a-Zellen zeigen auf dieser Höhe in allen Blots ein schwächeres Signal.

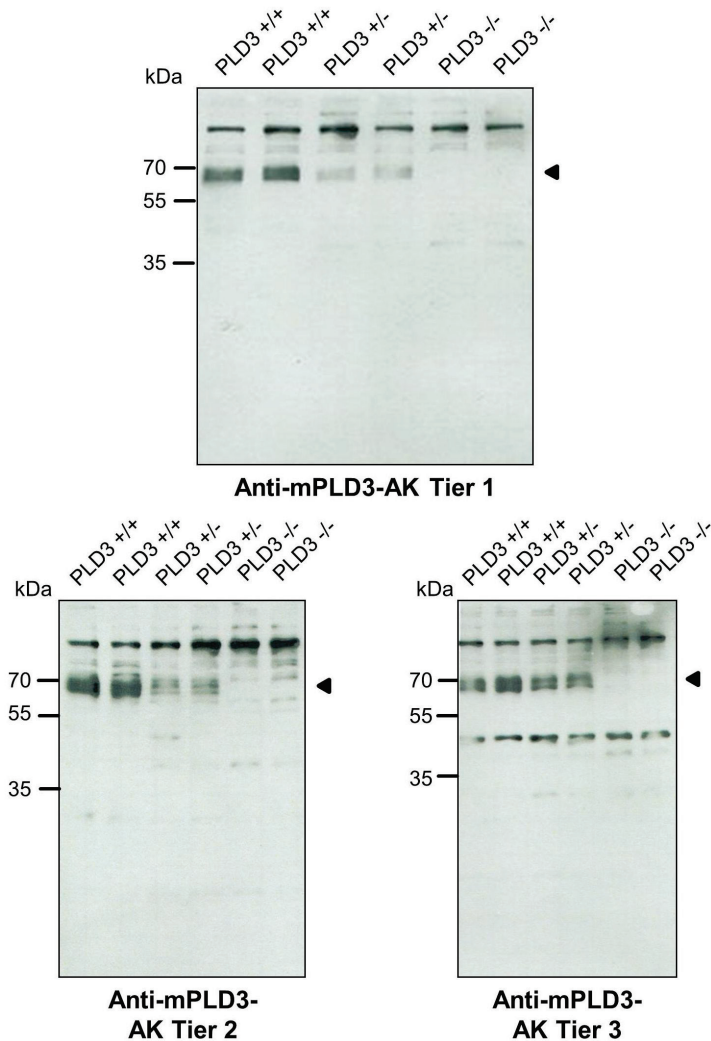


**Abbildung 20: Anti-PLD3-Serum (Tag 120 nach Erstimmunisierung) im Western Blot.** HeLa- und N2a-Zellen blieben untransfiziert oder wurden mit der cDNA von mCherry-mPLD3, mPLD3-mCherry oder hPLD3-crmCherry transfiziert. Der Western Blot, welcher mit dem Serum von Tier 1 inkubiert wurde, enthält zusätzlich eine Spur mit geblottetem Mäusegehirn-Lysat. Die geblotteten Proteine wurden mit drei verschiedenen Pineda anti-PLD3-Seren (Tier 1-3, N-terminal) inkubiert. Molekulargewicht mCherry: ~ 29 kDa.

### 5.6.2 Charakterisierung von anti-PLD3-Antikörpern

Nach Abschluß der Testphase der Antiseren wurde den drei Kaninchen seitens der Firma Pineda Blut entnommen und anti-PLD3-Antikörper nach Affinitätsaufreinigung gegen das Immunisierungspeptid (mPLD3, Aminosäure 2-21, Abb.19) gewonnen. Es folgte die Testung der anti-PLD3-Antikörper im Western Blot.

Zur Herstellung der folgenden Western Blots wurden PLD3 Wildtyp (+/+), PLD3 +/- und PLD3 -/- Mäusegehirnextrakte gewonnen und diese analysiert. Nach der Anfertigung der Western Blots wurde die Phospholipase D3 mit den entsprechenden anti-PLD3-Antikörper von Kaninchen 1, 2 oder 3 als Primärantikörper detektiert.



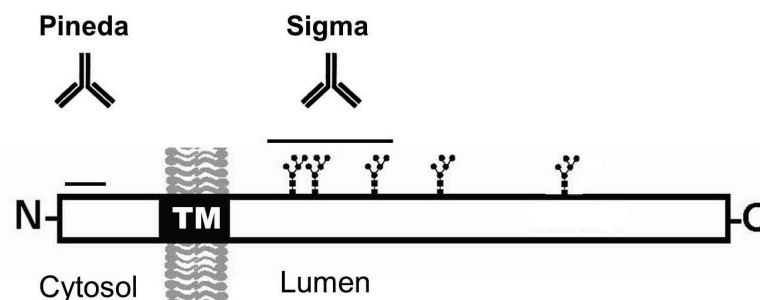
**Abbildung 21: Anti-PLD3-Antikörper im Western Blot.** Dargestellt sind Gehirnlysate von PLD3+/+, +/- und -/- Mäusen. Zur Sichtbarmachung der Proteine wurden die Nitrozellulose-Membranen jeweils mit den aufgereinigten anti-PLD3-Antikörpern der Kaninchen 1, 2 oder 3 inkubiert. Spezifische PLD3-Signale (Doppelbande, markiert) zeigen sich mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa. AK= Antikörper.

In den abgebildeten Blots sind spezifische Signale in Form von Doppelbanden auf einer Höhe von etwa 65 kDa in den Spuren der Wildtyp-Gehirne zu erkennen (Abb.21). Die Spuren der PLD3 +/- - Mäusegehirne zeigen ein schwächeres Signal auf der gleichen Höhe. In den Spuren der Gehirne der Knockoutmäuse sind keine Banden bei 65 kDa sichtbar. In den drei dargestellten Western Blots zeigen sich keine weiteren spezifischen PLD3-Signale. Aufgrund der spezifischen PLD3-Darstellung wurden in nachfolgenden Analysen die von Kaninchen 1 gebildeten Antikörper eingesetzt.

### 5.7 Anti-PLD3-Antikörper im Vergleich

Zuvor durchgeführte Experimente zeigten, dass die Phospholipase D3 selbst proteolytisch gespalten werden könnte, wobei kleinere Peptidfragmente entstehen würden (5.3, Abb.12,

A). Um eine mögliche Prozessierung von PLD3 zu untersuchen und entsprechende Fragmente zu detektieren, kamen in den folgenden Versuchen verschiedene anti-PLD3-Antikörper zur Anwendung (Abb.22). Zur Erkennung eines kurzen Abschnitts des cytosolischen N-Terminus diente der Pineda (Antikörper-Service, Berlin) anti-PLD3-Antikörper. Zur Darstellung einer Domäne des C-Terminus in der Mikroskopie sowie im Western Blot wurde ein kommerzieller anti-PLD3-Antikörper der Firma Sigma eingesetzt. Laut Herstellerangabe detektiert dieser Antikörper vorwiegend humanes PLD3. Durch die Erkennung unterschiedlicher Sequenzbereiche innerhalb der PLD3-Aminosäuresequenz durch die Antikörper könnten unterschiedliche Peptidfragmente dargestellt werden.



**Abbildung 22:** Pineda und Sigma anti-PLD3-Antikörper, PLD3-Antigen-Antikörper-Bindungsstellen. TM=Transmembrandomäne, mPLD3=488 AS / hPLD3=490 AS.

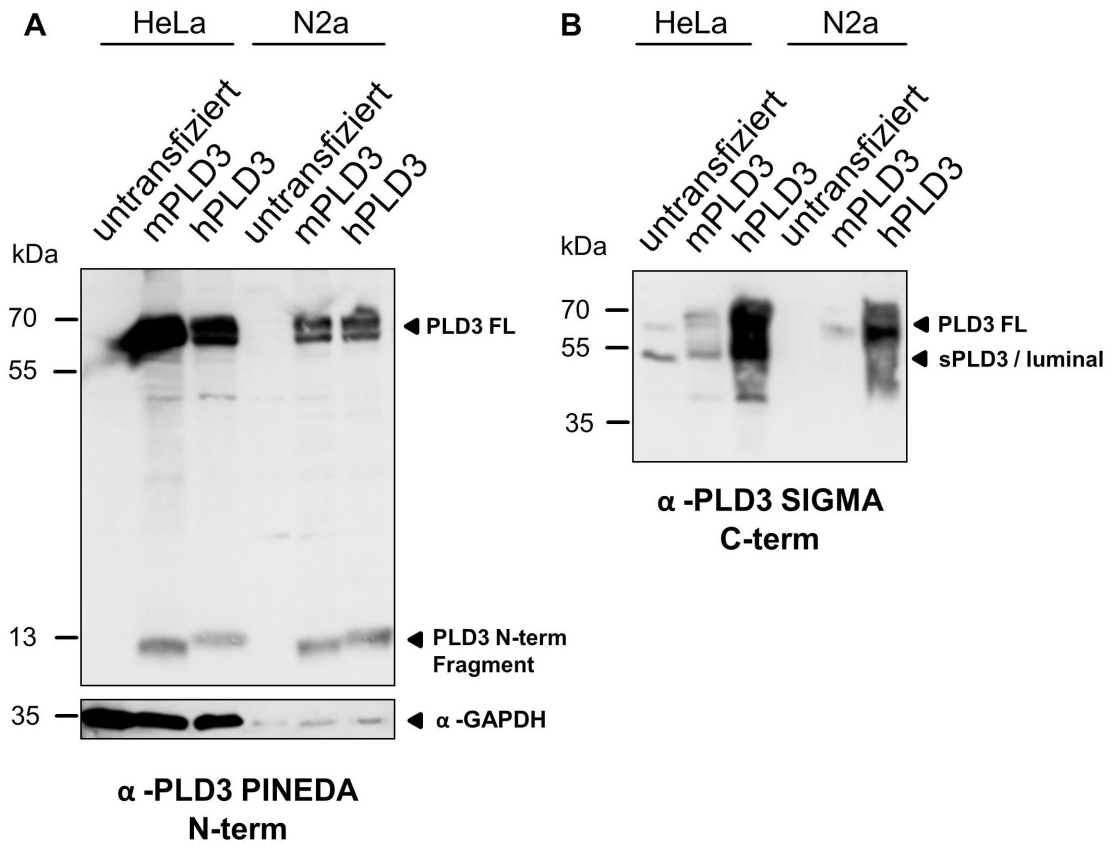
### 5.7.1 Detektion von humanem und murinem PLD3 im Western Blot

Der folgende Versuch sollte aufzeigen und vergleichen, wie der Pineda- sowie der Sigma-anti-PLD-Antikörper die humane/murine Phospholipase D3 auf endogenem Expressionsniveau und in Überexpression in unterschiedlichen Zelllinien im Western Blot darstellen. Des Weiteren sollte eine potentielle proteolytische Prozessierung von PLD3 durch eine mögliche Anfärbung verschiedener Peptidfragmente analysiert werden.

HeLa- und N2a-Zellen wurden untransfiziert kultiviert oder mit der cDNA von mPLD3, bzw. hPLD3 transfiziert. Die Darstellung der zellulären Proteine erfolgte als Western Blot. PLD3 wurde durch den N-terminalen Pineda- sowie durch den C-terminalen Sigma anti-PLD3-Antikörper gefärbt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Der von der Firma Pineda (Berlin) generierte anti-PLD3-Antikörper detektiert das Volllängen-PLD3 (FL) in den Spuren der Lysate der mPLD3 / hPLD3 überexprimierenden Zelllinien deutlich mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa (Abb.23, A). Dabei wird PLD3-FL als Doppelbande dargestellt. Zusätzlich ist unter Überexpressionsbedingungen ein weiteres Fragment zu erkennen, welches nur von diesem N-terminalen Antikörper detektiert wird (PLD3 N-terminales Fragment). Es zeigt sich mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa, wobei es einen minimalen Unterschied zwischen der murinen und humanen Variante gibt.

GAPDH zeigt ein Signal bei etwa 35 kDa, wobei sich die Proteingeesamtmenen Zelllinien-spezifisch zwischen den HeLa- und N2a-Zellen unterscheiden.



**Abbildung 23: Antigen-Erkennung durch die Pineda- und Sigma-anti-PLD3-Antikörper im Western Blot.** HeLa- und N2a- Zellen wurden untransfiziert belassen oder mit der cDNA von mPLD3 (murin) oder hPLD3 (human) transfiziert. Nach dem Immunoblotting der aufgetrennten Zellysate wurden die Nitrozellulose-Membranen mit anti-PLD3-Antikörpern (Pineda/N-term und Sigma/C-term) inkubiert. GAPDH ist als Ladekontrolle dargestellt. FL=„full length“, sPLD3=lösliches Fragment („soluble“).

Der C-terminale Sigma anti-PLD3-Antikörper färbt insgesamt, wie vom Hersteller beschrieben, humanes PLD3 intensiver als die murine Variante (Abb.23, B). Dies sowohl auf endogenem Expressionsniveau als auch in Überexpression. Die untransfizierten HeLa-Zellen zeigen zwei Signale. Eines zeigt eine Bande bei etwa 65 kDa, welches als Volllängen-Protein deklariert wurde (PLD3-FL). Die zusätzliche Bande hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Sie ist als sPLD3 („soluble“/löslich) beschriftet. Es ist zu erkennen, dass in HeLa-Zellen auf endogenem Expressionslevel die Intensität des sPLD3-Signals höher ist als das Signal des PLD3-FL. In der Überexpression zeigt sich besonders das Signal des PLD-FL in der Intensität angehoben. Zusätzlich ist PLD3-FL unter diesen Bedingungen deutlicher als Doppelbande zu erkennen. In den HeLa-Zellen ist, bei Anfärbung von PLD3 durch den C-terminalen Antikörper, eine weitere Bande bei etwa 40 kD zu erkennen, deren Intensität bei PLD3-Überexpression zunimmt. PLD3-NTF ist mit dem Sigma-Antikörper nicht nachweisbar.

In diesem Versuch ist in den murinen N2a-Zellen mit dem C-terminalen Antikörper, im Gegensatz zu den HeLa-Zellen, kein endogenes PLD3 darstellbar. In Überexpression zeigen sich jedoch ebenfalls deutliche Signale. Dabei wird PLD3-FL in den N2a-Zellen prominent gefärbt. Das sPLD3 (CTF) ist in diesen Zellen auch unter Überexpressions-Bedingungen durch den Sigma anti-PLD3-Antikörper nicht nachweisbar.

Der Versuch zeigt, dass die getesteten Antikörper jeweils humanes/murines PLD3 in Überexpression detektieren, wobei teils auch endogenes PLD3 gefärbt wird. Weiterhin lassen sich N- sowie C-terminale PLD3-Fragmente im Western Blot darstellen, wobei PLD3-CTF gegenüber PLD3-FL in HeLa-Zellen bei endogenem Expressionsniveau prominent erscheint.

### **5.7.2 Membranfraktionierung - Trennung der membrangebundenen von der löslichen PLD3-Form**

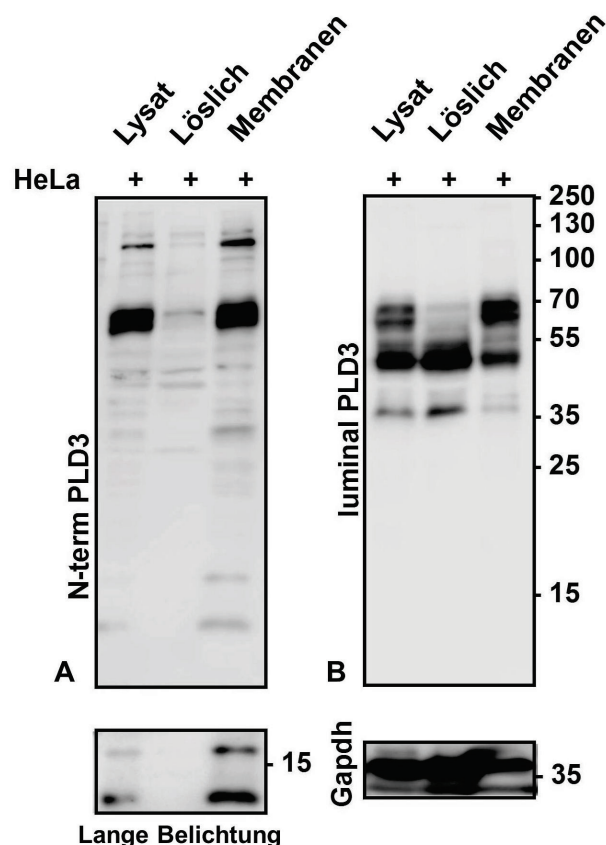
Um weitere Erkenntnisse über verschiedene PLD3-Fragmente zu gewinnen und zu untersuchen, ob diese membrangebunden oder löslich sind, wurde eine Membranfraktionierung durchgeführt. Durch diese Methode werden Zellproteine in eine Membran- sowie eine lösliche Fraktion separiert. Dadurch lassen sich Vollängen-Proteine sowie deren, durch eine Spaltung entstandenen, Fragmente einer entsprechenden Phase zuordnen.

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von hPLD3 transfiziert, Zelllysate gewonnen und diese durch Fraktionierung aufgetrennt. Zur Darstellung von PLD3 im Western Blot wurden die Blotting-Membranen jeweils mit dem Pineda (N-term)- und Sigma (C-term)- anti-PLD3-Antikörper inkubiert.

Durch den N-terminalen Antikörper sind im Lysat verschiedene Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht zu erkennen (Abb.24, A). Diese lassen sich durch die Anreicherung in den entsprechenden Phasen einer jeweiligen Fraktion zuordnen. Am prominentesten lässt sich eine Doppelbande bei etwa 65 kDa darstellen. Diese ist im Lysat und zusätzlich als kräftiges Signal in der Membranfraktion gefärbt. In der löslichen Phase ist diese Doppelbande mit dem N-terminalen Antikörper nicht deutlich darstellbar. Des Weiteren zeigen sich Banden mit einem Molekulargewicht von jeweils etwa 120, 33, 16 und 12 kDa, die ebenfalls maßgeblich im Lysat sowie in der Membranfraktion zu erkennen sind. Die Banden mit geringerem Molekulargewicht wurden zur besseren Signalgebung zusätzlich nach längerer Lichtexposition dargestellt.

Durch die Anfärbung mit dem C-terminalen Antikörper ist ebenfalls eine Doppelbande bei etwa 65 kDa darstellbar, die im Lysat sowie in der Membranfraktion deutlich zu erkennen

ist (Abb.24, B). Eine weitere prominente Bande zeigt sich bei ~50 kDa. Diese lässt sich im Lysat und mit verstärkter Intensität auch in der löslichen Phase darstellen. Mit geringerer Intensität ist dieses Signal auch in der Membranfraktion nachweisbar. Eine vergleichbare Darstellung zeigt sich für ein weiteres Signal, welches bei etwa 35 kDa liegt. Insgesamt kann membrangebundene sowie lösliche Phospholipase D3 nachgewiesen werden, was für eine proteolytische Prozessierung von PLD3 mit Entstehung mehrerer Fragmente spricht.



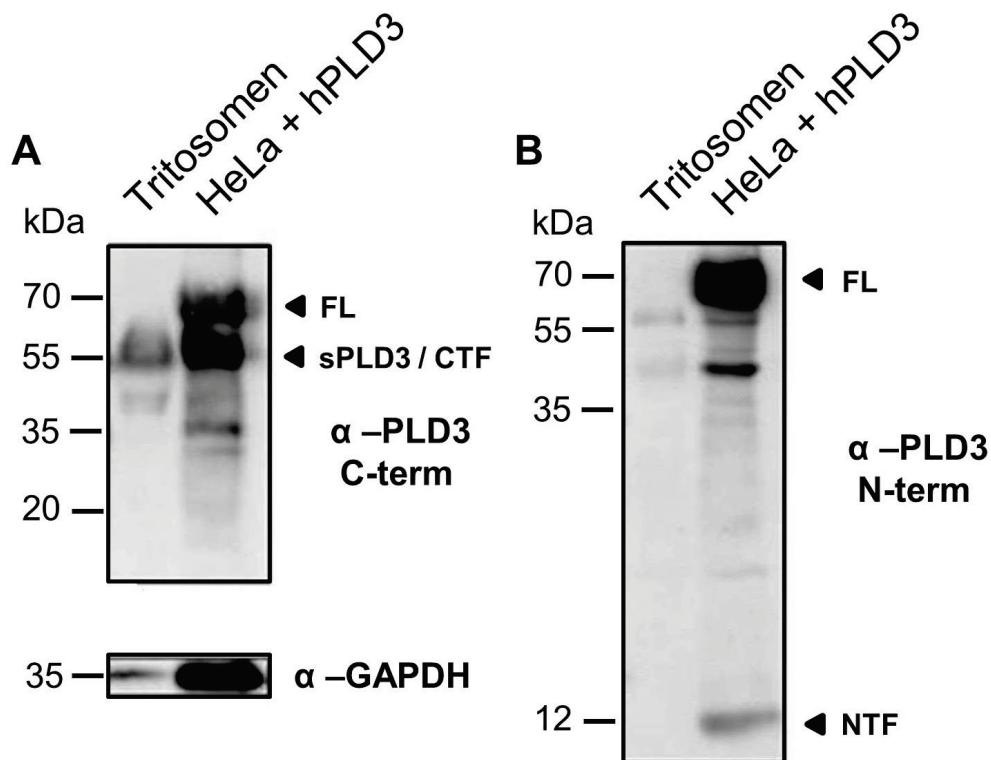
**Abbildung 24: Membranfraktionierung.** HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von hPLD3 transfiziert. Die Phospholipase D3 wurde durch Ultrazentrifugation in eine lösliche- sowie Membranfraktion separiert. Nach SDS-PAGE und Übertragung auf Nitrozellulosemembranen wurden die Proteine mit anti-PLD3-Antikörpern von Pineda (N-term) und Sigma (C-term) inkubiert. Aufgetragen sind jeweils Lysat, lösliche- und Membranfraktion. Gapdh dient als Ladekontrolle. Durchgeführt von Maike Langer, TA der AG Dr. M. Damme.

### 5.7.3 PLD3-Nachweis in Tritosomen

Im folgenden Versuchsaufbau wurden Tritosomen (aus Vorarbeiten der AG Damme) im Western Blot analysiert (Abb.25). Dies sind isolierte Lysosomen der Leber von Mäusen (Markmann et al. 2017). Durch die mögliche Anfärbung von PLD3 in Tritosomen mittels anti-PLD3-Antikörper (N-term, C-term) sollte die zuvor gezeigte lysosomale Lokalisation von PLD3 im Western Blot validiert werden (5.1, 5.4, 5.5). Als Kontrolle wurden zusätzlich die Lysate von HeLa-Zellen, welche hPLD3 überexprimieren, geblottet. GAPDH dient als Ladekontrolle.

Der C-terminale Antikörper detektiert in der Spur der HeLa-Zellen, welche humane PLD3 überexprimieren, ein Doppelbande bei ~65 kDa, die als Volllängenprotein gekennzeichnet ist (Abb.25, A, „FL“). Ein weiteres prominentes Signal zeigt sich bei etwa 55 kDa („sPLD3“, löslich, 5.7.2). Zusätzlich ist eine weitere Bande bei 35 kDa zu erkennen. In Tritosomen lässt sich PLD3 damit deutlich nachweisen. Dabei ist sPLD3 prominent dargestellt. Zusätzlich ist ein schwächeres Signal mit einem Molekulargewicht von etwa 42 kDa zu erkennen.

Der N-terminale Antikörper stellt ein deutliches PLD3-FL-Signal bei etwa 65 kDa in der Spur der HeLa-Zellen, welche hPLD3 exprimieren, dar (Abb.25, B). Eine weitere Bande ist bei etwa 42 kDa zu erkennen. Zusätzlich wird eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa detektiert, welche als N-terminales Fragment beschriftet ist (Abb.25, B, „NTF“). In der Spur der Tritosomen zeigen sich schwache Signale bei etwa 45 kDa sowie 57 kDa, PLD3-FL kann nicht nachgewiesen werden. GAPDH zeigt eine spezifisch gefärbte Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht.



**Abbildung 25: Darstellung endogener PLD3 in Tritosomen.** Endogenes PLD3 wurde in Tritosomen (mit Triton versetzte, isolierte Mäuseleber-Lysosomen) durch anti-PLD3-Antikörper (Pineda N-term, Sigma C-term) detektiert. Zusätzlich gibt es Spuren mit Lysaten von HeLa-Zellen, die hPLD3 überexprimieren. GAPDH dient als Ladekontrolle. FL=„full length“, sPLD3=lösliches Fragment / luminal / CTF, NTF=N-Terminales-Fragment.

