
2. Ergebnisse

2.1. Analyse der Dimerisierung von APP und der APP-Transmembransequenz

In der APP-Ektodomäne sind zwei Regionen bekannt, die an der Dimerisierung von APP beteiligt sind. Dies sind die erste Heparin-bindende Region oder auch „Loop“-Region und die Kollagen-bindende Region. Eine potenzielle dritte Dimerisierungs-Region wird möglicherweise von drei konsekutiven GxxxG-Motiven in der Transmembransequenz von APP gebildet. Im Folgenden wurde die Dimerisierung der Transmembransequenz über die GxxxG-Motive analysiert und der Einfluss der GxxxG-Motiv-vermittelten Dimerisierung auf die APP-Ektodomäne untersucht.

2.1.1. Dimerisierung der APP-Transmembransequenz

Zur Untersuchung der Dimerisierung der APP-Transmembransequenz wurde das ToxR-System verwendet (Langosch et al., 1996). In diesem System wird die zu untersuchende Transmembransequenz als Teil eines Fusionsproteins zwischen dem Maltose-bindenden Protein (MBP) und der ToxR-Transkriptionsaktivator-Domäne in *E. coli* FHK12-Zellen exprimiert. Die Dimerisierung der Transmembransequenz löst die Transkription des Reportergens β -Galaktosidase aus. Die Menge der gebildeten β -Galaktosidase verhält sich proportional zur Stärke der Dimerisierung und wurde anhand des enzymatischen Umsatzes eines photometrisch messbaren Produkts festgestellt. So kann die relative Stärke der Dimerisierung in einer biologischen Membran bestimmt werden.

Zunächst wurden drei verschiedene Konstrukte mit unterschiedlich langer APP-Transmembransequenz getestet, A β 29–42, A β 25–42 und A β 29–52 (Abb. 6A, C). Im Vergleich zu der Positivkontrolle (Az2, ein idealer Leucin-Zipper) (Gurezka and Langosch, 2001) konnte für alle Konstrukte ein ähnlicher Substratumsatz nachgewiesen werden, wobei die Sequenz A β 29–42 das stärkste Signal erzeugte (Abb. 6A). Da die längeren Sequenzabschnitte A β 29–52 und A β 25–42 die Dimerisierung der A β -Transmembransequenz nicht verstärken konnten im Vergleich zum kürzeren Sequenzabschnitt A β 29–42, ist anzunehmen, dass die Dimerisierung durch den N-terminalen Bereich A β 29–42 vermittelt wird. Obwohl das Konstrukt A β 25–42 alle drei konsekutiven GxxxG-Motive umfasst, wurde es nicht weiter analysiert, da es ein Lysin in Position 28 enthält, das möglicherweise sekundäre Effekte bewirken könnte. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt A β 29–42 ausgewählt, um eine

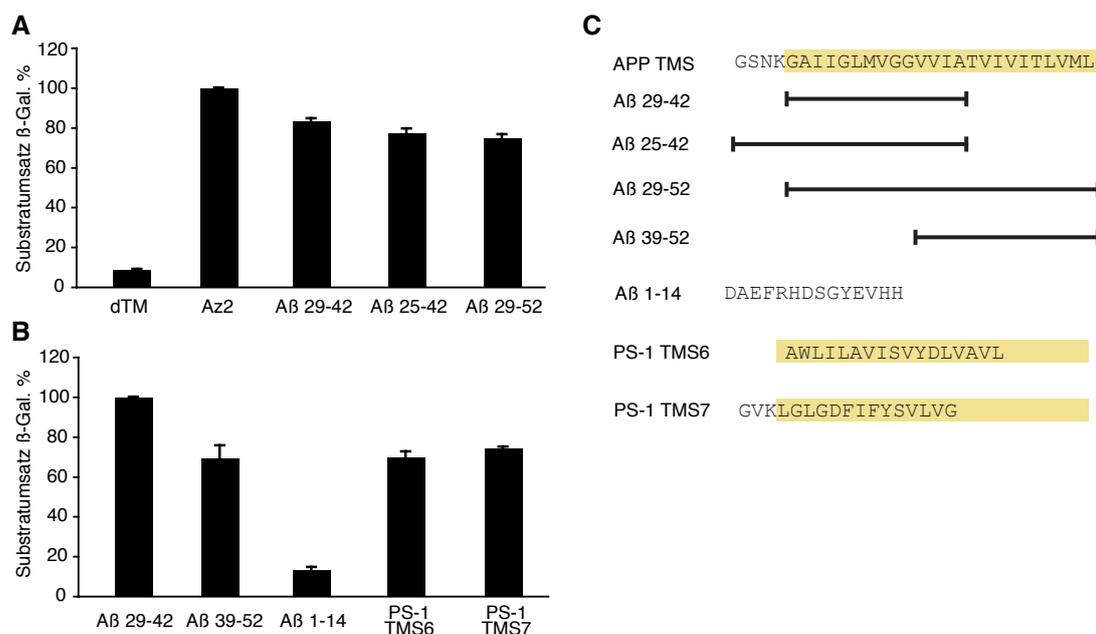


Abb. 6: Validierung des ToxR-Systems für die Aβ-Sequenz. (A) Die optimale Länge der Aβ-Transmembransequenz für das ToxR-System wurde getestet. dTM enthält keine Transmembransequenz, Az2 ist ein Leucin-Zipper und beide dienen als Kontrolle. Der Substratumsatz des Konstrukts Az2 wurde gleich 100% gesetzt, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n=2-4$. (B) Bestimmung der Dimerisierungsstärken einiger weiterer Konstrukte. Aβ 29–42 wurde gleich 100% gesetzt, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n=2-3$. (C) Dargestellt sind die im ToxR-System untersuchten Aminosäuresequenzen, die zwischen das MBP und die ToxR-Domäne eingefügt wurden.

Mutationsanalyse durchzuführen.

Vor der Durchführung der Mutationsanalyse wurden noch weitere Konstrukte, Aβ 39–52, Aβ 1–14, PS-1 TMS6 und PS-1 TMS7 getestet (Abb. 6B, C). Im Vergleich zu Aβ 29–42 (Substratumsatz der β-Galaktosidase gleich 100% gesetzt) wurde für den C-terminale Bereich der Aβ-Transmembransequenz Aβ 39–52 eine deutliche Dimerisierung nachgewiesen. Obwohl diese Sequenz 39–52 in dem Konstrukt Aβ 29–52 enthalten ist, führte sie zu keiner verstärkten Dimerisierung des Konstrukts Aβ 29–52 im Vergleich zu Aβ 29–42. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Sequenz Aβ 39–52 über eine unabhängige Dimerisierungsstelle verfügt. Da jedoch diese Dimerisierungsstelle für die Effekte des GxxxG-Motivs nicht ausschlaggebend sein sollte, wurde dieses Konstrukt nicht weiter untersucht. Um unspezifische Dimerisierungen von Teilsequenzen des Aβ-Peptids auszuschließen, wurde das Konstrukt Aβ 1–14 getestet. Wie erwartet erzeugte Aβ 1–14 keine Dimerisierung. Weiterhin wurde die Stärke der Dimerisierung der TMS6 und TMS7 aus PS-1 gemessen, die die katalytisch aktiven Aspartate enthalten (Abb. 6B). Beide Sequenzen dimerisierten deutlich. Möglicherweise deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass im aktiven Zentrum der γ-Sekretase TMS6 und TMS7 als Dimer vorliegen.

Es sollte nun festgestellt werden, ob die GxxxG-Motive in dem Konstrukt Aβ 29–42 die

Dimerisierung vermitteln. Dazu wurden weitere Konstrukte erzeugt, die an Stelle der Glycinreste ein Alanin oder Isoleucin tragen (Abb. 7). Dies sind die Mutationen G29A, G33A, G29/33A und G33I, G37A und G38A. Bei der Analyse dieser Konstrukte diente als Positivkontrolle die Transmembransequenz 75–87 von GpA, die ebenfalls ein GxxxG-Motiv enthält. Zur Kontrolle des dynamischen Bereichs der Messungen wurde die GpA Punktmutation G83A verwendet (Abb. 7A) (Langosch et al., 1996). Der Substratumsatz der von A β 29–42 erzeugten β -Galaktosidase wurde gleich 100% gesetzt. Die Dimerisierung von A β 29–42 konnte nur abgeschwächt werden, wenn die Glycinreste G29 und G33 ausgetauscht wurden. Die Mutationen G29A und G33A verursachten eine Schwächung der Dimerisierung um 7% bzw. 23% (Abb. 7A). Daraus kann geschlossen werden, dass die Position G33 die Dimerisierung stärker zu stabilisieren scheint als die Position G29. Die Stärke der Dimerisierung konnte durch die Kombination der Einzel-Alanin Mutationen zur Doppelmutation G29/33A weiter vermindert werden (Reduktion um 31%). Der Austausch

