

**Charakterisierung eines Dimerisierungsmotivs in der
A β -Region des Amyloid-Vorläuferproteins:
Mechanismus der A β -Entstehung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lisa-Marie Münter
aus Darmstadt

März 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

2. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Disputation am 27.04.2007

Inhalt

1. Einleitung	6
1.1. Die Alzheimer Krankheit	6
1.2. Die Molekularbiologie der Alzheimer Krankheit	7
1.2.1. Molekulare Ursachen der Alzheimer Krankheit	7
1.2.2. Charakterisierung und Funktion des APP	8
1.2.3. Die Prozessierung des APP und Entstehung von A β -Peptiden	10
1.2.4. A β 42 und die Amyloid-Hypothese	12
1.2.5. Charakterisierung der γ -Sekretase	13
1.2.5.1. Aufbau des γ -Sekretase-Komplexes	13
1.2.5.2. Substrate der γ -Sekretase	14
1.2.5.3. Der Schnittmechanismus der γ -Sekretase	15
1.3. Das GxxxG-Motiv	17
1.4. Zielsetzung	18
2. Ergebnisse	20
2.1. Analyse der Dimerisierung von APP und der APP-Transmembransequenz	20
2.1.1. Dimerisierung der APP-Transmembransequenz	20
2.1.2. Computermodell der Helix-Helix Interaktion	23
2.1.3. Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Dimerisierung von APP	24
2.1.4. Einfluss des GxxxG-Motivs auf das γ -Sekretase Substrat β -CTF	27
2.2. Einfluss der GxxxG-Motive auf die Prozessierung von APP	28
2.2.1. Prozessierung der APP-GxxxG-Mutanten durch α -, β - und γ -Sekretasen	28
2.2.2. Prozessierung der SPA4CT-GxxxG-Mutanten durch die γ -Sekretase	31
2.2.3. GxxxG-Mutationen verringern A β 42-Mengen zugunsten von A β 38	32
2.2.4. GxxxG-Mutationen wirken unabhängig von der APP-Ektodomäne	35
2.2.5. GxxxG-Mutanten und die Entstehung verkürzter A β -Formen	36
2.3. Einfluss familiärer APP-Mutationen auf das GxxxG-Motiv	37
2.3.1. Prozessierung von APP ^{sw} und APP ^{arc} mit GxxxG-Mutationen	37
2.3.2. A β -Entstehung aus APP ^{sw} und APP ^{arc}	39
2.3.3. A β -Entstehung aus APP ^{sw} - und APP ^{arc} -GxxxG-Mutationen	40
2.4. Bedeutung der GxxxG-Motive in A β -Peptiden	41
2.4.1 Fibrillenbildung synthetischer A β -Peptide mit GxxxG-Mutationen	42
3. Diskussion	44
3.1. GxxxG-Motive in anderen γ -Sekretase Substraten	44
3.2. Die γ -Sekretase kann dimerisierte Substrate spalten	45
3.3. Korrelation der Dimerisierung und A β 42-Entstehung	47
3.4. Mechanismus der Entstehung von A β 42	49
3.5. Einfluss familiärer Mutationen auf die A β 42-Menge	51

3.5.1. Die APPsw-Mutation	51
3.5.2. Die APParc-Mutation	52
3.6. GxxxG-Motive dominieren über FAD-Mutationen	52
3.6.1. APPsw-GxxxG-Mutanten und APParc-GxxxG-Mutanten	53
3.6.2. PS-1-FAD-Mutationen kombiniert mit GxxxG-Mutationen	53
3.7. GxxxG-Motive in der Fibrillenbildung von A β	54
3.8. Diagnose und Therapie der Alzheimer Krankheit	55
3.8.1. Diagnostik basierend auf dem γ -Sekretase Schnittmechanismus	55
3.8.2. Therapie basierend auf der Transmembransequenz Dimerisierung	55
4. Zusammenfassung	57
5. Material	61
5.1. Zelllinien und Nährmedien:	61
5.2. Bakterienstämme	61
5.3. Plasmid-Vektoren	62
5.3.1. Klonierungsvektoren	62
5.3.2. Vektoren zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	62
5.3.3. Vektoren zur Proteinexpression in bakteriellen Zellen	62
5.4. Primer	62
5.5. Erzeugte Konstrukte	63
5.6. Antiseren und Antikörper	64
5.8. Enzyme und „Kits“	65
5.9. Allgemeine Verbrauchsmaterialien	65
5.10. Pufferlösungen	65
5.10.1. Puffer für das ToxR-System	65
5.11. Geräte	66
5.12. Software	66
6. Methoden	67
6.1. Nukleinsäuremethoden	67
6.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	67
6.1.2. Klonierungsstrategien	67
6.1.2.1. Herstellung der ToxR-Vektor-Konstrukte	67
6.1.2.2. Klonierungsstrategie Flag-„tag“	67
6.1.2.3. Klonierungsstrategie nach der Megaprimer-Methode	68
6.1.2.4. Klonierungsstrategie nach der „Quick-Change“-Methode	68
6.1.2.5. Klonierungsstrategie zum Erstellen der YFP-/CFP-markierten Konstrukte	69
6.1.2.6. Sequenzierung der Konstrukte	69
6.1.3. Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	69
6.1.4. Elektrotransformation	70

6.1.5. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	70
6.1.6. DNA-Präparation	70
6.1.7. Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen	71
6.1.8. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	71
6.1.9. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	71
6.2. Proteinchemische Methoden	71
6.2.1. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen	71
6.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
6.2.3. Western Blot-Analyse	72
6.2.3.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen	72
6.2.3.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen	73
6.2.4. Herstellung von Zelllysaten	73
6.2.5. Immunpräzipitationen	73
6.2.6. Präparation von A β -Proben für MALDI-MS-Analysen	74
6.3. MALDI-MS-Messungen	74
6.4. Zellkultur	74
6.4.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	74
6.4.2. Herstellung stabiler Zelllinien	75
6.4.3. Transiente Transfektionen	75
6.5. ELISA	75
6.6. Immunfluoreszenz	76
6.7. Konfokale Mikroskopie	76
6.8. FRET	77
6.9. ToxR-System	78
6.9.1. Bestimmung der relativen Affinität der Dimerisierung	78
6.9.2. Kontrolle der Membraninsertion der Fusionsproteine	79
6.10. Molekulares Modell	80
6.11. Elektronenmikroskopie	80
6.12. Densitometrische Analysen	80
6.13. Statistische Analysen	81
7. Literaturverzeichnis	82
8. Abkürzungsverzeichnis	96
9. Anhang	98
9.1. Publikationsliste	98
9.2. Lebenslauf	100
9.3. Danksagung	101
9.4. Erklärung	102