Der Versuch zeigt, dass endogene Phospholipase D3 (PLD3-CTF) in Tritosomen und somit lysosomal nachgewiesen werden kann.



#### **5.7.4 Intrazelluläre Lokalisation von PLD3**

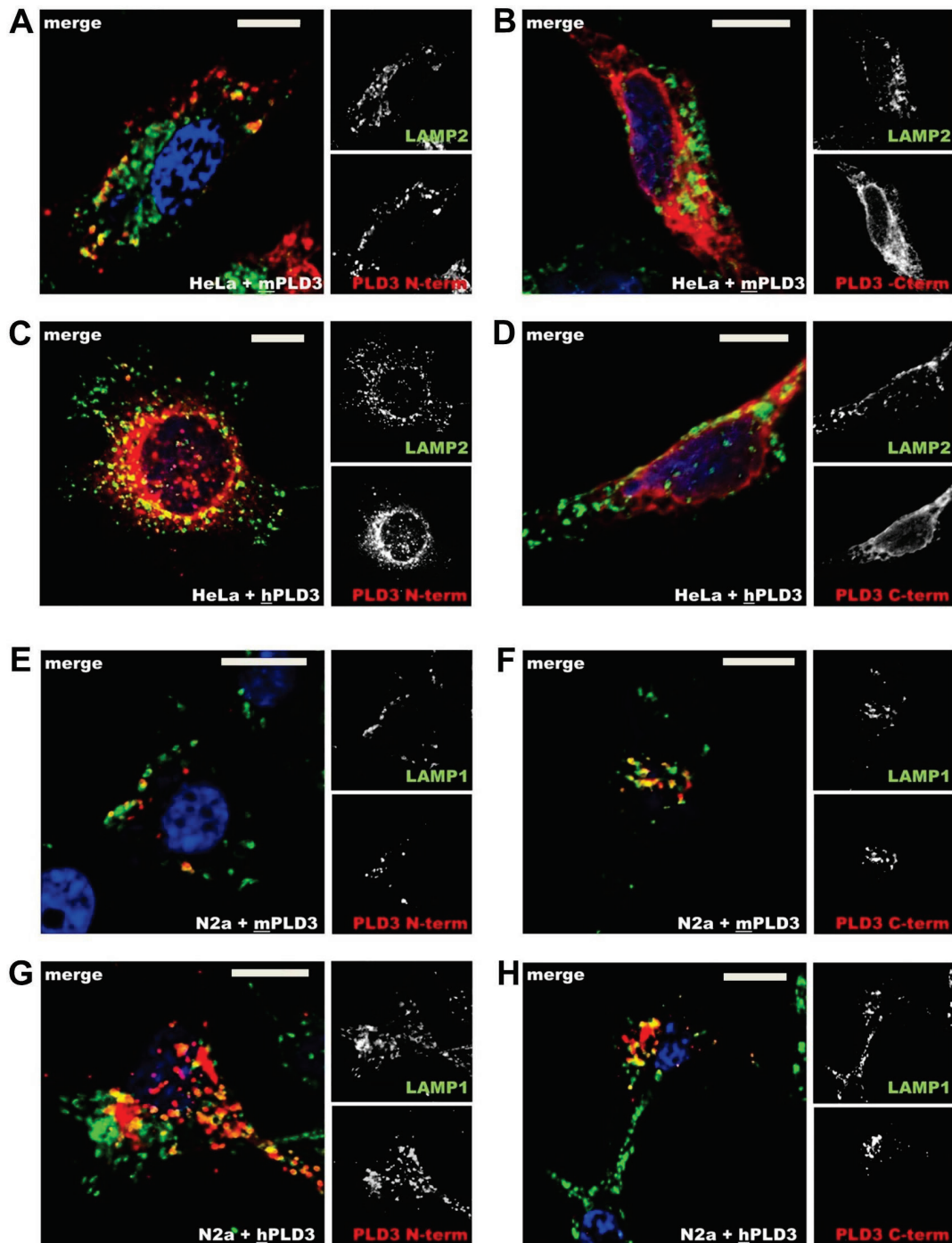
Es konnte gezeigt werden, dass mCherry- sowie 3xFLAG-PLD3-Fusionsproteine mit endosomalen/lysosomalen Markern kolokalisieren (5.1, 5.3, 5.4). Neben der Darstellung von PLD3 durch die verschiedenen anti-PLD3-Antikörper im Western Blot, war es auch von Interesse, die intrazelluläre Lokalisation von Wildtyp-PLD3 in der konfokalen Lasermikroskopie mittels dieser Antikörper in unterschiedlichen Zelllinien zu analysieren.

HeLa- und N2a-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3 oder hPLD3 transfiziert. Zur mikroskopischen Darstellung wurde die Phospholipase D3 von den spezifischen N-terminalen sowie C-terminalen anti-PLD3-Antikörpern detektiert. Als bekanntes Markerprotein für Lysosomen wurde LAMP1 / LAMP2 gegengefärbt.

In den HeLa-Zellen wird PLD3 durch den N-terminalen Antikörper in Abbildung 26 in Vesikeln dargestellt (Abb.26, A, C). Dabei kolokalisiert PLD3 großteils mit LAMP2. Der Antikörper detektiert die murine sowie die humane Variante gleichwertig. Des Weiteren sind PLD3-Signale in LAMP2-negativen Vesikeln zu erkennen und vice versa. Durch den C-terminalen Antikörper wird überexprimiertes murines und humanes PLD3 in den HeLa-Zellen intensiv gefärbt (Abb.26, B, D). Dabei zeigen sich kaum Kolokalisationen mit LAMP2. Der anti-PLD3-Antikörper markiert in diesen Abbildungen eher retikuläre Kompartimente. LAMP2 stellt zelluläre Vesikel dar.

In den N2a-Zellen wird überexprimiertes murines sowie humanes PLD3 als Bestandteil von Vesikeln dargestellt (Abb.26, E, G). Die N- sowie C-terminalen anti-PLD3-Antikörper zeigen jeweils eine vergleichbare Färbung der Phospholipase D3 (Abb.26, E, F). Es sind PLD3-positive Vesikel zu erkennen, in welchen PLD3 mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP1 kolokalisiert. Zusätzlich werden durch den C-terminalen anti-PLD3-Antikörper LAMP1-negative Vesikel in den N2a-Zellen gefärbt.

In der Zusammenschau kann überexprimiertes PLD3 durch die anti-PLD3-Antikörper mikroskopisch nachgewiesen werden. PLD3 ist dabei überwiegend lysosomal lokalisiert.



**Abbildung 26:** Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Darstellung von m/hPLD3 mittels anti-PLD3-Aantikörper. HeLa- (A/B/C/D) und N2a-Zellen (E/F/G/H) wurden mit der cDNA von mPLD3 oder hPLD3 transfiziert. Überexprimiertes PLD3 wurde mit den N-terminalen und den C-terminalen anti-PLD3-Antikörpern detektiert. Als lysosomale Markerproteine wurden LAMP1 / LAMP2 gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsbalken indizieren 10  $\mu$ m.

### 5.7.5 Lysosomale Lokalisation und Topologie

Endogene Phospholipase D3 konnte im Western Blot bereits in Tritosomen nachgewiesen werden (5.7.3). Ein weiteres Ziel war es, die Assoziation von Wildtyp-PLD3 mit Lysosomen auch mikroskopisch auf endogenem Expressionslevel zu zeigen. Die höchste endogene PLD3-Expression weisen neuronale Zellen auf (Pedersen et al. 1998; Yoshikawa et al.

2010). Es sollte getestet werden, ob endogenes PLD3-NTF in SH-SY5Y-Zellen (humanes Neuroblastom) im Western Blot nachgewiesen werden kann. Zuvor durchgeführte Experimente deuteten weiterhin an, dass C-terminal mCherry-fusioniertes PLD3 mikroskopisch teils luminal in Lysosomen dargestellt werden kann (5.4, 5.5.3). Es wurde analysiert, ob sich die Ergebnisse durch die Expression von Wildtyp-PLD3 und der Detektion mit dem C-terminalen anti-PLD3-Antikörper validieren lassen.

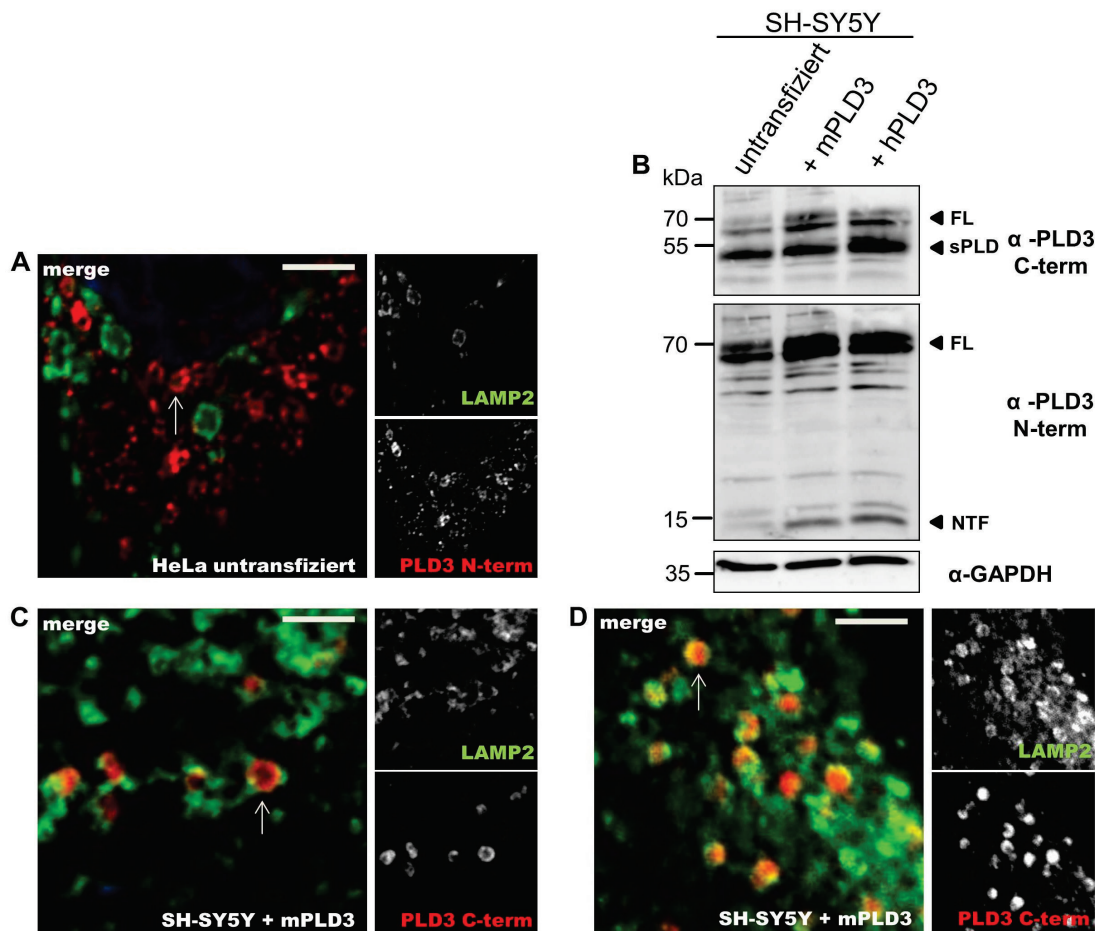
HeLa-Zellen wurden untransfiziert belassen und mikroskopische Präparate hergestellt. Anschließend wurde PLD3 durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper gefärbt. Des Weiteren wurden SH-SY5Y-Zellen kultiviert und diese mit der cDNA von mPLD3 oder hPLD3 transfiziert. Es wurden mikroskopische Präparate hergestellt und PLD3 mit dem C-terminalen anti-PLD3-Antikörper nachgewiesen. Als lysosomaler Marker wurde jeweils LAMP2 gegengefärbt. Zusätzlich ist ein Western Blot abgebildet, in welchem PLD3-Signale in untransfizierten sowie PLD3-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen analysiert wurden (Abb.27).

Im Western Blot (Abb.27, B) sind bei endogener sowie Überexpression von m/hPLD3 in den SH-SY5-Zellen durch die Färbung mit dem C-terminalen anti-PLD3-Antikörper mehrere spezifische PLD3-Signale, darunter eine Doppelbande bei 65 kDa (PLD3-FL), zu erkennen. Des Weiteren detektiert der C-terminale Antikörper eine deutliche Bande bei etwa 50 kDa (sPLD3). Die Banden von PLD3-FL und sPLD3, die bei endogener PLD3-Expression zu erkennen sind, nehmen in ihrer Intensität durch die PLD3-Überexpression zu.

Der N-terminale anti-PLD3-Antikörper detektiert ebenfalls in allen Spuren ein zweibandiges Signal bei etwa 65 kDa (Abb.27, B, PLD3-FL). Zusätzlich ist eine weitere Bande bei etwa 12 kDa (PLD3-NTF) bereits bei endogener PLD3-Expression dargestellt. Die Signale dieser Banden nehmen durch die PLD3-Überexpression in der Intensität zu.

In der Mikroskopie markiert der N-terminale Antikörper endogenes PLD3 in Membranen kleiner Vesikel in HeLa-Zellen (Abb.27, A, Pfeilmarkierung). Es zeigt sich keine Kolo-kalisation mit dem Marker LAMP2, welches als lysosomales Membranprotein zu erkennen ist.

Der C-terminale Antikörper detektiert mPLD3 in Überexpression als Bestandteil von Vesikeln dar (Abb.27, C, D). mPLD3 kolokalisiert dabei mit dem Lysosomenmarker LAMP2, welches als Membranprotein zu erkennen ist und größere Lysosomen teils vollständig abbildet. Durch die Färbung mit dem C-terminalen Antikörper stellt sich PLD3 dabei als membrangebunden dar (Abb.27, C, Pfeilmarkierung), zusätzlich ist es innerhalb der lysosomalen Lumina abgebildet (Abb.27, D, Pfeilmarkierung). Des Weiteren ist zu erkennen, dass mPLD3 nur in LAMP2-positiven Vesikeln gefärbt ist.



**Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blot mit SH-SY5Y- und HeLa-Zellen.** **B** Der Western Blot zeigt SH-SY5Y-Zellen, die PLD3 auf endogenem Niveau exprimieren oder humanes/murines PLD3 nach Transfektion überexprimieren. Die Immunoblots wurden mit spezifischen anti-PLD3-Antikörpern (N-terminal oder C-terminal) inkubiert. GAPDH dient als Ladekontrolle. FL=full length, sPLD3=soluble/lösliches PLD3, NTF=N-Terminales-Fragment. **A** HeLa-Zellen wurden untransfiziert belassen und mit dem anti-PLD3-Antikörper (N-terminal) inkubiert. Als lysosomales Markerprotein wurde LAMP2 in Grün dargestellt. **C/D** SH-SY5Y Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3 transfiziert. mPLD3 wurde mit dem C-terminalen anti-PLD3-Antikörper in Rot nachgewiesen. Als Markerprotein diente die Färbung von LAMP2 (grün dargestellt). Die Maßstabsbalken indizieren 10 µm.

Die Experimente zeigen, dass endogene Phospholipase D3 in SH-SY5Y-Zellen lysosomal vorrangig in der löslichen Form (PLD3-CTF) besteht, auch ein N-terminales Fragment ist bei endogener Expression nachweisbar. Mikroskopisch kann PLD3 lysosomal membrangebunden sowie luminal dargestellt werden, so dass insgesamt ein Anhalt für eine lysosomale proteolytische Prozessierung von PLD3 besteht.

## 5.8 Inhibition der lysosomalen Prozessierung von PLD3

Zuvor durchgeführte Experimente gaben Hinweise darauf, dass PLD3 proteolytisch gespalten werden könnte. In der Membranfraktionierung zeigten sich verschiedene PLD3-Fragmente als lösliche sowie als Membranproteine (5.7.2). Dazu passend konnten Lysosomen-assoziierte, lösliche Fragmente auch mikroskopisch dargestellt und PLD3 zusätzlich in Tritosomen nachgewiesen werden (5.7.3/5). Im folgenden Versuch sollte

analysiert werden, ob die mögliche proteolytische Prozessierung von PLD3 in den späten Endosomen/Lysosomen stattfindet und ob diese pH-abhängig ist. Des Weiteren wurde untersucht, welche Proteasen an der Prozessierung von PLD3 beteiligt sein könnten. Durch den gezielten Einsatz von Proteaseinhibitoren und der Hemmung der lysosomalen Azidifizierung sollte eine Spaltung der Phospholipase D3 unterbunden werden.

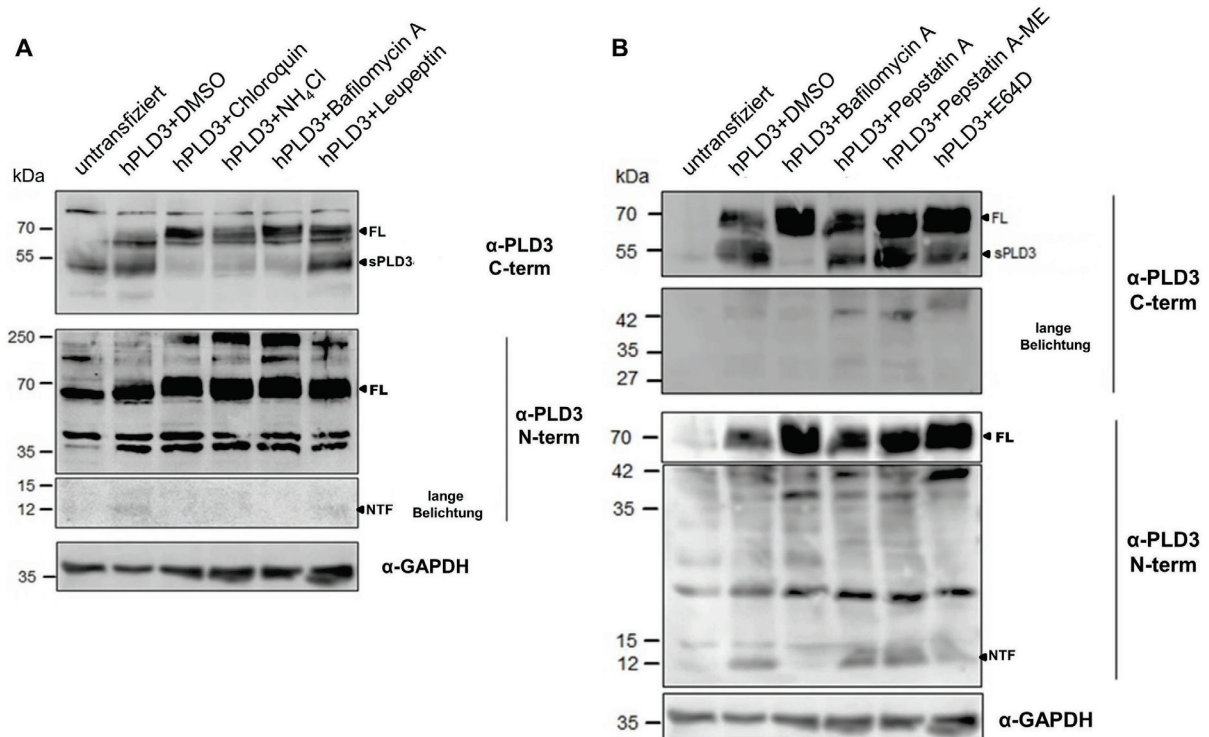
HeLa-Zellen wurden untransfiziert belassen oder mit der cDNA von hPLD3 transfiziert. Die Zellen wurden nach der PLD3-Expression mit verschiedenen Proteaseinhibitoren behandelt. Zur allgemeinen Hemmung der Azidifizierung des endosomalen/lysosomalen Milieus wurden alternativ Bafilomycin A, Chloroquin oder Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) eingesetzt. E64D und Leupeptin blockieren Cystein-Proteasen, wobei Leupeptin zusätzlich auch Serin- und Threonin-Proteasen inhibiert. Zur Inhibition von Aspartyl-Proteasen wurden Pepstatin A und Pepstatin A-Methylester eingesetzt. DMSO diente dabei als Negativkontrolle, um zu zeigen, dass ein eventueller Effekt nicht durch das Lösungsmittel der Inhibitoren bedingt ist.

Mit dem N-terminalen sowie dem C-terminalen Antikörper lässt sich endogenes PLD3 im Immunoblot von aufgetrennten HeLa-Zelllysaten darstellen (Abb.28, A, B). Durch Anfärbung mit dem C-terminalen Antikörper ist eine prominente Bande bei etwa 50 kDa zu erkennen (sPLD3). Durch die Überexpression von hPLD3 zeigt sich auch eine weitere Doppelbande bei 65 kDa (FL). Es ist zu erkennen, dass die Zellen, welche mit Inhibitoren der lysosomalen Azidifizierung (Chloroquin,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Bafilomycin A) behandelt wurden, eine Verminderung der löslichen Form von PLD3 (sPLD3, CTF) zeigen, wobei die PLD3-FL-Bande weiterhin prominent erkennbar bleibt.

Eine geringe Inhibition der proteolytischen Prozessierung von PLD3, mit Abnahme des Verhältnisses sPLD3/PLD-FL, zeigt sich ebenfalls in den Zellen, welche mit dem Cystein-Proteasen-Inhibitor E64D inkubiert wurden (Abb.28, B). In den Spuren der Zellen, welche mit Pepstatin A und Pepstatin A-Methylester behandelt wurden, ist ein Signal bei 42 kDa zu erkennen.

Der N-terminale anti-PLD3-Antikörper detektiert endogenes Vollängen-PLD3 (FL) als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa (Abb.28, A). Dieses Signal nimmt unter der PLD3-Überexpression an Intensität zu. Auf einer Höhe von etwa 12 kDa ist eine weitere Bande zu erkennen, welche endogen darstellbar ist und durch die PLD3-Überexpression ebenfalls in ihrer Darstellung intensiviert wird (Abb.28, B, NTF). Unter der Behandlung mit Chloroquin,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sowie Bafilomycin A nimmt dieses Signal in seiner Intensität stark ab und ist teilweise nicht mehr zu erkennen (Abb.28, A, B). Die Zellen, welche mit E64D inkubiert wurden, zeigen den gleichen Effekt auf PLD3-NTF, allerdings in

einer abgeschwächten Form (Abb.28, B). Die Behandlungen mit DMSO oder Leupeptin zeigen keinen Einfluss auf die proteolytische Prozessierung der Phospholipase D3.



**Abbildung 28: Einfluss von lysosomalen Proteaseinhibitoren und Hemmstoffen der lysosomalen Azidifizierung auf PLD3.** HeLa-Zellen wurden untransfiziert belassen oder mit der cDNA von hPLD3 transfiziert. Nach Überexpression des Proteins wurde das Zellkulturmedium gewechselt und den Zellen (Protease-)Inhibitoren oder DMSO dazugegeben. Die Immunoblots wurden mit anti-PLD3-Antikörpern (N-terminal, C-terminal) inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle gefärbt. Die Aufnahmen entstanden zusätzlich teils nach längerer Lichtexpositionszeit. FL=full length, sPLD=löslich / CTF, NTF=N-Terminales-Fragment.

Das Experiment zeigt, dass die Phospholipase D3 lysosomal proteolytisch prozessiert wird, wobei die Spaltung durch Hemmung der lysosomalen Azidifizierung sowie Blockierung von Cystein-Proteasen durch E64D inhibiert werden kann.

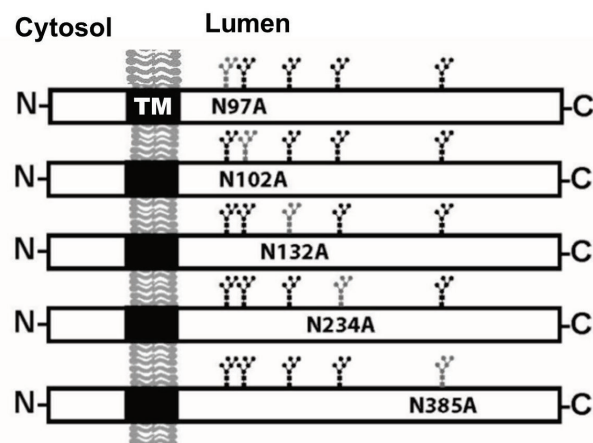
## 5.9 Glykosylierung von PLD3

Es gibt fünf Bereiche innerhalb der AS-Sequenz von PLD3, die entsprechend der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr glykosyliert sein könnten (Abb.29). Dies gilt gleichermaßen für die humane sowie für die murine Phospholipase D3. An diesen Asparaginen könnten N-glykosidisch Mannose-reiche, Hybrid- oder komplexe Zuckertypen gebunden sein (Kornfeld und Kornfeld 1985).