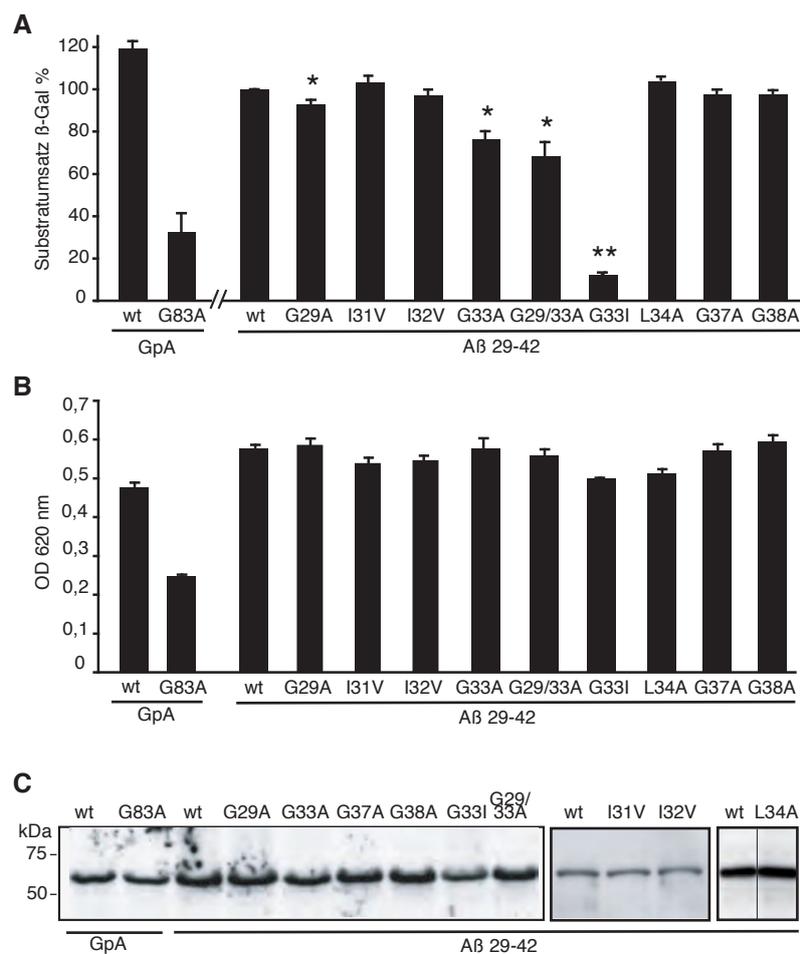


Abb. 7: Mutationsanalyse der Sequenz A β 29–42. (A) Der Substratumsatz der gebildeten β -Galaktosidase durch die Dimerisierung der A β 29–42 wt Sequenz wurde gleich 100% gesetzt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n=4–6). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zu A β 29–42 wt an (*p < 0,01, **p < 0,0001, Student t-Test). (B) Kontrolle der korrekten Integration der konstruierten Proteine in die bakterielle Membran. Die Zelldichte wurde bei 620 nm nach 48 h Inkubation gemessen. (C) Gleiche Zellzahlen wurden lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Expressionsspiegel der Fusionsproteine im Western Blot mittels eines anti-MBP-Antikörpers kontrolliert. wt: wildtypische Sequenz.

der Position G33 zu Isoleucin verhinderte die Dimerisierung vollständig. Die Stärke der Dimerisierung des Konstrukts A β 29–42 lässt sich folglich in Abhängigkeit der ausgetauschten Aminosäuren graduell reduzieren. Die Mutationen G37A und G38A beeinträchtigten die Dimerisierung nicht und bewiesen dadurch die Spezifität der Positionen G29 und G33 in der Stabilisierung des Dimers.

Es könnte vermutet werden, dass nicht eine geschwächte Dimerisierung sondern eine generelle strukturelle Veränderung der mutierten Sequenz 29–42 die Signalstärke des ToxR-Systems herabgesetzt. Um strukturelle Veränderungen auszuschließen, wurden die Aminosäuren um den zentralen Rest G33 mutiert. Die Mutationen I31V, I32V und L34A beeinflussten die Dimerisierung jedoch nicht (Abb. 7A). Ein Kontrollexperiment sollte zeigen, dass die Fusionsproteine korrekt in die Membran inseriert wurden. Dazu wurden die Konstrukte in dem MBP-defizienten *E. coli* Stamm PD28 exprimiert. Alle getesteten Konstrukte konnten die MBP-Defizienz komplementieren, so dass die transformierten PD28-Zellen in einem Maltose-Mangelmedium wachsen konnten (Abb. 7B). Folglich konnten alle Konstrukte korrekt in die Membran inseriert werden. Eine Western Blot-Analyse zeigte, dass alle Fusionsproteine in einem vergleichbaren Maß exprimiert wurden (Abb. 7C). Der Glycinrest G25 ist zwar Teil der konsekutiven GxxxG-Motive, konnte aber in der ausgewählten Sequenz A β 29–42 nicht untersucht werden.

Die durch das ToxR-System erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Sequenz A β 29–42 dimerisiert und diese Dimerisierung durch das G₂₉xxxG₃₃-Motiv vermittelt wird. Die getesteten GxxxG-Mutationen führten in der Reihenfolge G29A, G33A, G29/33A und G33I zu einer graduellen Abnahme der Dimerisierung der Sequenz 29–42. Die Mutationen I31V, I32V und L34A beeinflussten die Dimerisierung nicht.

2.1.2. Computermodell der Helix-Helix Interaktion

Aufbauend auf den experimentellen Ergebnissen des ToxR-Systems, sollte ein molekulares Modell der dimeren Transmembransequenz von A β computerbasiert berechnet werden. Das Ziel dieses Ansatzes ist das Auffinden von Konformationen, die energetisch günstig sind und bevorzugt eingenommen werden. Ein solches Modell wurde von Dr. Kay Gottschalk, Ludwig-Maximilians-Universität München, erstellt. Für die Sequenz A β 25–46 konnte eine Konformation mit einem Energieminimum gefunden werden, in der die Helices sich rechtshändig kreuzen und die Glycinreste der drei konsekutiven GxxxG-Motive in der

Berührungsfläche des Dimers liegen (Abb. 8). Die Aminosäuren G29 und G33 der Helix-Paare bilden mit $C\alpha-C\alpha$ Abständen von weniger als 5 Å den Kern der Berührungsfläche, verglichen mit den $C\alpha-C\alpha$ Abständen von G25 (6,7 Å) und G37 (5,7 Å). Dieses computergenerierte Modell unterstützt die Ergebnisse aus dem ToxR-System und bekräftigt somit die zentrale Rolle von G29 und G33 in der Dimerisierung der A β -Transmembransequenz.

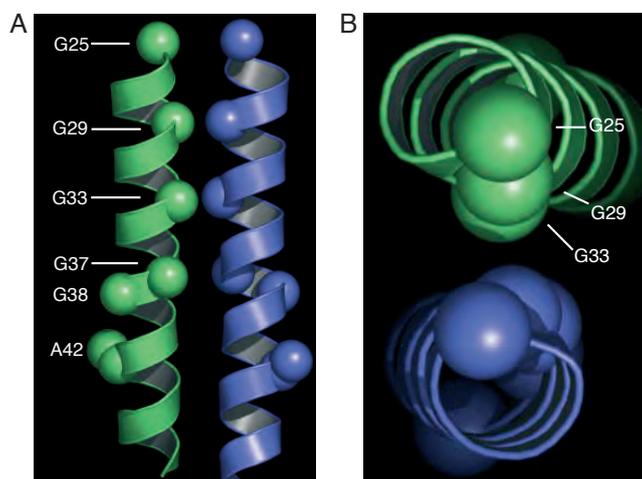


Abb. 8: Computergestütztes Modell der Struktur der dimeren A β -Transmembransequenz. Dieses Modell wurde von Dr. Kay Gottschalk, LMU München, berechnet. (A) Sichtweise entlang der Dimer-Kontaktfläche. Die Glycinreste sowie Alanin 42 sind als Kugeln hervorgehoben. Die beiden Helices kommen sich an den Aminosäureresten G29 und G33 am nächsten. (B) Die Sichtweise entlang der Dimer-Achse zeigt die räumliche Nähe von G29 und G33.

2.1.3. Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Dimerisierung von APP

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass die Transmembransequenz von APP bzw. von A β eine neue, dritte Dimerisierungsstelle mit dem zentralen G₂₉xxxG₃₃-Motiv enthält. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Dimerisierung der Transmembransequenz auf die Dimerisierung von Vollängen-APP hat, wurden Experimente mit der Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfers (FRET) durchgeführt (Abb. 9–11). Dazu wurde APP C-terminal mit dem gelb- oder blaugrün-fluoreszierenden Protein (YFP oder CFP) fusioniert und entsprechende GxxxG-Mutationen in die Transmembransequenz eingeführt. Die FRET-Messungen und konfokalen Zellaufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Philipp Voigt in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Michael Schäfer, Institut für Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

Für diese Experimente wurde zunächst anhand konfokaler Fluoreszenzmikroskopiebilder die subzelluläre Lokalisation von YFP-markiertem APP-Wildtyp (wt), APP-G33A, APP-G29/33A und APP-G33I in HEK293-Zellen untersucht. Es wurden keine Unterschiede in der Lokalisation festgestellt (Abb. 9). Ebenfalls wie YFP-markiertes APP im Vergleich zu nicht

markiertem APP keine andere Lokalisation auf (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den GxxxG-Mutanten wurde in diesem Ansatz eine weitere Mutation, APP-L17C, analysiert. Diese Mutation führt im A β -Bereich, entfernt von den GxxxG-Motiven, ein Cystein ein, das über Disulfidbrückenbildung zwei APP Moleküle kovalent miteinander verknüpfen kann. Dieses Konstrukt diente als Positivkontrolle. Die FRET-Messungen und konfokalen Aufnahmen von APP-L17C wurden von Daniela Kaden in Zusammenarbeit mit Philipp Voigt durchgeführt. Auch das Konstrukt APP-L17C zeigte eine normale subzelluläre Verteilung (Abb. 9).

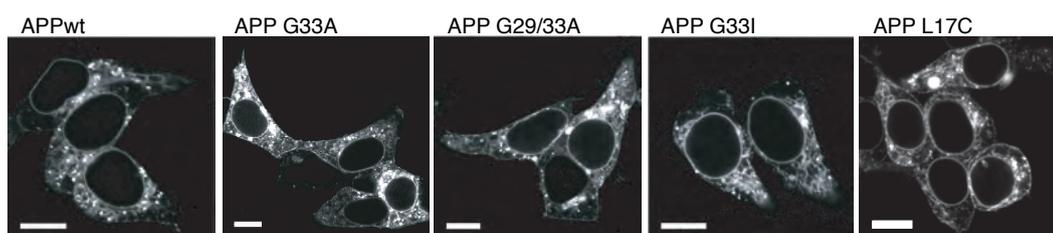


Abb. 9: Lokalisation von mutierten APP-Formen. Die konfokalen Mikroskopieaufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Philipp Voigt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schäfer durchgeführt. APP-YFP wurde in HEK293-Zellen exprimiert und die Lokalisation der fluoreszierenden Proteine in lebenden Zellen festgestellt. Balken geben 10 μ m an.