Im folgenden Experiment sollte der Glykosylierungsstatus von PLD3 analysiert werden. Dafür wurde PLD3 einem Glykoprotein-Verdau durch die Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H) unterzogen. Durch PNGase F wird die glykosidische Bindung von N-Acetylglucosamin an Asparagin gespalten. Dies gilt sowohl für



Mannose-reiche Zuckerreste, als auch für den Hybrid- sowie Komplextyp (Maley et al. 1989). Endo H spaltet zwischen zwei N-Acetylglucosaminen. Dabei ist nur die N-Glykosylierung, welche im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet, sensibel bezüglich des Endo H-Verdau. Weitere Veränderung der Glykosylierung im Golgi-Apparat sind dagegen, im Unterschied zum Verdau mit PNGase F, resistent gegenüber dem Verdau mit Endo H (Maley et al. 1989; Stanley 2011).

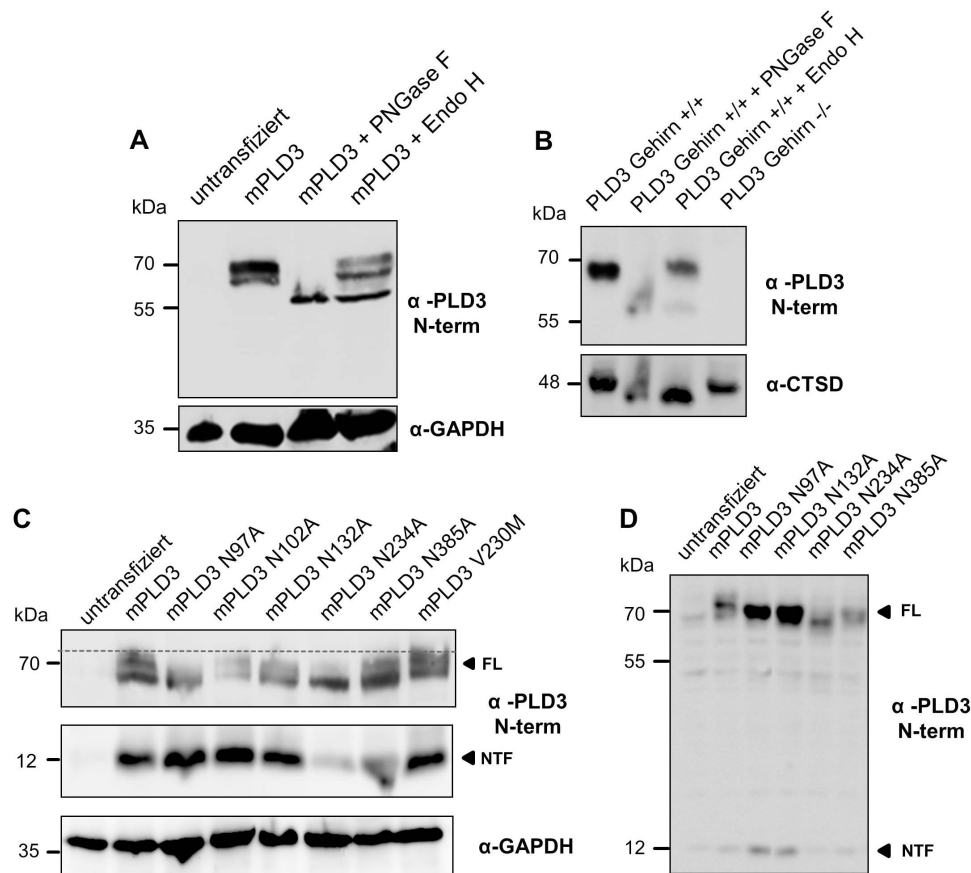


**Abbildung 29: Übersicht der generierten mPLD3-Mutanten zur Analyse potentieller N-Glykosylierungen.** TM=Transmembrandomäne.

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3 transfiziert und Zelllysate der PLD3-überexprimierenden Zellen hergestellt. Zusätzlich wurden Gehirnllysate von PLD3  $+/+$  und PLD  $-/-$  Mäusen gewonnen. Anschließend wurden die Proteine der HeLa-Zellen und Gehirnllysate mit PNGase F- sowie Endo H verdaut und nach SDS-PAGE im Western Blot untersucht. PLD3 wurde mit dem N-terminalen anti-PLD3-Antikörper detektiert. Dieser Versuch diente dem Aufzeigen einer möglichen Glykosylierung von PLD3 und sollte zusätzlich Hinweise geben, welche Zuckertypen mit dem Protein verbunden sein könnten. Als Kontrolle der Methodik wurde das Glykoprotein Cathepsin D gefärbt (Abb.30, B), welches N-glykosidisch mit Mannose-reichen Zuckerresten konjugiert ist (Hasilik und Neufeld 1980; Fortenberry et al. 1995).

Für die Western Blots in Abbildung 30 (C, D) wurden HeLa-Zellen mit der cDNA von PLD3-Mutanten, welche durch gerichtete Mutagenese generiert wurden, transfiziert. Dabei handelt es sich jeweils um eingebrachte Punktmutationen, die einen Aminosäureaustausch innerhalb der entsprechenden Konsensussequenzen von Asparagin zu Alanin bewirken. Der AS-Austausch führt dazu, dass an diese AS keine Zucker mehr angehängt werden können. Die gezielte Mutagenese sollte erkennen lassen, in welchen Bereichen Zuckerreste an PLD3 gebunden sein könnten. Zusätzlich wurde auch die humane Patientenmutation (V232M) (Cruchaga et al. 2014) in ihrer murinen Variante als mPLD3-V230M in HeLa-Zellen

transfiziert und analysiert, ob diese Mutation einen Einfluss auf die Glykosylierung/Darstellung von PLD3 im Western Blot hat (Abb.30, C).



**Abbildung 30: Deglykosylierung von WT-PLD3 sowie PLD3-Mutanten im Western Blot.** **A** HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3 transfiziert. Die Zelllysate sowie Gehirnllysate von PLD3- Wildtyp und Knockoutmäusen (**B**) wurden anschließend mit den Glykosidasen PNGase F und Endo H behandelt. Cathepsin D (CTSD) wurde als Kontrollprotein gefärbt. **C/D** HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3 und PLD3-Mutanten, in denen jeweils durch gerichtete Mutagenese innerhalb der entsprechenden Konsensussequenzen Asparagin durch Alanin ersetzt wurde, transfiziert. Zusätzlich fand die Transfektion mit der murinen Variante (V230M) einer PLD3-Patientenmutation statt. Die Phospholipase D3 wurde jeweils mit dem N-terminalen anti-PLD3-Antikörper detektiert. Für den in „D“ gezeigten Western Blot wurden die Proteine in einem NuPAGE-Gel (4-12%) aufgetrennt. GAPDH dient als Ladekontrolle. FL=„full length“, NTF=N-Terminales-Fragment.

In Abbildung 30 (A) ist mPLD3 als Vollängenprotein und Doppelbande bei etwa 65 kDa zu erkennen. Nach dem PNGase F-Verdau verbleibt nur noch eine Bande bei etwa 55 kDa. Der Endo H-Verdau zeigt weiterhin das Doppelbanden-Signal bei 65 kDa und zusätzlich eine Bande bei ~55 kDa. Im Western Blot (Abb.30, B) zeigt sich ein ähnliches Resultat. Die PLD3-Wildtyp-Gehirne zeigen ein spezifisches PLD3-Signal bei etwa 65 kDa. PLD3 zeigt sich hier ebenfalls sensibel gegenüber dem Verdau mit PNGase F und eine Bande bei etwa 55 kDa ist zu erkennen. Auch der Verdau mit Endo H zeigt ein, mit dem der mPLD3 überexprimierenden HeLa-Zellen, vergleichbares Bild. Die Bande des PLD3-FL bei ~65 kDa bleibt bestehen und zusätzlich ist eine weitere Bande bei etwa 55 kDa zu erkennen. In der PLD3 -/- -Gehirnllysate-Spur kann kein PLD3 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in



diesem Western Blot endogenes Cathepsin D (CTSD) als Kontrolle dargestellt. Cathepsin D wird erwartungsgemäß durch den Verdau mit PNGase F sowie Endo H vollständig deglykosyliert.

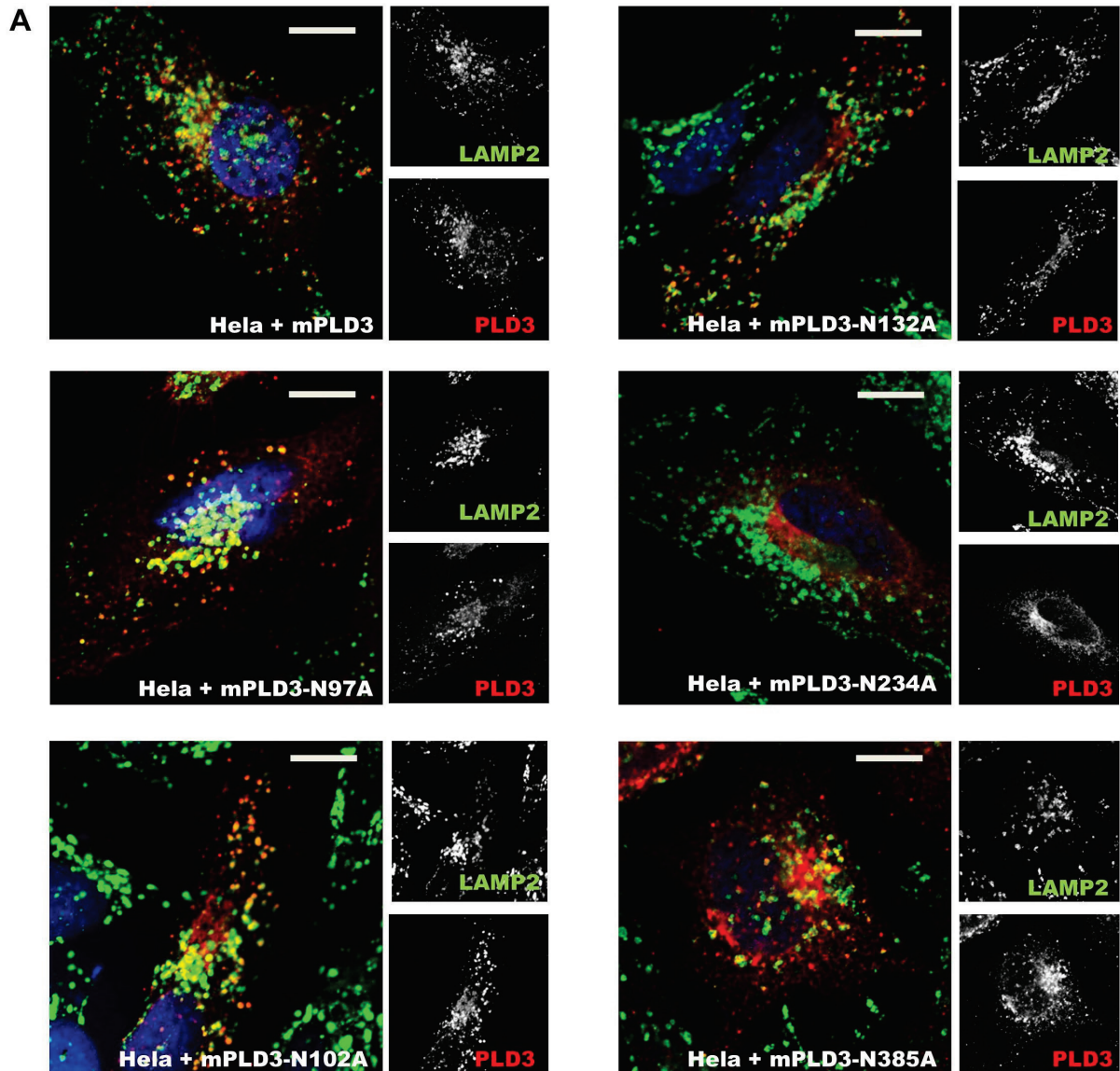
Im Immunoblot der PLD3-Mutanten wird Wildtyp-mPLD3-FL zweibandig bei etwa 65 kDA dargestellt (Abb.30, C). Die murine Variante der Patientenmutation (mPLD3-V230M) zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp. Auch die Mutante mPLD3-N102A ist bezüglich des Molekulargewichts gegenüber dem Wildtyp unverändert. Die mPLD3-N97A, -N132A, -N234A sowie -N385A erscheinen jeweils im Molekulargewicht um wenige kDa verringert gegenüber dem Wildtyp-Protein mit einer entsprechenden Bandenverschiebung im Western Blot. In den Spuren mit mPLD3-N97A und -N234A ist maßgeblich die untere Bande des physiologisch zweibandigen Vollängenproteins zu erkennen und betont dargestellt. Eine weitere Veränderung zeigt sich bezüglich der N-terminalen Fragmente. In allen Spuren mit Zelllysaten, in welchen PLD3 überexprimiert wurde, ist PLD3-NTF zu erkennen. Dabei zeigt sich eine deutliche Signalverminderung in der Spur mit mPLD3-N385A und nahezu eine Aufhebung des NTF-Signals in der mPLD3-N234A-Spur (Abb.30, C). Weiterhin ist zu erkennen, dass es keine Verschiebungen der NTF-Signale im Molekulargewicht in den Spuren der PLD3-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gibt (Abb.30, D).

In Zusammenschau der Experimente wird gezeigt, dass PLD3 mit verschiedenen Zuckern, teils vom Hybrid-/ Komplextyp, N-glykosidisch an verschiedenen Positionen konjugiert ist. Dabei hat eine Alteration der physiologischen Glykosilierung Auswirkungen auf die lysosomale proteolytische Prozessierung von PLD3.

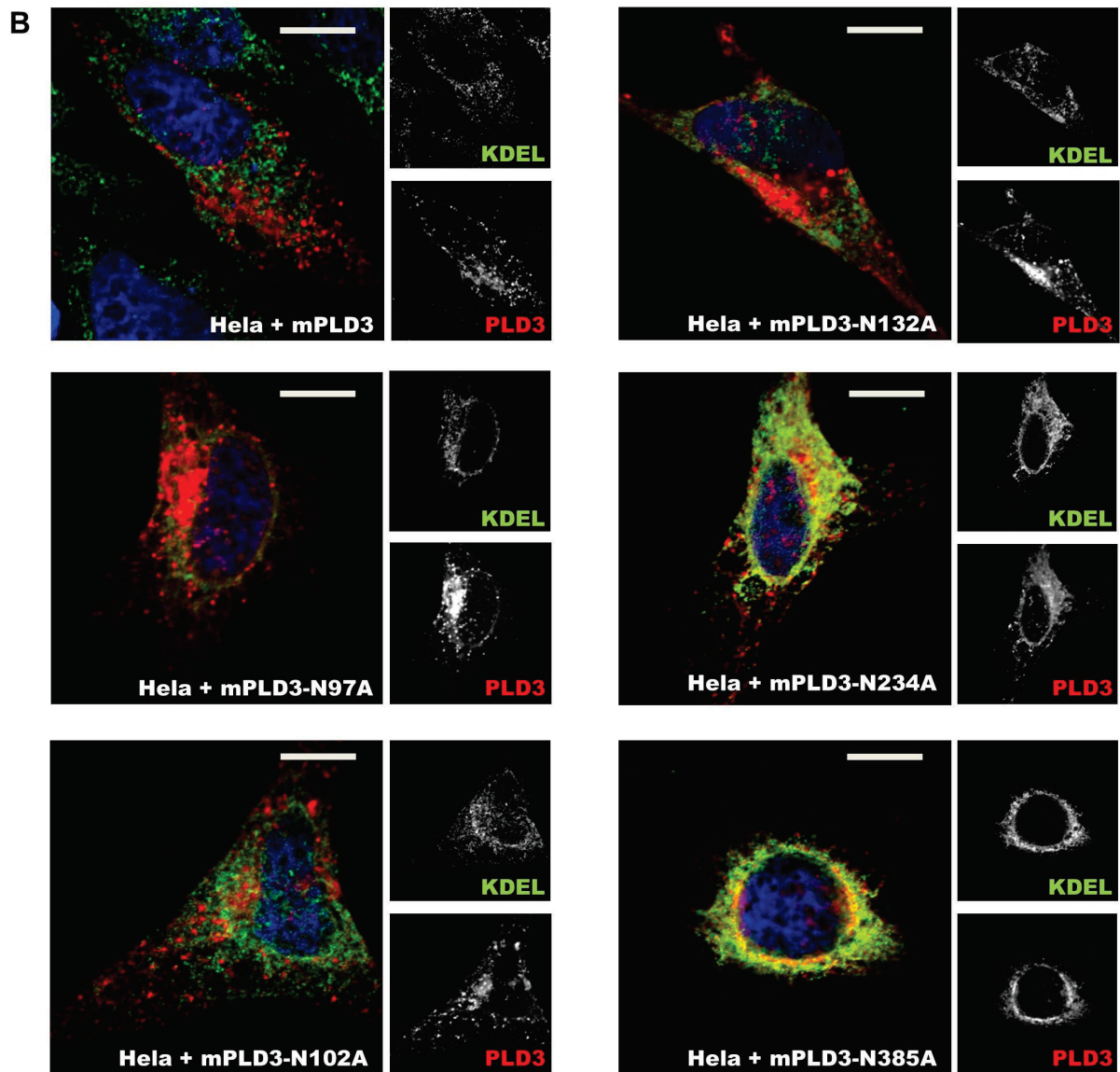
Die PLD3-Mutanten wurden auch als Immunfluoreszenz-Darstellungen in der konfokalen Lasermikroskopie untersucht (Abb.31, A, B). Es sollte analysiert werden, ob die intrazelluläre Lokalisation der PLD3-Mutanten vom Wildtyp abweicht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit der cDNA von WT-mPLD3 oder den entsprechenden Mutanten transfiziert. PLD3 wurde durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper detektiert. Als bekannte Markerproteine wurden jeweils LAMP2 (Lysosomen) oder KDEL (Endoplasmatisches Retikulum) gegengefärbt.

HeLa-Zellen, die Wildtyp-mPLD3 exprimieren, zeigen eine Anfärbung von Vesikeln durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper. Dabei kolokalisiert mPLD3 mit LAMP2 (Abb.31, A). Es sind jedoch auch einzelne PLD3-Vesikel erkennbar, die LAMP2-negativ sind. mPLD3 zeigt keine Kolokalisation mit dem ER-Markerprotein KDEL (Abb.31, B). Die Mutanten mPLD3-N97A, -N102A und -N132A verhalten sich bezüglich ihrer Lokalisation vergleichbar zum Wildtyp-Protein. Bezüglich der Lokalisation von mPLD3-N234A und -N385A sind Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen. Dabei kolokalisiert mPLD3-N234A nahezu

vollständig mit KDEL (B). Auch mPLD3-N385A zeigt eine Kolokalisation mit dem ER-Marker, jedoch zusätzlich auch die Färbung und Kolokalisation mit LAMP2-positiven Vesikeln.



**Abbildung 31 A:** mPLD3-Wildtyp und Mutanten in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3-Wildtyp oder PLD3-Mutanten, die Mutationen in den jeweiligen Konsensus-Sequenzen Asn-Xaa-Ser/Thr enthalten, transfiziert. Die Phospholipase D3 wurde mit einem  $\alpha$ -PLD3-Antikörper (N-term) detektiert. Als Markerproteine wurden LAMP2 (A) oder KDEL (B) gegengefärbt. Die Maßstabsbalken indizieren jeweils 10  $\mu$ m.



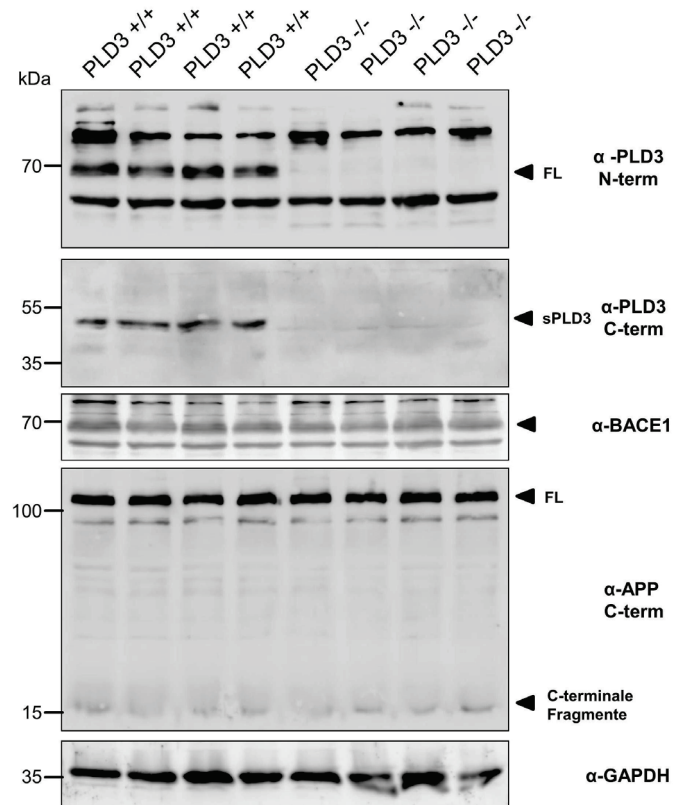
**Abbildung 31 B:** mPLD3-Wildtyp und Mutanten in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3-Wildtyp oder PLD3-Mutanten, die Mutationen in den jeweiligen Konsensus-Sequenzen Asn-Xaa-Ser/Thr enthalten, transfiziert. Die Phospholipase D3 wurde mit einem  $\alpha$ -PLD3-Antikörper (N-term) detektiert. Als Markerproteine wurden LAMP2 (A) oder KDEL (B) gegengefärbt. Die Maßstabsbalken indizieren jeweils 10  $\mu$ m.

Es kann gezeigt werden, dass eine Veränderung der Glykosilierung von PLD3 an den Positionen „234“ und „385“ der AS-Sequenz zu einer Fehlsortierung von PLD3 mit Retention im ER führt.

## 5.10 PLD3-Knockout-Maus und -MEF

Durch gezielten Gen-Knockout wurden in Vorarbeiten PLD3-Knockout-Mäuse generiert und gezüchtet. Diese erlauben es, mögliche Funktionen der Phospholipase D3 bei physiologischen Prozessen *in vivo* sowie *in vitro* zu analysieren. Des Weiteren wurden PLD3-defiziente Murine Embryonale Fibroblasten (MEF-PLD3  $-/-$ ) aus Mäusen dieser Zucht für *in vitro* - Experimente gewonnen und kultiviert.

Im Folgenden werden Experimente gezeigt, die sich mit einem möglichen Einfluss von PLD3 auf das Amyloid-Precursor-Protein (APP) befassen (Abb.32). Dabei sollte analysiert werden, ob es zwischen neuronalen Zellen der PLD3-Wildtyp- und Knockout-Mäuse Unterschiede bezüglich der Gesamtmengen von BACE-1, APP und dessen Spaltprodukten gibt. Dafür wurden Mäusegehirne von jeweils mehreren PLD3 +/+ und PLD3 -/- -Mäusen homogenisiert, Zelllysate gewonnen und Western Blot – Analysen durchgeführt. PLD3, BACE-1 und APP wurden mit Antikörpern nachgewiesen.

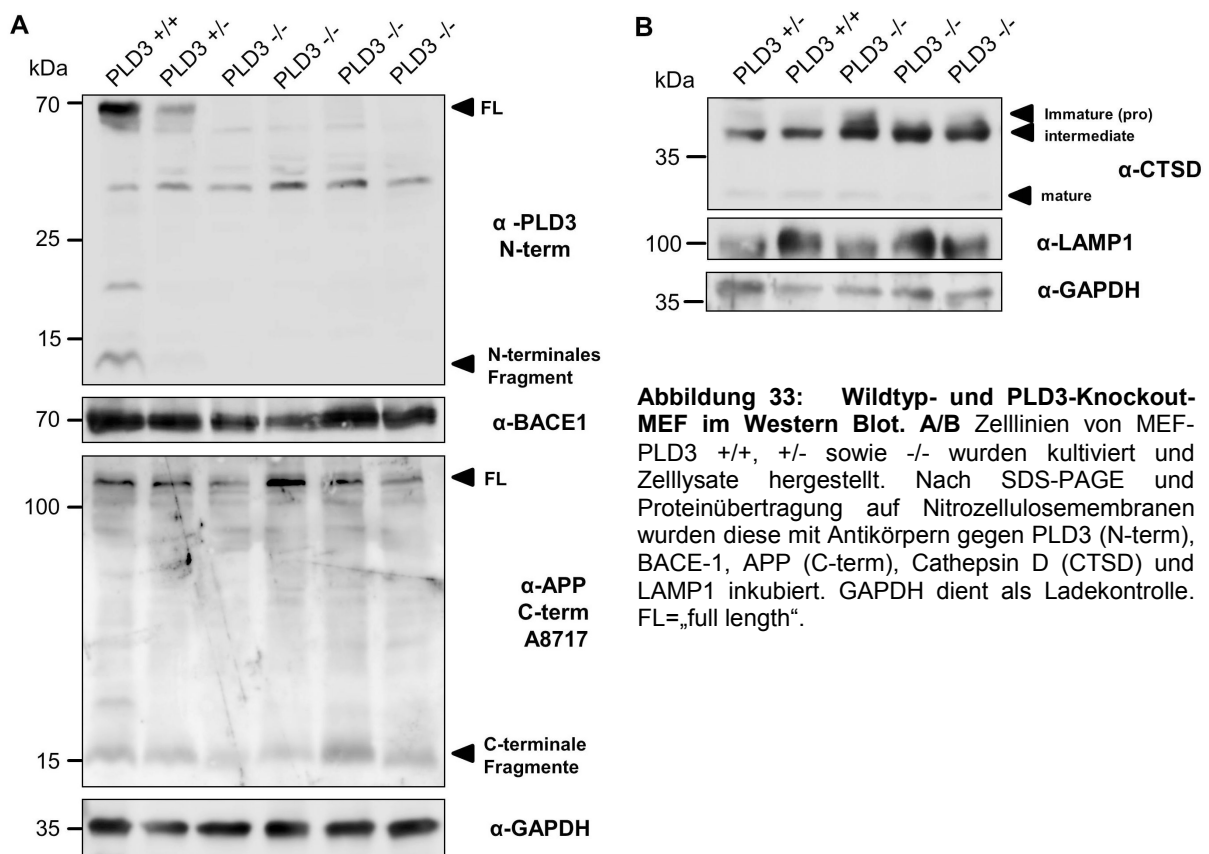


**Abbildung 32: PLD3-Wildtyp und -Knockout -Gehirnlysate im Western Blot.** Gehirne von jeweils vier PLD3 +/+ sowie PLD3 -/- -Mäusen wurden homogenisiert, lysiert und Western Blots angefertigt. Diese wurden anschließend mit Antikörpern gegen PLD3 (N-term, C-term), BACE-1 und APP (C-term) inkubiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. FL= „full length“, Volllängenprotein; sPLD3 = „soluble“, löslich.

Im Western Blot (Abb.32) sind Proteinfragmente von PLD3, detektiert durch den N-terminalen sowie den C-terminalen anti-PLD3-Antikörper, zu erkennen. Der N-terminale Antikörper markiert PLD3-FL in den Spuren der WT-Gehirnlysate als Doppelbande, welche bei etwa 65 kDa dargestellt ist. Der C-terminale Antikörper detektiert in den Spuren der PLD3 +/+ -Zellen jeweils kräftige Banden bei etwa 50 kDa (sPLD3, 5.7.2). PLD3-FL und sPLD3 lassen sich durch die eingesetzten anti-PLD3-Antikörper jeweils nur in den Spuren der PLD3-Wildtyp-Gehirnlysate nachweisen. In den Spuren der PLD3-Knockout-Gehirnlysate zeigen sich keine entsprechenden PLD3-Signale. Der α-BACE1-Antikörper zeigt unabhängig vom Genotyp eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa. Es ist zu

erkennen, dass sich keine Unterschiede zwischen den Gehirnllysaten der PLD3-Wildtyp- und Knockout-Mäuse bezüglich der BACE-1 -Signalintensitäten feststellen lassen. Ebenso sind keine Unterschiede bezüglich der Gesamtmengen von APP-FL und dessen C-terminaler Fragmente zwischen den Gehirnllysaten der Wildtyp- und Knockout-Mäuse im Western Blot zu erkennen.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Zelllinien Muriner Embryonaler Fibroblasten (MEF-PLD3 +/+, +/-, -/-) im Western Blot analysiert (Abb.33). Dabei sollten endogenes BACE-1, APP-FL sowie dessen C-terminale Fragmente dargestellt und mögliche Unterschiede aufgezeigt werden. Die entsprechenden Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen, welche gegen die genannten Proteine gerichtet sind. Zusätzlich wurden Cathepsin D, eine klassische lysosomale Hydrolase, sowie das lysosomale Membranprotein LAMP1 gefärbt. Es wurde untersucht, ob die PLD3-Defizienz einen Einfluss auf die Gesamtmengen von Cathepsin D / LAMP1 und dadurch auf Biogenese von Lysosomen sowie deren Funktion hat (Eskelinen 2006). PLD3 wurde durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper nachgewiesen.



**Abbildung 33: Wildtyp- und PLD3-Knockout-MEF im Western Blot.** A/B Zelllinien von MEF-PLD3 +/+, +/- sowie -/- wurden kultiviert und Zellysate hergestellt. Nach SDS-PAGE und Proteinübertragung auf Nitrozellulosemembranen wurden diese mit Antikörpern gegen PLD3 (N-term), BACE-1, APP (C-term), Cathepsin D (CTSD) und LAMP1 inkubiert. GAPDH dient als Ladekontrolle. FL=„full length“.

Der N-terminale anti-PLD3-Antikörper färbt mehrere PLD3-Banden in der Spur der MEF-PLD3 +/+ Zellen (Abb.33). Dabei sind PLD3-FL (~65kDa) und PLD3-NTF (~12 kDa) bei endogener Expression zu erkennen. Entsprechend der geringeren PLD3-Expression in den

MEF-PLD3 +/- -Zellen sind die Signale in geringerer Intensität dargestellt. Auch in den PLD3 +/- - Zellen ist PLD3-NTF zu erkennen. In den Spuren der PLD3-Knockout-MEF sind weder PLD3-FL, noch PLD-NTF nachweisbar. Der anti-BACE1-Antikörper zeigt ein relativ homogenes Bild im Vergleich der dargestellten Spuren mit Färbung einer Bande bei ~70 kDa. Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den analysierten Zelllinien zu erkennen. Gleiches gilt für die Anfärbung von APP. Weder die Banden von APP-FL (~130 kDa), noch die der C-terminalen APP-Fragmente (~15 kDa) zeigen eindeutige Unterschiede in der Signalgebung zwischen den Zelllinien.

Endogenes Cathepsin D wird mit den drei charakteristischen Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht („Pro-Form/immature“, „intermediate“, „mature“) dargestellt. Es sind keine deutlichen Unterschiede bezüglich Cathepsin D zwischen den Zelllinien zu erkennen. LAMP1 stellt sich im Vergleich ebenfalls unauffällig dar.

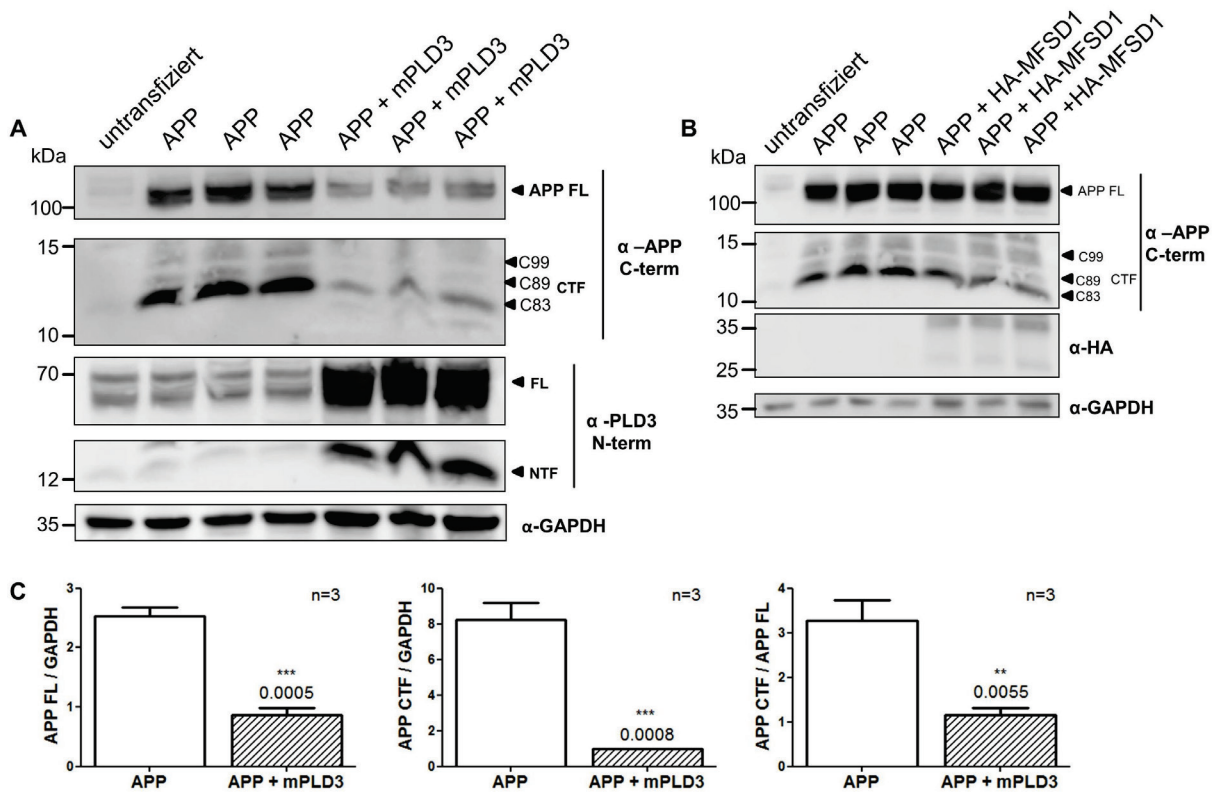
## **5.11 Einfluss von PLD3 auf die Gesamtmenge sowie die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP)**

### **5.11.1 Auswirkungen der Koexpression von mPLD3 mit APP bei transienter APP-Expression**

Es wurden genetische Varianten von PLD3 (z.B. V232M) beschrieben, die ein erhöhtes Risiko darstellen, im Laufe des Lebens an der späten Form des Morbus Alzheimer (LOAD) zu erkranken. Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei transienter Koexpression von APP695-WT und PLD3 in HEK293T-Zellen zu einer Abnahme des APP-Vollängenproteins kommt. Auch zeigten Überexpression und „Knockdown“ von PLD3 gegenteilige Effekte bezüglich der Gesamtmengen von A $\beta$ <sub>42</sub> und A $\beta$ <sub>40</sub> (Cruchaga et al. 2014). Diese Experimente sollten nun mit passender Negativkontrolle validiert sowie die Erkenntnisse über den Einfluss von PLD3 auf APP erweitert werden.

Es wurde analysiert, ob die transiente Koexpression von mPLD3 und APP695-WT in neuronalen N2a-Zellen einen Einfluss auf die APP-FL- sowie APP-CTF-Gesamtmengen hat. N2a-Zellen wurden kultiviert und mit Konstrukten zur Expression von APP, mPLD3, HA-MFSD1 transfiziert. Um sicherzustellen, dass mögliche Effekte spezifisch durch PLD3 verursacht werden und nicht durch die Koexpression eines beliebigen lysosomalen Membranproteins reproduziert werden könnten, wurde als passende Negativkontrolle HA-MFSD1 (Major Facilitator Superfamily Domain Containing 1) zusammen mit APP695-WT transient überexprimiert. MFSD1 ist ein lysosomales Membranprotein mit noch unbekannter Funktion (Chapel et al. 2013). Zur Darstellung von APP, PLD3 und MFSD1 wurden die Immunoblots mit Antikörpern, welche die genannten Proteine detektieren, inkubiert.





**Abbildung 34: Überexpression von APP und mPLD3 in N2a-Zellen.** A/B N2a-Zellen wurden mit der cDNA von APP695-WT und mPLD3 oder HA-MFSD1 (Negativkontrolle) kotransfiziert. Die Immunoblots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen APP, PLD3 (N-term), Hämagglutinin, GAPDH inkubiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Proteinauftrennung erfolgte in NuPAGE-Gelen (4-12%). C Quantifizierungen der Chemolumineszenz-Signale der Western Blots aus A. Ratiobildung von APP FL/GAPDH, APP CTF/FL. Statistische Auswertung durch einseitige Student t-Testung, FL= „full length“, NTF=N-Terminales-Fragment, CTF=C-Terminales-Fragmente, MFSD1= Major Facilitator Superfamily Domain Containing 1.

Der Western Blot in Abbildung 34 (A) lässt einen deutlichen Einfluss der Überexpression von mPLD3 auf APP und dessen C-terminale Fragmente erkennen. Dabei ist APP-FL (MW>100 kDa) als mehrbandiges Signal in allen Spuren der N2a-Zellen, die APP überexprimieren, sowie auf endogenem Expressionslevel dargestellt. Durch die Koexpression von APP mit mPLD3 zeigt sich APP-FL in der Intensität gegenüber der einfachen APP-Überexpression signifikant reduziert. Der C-terminale anti-APP-Antikörper bildet die klassischen C-terminalen APP-Fragmente (C99, C89, C83) ebenfalls ab. Entsprechende Banden sind mit Molekulargewichten von etwa 12-15 kDa gefärbt. Auch die APP-CTF-Signale und damit die Gesamtmengen dieser Fragmente zeigen sich durch die Koexpression von APP mit mPLD3 verringert. Vergleicht man die Signale der APP-CTF zwischen den Spuren, bleibt die C83-Betonung bezüglich der APP-CTF bei der Koexpression mit mPLD3 erhalten. Es ist zu erkennen, dass in den Spuren der Zellen, die APP und mPLD3 koexprimieren, ein zusätzliches APP-CTF im Western Blot dargestellt ist. Die entsprechende Bande liegt vom Molekulargewicht unterhalb von C83 bei etwa 11 kDa. Ein entsprechendes Signal ist in den Spuren der Zellen mit einfacher APP-Expression nicht zu erkennen.

Durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper wird endogenes PLD3 detektiert (Abb.34, A). PLD3-FL wird als Doppelbande bei etwa 65 kDa dargestellt. PLD3-NTF ist zusätzlich bereits bei endogener Proteinexpression bei etwa 12 kDa zu erkennen. Die Signale von PLD3-FL und PLD3-NTF sind unter mPLD3-Überexpression in ihrer Intensität verstärkt.

Nach statistischer Auswertung zeigt sich, dass in den Spuren der N2a-Zellen, die mPLD3 überexprimieren, APP-FL und APP-CTF gegenüber den N2a-APP-Zellen, die endogene PLD3-Level exprimieren, signifikant (APP-FL  $p=0.005$ ; APP-CTF  $p=0.008$ ) reduziert sind (Abb.34, C). Betrachtet man nun die Wichtungen der jeweiligen Gesamtmengen von APP-CTF mit APP-FL, so ist zu erkennen, dass durch Koexpression von mPLD3 nicht nur die APP-Gesamtmenge, sondern zusätzlich die Relation der C-terminalen Fragmente von APP bezogen auf das Volllängenprotein, signifikant ( $p=0.005$ ) verringert wird.

Die Koexpression von HA-MFSD1 mit APP695-WT ist als Negativkontrolle dargestellt (Abb.34, B). Es sind zwei HA-MFSD1-Banden (35 kDa/ 25 kDa) im Western Blot zu erkennen. Entsprechende Signale sind nur in den Spuren der N2a-Zellen, welche HA-MFSD1 koexprimieren, nachweisbar. Es zeigt sich, dass überexprimiertes MFSD1 nicht zu den Veränderungen der APP-Gesamtmengen führt, welche durch die Koexpression von APP mit mPLD3 bewirkt werden. Die Signale von APP-FL und APP-CTF werden durch die MFSD1-Koexpression im Vergleich mit den entsprechenden Signalen der N2a-Zellen, die lediglich APP überexprimieren, nicht wesentlich beeinflusst.

Damit kann gezeigt werden, dass PLD3 die Gesamtmengen von APP (FL und betont CTF) unter Überexpressionsbedingungen spezifisch verringert.

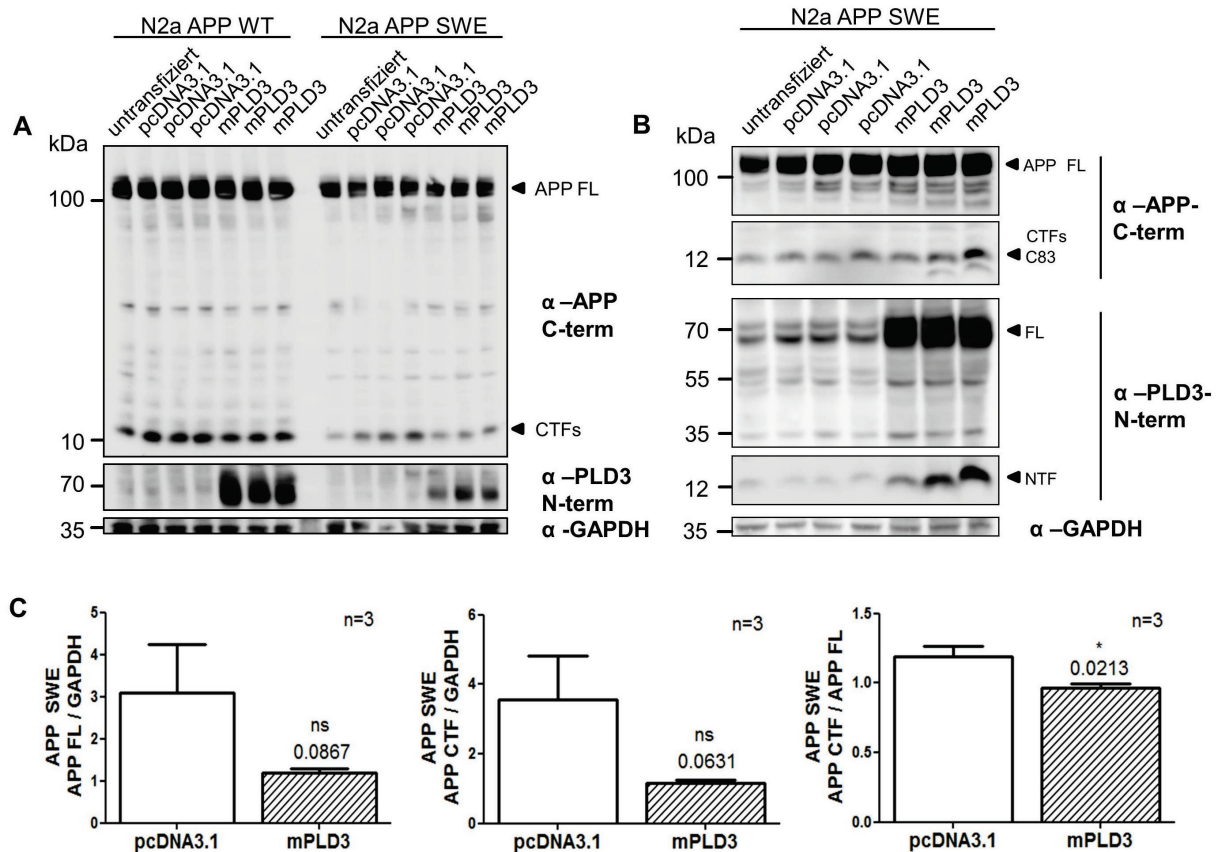
### **5.11.2 Auswirkungen der Koexpression von mPLD3 mit APP bei stabiler APP-Expression**

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von mPLD3 in N2a-Zellen einen Einfluss auf APP bei transienter APP-Überexpression hat (5.11.1). Im folgenden Experiment sollte analysiert werden, ob dieser Effekt auch bei stabiler APP-Expression besteht. Zusätzlich wurde untersucht, ob die PLD3-Expression einen Einfluss auf die APP-Gesamtmengen in N2a-Zellen, die APP695-KM670/671NL stabil exprimieren, hat. Diese APP-Doppelmutation ist auch als „Schwedische Mutation“ beschrieben (Haass et al. 1995). Sie führt zu einer starken Erhöhung der A $\beta$ -Gesamtlevel und Mutations-Träger erkranken häufig bereits im relativ frühen Lebensalter an M. Alzheimer (Cai et al. 1993; Wirths et al. 2001).

Es wurden N2a-Zelllinien kultiviert, die jeweils entweder APP695-WT oder APP695-KM670/671NL stabil überexprimieren (Olmsted et al. 1970; Cai et al. 1993). Die Zellen blieben untransfiziert oder wurden im Mehrfachansatz (Triplikate) jeweils mit der cDNA von



mPLD3 oder dem Vektor pcDNA3.1/Hygro(+) transfiziert. Die Vektor-Expression diente dabei als Negativkontrolle. Von den Zellen wurden Zelllysate gewonnen und Western Blots angefertigt. Die Immunoblots wurden mit Antikörpern gegen APP (C-term), PLD3 (N-term) und GAPDH inkubiert.



**Abbildung 35: Überexpression von mPLD3 in N2a-Zellen, die APP695-WT oder APP695-KM670/671NL stabil exprimieren.** **A** N2a-Zellen, die APP695-WT oder APP695-KM670/671NL („Schwedische Mutation“) stabil überexprimieren, wurden mit der cDNA von mPLD3 oder dem Vektor pcDNA3.1/Hygro (+) transfiziert. Die Proteinauftrennung erfolgte in NuPAGE-Gelen (4-12%). Antigendetektion durch spezifische  $\alpha$ -APP-Antikörper (C-term) und  $\alpha$ -PLD3-Antikörper (N-term). GAPDH dient als Ladekontrolle. **B** Zusätzlicher Western Blot mit dem gleichen experimentellen Aufbau, wie in A. beschrieben, hier in N2a- APP695-KM670/671NL-Zellen. **C** Quantifizierung der Signale der N2a APP SWE-Zellen des Western Blots in A. Statistische Auswertungen durch einseitige Student t-Testungen. SWE= Schwedische Mutation, FL=„full length“, NTF=N-Terminales-Fragment, CTF=C-Terminale-Fragmente.

In dem Western Blots aus Abbildung 35 (A, B) ist APP-FL als Signal mit einem Molekulargewicht von >100 kDa zu erkennen. Des Weiteren sind die klassischen C-terminalen Fragmente ebenfalls gut separiert dargestellt (12-15 kDa). In Abbildung 35 (A) stellt der N-terminale anti-PLD3-Antikörper PLD3-FL bei etwa 65 kDa dar. Der Western Blot zeigt, dass die Überexpression von mPLD3 in N2a-Zellen, die Wildtyp-APP oder die Schwedische Mutante stabil exprimieren, keinen deutlichen Unterschied bezüglich der Gesamtmengen an APP-FL und APP-CTF im Vergleich zur Vektorexpression verursacht. In den Spuren der N2a-APP-„SWE“-Zellen, welche mPLD3 überexprimieren, sind die APP-CTF-Signale mäßig reduziert. Nach Quantifizierung dieser und statistischer Auswertung

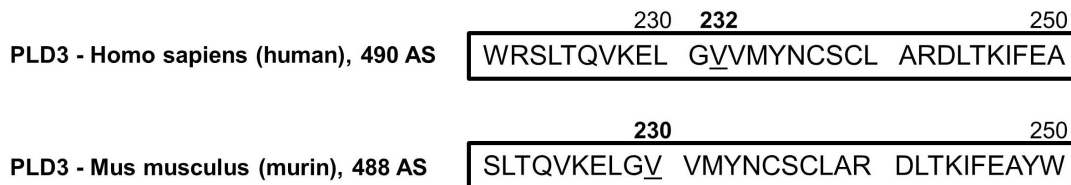
(Abb.35, C) zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied gegenüber der Negativkontrolle (APP-FL/GAPDH mit  $p=0.08$ ; APP-CTF/GAPDH mit  $p=0.06$ ). Im Vergleich der Mengenverhältnisse von APP-CTF/APP-FL ist in den mPLD3-überexprimierenden N2a-APP-„SWE“ ein signifikanter Unterschied mit einer relativen Reduktion von APP-CTF ( $p=0.0213$ ) gegenüber der Vektorexpression zu erkennen.