In APP-YFP und APP-CFP koexprimierenden HEK293-Zellen wurde die FRET-Effizienz der APP-Homodimerisierung gemessen. Dazu wurde über einen bestimmten Zeitraum der FRET-Akzeptor (YFP) gebleicht, wodurch die Fluoreszenz des FRET-Donors (CFP) zunahm (Abb. 10D). Ob YFP korrekt gebleicht wurde, wurde mittels einer Regressionsanalyse kontrolliert (Abb. 10E). Die FRET-Effizienz für APP-wt Homodimere betrug etwa 11% (Abb. 10B). Zur Untersuchung der Spezifität der APP-Homointeraktion wurde in steigenden Mengen nicht-fluoreszierendes, Flag-markiertes APP exprimiert. Dadurch konnte die FRET-Effizienz kompetiert werden, was die Spezifität der Messung beweist (Abb. 10A). Es konnte weiterhin keine FRET-Effizienz gemessen werden, wenn der CFP-markierte epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) mit APP-YFP koexprimiert wurde (Abb. 10A). Die FRET-Effizienzen der Homodimerisierung von APP-G33A, APP-G29/33A und APP-G33I waren vergleichbar mit der Effizienz von APP-wt (Abb. 10B). Neben der Homodimerisierung der APP-GxxxG-Mutanten wurde auch die Heterodimerisierung von APP-wt mit APP-G33A, APP-G29/33A oder APP-G33I bestimmt. Die GxxxG-Mutationen hatten keinen Einfluss auf die Heterodimerisierung, da die gemessenen FRET-Effizienzen untereinander vergleichbar waren (Abb. 10C). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die GxxxG-Mutationen nicht auf die Dimerisierung von Vollängen-APP auswirken. Die Dimerisierungsstellen in der Ektodomäne, die „Loop“-Region und die Kollagen-bindende Region, scheinen über die GxxxG-vermittelte Dimerisierung der Transmembransequenz zu dominieren.

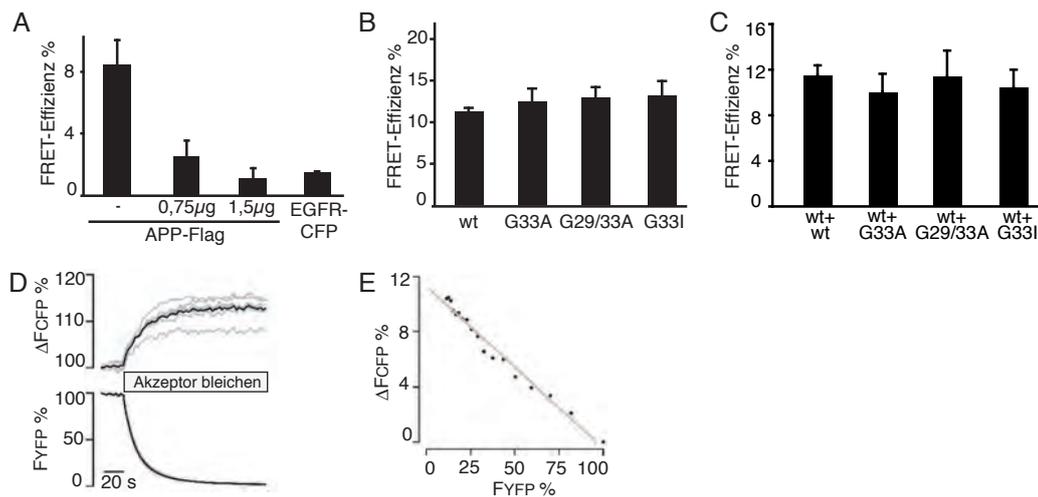


Abb. 10: Einfluss des GxxxG-Motivs auf die APP-Dimerisierung. (A) Die gemessene FRET-Effizienz ließ sich durch zusätzliche Expression steigender Mengen von nicht-fluoreszierendem, APP-wt-Flag kompetieren. Keine FRET-Effizienz wurde bei APP-YFP mit dem kolokalisierten EGFR-CFP gemessen. (B) FRET-Effizienzen von Homodimeren aus APP-wt und APP-Mutanten. Die APP-wt FRET-Effizienz in A fällt geringer aus als in B, da in A weniger Plasmid transfiziert wurde, um mit einem Plasmid, das für APP-wt-Flag kodiert, kompetieren zu können. (C) FRET-Effizienzen von Heterodimeren aus APP-wt und jeweils APP-G33A, APP-G29/33A oder APP-G33I. (A-C) Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n=2-4$ in Vierfachbestimmung mit 3–6 Zellen jeweils. (D) Zeitlicher Verlauf der Wiedererlangung der Donorfluoreszenz (ΔF_{CFP} %) während selektiv der FRET-Akzeptor gebleicht wird (F_{YFP} %). Die Daten zeigen repräsentative Einzelzellmessungen (grau) und den gemittelten Verlauf (schwarz) des Bleichens. (E) Lineare Regressionsanalyse der Wiedererlangung der Donorfluoreszenz (ΔF_{CFP} %) aufgetragen gegen die schrittweise gebleichte Fluoreszenz des Akzeptors (F_{YFP} %). Dargestellt ist der mittlere Verlauf der Einzelzellmessungen des Experimentes aus B.

Durch die Mutation L17C wird der Anteil an APP Molekülen, der durch Ausbildung von Disulfidbrücken kovalent dimerisiert, dem Monomer-Dimer Gleichgewicht entzogen. Der Anteil kovalent-dimerisierter APP-L17C Mutanten kann festgestellt werden, in dem die kovalenten Dimere von Monomeren durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt werden und mittels Western Blot-Analyse sichtbar gemacht werden. Die densitometrische Analyse von Röntgenfilmen von mindestens drei Western Blots ergab, dass etwa 30% des totalen APP-L17C als kovalent verbundene Dimere vorlagen (Abb. 11B). Die FRET-Effizienz der Mutation APP-L17C war um etwa 7% verstärkt im Vergleich zu APP-wt (Abb. 11A). Unter der Annahme, dass die relative Orientierung von CFP und YFP in APP-L17C unverändert ist, kann davon ausgegangen werden, dass der

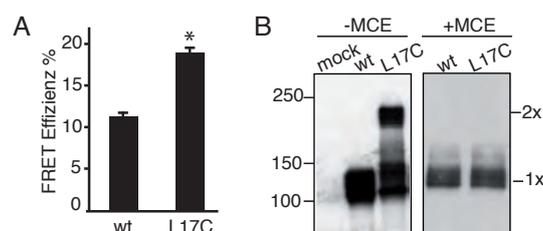


Abb. 11: Bestimmung des Anteils der APP-Dimere. (A) Gemessene FRET-Effizienz von APP-L17C im Vergleich zu APP-wt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n=3$ in Vierfachbestimmung mit 3–6 Zellen). Der Stern zeigt eine signifikante Verstärkung der FRET-Effizienz von APP-L17C an (* $p < 0,0001$, Student t-Test). (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit APP-L17C transfiziert, Zellysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und APP im Western Blot mit dem Antikörper 22C11 detektiert. APP-L17C bildet kovalente Dimere, die durch Zugabe von β -Mercaptoethanol (MCE) wieder aufgelöst werden können. 1x: Monomer, 2x: Dimer.

Anstieg der FRET-Effizienz um 7% korreliert mit der Menge an kovalentem APP-Dimer von 30%. Aus den Analysen der APP-L17C Mutation lässt sich demnach ableiten, dass die bei APP-wt gemessene FRET-Effizienz von 11% durch etwa 50% dimerisierter APP-Moleküle verursacht wurde. Mit den erzielten Ergebnissen der APP-L17C Mutation kann folglich abgeschätzt werden, dass mindestens der Hälfte aller APP-wt Moleküle als Homodimere in der lebenden Zelle vorkommen.

2.1.4. Einfluss des GxxxG-Motivs auf das γ -Sekretase Substrat β -CTF

Mittels der FRET-Messungen wurde gezeigt, dass die Dimerisierungsstellen der APP-Ektodomäne über das GxxxG-Dimerisierungsmotiv der Transmembransequenz dominieren. Doch sobald die Ektodomäne durch die α - oder β -Sekretase entfernt wurde, ist das GxxxG-Motiv das einzig verbleibende Dimerisierungsmotiv der γ -Sekretase Substrate α -CTF und β -CTF. Falls diese Substrate spezifisch über das GxxxG-Motiv dimerisieren können, sollte die Dimerisierung durch Einfügen von GxxxG-Mutationen reduziert werden können. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde das Konstrukt SPA4CT verwendet (Dyrks et al., 1992). SPA4CT besteht aus dem APP-Signalpeptid (SP) und den 99 C-terminalen Aminosäuren (β -CTF oder A4CT) ab der β -Sekretase Schnittstelle. Das Signalpeptid wird im Endoplasmatischen Retikulum entfernt und das direkte Substrat der γ -Sekretase, das β -CTF, liegt vor. Die mit diesem Konstrukt durchgeführten FRET-Messungen waren jedoch nicht aussagekräftig, da sie nicht kompetiert werden konnten. Möglicherweise ist die β -CTF-Dimerisierung niederaffin oder die Konstrukte aggregieren aufgrund der recht großen YFP- oder CFP-Modifikation von etwa 25 kDa.

Als Alternative zu den FRET-Messungen wurde die Dimerisierung von β -CTF mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analysen untersucht. Da β -CTF keine SDS-stabilen Dimere bildet, wurde die Mutation L17C eingeführt, damit β -CTF im Fall einer Dimerisierung kovalente Dimere bilden kann. Zusätzlich wurde ein Konstrukt SPA4CT-L17C/G33I hergestellt, um den Einfluss des GxxxG-Motivs auf die β -CTF Dimerisierung untersuchen zu können. Die Proteine wurden in SH-SY5Y-Zellen exprimiert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Anteile an Monomer und kovalentem Dimer mittels Western Blot und densitometrischer Analyse der Röntgenfilme bestimmt (Abb. 12). Während SPA4CT-wt nur als Monomer detektiert wurde, bildete die Mutante SPA4CT-L17C nahezu 100% kovalente Dimere aus. Bei Mutanten mit der Kombination L17C/G33I verblieben jedoch etwa 25% des gesamten

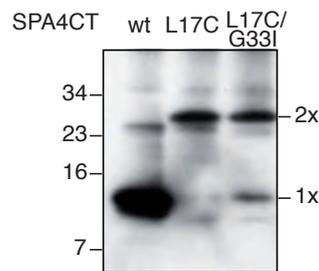


Abb. 12: SPA4CT dimerisiert über das GxxxG-Motiv. SH-SY5Y-Zellen wurden mit SPA4CT-wt, -L17C oder -L17C/G33I transfiziert und nach 6 h lysiert. β -CTF wurde mit dem polyklonalen Antikörper 27576 aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und im Western Blot mit dem Antikörper W0-2 detektiert. Die Kombination der GxxxG-Mutation G33I mit L17C verhinderte die kovalente Dimerisierung von etwa 25% des Gesamtproteins. 1x: Monomer; 2x: Dimer.

SPA4CT-L17C/G33I als Monomer (Abb. 12). Folglich erschwerte die GxxxG-Mutation G33I zumindest bei einem Anteil der Proteine die räumliche Annäherung, die zur Ausbildung eines kovalenten Dimers notwendig ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass β -CTF Dimere existieren und über das GxxxG-Motiv stabilisiert werden.

2.2. Einfluss der GxxxG-Motive auf die Prozessierung von APP

Die Prozessierung von APP zu A β findet in räumlicher Nähe zu den GxxxG-Motiven statt. Die α -Sekretase schneidet nur 9 Aminosäuren und die β -Sekretase nur 25 Aminosäuren entfernt vom ersten GxxxG-Motiv. Der γ -Sekretase Schnitt, der zu A β 40 führt, hat nur einen Abstand von 3 Aminosäuren zum letzten der drei konsekutiven GxxxG-Motive. Diese räumliche Nähe legt einen Einfluss der GxxxG-Motive auf die Prozessierung von APP nahe. Im Folgenden wurde diese Hypothese experimentell untersucht.

2.2.1. Prozessierung der APP-GxxxG-Mutanten durch α -, β - und γ -Sekretasen

Um zu untersuchen, ob die GxxxG-Mutationen die Prozessierung von APP verändern, wurde die im ToxR-System untersuchte Reihe von GxxxG- und Kontrollmutationen in Vollängen-APP eingeführt. SH-SY5Y-Zellen wurden stabil mit den APP-Konstrukten APP-wt, -G25A, -G29A, -G33A, -G29/33A oder -G33I oder transient mit APP-I31V, -I32V, -L34A oder -L17C transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der stabil transfizierten APP-Formen unterschied sich nicht von der Verteilung von APP-wt, wie mittels Immunfluoreszenz-Färbungen festgestellt werden konnte (Abb. 13). Die Expressionsspiegel von APP-wt und APP-Mutanten wurden mittels Western Blot kontrolliert und waren für alle Mutanten mit dem wt vergleichbar (Abb. 14A und für APP-L17C Abb. 11B). Eine längere Expositionszeit des Röntgenfilms machte endogenes APP in der mock-Kontrolle sichtbar und verdeutlichte die Überexpression des transfizierten APP (Abb. 14B). Es kann daher davon

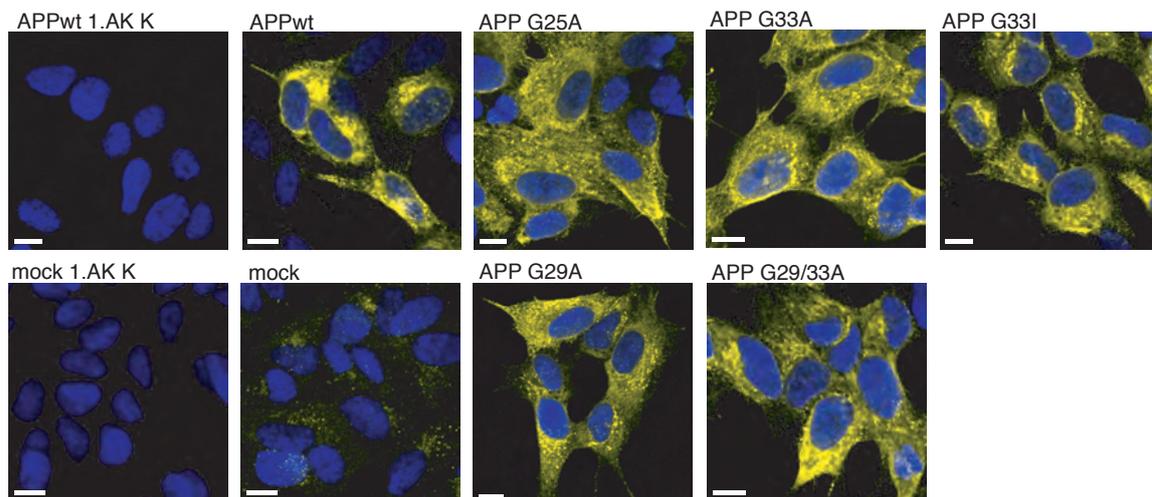


Abb. 13: Immunfluoreszenz-Analyse der Lokalisation von APP-wt und APP-Mutanten. Stabil-transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden fixiert und APP wurde mit dem polyklonalen Antikörper 40090 markiert. Die Fluoreszenz des Cy3-markierten Zweitantikörpers ist wegen des besseren Kontrasts gelb dargestellt. Kontrollen ohne den Erstantikörper sind in den ersten beiden Darstellungen abgebildet (1.AK K). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Die subzelluläre Verteilung von APP-wt und GxxxG-Mutanten unterscheidet sich nicht. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, Balken zeigen 10 µm an.

ausgegangen werden, dass das endogene APP die Prozessierung der APP-Mutanten nicht beeinflusst, da es nicht in einem ausreichenden, stöchiometrischen Verhältnis exprimiert wurde. Die Prozessierung der APP-GxxxG-Mutanten wurde anhand der entstehenden Fragmente analysiert (Abb. 14C-G). Nach dem α - oder β -Sekretase Schnitt wird sAPP α oder sAPP β in das Zellkulturmedium abgegeben und kann mit entsprechenden Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden. Bei den stabil transfizierten Zelllinien waren keine

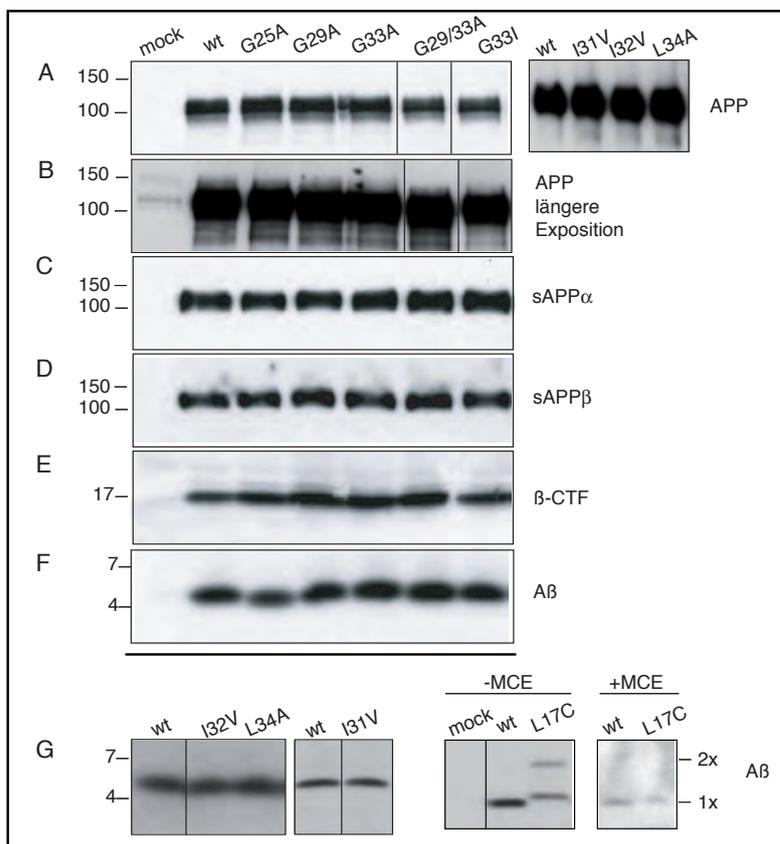


Abb. 14: Analyse der Expressionspiegel und Prozessierung von APP-wt und APP-Mutanten in SH-SY5Y-Zellen. (A) APP-Expressionskontrolle aus Zelllysaten, Detektion mit Antikörper 22C11. Die senkrechten Linien zeigen an, dass die Spuren G29/33A und G33I getauscht wurden, um eine einheitliche Beschriftung zu ermöglichen. (B) Röntgenfilm des Western Blots aus A mit verlängerter Expositionszeit. (C) Detektion von sAPP α aus konditioniertem Zellkulturüberstand, mit Antikörper W0-2. (D) Wie C, nur Detektion von sAPP β mit Antikörper 879. (E) Die Zelllinien wurden mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT inkubiert, lysiert und β -CTF mit dem Antikörper 27576 immunpräzipitiert. Im Western Blot wurde β -CTF mit dem Antikörper W0-2 detektiert. (F, G) A β wurde aus konditioniertem Zellkulturüberstand mit dem Antikörper 18-1 immunpräzipitiert und im Western Blot mit dem Antikörper W0-2 detektiert. 1x: Monomer, 2x: Dimer.