In Abbildung 35 (B) zeigt sich PLD3-FL als Doppelbande bei etwa 65-70 kDa. Zusätzlich ist endogenes PLD3-NTF bei etwa 12 kDa gefärbt. Die entsprechenden Signale werden durch die mPLD3-Überexpression intensiviert. Bezüglich des APP zeigen sich im Western Blot Abb.35 (B) Unterschiede im Vergleich mit Abb.35 (A). Dabei ist der geringe Einfluss der mPLD3-Überexpression auf die APP-CTF-Gesamtmenge in diesem Western Blot nicht zu erkennen. Allerdings wird in den Spuren der Zellen, welche mPLD3 koexprimieren, teils eine zusätzliche APP-CTF-Bande gefärbt. Diese liegt vom Molekulargewicht unterhalb des prominenten C83, also unterhalb von 12 kDa. Eine entsprechende Bande ist in den Zellen, die den Vektor pcDNA3.1 koexprimieren, nicht zu erkennen.

Die Experimente zeigen, dass PLD3 unter stabiler APP-/APP-„SWE“-Überexpression eher einen Einfluss auf die proteolytische Prozessierung von APP mit Beeinflussung der APP-CTF, weniger auf die Gesamtmenge von APP zu haben scheint.

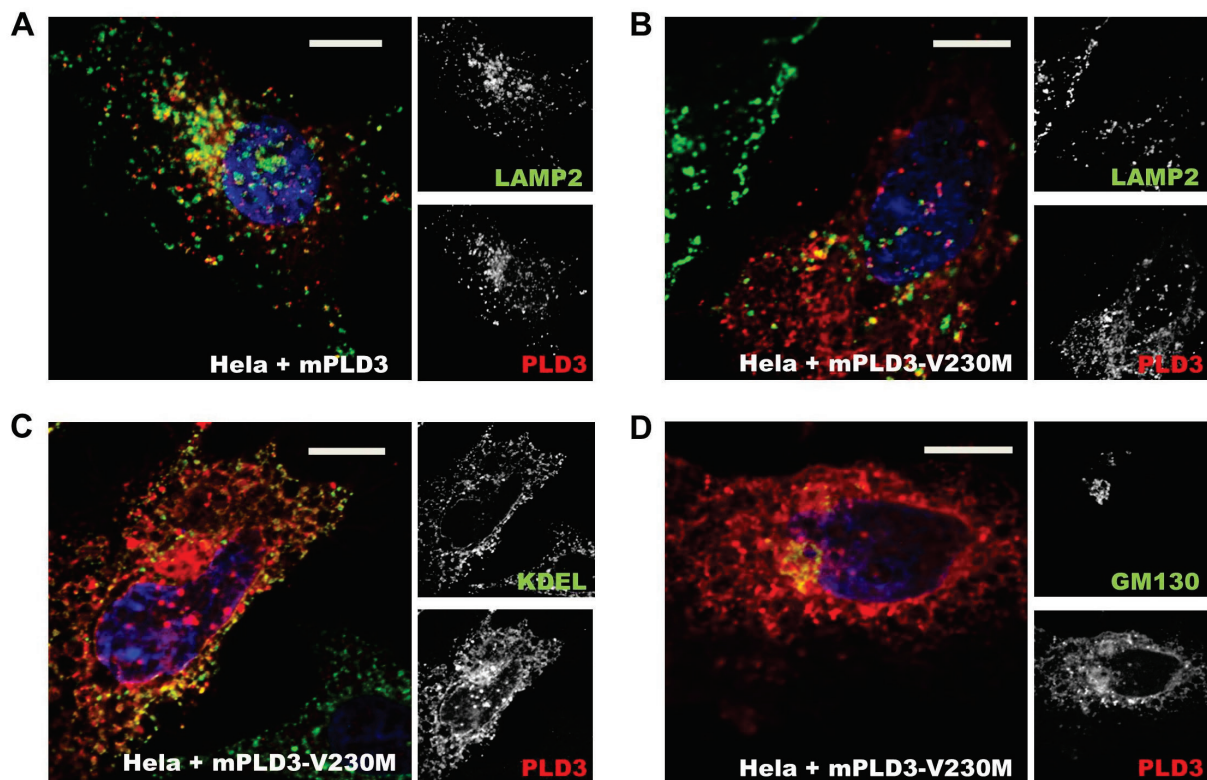
### **5.11.3 Patientenmutation PLD3-V232M**

Anfang 2014 wurde berichtet, dass die humane PLD3-Variante V232M zu einer Verdoppelung des Risikos, an der Spätform der Alzheimer-Demenz zu erkranken, führt (Cruchaga et al. 2014). Diese Mutation im PLD3-Gen bewirkt den Austausch der Aminosäure Valin gegen Methionin in der Position 232 der AS-Sequenz. Durch den folgenden Versuchsaufbau sollten weitere Erkenntnisse über diese Mutation gewonnen werden. Dabei war von Interesse, ob die Patientenmutation zu einer abweichenden Sortierung und intrazellulären Fehlverteilung von PLD3 führen könnte. Dafür wurde die murine Variante (mPLD3-V230M) der Patientenmutation durch gerichtete Mutagenese generiert. Der Unterschied zum hPLD3-V232M (humane Mutation) ist darauf zurückzuführen, dass die AS-Sequenz der murinen PLD3 mit 488 AS insgesamt zwei Aminosäuren weniger als die humane Variante beinhaltet. Die Bereiche, in denen die Mutationen liegen, entsprechen sich jedoch gegenseitig (Abb.36).



**Abbildung 36: Vergleich der AS-Sequenzen der humanen und murinen Phospholipase D3 im Bereich der Patientenmutation V232M.** Unterstrichen ist jeweils die AS Valin, welche in hPLD3-V232M sowie mPLD3-V230M durch eine Mutation im *PLD3*-Gen gegen Methionin ausgetauscht wird.

HeLa-Zellen wurden jeweils mit der cDNA von mPLD3 oder mPLD3-V230M transfiziert. Nach Expression entsprechender Proteine wurden Präparate für die spätere Analyse in der konfokalen Lasermikroskopie angefertigt. PLD3 wurde jeweils von dem N-terminalen anti-PLD3-Antikörper detektiert. Um Rückschlüsse auf die PLD3-Lokalisation ziehen zu können, wurden Markerproteine gegengefärbt. Es wurden die Marker LAMP2 (lysosomale Membran), KDEL (ER) sowie GM130 (Golgi) dargestellt.



**Abbildung 37: mPLD3-V230M in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie.** HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von mPLD3-Wildtyp (A) oder mPLD3-V230M (murine Variante der PLD3-Patientenmutation-V232M, B, C, D) transfiziert. PLD3 wird durch Färbung mit dem N-terminalen  $\alpha$ -PLD3-Antikörper jeweils in Rot dargestellt. Für die jeweiligen Aufnahmen wurden verschiedene Markerproteine in Grün gegengefärbt. Dies sind LAMP2 (lysosomale Membran), KDEL (ER) und GM130 (Golgi). Der Maßstabsbalken indiziert 10  $\mu$ m.

In den HeLa-Zellen, die Wildtyp-mPLD3 exprimieren, werden durch den N-terminalen anti-PLD3-Antikörper Vesikel dargestellt (Abb.37). Dabei kolokalisiert PLD3 mit LAMP2 (Abb.37, A). Zusätzlich werden LAMP2-negative Vesikel durch den anti-PLD3-Antikörper gefärbt. mPLD3-V230M zeigt Unterschiede bezüglich der zellulären Verteilung im Vergleich zum

Wildtyp. Durch die Färbung der Mutante mit dem N-terminalen anti-PLD3-Antikörper ist ein retikuläres Muster zu erkennen. PLD3-V230M kolokalisiert mit dem ER-Marker KDEL (Abb.37, C). Des Weiteren sind vereinzelt mPLD3-V230M-positive Vesikel dargestellt, in welchen die Mutante mit LAMP2 kolokalisiert (Abb.37, B). Die PLD3-Mutante zeigt ebenfalls eine Kolokalisation mit dem Golgi-Marker GM130 in der mikroskopischen Darstellung (Abb.37, D).

Es kann gezeigt werden, dass die PLD3-Mutante von der physiologischen Lokalisation des Wildtyp-Proteins abweicht und dabei im Wesentlichen mit dem ER assoziiert ist.

## **5.12 Katalytische Enzymaktivität als Phospholipase D**

Für die Phospholipase D3 wurden in der Vergangenheit weitere Bezeichnungen wie z.B. HU-K4, Cholin-Phosphatase 3 und HindIII-K4L-Homolog synonym verwendet. Letztendlich wurde dieses Protein in die Familie der Phospholipasen D eingegliedert. Der Grund dafür ist das Vorhandensein von zwei sogenannten HKD/E-Motiven. Diese sind hoch konserviert und typisch für Phospholipasen vom Typ D. PLD1 und PLD2 sind als Phospholipasen katalytisch aktiv und spalten Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und Cholin. Sie erfüllen dadurch wichtige Zellfunktionen. Für ihre katalytische Aktivität sind intakte HKD-Motive notwendig (Xie et al. 2000).

Ob die Phospholipase D3 tatsächlich auch als Phospholipase vom Typ D katalytisch aktiv ist, war zu Beginn der Arbeit nicht bekannt. Hinweise auf eine mögliche Funktion von PLD3 waren von großem Interesse. Im folgenden Experiment wurde die Phospholipase D-Aktivität von PLD3 analysiert. Dafür wurde ein PLD-Aktivitäts-Assay unter neutralen sowie unter sauren Bedingungen etabliert. Dabei handelt es sich um eine photometrische Analyse, das Testprinzip wird im Abschnitt „Methoden; 4.3.6“ erläutert.

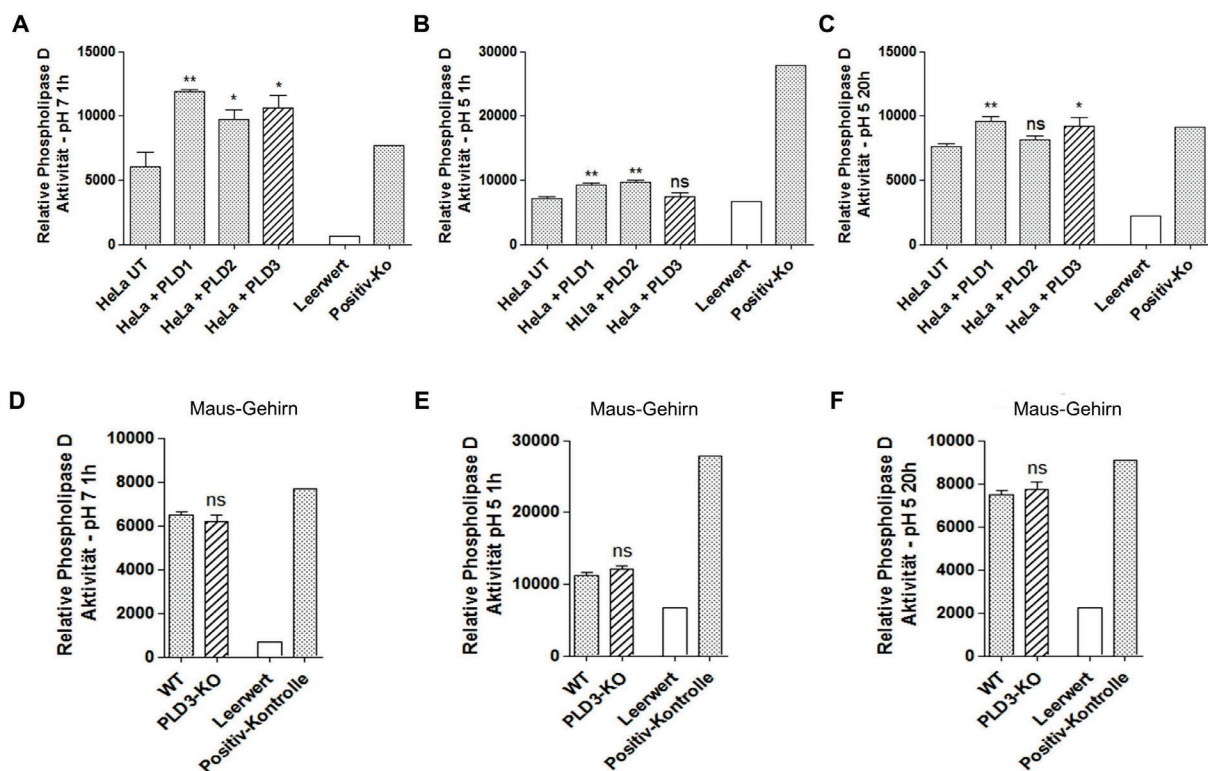
HeLa-Zellen wurden mit der cDNA von hPLD1-HA, mPLD2-HA oder mPLD3 transfiziert. Nach der Expression der entsprechenden Proteine wurden jeweils Zelllysate gewonnen. Die Untersuchungen der jeweiligen Aktivitäten von PLD1 und PLD2 dienten als biologische Positivkontrollen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellt die testinterne Positivkontrolle dar. Zusätzlich wurden Zelllysate aus Gehirnhomogenaten von PLD3-Wildtyp- sowie Knockoutmäusen hergestellt und diese bezüglich ihrer PLD-Aktivität analysiert.

In Abbildung 38 (A, B, C) sind HeLa-Zellen dargestellt, die endogenes PLD1/2/3 exprimieren oder diese Proteine durch entsprechende cDNA-Transfektionen transient überexprimieren. Bei der Messung im neutralen pH-Bereich zeigt sich, dass die PLD-Aktivitäten aller transfizierten Zellen gegenüber dem endogenen Expressionsniveau signifikant erhöht sind (PLD1 p=0.003, PLD2 p=0.02, PLD3 p=0.01). Die Aktivitäten im sauren pH-Bereich sind

nach Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Die Messungen erfolgten nach einer sowie nach 20 Stunden Inkubation mit dem Amplex-Red-Reagenz. Nach einer Stunde zeigt sich, dass die Aktivitäten von PLD1 ( $p=0.004$ ) und PLD2 ( $p=0.003$ ) gegenüber der Bezugsgröße (untransfizierte HeLa-Zellen) signifikant erhöht sind.

Die Zellen, die mPLD3 überexprimieren, zeigen im sauren Milieu nach dieser Inkubationszeit keine signifikante Aktivitätszunahme ( $p=0,26$ ). Nach einer längeren Inkubation über Nacht sind Effekte zu erkennen. Dabei zeigen auch die mPLD3-überexprimierenden Zellen eine signifikante Aktivitätszunahme ( $p=0.04$ ).

Auch die PLD1-Überexpression bewirkt eine signifikant erhöhte PLD-Aktivität ( $p=0.007$ ). Lediglich die PLD2-überexprimierenden Zellen zeigen zum späten Messzeitpunkt keinen statistisch signifikanten Aktivitätsunterschied gegenüber der endogenen Expression ( $p=0.11$ ).



**Abbildung 38: Phospholipase D Aktivitäts-Testung in HeLa-Zellen und Maus-Gehirnen im neutralen sowie sauren pH-Bereich.** A/B/C HeLa-Zellen blieben untransfiziert (UT) oder wurden mit der cDNA von hPLD1-HA, mPLD2-HA, mPLD3 transfiziert und für die Aktivitäts-Testung eingesetzt. D/E/F Von Wildtyp- und PLD3-Knockout-Mäusen wurden die Gehirne entnommen, homogenisiert und lysiert. Die PLD3-Aktivität wurde mit dem „Amplex Red Phospholipase D Assay Kit“ photometrisch analysiert. Dargestellt sind jeweils die relativen PLD-Aktivitäten in Bezug zu untransfizierten HeLa-Zellen (A/B/C) oder Wildtyp-Maus-Gehirnen (D/E/F). Die Aktivitätsmessungen im sauren pH-Bereich erfolgten jeweils nach einer Stunde und zusätzlich nach 20 Stunden Inkubation mit dem Amplex Red-Reagenz. Der Leerwert entspricht den jeweils für die Proben eingesetzten Puffern. Die testinterne Positiv-Kontrolle ist  $H_2O_2$ . Die Messungen der Proben erfolgten jeweils als Triplikatsansatz. Statistik und Signifikanzniveau-Berechnung durch einseitige Student t-Testung.

In Abbildung 38 (D, E, F) sind die PLD-Aktivitätsmessungen der Gehirnhomogenate von Wildtyp- sowie PLD3-Knockoutmäusen dargestellt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C mit Amplex-Red ist im neutralen ( $p=0.2$ ) sowie im sauren pH-Bereich ( $p=0.08$ ) keine signifikante PLD-Aktivitätsabnahme der PLD3-KO-Proben gegenüber dem Wildtyp festzustellen. Auch nach 20-stündiger Inkubation im sauren Milieu zeigen sich keine signifikanten Aktivitätsunterschiede ( $p=0.28$ ).

In Zusammenschau deuten die Experimente an, dass PLD3 maßgeblich im neutralen pH-Bereich katalytisch aktiv erscheint und dabei Phosphatidylcholin spaltet. Bezüglich der zellulären Gesamt-PLD-Aktivität erzielt der PLD3-Knockout keine signifikanten Effekte.

## 6 Diskussion

### 6.1 Anti-PLD3-Antikörper

Ein Ziel dieser Arbeit war, endogenes sowie überexprimiertes PLD3 mikroskopisch sowie im Western Blot darzustellen, um PLD3 weiterführend analysieren zu können. Dafür wurde zu Beginn der Arbeit ein N-terminaler anti-PLD3-Antikörper generiert, dessen Spezifität in den verschiedenen Testphasen und weiterführenden Experimenten gezeigt werden konnte (5.6, 5.7).

Für eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung sollte die Größe des Epitops, bzw. das zur Immunisierung gewählte Peptid, möglichst gering sein. Das Epitop, an welches ein Antikörper bindet, umfasst bis zu 15 AS (Benjamin und Perdue 1996). Zur Immunisierung werden daher Peptide mit einer Länge von 10-20 AS gewählt (Forsström et al. 2015; Niman et al. 1983). Um eine hohe Spezifität und Affinität zu erzielen, wurden die Tiere zur Gewinnung des N-terminalen Antikörpers gegen ein Peptidfragment des kurzen N-terminalen Bereichs von PLD3 immunisiert, welches aus 20 AS besteht. Die Spezifität der Signalgebung kann am Besten im Vergleich zwischen Proben untersucht werden, die PLD3 exprimieren und Proben, in denen PLD3 herunterreguliert wurde. Dazu eignet sich der Gen-„Knockdown“, im Idealfall der Gen-„Knockout“. In dieser Arbeit wurden Lysate von Wildtypzellen und PLD3-Knockout-Mäusegehirnen sowie Wildtypzellen und PLD3-Knockout-MEFs vergleichend analysiert (Abb. 32/33). Dabei zeigten sich verschiedene Signale im Western Blot, die nur in den Lysaten der PLD3-+/+ und PLD3+/- -Zellen gefärbt wurden. Diese Signale waren nicht in den PLD3-Knockout-Zellen nachweisbar, was ein Indiz für die Antikörper-Spezifität ist und gleichzeitig zeigt, dass der PLD3-Knockout effizient war. Auch die geringere PLD3-Expression in Zellen der PLD3 +/- -Mäuse im Vergleich zum Wildtyp konnte differenziert dargestellt werden. Dies spricht für eine hohe Qualität des generierten N-terminalen anti-PLD3-Antikörpers.

Endogenes humanes sowie murines PLD3 konnte durch den N-terminalen sowie durch den C-terminalen Antikörper, einem kommerziell erwerblichen anti-PLD3-Antikörper der Firma Sigma, auch in weiteren etablierten Zelllinien (z.B. SH-SY5Y, HeLa, N2a) im Western Blot nachgewiesen werden (Abb.23/25/27/32). PLD3-Vollängenprotein sowie weitere prominente, spezifische Signale wurden durch die anti-PLD3-Antikörper detektiert und neu beschrieben. Der N-terminale Antikörper detektiert die humane sowie murine Phospholipase D3 insgesamt gleichwertig. Das humane / murine PLD3 besitzt in dem Bereich, an welchen der N-terminale Antikörper bindet, eine Sequenzhomologie von 90%, was die gleichwertige Spezifität des Antikörpers zur jeweiligen Antigenbindungsstelle erklärt.



**PLD3\_HUMAN|Q8IV08** MKPKLMYQELKVPVEEPAGELPLNEIEAWKAAEKKARW  
**PLD3\_MAU5 |O35405** MKPKLMYQELKVPAAEPANELPMNEIEAWKAAEKKARW

**Abbildung 39: AS-Sequenz des N-Terminus der humanen/murinen Phospholipase D3.** Der Bereich, der vom N-terminalen Pineda anti-PLD3-Antikörper detektiert wird, ist jeweils unterstrichen.

Die Differenz zwischen dem berechneten (etwa 54 kDa) sowie dem angezeigten Molekulargewicht des PLD3-FL (etwa 65 kDa) ließe sich durch eine mögliche posttranslationale Modifikation, z.B. Glykosylierung, erklären, welche für PLD3 bereits beschrieben wurde (Munck et al. 2005) und in dieser Arbeit experimentell bestätigt sowie weiterführend differenziert werden konnte (5.9, 6.3). Unter dieser Annahme würde das Gewicht der Zuckerreste, welche an die PLD3-AS-Struktur gebunden sind, etwa 11 kDa betragen.

## 6.2 Lokalisation und Topologie von PLD3

Nach der bisherigen, geringen Studienlage handelt es sich bei der Phospholipase D3 um ein Protein, welches über eine Transmembrandomäne mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist (Munck et al. 2005). Außerdem wurde PLD3 als mögliches lysosomales Protein identifiziert (Palmieri et al. 2011). Es konnte mikroskopisch gezeigt werden, dass ein PLD3-mCherry-Fusionsprotein mit dem lysosomalen Marker NPC2 kolokalisiert (Sleat et al. 2013). In dieser Arbeit konnten die Fusionsproteine mCherry-mPLD3 sowie mPLD3-mCherry in verschiedenen Zelllinien in Kolokalisationen mit Markerproteinen für den Golgi-Apparat, frühen/späten Endosomen sowie Lysosomen gezeigt werden (Abb.7/8/9). Weiterhin konnte eine Lokalisation der N-terminal mCherry-fusionierten Phospholipase D3 entlang der Plasmamembran nachgewiesen werden. Dabei besteht die Möglichkeit, dass PLD3 im Zuge der physiologischen Sortierung zwischenzeitlich mit der Plasmamembran assoziiert ist, um folgend weiter zu den Lysosomen transportiert zu werden (6.4).

Auch 3xFLAG-mPLD3 konnte lysosomal sowie plasmamembranständig abgebildet werden (Abb.12, B). Dies lässt eine mögliche Fehlsortierung durch eine Fusion von PLD3 mit dem relativ großen Fluoreszenzprotein mCherry, mit möglichem Einfluss auf die Proteinkonformation, als eher unwahrscheinlich erscheinen. In der Theorie ist der kurze N-Terminus des Typ-2-Transmembranproteins Phospholipase D3 zytosolisch und membrannah. Dazu passend konnte das FLAG-PLD3-Fusionprotein eher als Teil der Lysosomenmembran dargestellt werden, wobei das Lumen in größeren Vesikeln ungefärbt erschien.

Zur Validierung der lysosomalen Lokalisation der Phospholipase D3 wurde das PLD3-Wildtypprotein in der murinen und humanen Variante auch durch die spezifischen N/C-



terminalen anti-PLD3-Antikörper, also ohne Fluoreszenzprotein-Tag, mikroskopisch in Überexpression in Hela- sowie N2a-Zellen analysiert (Abb.26). Passend zu den Darstellungen von PLD3 als getaggetem Fusionprotein, zeigte sich ein vergleichbares mikroskopisches Bild bei Anfärbung der Phospholipase D3 durch die anti-PLD3-Antikörper. Humanes sowie murines PLD3 zeigte sich dabei deutlich und vorrangig in Kollokalisation mit den Lysosomenmarkern LAMP1/LAMP2 und somit als lysosomales Protein.

Die höchste zelluläre PLD3-Expression wurde in Neuronen detektiert (Pedersen et al. 1998; Yoshikawa et al. 2010). Durch die vergleichsweise kräftigen Anfärbungen von PLD3 auf endogenem Expressionsniveau in neuronalen Zellen (Abb.27, B, SH-SY5Y-Zellen) im Western Blot, konnte auch durch diese Experimente indirekt, also ohne direkte Quantifizierung, auf eine hohe Proteinexpression von PLD3 in diesen Zellen geschlossen werden. In der Theorie sollten sich SH-SY5Y-Zellen daher auch für eine mikroskopische Darstellung von endogener Phospholipase D3 eignen. Durch Färbungen mittels des N-terminalen anti-PLD3-Antikörpers wurden Membranen von Vesikeln markiert, wobei teils vollständige Ringstrukturen zu erkennen waren (Abb.27).

*PLD3* wird mit weiteren lysosomalen Genen ko-exprimiert (Sato et al. 2014). Des Weiteren beinhaltet die Promotor-Region von *PLD3* sogenannte CLEAR („Coordinated Lysosomal Expression and Regulation“)-Sequenzen (Sardiello et al. 2009), was impliziert, dass die Transkription von *PLD3* durch den, für die lysosomale Biogenese entscheidenden, Transkriptionsfaktor EB (TFEB) reguliert wird (Palmieri et al. 2011). Der Nachweis endogener *PLD3* in Tritosomen, aufgereinigten Mäuseleber-Lysosomen, im Western Blot sowie eine Reduktion von sPLD3 (lösliche Form) unter Hemmung lysosomaler Proteasen bestätigten die lysosomale Lokalisation von *PLD3* zusätzlich direkt/indirekt (Abb. 25/28, 6.5). In der Zusammenschau ist davon auszugehen, dass *PLD3* unter „steady state“-Bedingungen überwiegend lysosomal lokalisiert ist.

Zur weiteren Analyse der Topologie von *PLD3* wurde LIMP-2 ko-exprimiert (Abb.13). LIMP-2 ist ein integrales lysosomales Membranprotein und Transporter von  $\beta$ -Glucocerebrosidase (Reczek et al. 2007). Es wurde beschrieben, dass die Überexpression von LIMP-2 zur Vergrößerung von Endosomen/Lysosomen führt (Kuronita et al. 2002). Die Generierung vergrößerter Lysosomen wurde experimentell bewirkt, um *PLD3* fluoreszenzmikroskopisch deutlicher darstellen und die Topologie besser beurteilen zu können. Dabei konnten teils stark vergrößerte Lysosomen generiert werden (Abb.13), wodurch der eigentliche Zweck der LIMP-2 -Expression erreicht wurde und zur weiteren Analyse genutzt werden konnte. N-terminal mCherry-fusioniertes mPLD3 zeigte sich in den Lysosomenmembranen lokalisiert. Das mPLD3-mCherry (C-term) stellte die Lysosomen eher als Ganzes dar. Auch in SH-

SY5Y-Zellen konnte gezeigt werden, dass mPLD3 teils membrangebunden und teils luminal in den Lysosomen besteht (Abb. 27). Eine mögliche Erklärung für diese mikroskopischen Darstellungen wäre eine Prozessierung der Phospholipase D3 in den späten Endosomen/Lysosomen, wobei der N-Terminus mitsamt der Membrandomäne membranständig bleiben würde und sich ein C-terminales PLD3-Fragment luminal in Lösung befinden könnte.

### **6.3 Glykosylierung von PLD3**

In dieser Arbeit wurde die Phospholipase D3 bezüglich ihres Glykosylierungsstatus analysiert (Abb.30). Die AS-Sequenz der humanen sowie der murinen PLD3 birgt jeweils fünf Bereiche, die entsprechend der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr glykosyliert sein könnten (Abb.29). An diesen Asparaginen könnten jeweils verschiedene Zuckerstrukturen gebunden sein. Durch die Behandlung mit N-Glykosidase F (PNGase F) und dem N-Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin wurde eine Glykosylierung von PLD3 beschrieben (Munck et al. 2005). Weiterhin konnte PLD3 durch die M6P-Rezeptor-Affinitätschromatographie und folgender Massenspektrometrie identifiziert werden (Sleat et al. 2013), was dafür spricht, dass Mannose-reiche Zuckerreste an PLD3 glykosidisch gebunden sind. Um weitere Erkenntnisse darüber zu gewinnen, welche Zuckertypen an PLD3 gebunden sind, wurde in dieser Arbeit ein Verdau mit PNGase F sowie zusätzlich Endo H durchgeführt.

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich mPLD3 komplett sensibel gegenüber dem Verdau durch PNGase F (Abb.30). Sämtliche N-glykosidisch gebundene Zuckerstrukturen wurden vom Proteingrundgerüst abgespalten. Durch den Verdau mit Endo H zeigte sich ein unterschiedliches Bild. Phospholipase D3 zeigte sich nur teilweise sensibel gegenüber der Endo H-Deglykosylierung und teilweise resistent. PNGase F spaltet die glykosidische Bindung von N-Acetylglucosamin unmittelbar an Asparagin und damit Mannose-reiche Zuckerreste sowie den Hybrid- und Komplextyp. EndoH spaltet davon abweichend zwischen zwei N-Acetylglucosaminen. Es ist zu beachten, dass im Gegensatz zu PNGase F, durch den Endo H-Verdau keine komplexen Zucker vom Protein abgespalten werden können (Trimble und Tarentino 1991; Freeze und Kranz 2008). Dies gibt Rückschlüsse darauf, dass PLD3 neben Mannose-reichen Zuckerresten auch Hybrid- und Komplexzuckerstrukturen bindet. Die N-Glykosylierung von Glykoproteinen erfolgt typischerweise im ER. Eine weitere Modifikation der Zucker zu komplexeren Zuckerstrukturen schließt sich im Golgi-Apparat an (Helenius und Aebi 2001; Kornfeld und Kornfeld 1985; Freeze und Kranz 2008). Demnach ist abzuleiten, dass PLD3 nach der Proteintranslation in das ER sortiert wird, wo es glykosyliert wird, und folgend in den Golgi gelangen muss, um weiter modifiziert zu werden. Dazu

passend konnte die Kolo-kalisation von PLD3 mit einem Golgi-Markerprotein gezeigt werden (Abb.7). Wäre PLD3 maßgeblich im ER lokalisiert, was ältere Studien suggerieren (Munck et al. 2005), müsste der Verdau gegenüber PNGase F und Endo H vollständig sensibel sein. Es ist davon auszugehen, dass PLD3 vom Golgi zu weiteren Zellkompartimenten, wie den Endosomen/Lysosomen, transportiert wird.

Weiterhin wurde das Verhalten von PLD3-Mutanten, welche durch gerichtete Mutagenese generiert wurden, mikroskopisch sowie im Western Blot analysiert (Abb. 30, C/D). Es konnte gezeigt werden, dass mPLD3 wahrscheinlich in den Positionen 97, 132, 234 und 385 der AS-Sequenz mit Zuckerresten konjugiert ist. Die deutlichste Bandenverschiebung zeigte mPLD3-N234A. Dies könnte anzeigen, dass PLD3 in der Position 234 der AS-Sequenz mit einem komplexen, relativ schweren Zuckertyp konjugiert ist. Des Weiteren war auffällig, dass die Signale der N-terminalen Fragmente der Varianten mPLD3-N234A/-N385A im Western Blot deutlich signalschwächer im Vergleich zum Wildtyp oder der weiteren Varianten dargestellt wurden (Abb.30, C). Besonders deutlich kam dies durch die Expression von mPLD3-N234A zur Darstellung. Es wurde beschrieben, dass die Glykosylierung einen Einfluss auf die Faltung und Proteinkonformation haben kann (Hoffmann und Flörke 1998). Ein veränderter Glykosylierungsstatus kann außerdem zu Fehlsortierungen führen (Potter et al. 2006; Vagin et al. 2009). Weitere Analysen deuteten darauf hin, dass PLD3 lysosomal proteolytisch prozessiert wird (5.8, 6.5). Die geringeren NTF-Level von mPLD3-N234A/-N385A könnten dementsprechend Folge einer fehlerhaften Sortierung von PLD3 sein. Dies würde dazu führen, dass geringere PLD3-Mengen die Endosomen/Lysosomen erreichen und folglich weniger PLD3-NTF sowie sPLD3 (lösliches CTF) durch eine mögliche Prozessierung entsteht. Passend dazu zeigten mikroskopische Analysen eine überwiegende ER-Assoziation, bzw. ER-Retention, der Mutanten mPLD3-N232A/N385A (Abb.31). Insofern ist davon auszugehen, dass die konjugierten Zuckertypen in den Positionen 234/385 der AS-Sequenz der Phospholipase D3 einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinkonformation haben und für eine korrekte Sortierung notwendig sind.

## **6.4 Sortierung von PLD3**

In dieser Arbeit wurde analysiert, durch welche Mechanismen die Phospholipase D3 zu den Lysosomen sortiert wird. Lysosomale Membranproteine erreichen die Lysosomen in der Regel über zwei unterschiedliche Routen, die als direkt und indirekt bezeichnet werden (Braulke und Bonifacio 2009). Beim direkten Weg werden die Proteine vom TGN intrazellulär direkt zu den frühen oder späten Endosomen und folgend zu den Lysosomen transportiert. Gut beschriebene lysosomale Membranproteine, die über diese Route transportiert werden, sind z.B. einige LAMP oder LIMP (Saftig und Klumperman 2009; Harter

und Mellman 1992). Der indirekte Sortierungsweg beinhaltet den konstitutiven Transport der Membranproteine vom TGN zur Plasmamembran. Im Anschluß werden die Proteine internalisiert und können in Verbindung mit frühen Endosomen zu späten Endosomen/Lysosomen reifen. Die Internalisierung von Membranproteinen mit späterem Transport zu den Lysosomen wird durch ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen Sortierungsmotiven, Adapterproteinen, Clathrin sowie Dynamin zur Vesikelabschnürung vermittelt (Bonifacino und Traub 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass N-terminal mCherry/FLAG-fusioniertes PLD3 neben Lysosomen auch mit der Plasmamembran assoziiert ist (Abb. 7/8/9/12 B). Die Koexpression einer dominant inaktiven Dynaminmutante beeinflusste die Sortierung von PLD3, wobei PLD3 teilweise an der Plasmamembran akkumulierte (Abb.15). Die Expression von dominant inaktivem Dynamin sollte auch die Abschnürung von Vesikeln am TGN beeinflussen. Passend zeigte PLD3 perinukleär intensive Fluoreszenzsignale. Die Ergebnisse konnten durch den Einsatz des Dynamininhibitor „Dynasore“ zusätzlich validiert werden (Abb.16). Dabei zeigten sich vergleichbare Resultate zur Expression der Dynaminmutante, jedoch in abgeschwächter Form. Eventuell könnten stärkere Effekte durch eine erhöhte Konzentration des Inhibitors erzielt werden. Dies könnte jedoch eine erhöhte Zelltoxizität bedingen und zum Zelltod führen (Preta et al. 2015). In Zusammenschau deuten die Experimente an, dass PLD3 zumindest partiell über den indirekten Sortierungsweg zu den Lysosomen transportiert werden könnte.

Wie bereits erläutert, werden lysosomale Membranproteine zumeist direkt oder indirekt zu den Lysosomen transportiert. In beiden Fällen sind verschiedene Sortierungsmotive der jeweiligen Proteine an dem Transport beteiligt. Diese Motive basieren überwiegend auf Dileucin- (DXXLL oder [DE]XXXL[LI]) oder Tyrosin-Signalen (YXXØ) (Braulke und Bonifacino 2009) und befinden sich zumeist in Nähe der Transmembrandomäne (Rohrer et al. 1996; Geisler et al. 1998). Auch PLD3 hat ein Tyrosin-Motiv, welches membranah im Bereich des kurzen, zytosolischen N-Terminus liegt (Abb. 14). Durch gezielte Mutation im Bereich des Tyrosin Motivs konnte gezeigt werden, dass die Mutante mPLD3-Y7A teils an der Plasmamembran akkumulierte, jedoch weiterhin zu den Lysosomen sortiert werden konnte (Abb. 18). Daher ist anzunehmen, dass das Tyrosin-Motiv einen Einfluss auf die Sortierung von PLD3 hat. Gleichzeitig muss aber ein alternativer Mechanismus bestehen, der PLD3 zu den Endosomen/Lysosomen sortiert und als vorherrschend anzusehen ist.

Wie in Kapitel 6.3 beschrieben, ist PLD3 N-glykosidisch mit Mannose-reichen oder komplexeren Zuckertypen verbunden. Besonders lösliche lysosomale Proteine, vor allem saure Hydrolasen, werden über Mannose-6-Phosphat mit der Bindung an entsprechende

M6P-Rezeptoren vom TGN zu den Endosomen sortiert (Ghosh et al. 2003). Lysosomale Membranproteine werden in der Regel M6P-unabhängig transportiert (Braulke und Bonifacio 2009). Da auch eine lösliche Form von PLD3 nachgewiesen (5.7.2, 6.2, 6.5) und PLD3 als wahrscheinlich M6P-haltiges Glykoprotein beschrieben werden konnte (6.3), wurde diese Möglichkeit der Sortierung weiterführend untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Phospholipase D3 unabhängig von M6P zu Endosomen/Lysosomen sortiert wird (Abb.17).

Neben den genannten, sind weitere M6P-unabhängige Transportrouten und Rezeptoren für den Transport lysosomaler Proteine beschrieben. Sortilin ist ein alternativer Rezeptor, der am Transport von Prosaposin oder der sauren Sphingomyelinase zu den Lysosomen beteiligt ist (Lefrancois et al. 2003). Weiterhin wurde das Lysosomale-Integrale-Membran-Protein-2 (LIMP-2) als ein spezifischer Rezeptor identifiziert, welcher das lösliche Enzym  $\beta$ -Glucocerebrosidase M6P-unabhängig in lysosomale Lumina transportiert (Reczek et al. 2007). Eine Alternative, wie Proteine zu den Lysosomen transportiert werden können, ist die Ubiquitinierung. Die Ubiquitinierung ist u.a. eine posttranslationale Modifikation, wobei das Protein Ubiquitin an spezifische, zytosolische Motive der Zielproteine gebunden wird (Polo et al. 2002; Weissman 2001). Bei der Bindung wird der C-Terminus von Ubiquitin im Zusammenspiel mit spezifischen Ligasen an Lysin des jeweiligen Substrats konjugiert (Mattioli und Sixma 2014; Hicke 2001). Vorrangig wird der Transport zu Lysosomen über eine Mono-Ubiquitinierung bewirkt, die Poly-Ubiquitinierung hingegen führt zum Abbau von Proteinen in Proteasomen (Urbé 2005). Betrachtet man die AS-Sequenz des kurzen, zytosolischen N-Terminus von PLD3, so finden sich mehrere potentielle Motive, die *in vivo* ubiquitiniert sein könnten. Dementsprechend ist auch der Transport von PLD3 zu Lysosomen über eine Ubiquitin-Bindung prinzipiell denkbar. Weiterhin ist ein Transport durch die Interaktion mit einem anderen M6P-haltigen oder ubiquitinierten Partnerprotein möglich. Es konnte gezeigt werden, dass das lysosomale Transmembranprotein LAPT5 die Ubiquitin-Ligase Nedd4 und ubiquitiniertes GGA3 bindet, wodurch der korrekte Transport ermöglicht wird (Pak et al. 2006).

## **6.5 PLD3 und der Retromer-Komplex**

Es wurde analysiert, ob PLD3 mit dem Retromer-Komplex assoziiert ist. Der Retromer vermittelt den retrograden Transport von den Endosomen zum Golgi (Kim et al. 2010; Seaman 2004). Eine korrekte Funktion des Retromer-Komplexes ist für den Transport und die physiologische proteolytische Prozessierung von APP entscheidend (Fjorback et al. 2012; Fernández et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die Retromer-Defizienz zur Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden und damit zu neurodegenerativen Erkrankungen führen kann (Small und Petsko 2015; Muhammad et al. 2008). In einer anderen Studie wurde gezeigt,

dass der Knockdown von PLD3 zu intrazellulär erhöhten A $\beta$ -Gesamtmenen führt (Cruchaga et al. 2014). Weiterhin wurde beschrieben, dass PLD3 als Regulator an dem retrograden Kargo-Transport von den Endosomen zum Golgi beteiligt ist (Breusegem und Seaman 2014). In dieser Arbeit konnte dazu passend gezeigt werden, dass mPLD3-mCherry mit VPS29-GFP, einer wichtigen Untereinheit des Retromer (Seaman 2012), zellulär kolokalisiert (Abb. 10). Die Retromer-Vesikel werden samt Kargo während der Reifung der frühen Endosomen zu späten Endosomen/MVB abgeschnürt, um anschließend retrograd zum Golgi transportiert zu werden (Arighi et al. 2004). Markerproteine für frühe/späte Endosomen sind RAB5/RAB7 (Nielsen et al. 1999; Vanlandingham und Ceresa 2009). Des Weiteren wird die Verbindung des Retromer-Komplexes mit Endosomen von RAB5 und RAB7 reguliert (Rojas et al. 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PLD3-mCherry-Fusionsproteine mit RAB5 sowie RAB7 kolokalisieren (Abb.7). Der Snx-Dimer des Retromer-Komplexes ist für die tubuläre Formation der späteren Vesikel und die Membranabschnürung von Bedeutung (Hong et al. 2009; Seaman et al. 1998). Es wurde beschrieben, dass katalytisch aktive Phospholipase D vorwiegend Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und freiem Cholin spaltet (Frohman 2015). Die Phosphatidsäure hat eine negativ geladene Kopfgruppe, wodurch Membranen bei hoher lokaler Konzentration in ihrer Krümmung verändert werden können. Dadurch wird die Abschnürung von Vesikeln aus Membranen erleichtert und beispielsweise die Prozesse der Endozytose/Exozytose gefördert (Ammar et al. 2013; Kooijman et al. 2005; Frohman 2015). Wie gezeigt, könnte PLD3 katalytisch aktiv sein und Phosphatidsäure generieren (Abb.38). Es wäre denkbar, dass PLD3 funktionell an der Formation/Abschnürung der Vesikel des Retromer-Komplexes beteiligt ist und so u.a. auch einen Einfluss auf die korrekte Sortierung und proteolytische Spaltung von APP ausübt.

## **6.6 Proteolytische Prozessierung von PLD3**

Durch die Detektion der Phospholipase D3 durch die N-/C-terminalen Antikörper sowie durch die PLD3-mCherry/FLAG-Fusionsproteine im Western Blot konnten neben dem PLD3-Volllängenprotein (PLD3-FL) weitere spezifische Banden dargestellt werden (6.1, 6.2). Diese wurden als Fragmente interpretiert, die nach einer vorherigen proteolytischen Prozessierung entstanden sein könnten. PLD3 beinhaltet einen kurzen N-Terminus (AS 1-39), eine Transmembrandomäne (AS 39-59) und einen relativ großen C-terminalen Bereich (AS 60-490). Eine mögliche Spaltung von PLD3 sollte damit am ehesten C-terminal lokalisiert sein (Abb. 40). Die PLD3-Fragmente wurden anhand einer Membranfraktionierung analysiert, d.h. lösliche sowie Membranproteine getrennt im Western Blot dargestellt (Abb. 24). Dabei konnten spezifische Fragmente entsprechenden Phasen zugeordnet und neu beschrieben werden. PLD3-FL sowie ein PLD3-NTF (~12 kDa) liegen dabei membrangebunden, ein

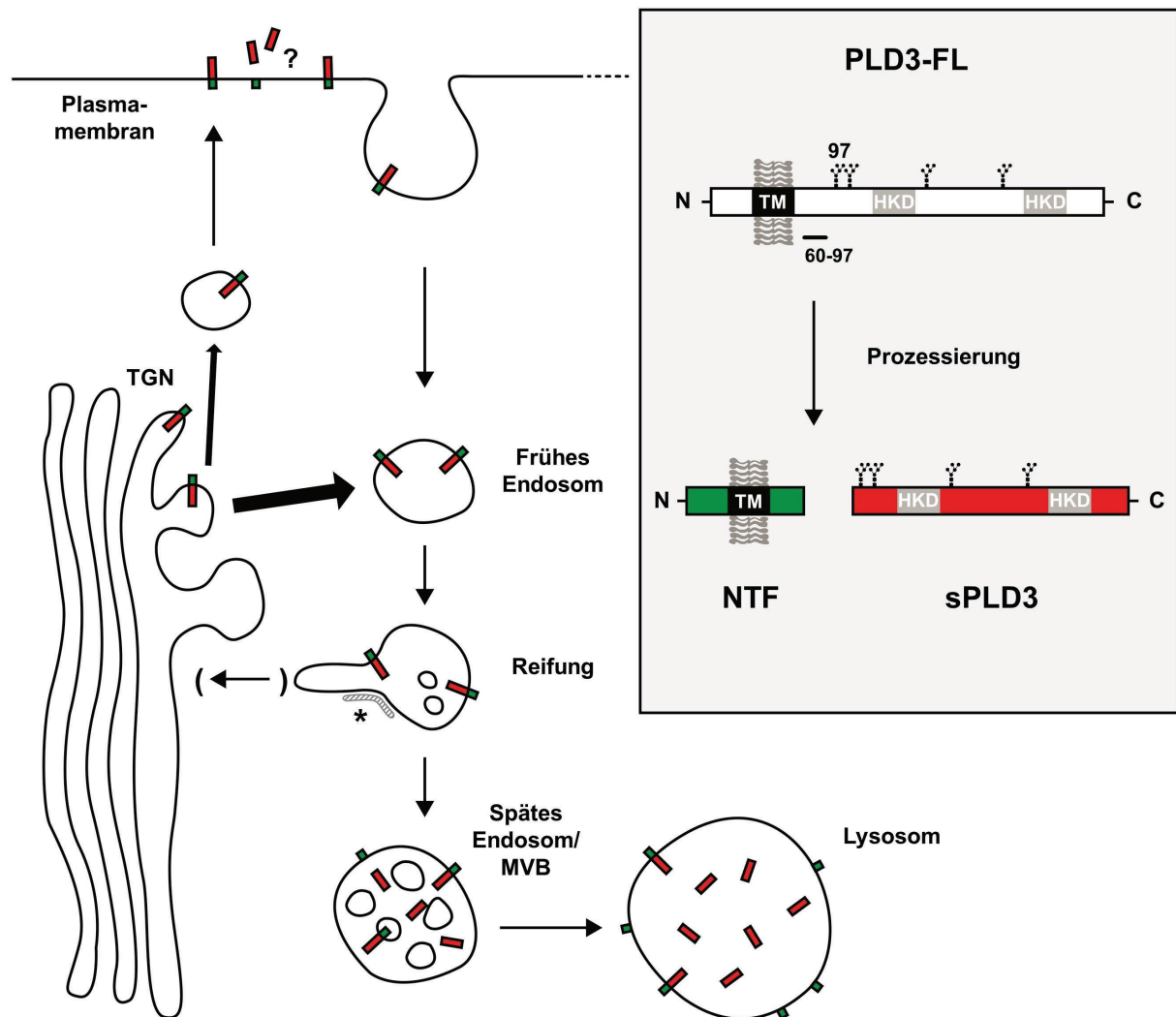
weiteres PLD3-CTF (~50 kDa) löslich vor. Entsprechend der Topologie von PLD3 (6.2) konnte das lösliche PLD3-CTF als lysosomal-luminal gedeutet werden.

PLD3 ist im Wesentlichen mit Lysosomen assoziiert (6.1, 6.2). Folgend wurde analysiert, ob PLD3 innerhalb der Lysosomen proteolytisch gespalten wird. Viele lysosomale Proteine werden pH-abhängig durch luminal Proteasen, z.B. Cathepsin D / B, in den späten Endosomen/Lysosomen gespalten (Brulke und Bonifacino 2009). Dafür muss luminal ein saures Milieu bestehen (pH ~5), eine Anhebung führt zu einer starken Reduktion der katalytischen Aktivität (Mindell 2012). Mittels Hemmstoffen der endosomalen/lysosomalen Azidifizierung wurde untersucht, ob eine mögliche Prozessierung von PLD3 somit unterbunden werden kann. Dabei wurde der Einfluss von Bafilomycin A, Chloroquin, Ammoniumchlorid auf PLD3-FL sowie die PLD3-Fragmente dargestellt (Abb.28). Es ist davon auszugehen, dass durch die fehlende Ansäuerung des lysosomalen Milieus in diesem Experiment die Aktivität der lysosomalen Proteasen stark reduziert war, so dass nur noch geringe PLD3-Mengen proteolytisch prozessiert wurden. Passend waren sPLD3 (CTF, „s=soluble“/löslich) und das PLD3-NTF kaum nachweisbar, wobei PLD3-FL gleichzeitig akkumulierte. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Phospholipase D3 lysosomal und pH-abhängig proteolytisch gespalten wird.

Des Weiteren wurde untersucht, welche Proteasen an dieser Prozessierung beteiligt sein könnten. Dazu wurden die Zellen mit Proteaseinhibitoren gegen Aspartylproteasen (Pepstatin A, Pepstatin A-Methylester), Cysteinproteasen (E64D) und Serin-/Threoninproteasen (Leupeptin) behandelt. Dabei zeigte sich in der Zusammenschau ein geringer Effekt mit einer reduzierten Spaltung von PLD3 durch die Anwendung von E64D. Es wäre möglich, dass der erzielte Effekt durch eine höhere E64D-Konzentration gesteigert werden könnte. Aufgrund der Katalyseinhibition durch E64D ist anzunehmen, dass lysosomale Cysteinproteasen, wie z.B. Cystein-Cathepsine (Stoka et al. 2005), PLD3 *in vivo* proteolytisch spalten.