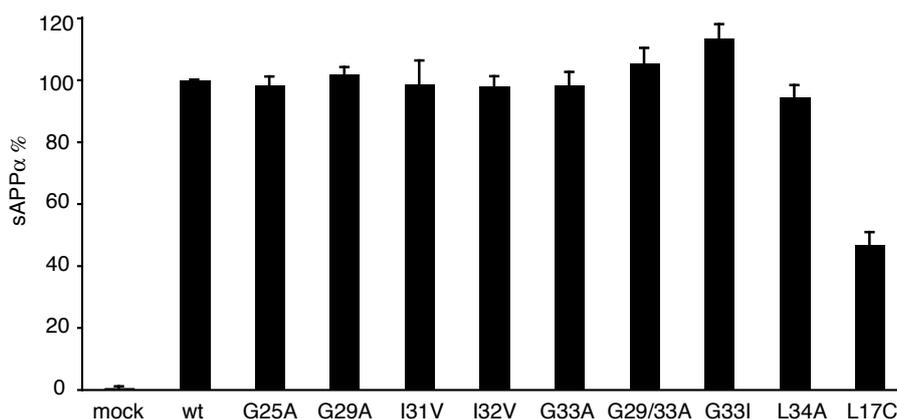


Abb. 15: Quantifizierung von sAPP α mittels ELISA. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen. Im ELISA wurde sAPP α mit einem anti-Myc-,tag“-Antikörper immobilisiert und mit dem biotinylierten Antikörper W0-2 detektiert. APP-wt wurde auf 100% gesetzt, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n=5–7.

deutlichen Unterschiede zu APP-wt nachweisbar (Abb. 14C, D). Zusätzlich wurde sAPP α mittels eines „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) quantifiziert (Abb. 15). Im Vergleich zu APP-wt führten die Mutationen G25A, G29A, I31V, I32V, G33A und L34A zu vergleichbaren sAPP α -Mengen. Die Mutationen G29/33A und G33I erhöhten die Spaltung durch die α -Sekretase leicht um 5% bzw. 14%. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Mutationen des GxxxG-Motivs oder benachbarter Positionen nicht wesentlich die Prozessierung durch die α - oder β -Sekretase beeinflussen. Hingegen wurde die α -Sekretase-Prozessierung durch die Mutation APP-L17C signifikant auf 47% verglichen mit der APP-wt Prozessierung herabgesetzt. Da die Mutation L17C direkt die α -Sekretase-Schnittstelle verändert, ist APP-L17C vermutlich ein schlechtes α -Sekretase Substrat. Dennoch wurde A β aus APP-L17C in einer vergleichbaren Menge zu A β aus APP-wt gebildet, was bedeutet, dass APP-17C nicht die Prozessierung durch die β -Sekretase verstärkte (Abb. 14G). APP-L17C führte zur Entstehung von monomerem und dimerem A β . Die Zugabe von β -Mercaptoethanol zum Probenpuffer löste das Dimer auf, was darauf hinweist, dass das A β -Dimer über eine Disulfidbrücke verbunden war (Abb. 14G). Für die stabilen Zelllinien konnten weiterhin vergleichbare β -CTF-Mengen aus Zelllysaten nachgewiesen werden (Abb. 14E). Die A β -Mengen aus konditionierten Zellkulturüberständen der stabil oder transient transfizierten Zelllinien waren zu dem A β -Spiegel von APP-wt vergleichbar (Abb. 14F, G). Diese Ergebnisse zeigen, dass Mutationen des GxxxG-Motivs wie auch Kontrollmutationen benachbarter Aminosäuren keinen Einfluss auf die Prozessierung durch die α - oder β -Sekretase haben und auch nicht die Effizienz der Prozessierung durch die α -, β - oder γ -Sekretasen beeinflussen. Dies weist darauf hin, dass die GxxxG-Mutationen nicht die Interaktion mit den Sekretasen verändern.

2.2.2. Prozessierung der SPA4CT-GxxxG-Mutanten durch die γ -Sekretase

GxxxG-Mutationen im APP beeinträchtigen nicht die Effizienz der Prozessierung durch die Sekretasen. Es sollten nun zwei Faktoren, die die Prozessierung des APP beeinflussen könnten, ausgeschlossen werden. Erstens könnte die APP-Ektodomäne die Prozessierung durch die α - oder β -Sekretase verändern, beispielsweise über die Kontaktstellen der Ektodomäne. Zweitens könnte die Aktivität der α - oder β -Sekretase die Prozessierung durch die γ -Sekretase beeinflussen. Um diese beiden Faktoren auszuschalten, wurden GxxxG-Mutationen in dem Konstrukt SPA4CT untersucht, wodurch selektiv der Einfluss der GxxxG-Motive auf die γ -Sekretase betrachtet werden kann. Die GxxxG-Mutationen wurden in SPA4CT eingeführt und SH-SY5Y-Zellen wurden stabil mit SPA4CT-wt, -G25A, -G29A, -G33A, -G29/33A und -G33I transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der Proteine wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie überprüft und keine Abweichungen zwischen SPA4CT-wt und GxxxG-Mutanten festgestellt (Abb. 16). Mittels Western Blot-Analysen wurde die β -CTF-Expression der SPA4CT-Konstrukte kontrolliert und vergleichbare β -CTF-Mengen nachgewiesen (Abb. 17A). Das von den Zelllinien sekretierte A β wurde immunpräzipitiert und im Western Blot analysiert. Vergleichbar zu den Daten aus APP-transfizierten Zellen generierten Zellen, die SPA4CT-wt oder SPA4CT-Mutanten exprimierten, gleiche A β -Gesamtmenen (Abb. 17B). Folglich haben die GxxxG-Mutationen auch in dem Konstrukt SPA4CT keinen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine und verändern auch nicht die Effizienz der Prozessierung durch die γ -Sekretase.

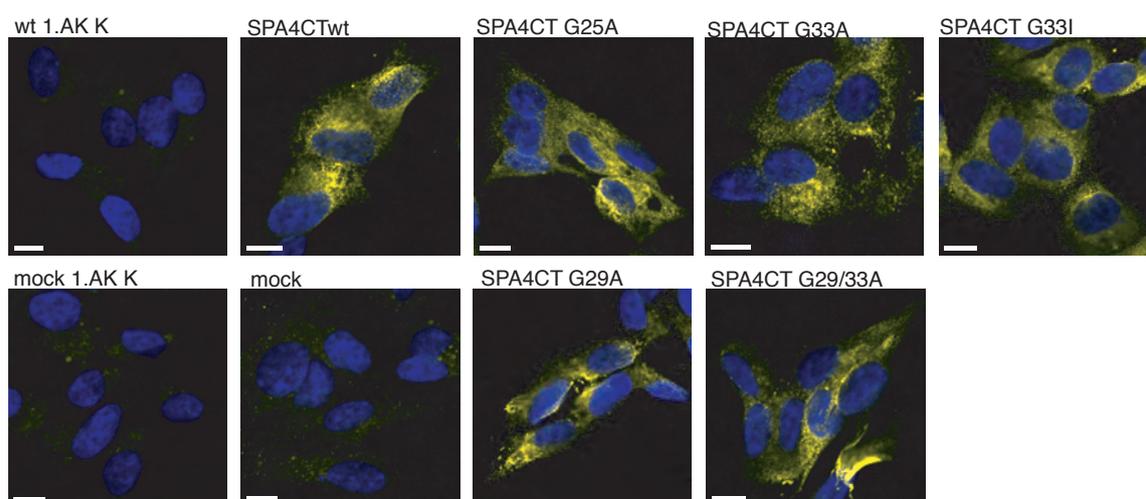


Abb. 16: Immunfluoreszenz-Analyse der Lokalisation von SPA4CT-wt und SPA4CT-Mutanten. Stabil-transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden fixiert und SPA4CT durch einen C-terminal angehängten Flag-„tag“ mit einem anti-Flag-Antikörper detektiert. Die Fluoreszenz des Alexa-Fluor594-markierten Zweitantikörpers ist wegen des besseren Kontrasts in gelb dargestellt. Kontrollen ohne den Erstantikörper sind in den ersten beiden Darstellungen abgebildet (1.AK K). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Die subzelluläre Verteilung von SPA4CT-wt und GxxxG-Mutanten unterscheidet sich nicht. Dargestellt sind repräsentative Bilder, Balken zeigen 10 μ m an.

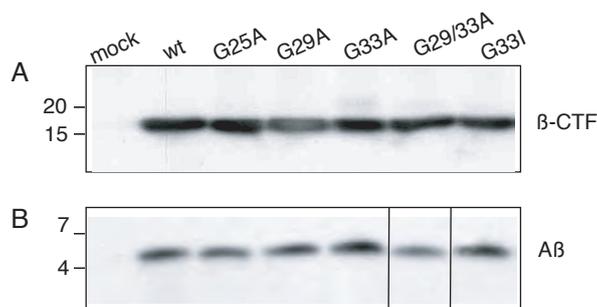


Abb. 17: GxxxG-Mutationen in dem Konstrukt SPA4CT. (A) Expressionskontrolle von β -CTF aus SH-SY5Y-Zellen, die stabil SPA4CT-wt oder SPA4CT-Mutanten exprimieren. Die Zelllinien wurden mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt und β -CTF wurde aus den Zelllysaten mit dem Antikörper 27576 immunpräzipitiert. Im Western Blot wurde β -CTF mit dem Antikörper W0-2 detektiert. (B) A β wurde mit dem Antikörper 18-1 aus konditioniertem Medium präzipitiert und im Western Blot mit dem Antikörper W0-2 detektiert. Senkrechte Linien zeigen an, dass die Spuren G29/33A und G33I für eine einheitliche Beschriftung getauscht wurden.

2.2.3. GxxxG-Mutationen verringern A β 42-Mengen zugunsten von A β 38

Die γ -Sekretase schneidet das Substrat β -CTF an verschiedenen Positionen in der Membran und produziert so unterschiedliche A β -Peptide mit variablem C-Terminus. Daher wurden sekretierte A β -Spezies aus Zellkulturmedium von APP-GxxxG-Mutanten exprimierenden Zellen mittels ELISA näher analysiert. In diesem Ansatz wurden monoklonale Antikörper verwendet, die spezifisch den C-Terminus von A β 42, A β 40 und A β 38 erkennen. Bei diesen Analysen wurden signifikante Unterschiede in der Prozessierung der GxxxG-Mutanten deutlich (Abb. 18). Die GxxxG-Mutationen G25A, G29A und G33A mit einem einzelnen Austausch von Glycin zu Alanin verringerten die Prozessierung zu A β 42 um 28%, 67% und 60%, veränderten jedoch nicht die Prozessierung zu A β 40 im Vergleich zu APP-wt (APP-wt wurde auf 100% gesetzt, Abb. 18A, B). Im Zellkulturmedium von APP-G29/33A exprimierenden Zellen wurde weniger A β 40 und kein A β 42 nachgewiesen. Die Prozessierung der Mutante APP-G33I führte weder zur A β 40- noch zur A β 42-Sekretion (Abb. 18A, B). Da die Mutation G25A eine signifikante Reduktion der A β 42-Menge verursachte, kann angenommen werden, dass G25 außerhalb der Transmembransequenz dennoch Teil der konsekutiven GxxxG-Motive ist. Die Reduktion der A β 42-Mengen durch die GxxxG-Mutationen konnte durch eine Immunpräzipitation mit dem A β 42-spezifischen Antikörper G2-13 im Western Blot bestätigt werden (Abb. 19).

Dennoch war die Gesamtmenge des sekretierten A β bei keiner der GxxxG-Mutanten verringert, auch nicht bei der Mutation APP-G33I, die weder A β 40 noch A β 42 sezernierte (Abb. 14F). Daher war anzunehmen, dass die Reduktion der A β 40- und A β 42-Mengen kompensiert wird durch die Bildung anderer, kürzerer A β -Spezies. Zunächst wurden die

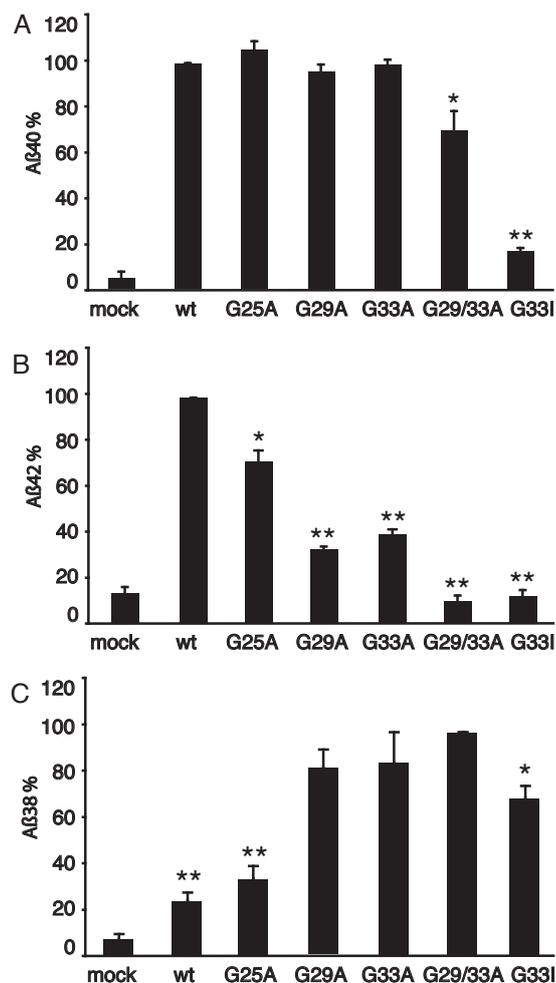


Abb. 18: Quantifizierung von Aβ42, Aβ40 und Aβ38 aus Zellkulturmedium APP-exprimierender Zellen mittels ELISA. (A) Aβ40-spezifischer ELISA. APP-wt wurde gleich 100% gesetzt. (B) Aβ42-spezifischer ELISA. APP-wt wurde gleich 100% gesetzt. (C) Aβ38-spezifischer ELISA. APP-G29/33A wurde gleich 100% gesetzt. (A-C) Die Prozessierung der Mutanten APP-G29A und APP-G33A führt zu geminderten Aβ42-Mengen und einer gesteigerten Aβ38-Mengen, ohne die Menge von Aβ40 zu verändern. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n=4-7$. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$ und ** $p < 0,0001$, Student t-Test.

Aβ38-Mengen mittels ELISA quantifiziert. Der Aβ38-Spiegel stieg bei denjenigen GxxxG-Mutanten an, die Aβ42 in verminderten Mengen oder gar nicht generierten (Abb. 18C). Die Prozessierung der Mutanten APP-G29/33A und APP-G33I, die wenig Aβ42 und verminderte Mengen Aβ40 generierte, führte zu den höchsten Aβ38-Mengen (die gebildete Aβ38-Menge der Mutante G29/33A wurde gleich 100% gesetzt). Bei einem Vergleich der mildereren Mutationen G29A und G33A mit den stärkeren Mutationen G29/33A und G33I wird die graduelle Veränderung in den prozessierten Aβ-Spezies in Abhängigkeit der ausgetauschten Aminosäuren deutlich. Während G29A und G33A nur die Aβ42- und Aβ38-

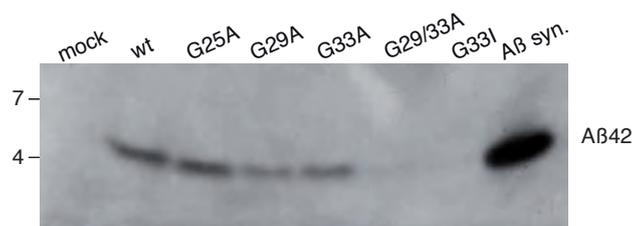


Abb. 19: Immunpräzipitation von Aβ42. Aus konditioniertem Zellkulturmedium APP-exprimierender SH-SY5Y-Zellen wurde Aβ42 mit dem Aβ42-spezifischen Antikörper G2-13 immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Aβ im Western Blot mit dem Antikörper W0-2 detektiert. Die Mutanten APP-G29A und APP-G33A generieren deutlich weniger Aβ42 als APP-wt. Die Mutanten APP-G29/33A und APP-G33I produzieren kaum Aβ42. Aβ syn.: synthetisches Aβ40-Peptid, dass zur Kontrolle aufgetragen wurde.

Mengen beeinflussten, wirkten sich G29/33A und G33I auch noch auf die A β 40-Produktion aus und generierten extreme Veränderungen im A β 42- und A β 38-Spiegel. APP-G33I führte dabei zu einer geringeren A β 38-Menge als APP-G29/33A zugunsten der Bildung von weiteren, kürzeren A β -Spezies (siehe unten 2.2.5).

Um zu untersuchen, ob die veränderte Prozessierung auf die verringerte Stärke der Dimerisierung der Transmembransequenz zurückzuführen ist oder ob sie Ursache einer strukturellen Veränderung des Substrats ist, wurden die Kontrollmutationen I31V, I32V und L34A um die zentrale Position G33 getestet. Zu diesem Zweck wurden ELISA-Messungen aus konditioniertem Medium transient-transfizierter SH-SY5Y-Zellen durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass die Prozessierung der Kontrollmutationen weder die A β 40- noch die A β 42-Spiegel signifikant veränderte (Abb. 20). A β 38 konnte nicht nachgewiesen werden, da die transienten Transfektionen zu wenig A β generierten und im ELISA unter der Detektionsgrenze lagen. Es ist daher anzunehmen, dass die veränderte Prozessierung der GxxxG-Mutanten auf eine geschwächte Dimerstabilität zurückzuführen ist.

Um diese Schlussfolgerung mit weiteren Evidenzen belegen zu können, wurde folgende Überlegung angestellt. Wenn eine geschwächte Dimerisierung die A β 42-Menge senkt, sollte im Umkehrschluss ein stabilisiertes Dimer die A β 42-Produktion erhöhen. Dazu wurde die Mutante APP-L17C analysiert. Die Prozessierung dieser Mutante führte zu erhöhten A β 42-Mengen (136% im Vergleich zu APP-wt) und veränderte nicht die A β 40-Menge (Abb. 20). Die Auswirkung der Mutation L17C ausschließlich auf A β 42 bestätigt die spezifischen Effekte der Mutationen G29A und G33A. Diese Mutationen setzten die Dimerisierungsstärke herab, führten zu verminderten A β 42-Mengen und hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die A β 40-Menge.