Außerdem wurden PLD3-Mutanten untersucht, die gezielte Mutationen in den Bereichen tragen, an denen das Wildtypprotein N-glykosidisch mit Zuckern konjugiert ist (6.3, Abb.30). Durch die Mutationen ist PLD3 in den entsprechenden Bereichen nicht glykosyliert. Es konnte gezeigt werden, dass es bei keiner der dargestellten Mutanten zu einer Verschiebung des PLD3-NTF-Signals kommt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Spaltung der Phospholipase D3 im C-terminalen Bereich, distal der Transmembrandomäne (AS 39-59) zwischen der 60. und der 97. Position der PLD3-AS-Sequenz liegen muss. Lage der Bereich der Prozessierung distal/C-terminal von Position 97 müsste eine Verschiebung der NTF-

Bande in diesem Versuchsaufbau bereits in der Spur von PLD3-N97A nachzuweisen sein (Abb. 40).



**Abbildung 40: Modellhafte Darstellung der Lokalisation, des Transportes und der proteolytischen Prozessierung der Phospholipase D3.** Im Kasten ist die proteolytische Spaltung des Vollproteins (PLD3-FL) exemplarisch dargestellt, bei welcher ein kleines, membrangebundenes N-terminales Fragment (NTF) sowie ein größeres, lösliches C-terminales Fragment (sPLD3) entstehen. Die Spaltung erfolgt dabei C-terminal zwischen der Transmembran-Ähre (TM) und dem Zuckerrest in Position 97 der AS-Sequenz von PLD3. PLD3 wird wahrscheinlich maßgeblich direkt zu den frühen Endosomen transportiert. Geringere Mengen könnten zusätzlich über sekretorische Vesikel die Plasmamembran erreichen und anschließend internalisiert werden, um indirekt zu den Endosomen transportiert zu werden. Die frühen Endosomen reifen zu späten Endosomen/MVB und weiter zu Lysosomen. Im sauren Milieu der späten Endosomen und Lysosomen wird PLD3 durch lösliche (Cystein)Proteasen gespalten. PLD3 besteht zellulär maßgeblich in der löslichen, stabilen Form im Lysosomen-Lumen. In der Phase der Reifung der Endosomen / RAB-Konversion könnte PLD3 an der Bildung sowie Abschnürung von Retromer-Tubuli/Vesikeln beteiligt sein. Der Retromer-Komplex (\*) vermittelt den retrograden Kargo-Transport von den Endosomen zum Golgi/TGN. Weiterhin ist eine proteolytische Prozessierung von PLD3 an der Plasmamembran denkbar. Dabei würde das lösliche, C-terminale PLD3-Fragment in den Extrazellulärraum gelangen.

Die proteolytische Prozessierung lysosomaler Proteine ist in der Regel mit einer Konversion des Vollproteins in eine aktive, stabile Form assoziiert (Ishidoh und Kominami 2002; Roberts 2005). In der Darstellung von Tritosomen sowie endogener PLD3 aus SH-SY5Y- sowie HeLa-Zellen im Western Blot zeigte sich PLD3-CTF gegenüber PLD3-FL und PLD3-



NTF prominent (Abb. 23/25/27). Es ist davon auszugehen, dass PLD3 unter endogenen Bedingungen im Wesentlichen in der löslichen, C-terminalen Form in Lysosomen besteht. Weitere, alternative proteolytische Prozessierungen von PLD3-FL können nicht ausgeschlossen werden. Auch ist ein zweiter, nachfolgender Prozessierungsschritt denkbar. Dieser könnte innerhalb der Transmembrandomäne liegen, wodurch das NTF von der Membran gelöst wird. Prominente Beispiele für die proteolytische Prozessierung von Transmembranproteinen sind APP- $\alpha/\beta$ -CTF durch den Gamma-Sekretase-Komplex oder Transmembran-TNF $\alpha$  durch SPPL2a/b (Annaert et al. 2000; Friedmann et al. 2006).

## 6.7 Enzymaktivität als Phospholipase D

Die katalytische Aktivität mit der Generierung von Phosphatidsäure und Cholin aus dem Substrat Phosphatidylcholin wurde mit dem kommerziellen „Amplex Red Phospholipase D Assay Kit“ (Testprinzip in 4.3.6) bestimmt. Es wurde die PLD-Aktivität durch PLD3-Überexpression in HeLa-Zellen sowie endogene Aktivitätsniveaus in Wildtyp- und PLD3-Knockout-Mäusegehirnen analysiert. Dabei wurde auch eine mögliche pH-Abhängigkeit der katalytischen Funktion von PLD3 durch die Messung im neutralen sowie sauren Milieu berücksichtigt. Für PLD1 sowie PLD2 wurde jeweils eine katalytische Aktivität mit der Spaltung von Phosphatidylcholin beschrieben (Frohman 2015). Die gemessenen enzymatischen Aktivitäten konnten durch die Expression der biologischen Positivkontrollen PLD1 und PLD2 erwartungsgemäß jeweils signifikant gesteigert werden (Abb.38, A, B). Dies gilt für die Messungen im neutralen sowie im sauren pH-Bereich. Die richtig positiven Ergebnisse der gemessenen Kontrollen sprechen in Zusammenschau für die Validität des Assays. Die Phospholipase D3 zeigte maßgeblich eine signifikant erhöhte Aktivität im neutralen pH-Bereich (Abb. 38, A). Im sauren Milieu zeigte sich eine signifikant erhöhte PLD-Aktivität erst nach verlängerter Inkubation über Nacht (Abb. 38, C). Neben PLD3 zeigte nur PLD1 zu diesem Zeitpunkt noch ein signifikant erhöhtes Aktivitäts-Niveau. Es ist zu beachten, dass es sich bei dem Testsystem entsprechend der Reaktionskinetik nicht um eine Endpunktbestimmung, sondern um einen kontinuierlichen Aktivitäts-Assay handelt. Verschiedene, undefinierte Messzeitpunkte werden vom Hersteller empfohlen. Die unterschiedlichen zeitlichen Aktivitäten der getesteten Enzyme könnten durch eine jeweils charakteristische Reaktionskinetik bedingt sein. Die Aktivität von PLD1 ist dabei insbesondere von stimulierenden Aktivatoren, wie Proteinkinasen, GTP-bindenden Proteinen (z.B. ARF, Rho), Polyphosphoinositiden und Hormonen abhängig (Kolesnikov et al. 2012).

Die gemessenen PLD-Aktivitäten der Phospholipase D3 weisen darauf hin, dass PLD3 vorwiegend in Kompartimenten enzymatisch aktiv sein könnte, in denen überwiegend ein neutrales pH-Milieu besteht. PLD3 ist unter anderem in frühen/späten Endosomen sowie in

Lysosomen lokalisiert (6.2, 6.4, 6.6). In den Mechanismen der Azidifizierung der Endosomen/Lysosomen und der Aufrechterhaltung des sauren Milieus spielt die V-Typ-ATPase eine maßgebliche Rolle (Mindell 2012). Die Protonenpumpe beginnt bereits in der Phase der frühen Endosomen geringe Mengen von  $H^+$ -Ionen in das Lumen zu befördern. Damit wird der pH-Wert in diesen Vesikeln sukzessive angesäuert und erreicht bis zur späteren Reifung zu Lysosomen einen pH-Wert von unter 5 (Lafourcade et al. 2008). PLD3 ist mit dem Retromer-Komplex assoziiert und es wurde beschrieben, dass eine mögliche katalytische Aktivität von PLD3 durch die Generierung von Phosphatidsäure eine Funktion in der Abschnürung von Retromer-Vesikeln haben könnte (6.5). Die Bildung von Membrantubuli und die spätere Abschnürung der gebildeten Vesikel erfolgt größtenteils in der Phase der RAB-Konversion, also der Reifung von frühen zu späten Endosomen (van Weering et al. 2012; Seaman 2012). In dieser Phase besteht noch ein gering saurer pH-Wert in den vesikulären Lumina (Nishi und Forgac 2002; Lafourcade et al. 2008). Eine funktionelle Beteiligung von PLD3 an den Mechanismen der Formung und Abschürung von Vesikeln des Retromers in dieser Phase wäre somit mit der experimentell gezeigten, enzymatischen Aktivität von PLD3 und dessen pH-Abhängigkeit vereinbar.

Weiterhin wurde die PLD-Aktivität von Gehirnlysaten der PLD3-Knockoutmäuse mit denen von Wildtypmäusen verglichen (Abb.38, D, E, F). Dabei konnten keine signifikanten Aktivitätsunterschiede gemessen werden. Diese Ergebnisse stehen auf den ersten Blick im Widerspruch zu den erhöhten gemessenen Aktivitäten durch die zelluläre PLD3-Überexpression (Abb.38, A, C). Es wäre eine erniedrigte zelluläre PLD-Aktivität der Gehirne von PLD3-Knockoutmäusen im Vergleich mit dem Wildtyp zu erwarten. Durch die Überexpression von PLD1/2/3 stieg die PLD-Aktivität statistisch signifikant, jedoch zeigte sich trotz der Proteinüberexpressionen keine Vervielfachung der endogen bereits relativ hohen PLD-Aktivitäten. Zusätzlich werden PLD1 und PLD2 betont in Zellen des ZNS exprimiert (Zhang et al. 2004). Dies könnte erklären, warum der PLD3-Knockout zu keinen signifikanten Veränderungen der gemessenen Gesamt-PLD-Aktivitäten führt. Außerdem könnten weitere kompensatorische Mechanismen in den PLD3-Knockout-Zellen greifen, z.B. die vermehrte Generierung von Phosphatidsäure durch hochregulierte Aktivitäten der Diacylglycerolkinase (DGK) und Lysophosphatidsäure-Acyltransferase (LPAAT) (Frohman 2015). Eine erneute Aktivitätsmessung von kultivierten Neuronen von Wildtyp- sowie PLD3-Knockoutmäusen mit vorigem Knockdown von PLD1/2 könnte zu weiterführenden Erkenntnissen führen.

Für die katalytische PLD-Aktivität von PLD1 werden zwei funktionelle HKD-Motive benötigt (Xie et al. 2000). Die Motive von PLD3 sind C-terminal lokalisiert und damit luminal oder extrazellulär (6.11). Es ist zu beachten, dass es sich bei dem zweiten Motiv von PLD3 um ein

HKE-Motiv handelt. Ein solches Motiv gilt als „imperfekt“, es ist jedoch nicht eindeutig beschrieben, ob eine mögliche katalytische Funktion dadurch gestört ist (Pedersen et al. 1998). Das Protein VP37 besitzt nur ein HKD-Motiv. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv essentiell für die effiziente zelluläre Ausbreitung des Vacciniavirus ist (Blasco und Moss 1991). Auch Bfil und Bmrl (Restriktionsendonukleasen) besitzen jeweils nur ein HKD-Motiv. Es wird angenommen, dass diese Proteine jeweils dimerisieren, um ein katalytisch aktives Zentrum zu formen (Chan et al. 2007). Weitere experimentelle Ergebnisse legen nahe, dass auch PLD1 und PLD2 Homo- oder Heterodimere untereinander bilden könnten (Kam und Exton 2002). Ob auch PLD3 mit den löslichen PLD1/2 interagiert, könnte weiterführend durch die Methodik der Ko-Immunopräzipitation oder mikroskopische Analysen getestet werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass PLD6 Phosphatidsäure nicht durch die Katalyse von Phosphatidylcholin, sondern durch die Spaltung von Cardiolipin generiert. PLD6 hat zusätzlich eine Funktion als Endonuklease (Ha und Frohman 2014).

Es wäre denkbar, dass PLD3 neben Phosphatidylcholin auch weitere Substrate katalytisch umsetzt. So konnte jüngst berichtet werden, dass PLD3 und PLD4 eine Funktion als saure Exonukleasen aufweisen, dabei Liganden von TLR-9 (Toll-ähnliche Rezeptoren des angeborenen Immunsystems) spalten und so die zelluläre Immunreaktion regulieren, bzw. eine überschießende Immunantwort eindämmen könnten (Gavin et al. 2018). Die Bindung von vorwiegend Einzelstrang-RNA/DNA (z.B. bakterielle Pathogene) an TLR-9 führt u.a. zur Produktion von pro-inflammatorischen Interferonen und Zytokinen (Wagner und Bauer 2006). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene PLD4-Varianten mit Autoimmunerkrankungen wie der Systemischen Sklerose oder der Rheumatoiden Arthritis assoziiert sind (Terao et al. 2013; Okada et al. 2012). In der näheren Vergangenheit wurde, in Ergänzung zur Amyloid-Theorie, auch eine chronisch-neuronale Inflammation bezüglich der Genese der Alzheimer-Erkrankung diskutiert (Tuppo und Arias 2005; Spangenberg und Green 2017). Insofern ist auch eine Beteiligung von PLD3 im Rahmen der Regulation von neuronalen Entzündungsreaktion denkbar.

## **6.8 Einfluss von PLD3 auf die Gesamtmenge sowie die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins**

Es konnte gezeigt werden, dass die transiente Überexpression von PLD3 in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) zur Reduktion von APP-FL und der Knockdown von PLD3 zum zellulären Anstieg von  $A\beta_{40/42}$  führt (Cruchaga et al. 2014). Zusätzlich wurde beschrieben, dass PLD3 mit APP ko-immunopräzipitiert werden kann, was die Möglichkeit einer zellulären Interaktion unterstreicht. Der Einfluss von PLD3 auf APP-FL sollte im

erweiterten Versuchsaufbau in dieser Arbeit verifiziert und zusätzlich die Auswirkungen auf die C-terminalen Fragmente von APP analysiert werden.

Die erzielten Effekte der transienten Überexpression von PLD3 bezüglich APP konnten bestätigt werden (Abb.34). Die Koexpression von APP-WT und mPLD3-WT führte im Vergleich mit der einfachen APP-Expression zur signifikanten Abnahme von APP-FL ( $p=0.0005$ ) sowie APP-CTF ( $p=0.0008$ ). Die alternative Koexpression eines weiteren, beliebigen lysosomalen Membranproteins (MFSD-1) zeigte keinen solchen Einfluss auf APP-FL sowie APP-CTF. Es ist daher davon auszugehen, dass PLD3 spezifisch die APP-/ APP-CTF-Gesamt mengen beeinflussen kann. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression von mPLD3 die Gesamt mengen von APP-CTF bezogen auf APP-FL im Vergleich zur einfachen APP-Expression signifikant reduziert (Abb.34, C,  $p=0.0055$ ). Es ist wahrscheinlich, dass PLD3 nicht nur einen Einfluss auf die APP-FL-Gesamtmenge ausübt, sondern zusätzlich die proteolytische Spaltung von APP modifiziert.

Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass nur im Falle der Expression von mPLD3 ein zusätzliches C-terminales Fragment detektiert wurde. Zu den klassischen CTF gehören das nach Spaltung durch die Alpha-Sekretase entstandene C83 sowie die nach APP-Prozessierung durch die Beta-Sekretase generierten C99 und C89 (Tanzi und Bertram 2005; Siegel et al. 2017). Das nachgewiesene vierte C-terminale Fragment (Abb. 34/35), welches durch den Einfluss von PLD3 vermehrt/bevorzugt generiert wurde, lag vom Molekulargewicht (etwa 11 kDa) unterhalb von C83/89/99. Dies bedeutet, dass zur Generierung eines solchen Fragmentes der erste Prozessierungsschnitt von APP membrannäher als die typischen Schnittstellen für die Generierung der sonst prominenten APP-CTF liegen muss (Abb. 4). Die erste Spaltung vom Vollängen-APP erfolgt durch die Alpha-Sekretase oder konkurrierend durch die Beta-Sekretase, insbesondere BACE-1 (Skovronsky et al. 2000). Neuere Studien beschreiben einen alternativen ersten Prozessierungsschritt von APP durch BACE-2. BACE-2 kolokalisiert mit BACE-1 an der Plasmamembran sowie in endozytierten Vesikeln (Casas et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Spaltung von APP durch BACE-2 ein C-terminales Fragment generiert wird, welches vom Molekulargewicht unterhalb von C83/89/99 liegt und als C79 bezeichnet wird (Farzan et al. 2000). Es wird angenommen, dass BACE-2 mit BACE-1 um die proteolytische Prozessierung von APP konkurriert, wobei BACE-1 bezüglich der Gesamtmenge im Gehirn überwiegt (Voytyuk et al. 2018). Die alternative Spaltung durch BACE-2 beugt der Bildung von neurotoxischen A $\beta$ -Monomeren im zweiten Prozessierungsschritt durch die Gamma-Sekretase vor (Tanzi und Bertram 2005). Die Aggregation der einzelnen A $\beta$ -Peptide sowie die damit verbundene Bildung von senilen Plaques gilt als ätiologisch bedeutsam für die Entstehung der Alzheimer-Demenz (Ahmed et al. 2010; Annaert und Strooper 2002). Eine geringere Bildung von A $\beta$ -Peptiden durch den

alternativen ersten Schnitt von APP durch BACE-2 könnte, ähnlich wie die Prozessierung durch die Alpha-Sekretase, der Bildung von Amyloid-Plaques vorbeugen (Tanzi und Bertram 2005). Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem dargestellten vierten APP-CTF (Abb. 34/35), welches durch die Überexpression von mPLD3 vermehrt gebildet wird, um C79 (BACE-2 generiert) handelt.

Es konnte beobachtet werden, dass die erzielten Effekte teils variieren und unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Abb. 34/35). Daher ist anzunehmen, dass der mögliche Effekt von PLD3 auf die Gesamtmenge sowie proteolytische Prozessierung von APP von weiteren, bislang eventuell unbekanntem Einflussgrößen und Regulatoren abhängig ist.

## **6.9 PLD3-Knockout-Maus und -MEF**

Die Zelllysate von PLD3  $-/-$  /  $+/+$  -Mäusen wurden im Western Blot analysiert (Abb. 32). Bei einem vollständigen PLD3-Knockout sollte kein PLD3-FL sowie PLD3-Fragmente darstellbar sein. Die Ergebnisse der Western Blots (Abb.32) sprechen zusammen mit weiteren molekularbiologischen Untersuchungen der AG Damme dafür, dass der Knockout effizient war und die Mäuse tatsächlich PLD3-defizient sind.

Es wurde analysiert, ob durch den *PLD3*-Genknockout Veränderungen hinsichtlich der intrazellulären Gesamtmengen von BACE-1, APP und dessen C-terminaler Fragmente bewirkt werden (Abb.32/33). Im Vergleich der Gehirnllysate / MEF von PLD3-Wildtyp- und Knockout-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gesamtmengen von BACE-1, APP und APP-CTF. Es ist nicht davon auszugehen, dass PLD3 maßgeblich an der Degradation von APP oder BACE-1 beteiligt ist. Wie in weiteren Kapiteln dieser Arbeit diskutiert, könnte PLD3 eher als indirekter Regulator der proteolytischen APP-Prozessierung wirken und dadurch einen Einfluss auf die Bildung von A $\beta$ -Peptiden haben (6.5, 6.7, 6.8, 6.10). Allerdings muss beachtet werden, dass in dem Versuchsaufbau des Experimentes aus Abbildung 32 jeweils Lysate des gesamten Gehirns der entsprechenden Mäuse getestet wurden. Im Rahmen der Alzheimer-Demenz ist beschrieben, dass es charakteristischerweise zu einem Untergang der neuronalen Zellen in der Hippocampus-Formation kommt (Padurariu et al. 2012; Zarow et al. 2005). Auch eine entsprechende Bildung von sogenannten senilen Plaques, extrazellulär aggregierte A $\beta$ -Peptide, zeigt sich vermehrt in dieser Gehirnregion (Davies et al. 1988). Daher könnte die Methodik dadurch verbessert werden, dass gezielt Zellen aus den Hippocampi der Mäusegehirne analysiert werden.

## 6.10 PLD3 Patientenmutation -V232M

Es wurde berichtet, dass die humane PLD3-Variante V232M zu einer Verdoppelung des Risikos, an der Spätform der Alzheimer-Demenz zu erkranken, führt (Cruchaga et al. 2014). Weiterführend wurde in dieser Arbeit analysiert, ob eine vergleichbare Mutation in der murinen Phospholipase D3 zu einer veränderten intrazellulären Sortierung von PLD3 führt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Verteilung von mPLD3-V230M im Vergleich zum PLD3-Wildtyp, wobei der Transport vom ER über den Golgi/TGN zu den Endosomen/Lysosomen stark eingeschränkt war (Abb.37). Die Variante mPLD3-V230M retinierte großteils im ER, nur geringe Mengen erreichten die Lysosomen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mPLD3 in Position 234 N-glykosidisch mit einem Zuckerrest konjugiert ist (Abb.30). Die Glykosylierung in diesem Bereich ist für einen korrekten Transport von PLD3 wichtig. Die Mutante mPLD-N234A retinierte ebenfalls im ER (Abb.31). Es wurde beschrieben, dass bereits der Austausch einer einzigen AS durch Punktmutationen die Struktur sowie die Funktion eines Proteins verändern kann (Schaefer und Rost 2012). Die generierte Mutation (mPLD3-V230M) könnte zu einer Fehlfaltung mit verbundener Änderung der Proteinkonformation führen, wodurch die physiologische Glykosylierung sowie Sortierungsmechanismen blockiert werden. Die humane Variante PLD3-V232M ist wahrscheinlich auf eine vergleichbare Art in ihrer Sortierung und Funktion verändert. Im Bereich der Mutation zeigt sich eine identische AS-Abfolge im Vergleich mit der murinen Variante (Abb.36).

PLD3 könnte u.a. an der Rezirkulation, bzw. dem retrograden Transport des APP von frühen Endosomen zum Golgi durch eine Interaktion mit dem Retromer-Komplex beteiligt sein (6.5). APP wird im Golgi maßgeblich durch die Alpha-Sekretase proteolytisch prozessiert, was der A $\beta$ -Bildung vorbeugt und daher als nicht-amyloidogener Weg bezeichnet wird (Haass et al. 2012; Mecozzi et al. 2014). PLD3-Varianten (z.B. mPLD3-V230M), welche durch eine fehlerhafte Sortierung nicht zu den Endosomen/Lysosomen transportiert werden und dabei im ER retinieren, könnten folglich nicht mehr ihre physiologische Funktion erfüllen. Dies könnte die Bildung von senilen Plaques begünstigen sowie die Risikoerhöhung der Mutationsträger, an M. Alzheimer zu erkranken, begründen.

## 7 Zusammenfassung

Zur Analyse der Phospholipase D3 wurden molekularbiologische, zellbiologische und biochemische Methoden eingesetzt. Außerdem wurde ein anti-PLD3-Antikörper experimentell etabliert, der den kurzen N-Terminus spezifisch detektiert.

Nach der bisherigen, geringen Studienlage handelt es sich bei der Phospholipase D3 um ein Membranprotein, welches maßgeblich mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist (Munck et al. 2005), wobei neuere Studien auf eine Verbindung mit Lysosomen weisen (Palmieri et al. 2011). In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass PLD3 zellulär in Endosomen/Lysosomen lokalisiert ist. PLD3 wird proteolytisch in Lysosomen gespalten, wobei N- sowie C-terminale PLD3-Fragmente neu beschrieben werden konnten. Die Phospholipase D3 besteht *in vitro* überwiegend in der löslichen, luminalen Form. Weiterhin kann gezeigt werden, dass PLD3 an verschiedenen Positionen der AS-Sequenz mit unterschiedlichen Zuckertypen N-glykosidisch konjugiert ist. PLD3 wird nicht über Mannose-6-Phosphat-Reste sortiert. Auch dem potentiellen N-terminalen Tyrosin-Sortierungsmotiv kommt nur eine untergeordnete Rolle bezüglich des lysosomalen PLD3-Transportes zu und es werden alternative Transportmechanismen diskutiert.

Zur Analyse einer potentiellen katalytischen Funktion von PLD3 als Phospholipase D wurde ein Enzym-Aktivitäts-Assay etabliert, welcher eine mögliche pH-Abhängigkeit der Aktivität berücksichtigt. Unter Testbedingungen kann eine enzymatische Aktivität von PLD3 im neutralen Milieu nachgewiesen werden. Die Phospholipase D3 wurde mit dem Retromer-Komplex in Verbindung gebracht (Breusegem und Seaman 2014). Passend kann gezeigt werden, dass PLD3 mit einer essentiellen Untereinheit des Retromer-Komplexes endosomal kolokalisiert, wodurch eine funktionelle Beteiligung der Phospholipase D3 bei der Formierung und Abschnürung retrograder Vesikel denkbar ist.

Durch die PLD3-Überexpression in neuronalen Zellen können die APP-Gesamtlevel teils signifikant reduziert werden, in Zusammenschau mit der Analyse von *PLD3*-Kockout-Zellen ist der Einfluss auf das APP-Volllängenprotein jedoch als mäßig zu werten. PLD3 hat eher einen Effekt auf die proteolytische Prozessierung von APP, wobei die nicht-amyloidogene Spaltung gefördert und insgesamt geringere zelltoxische Abeta-Mengen generiert werden könnten. Außerdem wurde die murine Variante der wichtigsten PLD3-Patientenmutation (*PLD3*-V232M) mikroskopisch analysiert. Diese zeigt sich unter Überexpression, abweichend vom Wildtyp, überwiegend ER-lokalisiert. Ein pathologischer Transport mit konsekutivem Funktionsverlust von *PLD3*-V232M könnte eine zellbiologische Erklärung für die beschriebene Assoziation mit der Spätform des M. Alzheimer (Cruchaga et al. 2014) sein.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aebi, M. (2013): N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (11), 2430–2437
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S. et al. (2010): Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol*, 17 (5), 561–567
- Ammar, M. R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.-F., Vitale, N. (2013): Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4:125, doi: 10.3389/fendo.2013.00125
- Annaert, W., Strooper, B. de (2002): A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 25–51
- Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Strooper, B. de (2000): Presenilin function in APP processing. *Ann N Y Acad Sci*, 920, 158–164
- Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R., Bonifacino, J. S. (2004): Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol*, 165 (1), 123–133
- Banno, Y. (2002): Regulation and possible role of mammalian phospholipase D in cellular functions. *J Biochem*, 131 (3), 301–306
- Benilova, I., Karran, E., Strooper, B. de (2012): The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 15 (3), 349–357
- Benjamin, Perdue (1996): Site-Directed Mutagenesis in Epitope Mapping. *Methods*, 9 (3), 508–515
- Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33 (11), 2643–2652
- Blasco, R., Moss, B. (1991): Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol*, 65 (11), 5910–5920
- Bonifacino, J. S. (2004): The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (1), 23–32
- Bonifacino, J. S., Traub, L. M. (2003): Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 72, 395–447



- Braulke, T., Bonifacino, J. S. (2009): Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1793 (4), 605–614
- Breusegem, S. Y., Seaman, M. N. J. (2014): Genome-wide RNAi screen reveals a role for multipass membrane proteins in endosome-to-golgi retrieval. *Cell Rep*, 9 (5), 1931–1945
- Cai, X. D., Golde, T. E., Younkin, S. G. (1993): Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science*, 259 (5094), 514–516
- Cai, Y., Gui, C., Samedov, K., Su, H., Gu, X., Li, S. et al. (2017): An acidic pH independent piperazine-TPE AIEgen as a unique bioprobe for lysosome tracing. *Chem Sci*, 8 (11), 7593–7603
- Casas, S., Casini, P., Piquer, S., Altirriba, J., Soty, M., Cadavez, L. et al. (2010): BACE2 plays a role in the insulin receptor trafficking in pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299 (6), E1087-95
- Chan, S.-h., Bao, Y., Ciszak, E., Laget, S., Xu, S.-y. (2007): Catalytic domain of restriction endonuclease Bmrl as a cleavage module for engineering endonucleases with novel substrate specificities. *Nucleic Acids Res*, 35 (18), 6238–6248
- Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagné, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M. et al. (2013): An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol Cell Proteomics*, 12 (6), 1572–1588
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J., Frohman, M. A. (2006): A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol*, 8 (11), 1255–1262
- Cruchaga, C., Karch, C. M., Jin, S. C., Benitez, B. A., Cai, Y., Guerreiro, R. et al. (2014): Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*, 505 (7484), 550–554
- Davies, D. C., Wilmott, A. C., Mann, D. M. (1988): Senile plaques are concentrated in the subicular region of the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 94 (1-2), 228–233
- Dittmer, F., Pohlmann, R., Figura, K. von (1997): The phosphorylation pattern of oligosaccharides in secreted procathepsin D is glycosylation site-specific and independent of the expression of mannose 6-phosphate receptors. *J Biol Chem*, 272 (2), 852–858
- Doherty, G. J., McMahon, H. T. (2009): Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857–902

- Eskelinen, E.-L. (2006): Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*, 27 (5-6), 495–502
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., Choe, H. (2000): BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (17), 9712–9717
- Fernández, M. V., Black, K., Carrell, D., Saef, B., Budde, J., Deming, Y. et al. (2016): SORL1 variants across Alzheimer's disease European American cohorts. *Eur J Hum Genet*, 24 (12), 1828–1830
- Fjorback, A. W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C. et al. (2012): Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci*, 32 (4), 1467–1480
- Forsström, B., Axnäs, B. B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., Uhlen, M. (2015): Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS ONE*, 10 (3), e0121673
- Fortenberry, S. C., Schorey, J. S., Chirgwin, J. M. (1995): Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *J Cell Sci*, 108 (Pt 5), 2001–2006
- Foster, D. A., Salloum, D., Menon, D., Frias, M. A. (2014): Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem*, 289 (33), 22583–22588
- Freeze, H. H., Kranz, C. (2008): Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Curr Protoc Immunol*, 83 (1), 8.15.1-8.15.26
- Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleegeer, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F. et al. (2006): SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol*, 8 (8), 843–848
- Frohman, M. A. (2015): The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36 (3), 137–144
- Gavin, A. L., Huang, D., Huber, C., Mårtensson, A., Tardif, V., Skog, P. D. et al. (2018): PLD3 and PLD4 are single-stranded acid exonucleases that regulate endosomal nucleic-acid sensing. *Nat Immunol*, 19 (9), 942–953
- Geisler, C., Dietrich, J., Nielsen, B. L., Kastrup, J., Lauritsen, J. P., Odum, N., Christensen, M. D. (1998): Leucine-based receptor sorting motifs are dependent on the spacing relative to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 273 (33), 21316–21323

Geller, L. N., Potter, H. (1999): Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 6 (3), 167–179

Ghosh, P., Dahms, N. M., Kornfeld, S. (2003): Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (3), 202–212

Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., Gruenberg, J. (1991): rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 64 (5), 915–925

Grant, B. D., Donaldson, J. G. (2009): Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (9), 597–608

Guerreiro, R. J., Gustafson, D. R., Hardy, J. (2012): The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging*, 33 (3), 437–456

Ha, E. E.-J., Frohman, M. A. (2014): Regulation of mitochondrial morphology by lipids. *Biofactors*, 40 (4), 419–424

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., Sisodia, S. (2012): Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (5), a006270

Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D. et al. (1995): The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*, 1 (12), 1291–1296

Harter, C., Mellman, I. (1992): Transport of the lysosomal membrane glycoprotein Igp120 (Igp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol*, 117 (2), 311–325

Hartl, D., Klatt, S., Roch, M., Konthur, Z., Klose, J., Willnow, T. E., Rohe, M. (2013): Soluble alpha-APP (sAPPalpha) regulates CDK5 expression and activity in neurons. *PLoS ONE*, 8 (6), e65920

Hasilik, A., Neufeld, E. F. (1980): Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *J Biol Chem*, 255 (10), 4946–4950

Helenius, A., Aebi, M. (2001): Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291 (5512), 2364–2369

Henley, J. R., Cao, H., McNiven, M. A. (1999): Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB J*, 13 (S2), 243-247

Hicke, L. (2001): A New Ticket for Entry into Budding Vesicles—Ubiquitin. *Cell*, 106 (5), 527–530

- Hicke, L., Dunn, R. (2003): Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 141–172
- Hoffmann, D., Flörke, H. (1998): A structural role for glycosylation. Lessons from the hp model. *Folding and Design*, 3 (5), 337–343
- Hong, Z., Yang, Y., Zhang, C., Niu, Y., Li, K., Zhao, X., Liu, J.-J. (2009): The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150(Glued) and mediates endosome-to-TGN transport. *Cell Res*, 19 (12), 1334–1349
- Hooli, B. V., Lill, C. M., Mullin, K., Qiao, D., Lange, C., Bertram, L., Tanzi, R. E. (2015): PLD3 gene variants and Alzheimer's disease. *Nature*, 520 (7545), E7-10
- Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H. et al. (2011): piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev Cell*, 20 (3), 376–387
- Hutton, M., Hardy, J. (1997): The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 6 (10), 1639–1646
- Ipsaro, J. J., Haase, A. D., Knott, S. R., Joshua-Tor, L., Hannon, G. J. (2012): The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 491 (7423), 279–283
- Ishida, Y., Nayak, S., Mindell, J. A., Grabe, M. (2013): A model of lysosomal pH regulation. *J Gen Physiol*, 141 (6), 705–720
- Ishidoh, K., Kominami, E. (2002): Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem*, 383 (12), 1827–1831
- Jenkins, G. M., Frohman, M. A. (2005): Phospholipase D. A lipid centric review. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62 (19-20), 2305–2316
- Kam, Y., Exton, J. H. (2002): Dimerization of phospholipase d isozymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (1), 375–380
- Kent, D. G., Copley, M. R., Benz, C., Wöhrer, S., Dykstra, B. J., Ma, E. et al. (2009): Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood*, 113 (25), 6342–6350
- Kim, E., Lee, Y., Lee, H.-J., Kim, J. S., Song, B.-S., Huh, J.-W. et al. (2010): Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 403 (2), 167–171
- Klionsky, D. J. (2007): Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (11), 931–937

- Kolesnikov, Y. S., Nokhrina, K. P., Kretynin, S. V., Volotovskii, I. D., Martinec, J., Romanov, G. A., Kravets, V. S. (2012): Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochemistry Mosc*, 77 (1), 1–14
- Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., Kruijff, B. de, Burger, K. N. J., Rand, P. R. (2005): Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry*, 44 (6), 2097–2102
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 54, 631–664
- Kuronita, T., Eskelinen, E.-L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M., Tanaka, Y. (2002): A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci*, 115 (Pt 21), 4117–4131
- Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J., van der Goot, F. Gisou (2008): Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS ONE*, 3 (7), e2758
- Lambert, J.-C., Grenier-Boley, B., Bellenguez, C., Pasquier, F., Campion, D., Dartigues, J.-F. et al. (2015): PLD3 and sporadic Alzheimer's disease risk. *Nature*, 520 (7545), E1-E6
- Lefrançois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M., Morales, C. R. (2003): The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J*, 22 (24), 6430–6437
- Lieberman, A. P., Puertollano, R., Raben, N., Slaugenhaupt, S., Walkley, S. U., Ballabio, A. (2012): Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy*, 8 (5), 719–730
- Luzio, J. P., Gray, S. R., Bright, N. A. (2010): Endosome-lysosome fusion. *Biochem Soc Trans*, 38 (6), 1413–1416
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., Plummer, T. H. (1989): Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*, 180 (2), 195–204
- Markmann, S., Krambeck, S., Hughes, C. J., Mirzaian, M., Aerts, Johannes M F G, Saftig, P. et al. (2017): Quantitative Proteome Analysis of Mouse Liver Lysosomes Provides Evidence for Mannose 6-phosphate-independent Targeting Mechanisms of Acid Hydrolases in Mucopolysaccharidosis II. *Mol Cell Proteomics*, 16 (3), 438–450
- Mattioli, F., Sixma, T. K. (2014): Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways. *Nat Struct Mol Biol*, 21 (4), 308–316

Mecozzi, V. J., Berman, D. E., Simoes, S., Vetanovetz, C., Awal, M. R., Patel, V. M. et al. (2014): Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing. *Nat Chem Biol*, 10 (6), 443–449

Mindell, J. A. (2012): Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 74, 69–86

Moreira, P. I., Carvalho, C., Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G. (2010): Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*, 1802 (1), 2–10

Muhammad, A., Flores, I., Zhang, H., Yu, R., Staniszewski, A., Planel, E. et al. (2008): Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and Abeta accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (20), 7327–7332

Munck, A., Böhm, C., Seibel, N. M., Hashemol Hosseini, Z., Hampe, W. (2005): Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *FEBS J*, 272 (7), 1718–1726

Nelson, N., Perzov, N., Cohen, A., Hagai, K., Padler, V., Nelson, H. (2000): The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol*, 203 (Pt 1), 89–95

Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., Zerial, M. (1999): Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol*, 1 (6), 376–382

Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M., Lerner, R. A. (1983): Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (16), 4949–4953

Nishi, T., Forgac, M. (2002): The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (2), 94–103

Nishikimi, A., Fukuhara, H., Su, W., Hongu, T., Takasuga, S., Mihara, H. et al. (2009): Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science*, 324 (5925), 384–387

Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M. K., Bonnefond, L. et al. (2012): Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, (7423), 284–287

Nishioka, T., Frohman, M. A., Matsuda, M., Kiyokawa, E. (2010): Heterogeneity of Phosphatidic Acid Levels and Distribution at the Plasma Membrane in Living Cells as Visualized by a Forster Resonance Energy Transfer (FRET) Biosensor. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (46), 35979–35987

- Noh, D. Y., Ahn, S. J., Lee, R. A., Park, I. A., Kim, J. H., Suh, P. G. et al. (2000): Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues. *Cancer Lett*, 161 (2), 207–214
- Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A. et al. (2012): Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet*, 44 (5), 511–516
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Tian, H., Laredo, M., Shui, G., Staniszewski, A. et al. (2010): Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J Neurosci*, 30 (49), 16419–16428
- Olmsted, J. B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J. (1970): Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 65 (1), 129–136
- Osisami, M., Ali, W., Frohman, M. A. (2012): A role for phospholipase D3 in myotube formation. *PLoS ONE*, 7 (3), e33341
- Otani, Y., Yamaguchi, Y., Sato, Y., Furuichi, T., Ikenaka, K., Kitani, H. et al. (2011): PLD4 Is Involved in Phagocytosis of Microglia. Expression and Localization Changes of PLD4 Are Correlated with Activation State of Microglia. *PLoS ONE*, 6 (11), e27544
- Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D., Baloyannis, S. (2012): Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub*, 24 (2), 152–158
- Pak, Y., Glowacka, W. K., Bruce, M. C., Pham, N., Rotin, D. (2006): Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination. *J Cell Biol*, 175 (4), 631–645
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., Di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A. (2011): Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*, 20 (19), 3852–3866
- Pedersen, K. M., Finsen, B., Celis, J. E., Jensen, N. A. (1998): Expression of a novel murine phospholipase D homolog coincides with late neuronal development in the forebrain. *J Biol Chem*, 273 (47), 31494–31504
- Peng, X., Frohman, M. A. (2012): Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiologica*, 204 (2), 219–226

Platt, F. M., Boland, B., van der Spoel, Aarnoud C (2012): The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*, 199 (5), 723–734

Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G. et al. (2002): A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*, 416 (6879), 451–455

Potter, B. A., Hughey, R. P., Weisz, O. A. (2006): Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 290 (1), C1-C10

Preta, G., Cronin, J. G., Sheldon, I. M. (2015): Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun Signal*, 13:24, doi: 10.1186/s12964-015-0102-1

Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Bonifacino, J. S. (2001): Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science*, 292 (5522), 1712–1716

Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X. et al. (2007): LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*, 131 (4), 770–783

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., Zerial, M. (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122 (5), 735–749

Roberts, R. (2005): Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins. *Drug News Perspect*, 18 (10), 605–614

Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D., Kornfeld, S. (1996): The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol*, 132 (4), 565–576

Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S. et al. (2008): Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*, 183 (3), 513–526

Ross, R. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. (1983): Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 71 (4), 741–747

Saftig, P., Klumperman, J. (2009): Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (9), 623–635

Saito, M., Iwadate, M., Higashimoto, M., Ono, K., Takebayashi, Y., Takenoshita, S. (2007): Expression of phospholipase D2 in human colorectal carcinoma. *Oncol Rep*, 18 (5), 1329–1334



- Sakono, M., Zako, T. (2010): Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J*, 277 (6), 1348–1358
- Sardiello, M., Palmieri, M., Di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A. et al. (2009): A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 325 (5939), 473–477
- Satoh, J.-I., Kino, Y., Yamamoto, Y., Kawana, N., Ishida, T., Saito, Y., Arima, K. (2014): PLD3 is accumulated on neuritic plaques in Alzheimer's disease brains. *Alzheimers Res Ther*, 6:70, doi: 10.1186/s13195-014-0070-5
- Schaefer, C., Rost, B. (2012): Predict impact of single amino acid change upon protein structure. *BMC Genomics*, 13:S4, doi: 10.1186/1471-2164-13-S4-S4
- Schwake, M., Schroder, B., Saftig, P. (2013): Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic*, 14 (7), 739–748
- Seaman, M. N. J. (2004): Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol*, 165 (1), 111–122
- Seaman, M. N. J. (2012): The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*, 125 (Pt 20), 4693–4702
- Seaman, M. N. J., McCaffery, J. M., Emr, S. D. (1998): A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*, 142 (3), 665–681
- Siegel, G., Gerber, H., Koch, P., Bruestle, O., Fraering, P. C., Rajendran, L. (2017): The Alzheimer's Disease  $\gamma$ -Secretase Generates Higher 42:40 Ratios for  $\beta$ -Amyloid Than for p3 Peptides. *Cell Rep*, 19 (10), 1967–1976
- Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W., Lee, V. M. (2000): Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem*, 275 (4), 2568–2575
- Sleat, D. E., Sun, P., Wiseman, J. A., Huang, L., El-Banna, M., Zheng, H. et al. (2013): Extending the mannose 6-phosphate glycoproteome by high resolution/accuracy mass spectrometry analysis of control and acid phosphatase 5-deficient mice. *Mol Cell Proteomics*, 12 (7), 1806–1817
- Sleat, D. E., Zheng, H., Qian, M., Lobel, P. (2006): Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics*, 5 (4), 686–701
- Small, S. A., Petsko, G. A. (2015): Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci*, 16 (3), 126–132

- Sosa, M. A., Schmidt, B., Figura, K. von, Hille-Rehfeld, A. (1993): In vitro binding of plasma membrane-coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J Biol Chem*, 268 (17), 12537–12543
- Spangenberg, E. E., Green, K. N. (2017): Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun*, 61, 1–11
- Spiro, R. G. (2002): Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12 (4), 43R-56R
- Stanley, P. (2011): Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (4), a005199
- Stoka, V., Turk, B., Turk, V. (2005): Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life*, 57 (4-5), 347–353
- Su, W., Chen, Q., Frohman, M. A. (2009): Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncology*, 5 (9), 1477–1486
- Tanzi, R. E., Bertram, L. (2005): Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 120 (4), 545–555
- Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R. et al. (2008): Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis*, 31 (2), 250–260
- Terao, C., Ohmura, K., Kawaguchi, Y., Nishimoto, T., Kawasaki, A., Takehara, K. et al. (2013): PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum*, 65 (2), 472–480
- Trimble, R. B., Tarentino, A. L. (1991): Identification of distinct endoglycosidase (endo) activities in *Flavobacterium meningosepticum*: endo F1, endo F2, and endo F3. Endo F1 and endo H hydrolyze only high mannose and hybrid glycans. *J Biol Chem*, 266 (3), 1646–1651
- Tuppo, E. E., Arias, H. R. (2005): The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (2), 289–305
- Urbé, S. (2005): Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem*, 41, 81–98
- Vagin, O., Kraut, J. A., Sachs, G. (2009): Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296 (3), F459-69
- van der Lee, Sven J, Holstege, H., Wong, T. H., Jakobsdottir, J., Bis, J. C., Chouraki, V. et al. (2015): PLD3 variants in population studies. *Nature*, 520 (7545), E1-6

- van Weering, Jan R T, Verkade, P., Cullen, P. J. (2012): SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic*, 13 (1), 94–107
- Vanlandingham, P. A., Ceresa, B. P. (2009): Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*, 284 (18), 12110–12124
- Vorland, M., Holmsen, H. (2008): Phospholipase D in human platelets: presence of isoenzymes and participation of autocrine stimulation during thrombin activation. *Platelets*, 19 (3), 211–224
- Voytyuk, I., Mueller, S. A., Herber, J., Snellinx, A., Moechars, D., van Loo, G. et al. (2018): BACE2 distribution in major brain cell types and identification of novel substrates. *Life Sci Alliance*, 1 (1), e201800026
- Wagner, H., Bauer, S. (2006): All is not Toll: new pathways in DNA recognition. *J Exp Med*, 203 (2), 265–268
- Wang, C., Wang, H.-F., Tan, M.-S., Liu, Y., Jiang, T., Zhang, D.-Q. et al. (2016): Impact of Common Variations in PLD3 on Neuroimaging Phenotypes in Non-demented Elders. *Mol Neurobiol*, 53 (7), 4343–4351
- Wang, L., Barylko, B., Byers, C., Ross, J. A., Jameson, D. M., Albanesi, J. P. (2010): Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem*, 285 (30), 22753–22757
- Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (3), 169–178
- Wirhth, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G. et al. (2001): Intraneuronal A $\beta$  accumulation precedes plaque formation in  $\beta$ -amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neuroscience Letters*, 306 (1-2), 116–120
- Xie, Z., Ho, W. T., Exton, J. H. (2000): Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. Contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme. *J Biol Chem*, 275 (32), 24962–24969
- Yoshikawa, F., Banno, Y., Otani, Y., Yamaguchi, Y., Nagakura-Takagi, Y., Morita, N. et al. (2010): Phospholipase D family member 4, a transmembrane glycoprotein with no phospholipase D activity, expression in spleen and early postnatal microglia. *PLoS ONE*, 5 (11), e13932

- Zarow, C., Vinters, H. V., Ellis, W. G., Weiner, M. W., Mungas, D., White, L., Chui, H. C. (2005): Correlates of hippocampal neuron number in Alzheimer's disease and ischemic vascular dementia. *Ann Neurol*, 57 (6), 896–903
- Zhang, D.-F., Fan, Y., Wang, D., Bi, R., Zhang, C., Fang, Y., Yao, Y.-G. (2016): PLD3 in Alzheimer's Disease: a Modest Effect as Revealed by Updated Association and Expression Analyses. *Mol Neurobiol*, 53 (6), 4034–4045
- Zhang, L., Sheng, R., Qin, Z. (2009): The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41 (6), 437–445
- Zhang, Y., Huang, P., Du, G., Kanaho, Y., Frohman, M. A., Tsirka, S. E. (2004): Increased expression of two phospholipase D isoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth. *Glia*, 46 (1), 74–83
- Zhang, Y.-w., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H. (2011): APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 4:3, doi: 10.1186/1756-6606-4-3
- Zhao, C., Du, G., Skowronek, K., Frohman, M. A., Bar-Sagi, D. (2007): Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos. *Nat Cell Biol*, 9 (6), 706–712

## 9 Publikation

Gonzalez, A. C., Schweizer, M., **Jagdmann, S.**, Bernreuther, C., Reinheckel, T., Saftig, P., Damme, M. (2018): Unconventional Trafficking of Mammalian Phospholipase D3 to Lysosomes. *Cell Rep* 22 (4), 1040–1053

## 10 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Paul Saftig, da er mir ermöglicht hat, an diesem interessanten Projekt forschend tätig zu werden und mich stets wissenschaftlich gefördert hat.

Mein besonderer Dank ist an meinen Betreuer PD Dr. Markus Damme gerichtet. Er hat mich vom ersten Tag bis zum Abschluss dieser Arbeit hervorragend betreut, mich unterstützt und mir die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens gelehrt. Unsere Zusammenarbeit in seiner Arbeitsgruppe war mir stets eine große Freude. Unsere nahezu täglichen Absprachen über das Forschungsprojekt, aktuelle wissenschaftliche Publikationen und neue Ideen zur Planung der weiteren Experimente auf Grundlage der erzielten Ergebnisse sind das, was für mich die echte Faszination und Spannung am wissenschaftlichen Arbeiten in diesem Projekt ausgemacht haben.

Mein großer Dank gebührt Dr. Annegret Bruhn und dem Stiftungsvorstand der Bruhn-Stiftung. Die Bruhn-Stiftung fördert nun schon seit einigen Jahren den wissenschaftlichen Nachwuchs der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf eine beispielhafte Art und Weise. Es war mir eine große Ehre, als Träger des Bruhn-Förderpreises 2015 diese Auszeichnung am Tag der Medizinischen Fakultät erhalten und den Gästen das Forschungsprojekt vorgestellt haben zu dürfen.

Weiterhin danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Biochemischen Instituts in Kiel für unsere tolle Kooperation. Erst eine ausgeprägte Teamarbeit ermöglicht die Umsetzung der hervorragenden Projekte dieses Instituts. Insbesondere möchte ich mich bei Maike Langer und David Massa López für ihre Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit in der AG Damme bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder meinen Dank aussprechen. Wir wissen, dass wir immer aufeinander zählen und uns aufeinander verlassen können.