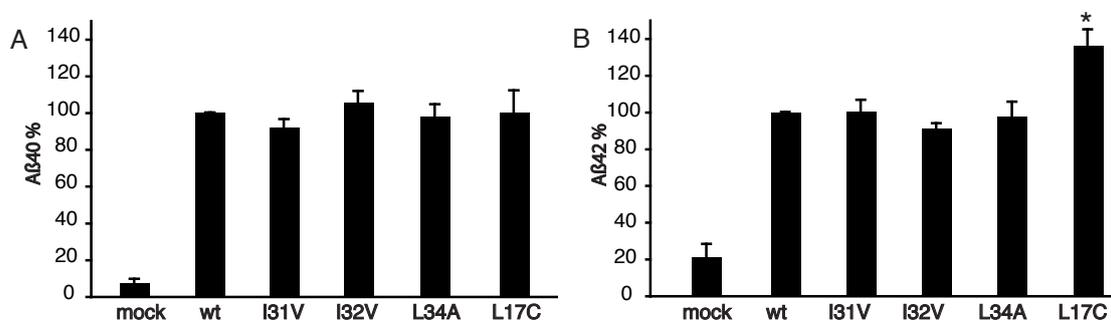


Abb. 20: Quantifizierung von A β 40 und A β 42 aus der Prozessierung von APP-Kontrollmutationen. SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit APP-wt und APP-Kontrollmutanten transfiziert. Aus konditioniertem Medium wurden die Mengen von A β 40 (A) bzw. A β 42 (B) quantifiziert. APP-wt wurde gleich 100% gesetzt. Die Kontrollmutationen I31V, I32V und L34A verändern nicht den A β 40- und A β 42-Spiegel. Die Mutation L17C hat keinen Einfluss auf die A β 40-Menge, führt jedoch zu gesteigerten Mengen A β 42. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n=3–9. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied zu APP-wt mit *p < 0,01, Student t-Test.

2.2.4. GxxxG-Mutationen wirken unabhängig von der APP-Ektodomäne

Um selektiv die durch GxxxG-Mutationen veränderte Prozessierung der γ -Sekretase untersuchen zu können und mögliche Einflüsse der Ektodomäne auf die Prozessierung ausschließen zu können, wurden, wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben, die GxxxG-Mutationen in dem Konstrukt SPA4CT untersucht. Die ELISA-Messungen wurden mit SH-SY5Y-Zellen wiederholt, die stabil SPA4CT-wt oder SPA4CT-G25A, -G29A, -G33A, -G29/33A oder -G33I exprimierten. Die Quantifizierung der A β -Spezies A β 42, A β 40 und A β 38 lieferte ähnliche Ergebnisse, wie sie für die APP-Mutanten erzielt wurden (Abb. 21). Auch hier führte die Prozessierung der GxxxG-Mutanten zu einer Verminderung der A β 42-Mengen und einer gleichzeitigen Erhöhung der A β 38-Mengen (Abb. 21B, C). Die Prozessierung der Mutanten G25A, G29A und G33A veränderte nicht die A β 40-Spiegel, während die A β 40-Mengen durch die Mutationen G29/33A und G33I herabgesetzt wurden (Abb. 21A). Das Ergebnis zeigt, dass die GxxxG-Mutationen die Prozessierung der γ -Sekretase unabhängig von der APP-Ektodomäne verändern. Die Mutationen G29A und G33A verdeutlichen diese Effekte am besten, da sie nicht die A β 40-Mengen sondern selektiv nur die Produktion von A β 42 und A β 38 verändern.

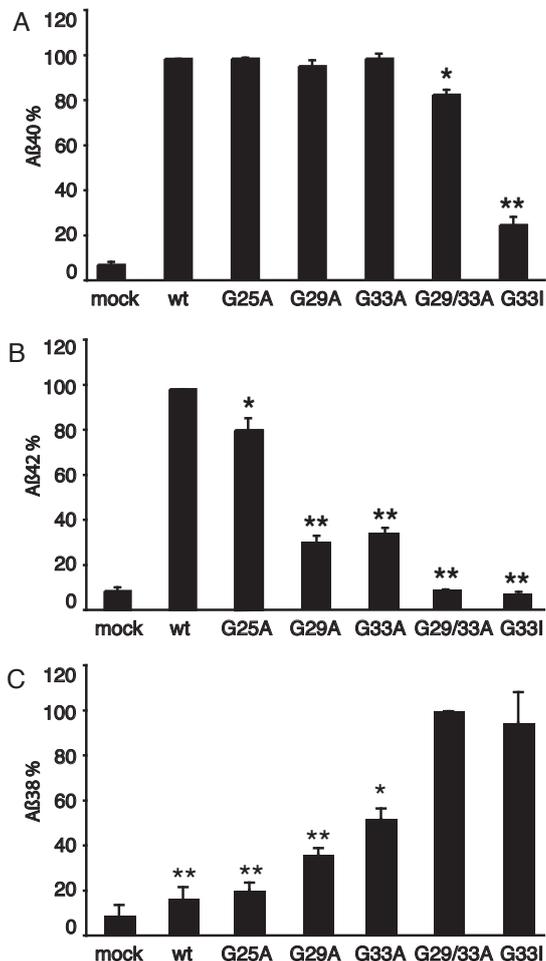


Abb. 21: Quantifizierung von A β 42, A β 40 und A β 38 aus SPA4CT-exprimierenden Zellen mittels ELISA. (A) A β 40-spezifischer ELISA. SPA4CT-wt wurde gleich 100% gesetzt. (B) A β 42-spezifischer ELISA. SPA4CT-wt wurde gleich 100% gesetzt. (C) A β 38-spezifischer ELISA. SPA4CT-G29/33A wurde gleich 100% gesetzt. (A-C) Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n=3–5. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert von 100% an mit *p < 0,01 und **p < 0,0001, Student t-Test.

2.2.5. GxxxG-Mutanten und die Entstehung verkürzter A β -Formen

Spezifische Antikörper zur Unterscheidung der verschiedenen A β -Spezies sind bislang nur für A β 42, A β 40 und A β 38 erzeugt worden. Um die Prozessierung der GxxxG-Mutanten näher zu untersuchen, wurde gesamt-A β aus konditioniertem Medium APP-transfizierter SH-SY5Y-Zellen mit dem Antikörper W0-2 (Epitop A β Positionen 5–8) präzipitiert und das Präzipitat mittels „matrix-assisted laser-desorption ionisation“-Massenspektrometrie (MALDI-MS) analysiert (Abb. 22). Mit APP-wt transfizierten Zellen produzierten verschiedene A β -Spezies, die anhand der Massen zu A β 40, A β 39, A β 38 und A β 37 zuzuordnen waren (Abb. 22B). Auch A β 42 konnte detektiert werden (Abb. 22C). In dem Massenbereich, in dem kleinere A β -Spezies detektiert werden können, war es möglich, A β 35 und A β 34 an der Detektionsgrenze nachzuweisen. Als Folge der Aminosäuresubstitutionen der GxxxG-Mutanten wurden die Massen der einzelnen A β -Spezies verschoben (Abb. 22). Der Vergleich der relativen Intensitäten der A β 40-Peaks gegenüber dem Signal für A β 38 zeigt eine Zunahme der A β 38-Menge in Abhängigkeit der Stärke des Aminosäureaustauschs. Dieses Ergebnis bestätigt die erzielten ELISA-Daten. Darüber hinaus nahm auch die relative Signalhöhe von A β 37 bei APP-G29/33A- und besonders bei APP-G33I-exprimierenden Zellen deutlich zu (Abb. 22B). Kürzere A β 35-Peptide wurden durch alle GxxxG-Mutationen

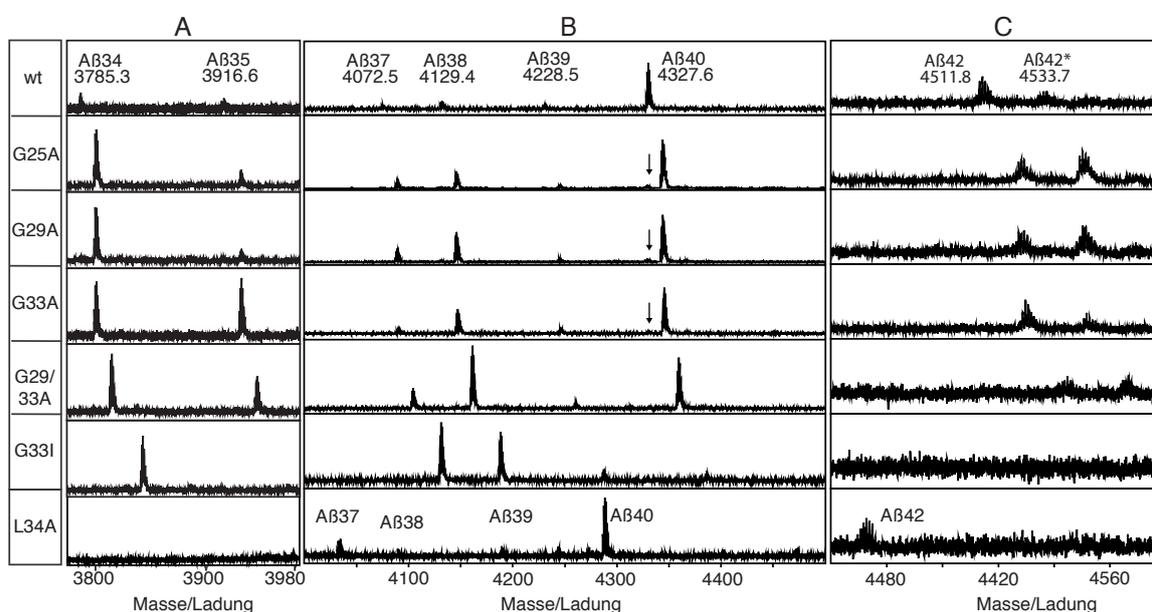


Abb. 22: MALDI-MS Spektren der sekretierten A β -Spezies aus APP-exprimierenden Zellen. Jeder Austausch eines Glycins zu Alanin verursacht eine Massenzunahme von 14 Da, die Mutation G33I erhöht die Massen um 56 Da und die Mutation L34A führt zu um 42 Da leichtere A β -Spezies. Nach externer Kalibrierung betrug die Standardabweichung nicht mehr als 250 ppm. (A) Massenspektrum mit Signalen für die A β -Spezies A β 34 (berechnete monoisotope Masse 3785,9 Da) und A β 35 (berechnete monoisotope Masse 3916,9 Da). (B) Spektrum mit Signalen entsprechend den A β -Peptiden A β 37 bis A β 40. Berechnete monoisotope Massen für A β 37: 4073,0, A β 38: 4130,0, A β 39: 4229,0 and A β 40: 4328,2. Die Pfeile weisen auf endogenes A β 40 hin, das sich in seiner Masse von den GxxxG-Mutanten unterscheidet. (C) Massenspektrum mit dem Signal für A β 42. Die berechnete monoisotope Masse von A β 42 ist 4512,3 Da. A β 42* markiert ein Signal, das ein Natrium-Addukt von A β 42 darstellt.

graduell verstärkt gebildet, mit Ausnahme von G33I (Abb. 22A). Interessanterweise wurde A β 34 durch die Prozessierung aller APP-GxxxG-Mutanten vermehrt produziert, ohne dass graduelle Abstufungen zu erkennen gewesen wären (Abb. 22A). A β 36 wurde in keinem der Spektren detektiert (Abb. 22A). Die MALDI-MS-Analyse der A β -Peptide mit der Mutation G33I zeigte, dass diese Mutation hauptsächlich zur Produktion von A β 38, A β 37 und A β 34 führt. Dieses Ergebnis erklärt, warum die Mutation G33I eine zum Wildtyp vergleichbare A β -Gesamtmenge in der Western Blot-Analyse lieferte, jedoch im ELISA weder A β 40 noch A β 42 nachgewiesen werden konnte. Die Mutation G33I bewirkte, dass die Bildung der längeren A β -Spezies A β 40 und A β 42 zu Gunsten der Entstehung kürzerer A β -Spezies reduziert wurde. Das A β -Präzipitat aus Medium APP-L34A-transfizierter Zellen zeigte ein Spektrum, das vergleichbar zu dem Spektrum der A β -Spezies aus APP-wt war und keine verstärkte Bildung kürzerer A β -Spezies vermuten lässt (Abb. 22). Dabei muss beachtet werden, dass MALDI-MS-Analysen nicht zur Quantifizierung geeignet sind. Relative Signalthöhen können nur im Vergleich zu Referenzpeaks festgestellt werden, wie z.B. zu den Peaks für A β 38 und A β 40, die bereits im ELISA quantifiziert wurden.

Die GxxxG-Mutationen verursachen also nicht nur eine reziproke Verschiebung der A β 42- und A β 38-Mengen, sondern generieren darüber hinaus noch weitere kürzere A β -Spezies wie A β 37, A β 35 und A β 34.

2.3. Einfluss familiärer APP-Mutationen auf das GxxxG-Motiv

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen bislang auf eine zentrale Rolle des G₂₉xxxG₃₃-Motivs in der γ -Sekretase-Prozessierung hin. Um die Bedeutung des GxxxG-Motivs experimentell weiter zu untersuchen, wurde die Auswirkung von zwei bekannten, familiären APP-Mutationen auf die Prozessierung untersucht. Es wurden die schwedische Mutation mit einem doppelten Aminosäure-Austausch K670N M671L (APP^{sw}) N-terminal der β -Sekretase-Schnittstelle (Mullan et al., 1992) und die arktische Mutation E22G (APP^{arc}) innerhalb des A β -Peptids ausgesucht (Kamino et al., 1992; Nilsberth et al., 2001).

2.3.1. Prozessierung von APP^{sw} und APP^{arc} mit GxxxG-Mutationen

Die FAD-Mutationen APP^{sw} und APP^{arc} wurden mit den GxxxG-Mutationen G33A, G29/33A und G33I in einem Konstrukt kombiniert. Alle Konstrukte wurden stabil in SH-SY5Y-Zellen exprimiert und die Expression der APP-Mutanten in einer Western Blot-Analyse kontrolliert

(Abb. 23). Diese Analyse zeigte, dass die Expressionsspiegel von APP^{sw} und APP^{sw}-GxxxG-Mutanten untereinander vergleichbar waren, aber insgesamt etwas niedriger als die Expression von APP-wt (Abb. 23A). Die Expression der APP^{arc}-Mutanten war vergleichbar zu APP-wt. Im Anschluss daran wurde die Prozessierung der APP-Konstrukte anhand der aus Zelllysaten immunpräzipitierten CTFs in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 23B). Dabei wurden sowohl β -CTF als auch α -CTF mit dem gleichen Antikörper detektiert, so dass ersichtlich wurde, dass APP-wt, APP^{arc} und APP^{arc}-GxxxG-Mutanten hauptsächlich von der α -Sekretase geschnitten werden, da deutlich mehr α -CTF nachzuweisen war als β -CTF. APP^{sw} und APP^{sw}-GxxxG-Mutanten wurden jedoch verstärkt von der β -Sekretase prozessiert, da aus diesen Mutanten etwa gleichviel β -CTF und α -CTF generiert wurde. Die Interpretation der α -CTF- und β -CTF-Signale wurde mit einer erneuten Detektion mit einem β -CTF-spezifischen Antikörper verifiziert (Abb. 23C). Sekretiertes gesamt-A β wurde aus Zellkulturmedium immunpräzipitiert und im Western Blot nachgewiesen (Abb. 23D). Dies zeigte, dass die Prozessierung von APP^{sw} und APP^{sw}-GxxxG-Mutanten zu mehr gesamt-A β führte als die Prozessierung von APP^{arc} und APP^{arc}-GxxxG-Mutanten (Abb. 23D). Insgesamt verändern die GxxxG-Mutationen in Kombination mit APP^{sw} oder APP^{arc} nicht die Prozessierung zu α -CTF, β -CTF oder gesamt-A β im Vergleich zu APP^{sw} oder APP^{arc} allein (Abb. 23B–D).

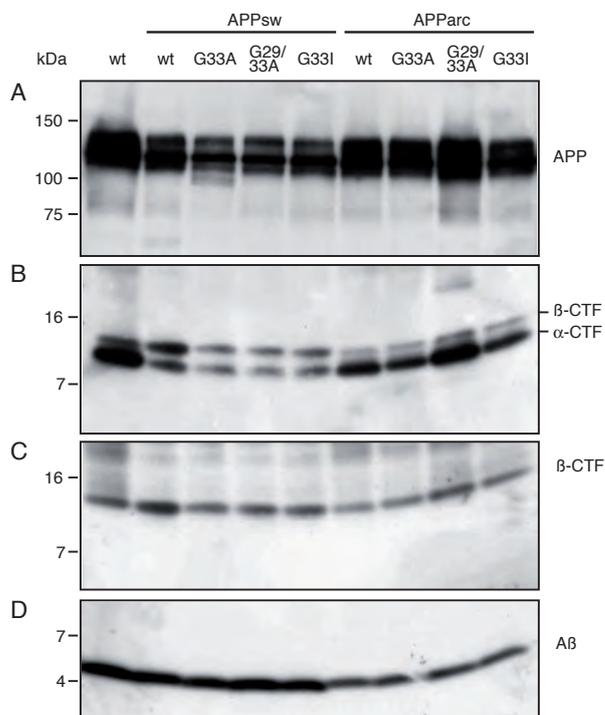


Abb. 23: Western Blot-Analysen der APP^{sw}- und APP^{arc}-Mutanten in stabil-transfizierten SH-SY5Y-Zellen. (A) APP-Expressionskontrolle aus Zelllysaten (Antikörper 22C11). (B) Die C-terminalen Fragmente β -CTF und α -CTF wurden aus Zelllysaten mit dem Antikörper 27576 präzipitiert und im Western Blot mit dem anti-Flag-Antikörper detektiert. (C) Der Detektionsantikörper des Western Blots aus B wurde entfernt und zur erneuten Detektion der Antikörper W0-2 genutzt, der nur β -CTF erkennt. Die erhaltenen Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 14 kDa stimmen mit den β -CTF Banden in B überein und verifizieren die Interpretation des Bandenmusters in B. (D) A β wurde aus konditioniertem Medium mit dem Antikörper 18-1 präzipitiert und im Western Blot mit dem Antikörper W0-2 detektiert. Die generierte A β -Menge aus APP-wt ist in anderen Western Blots zu der A β -Menge aus APP^{arc} vergleichbar. A β -Mengen aus der Prozessierung der APP^{sw}-Mutanten sind erhöht.

2.3.2. A β -Entstehung aus APPsw und APParc

Zunächst wurde die Prozessierung von APPsw und APParc mit der Prozessierung von APP-wt verglichen. Dazu wurde aus konditioniertem Medium von APP-wt-, APPsw- und APParc-exprimierenden Zellen die Mengen von sAPP α , A β 42, A β 40 und A β 38 mittels ELISA bestimmt. (Abb. 24). Im Vergleich zu APP-wt führte die Prozessierung von APPsw und APParc zu nur noch 18% bzw. 83% der sAPP α -Menge von APP-wt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die schwedische Mutation deutlich die Prozessierung durch die β -Sekretase verstärkte und die arktische Mutation dies in einem geringeren Umfang ebenfalls bewirkte (Abb. 24A). Im Zellkulturmedium APParc-exprimierender Zellen wurden erhöhte A β 42- (um 15%) und A β 40-Mengen (um 22%) nachgewiesen (Abb. 24B, C). Die Prozessierung von APPsw führte zu einem starken Anstieg der gesamten A β -Menge, jedoch stiegen die A β 42- und A β 40-Mengen ungleichmäßig an. Während sich die A β 40-Produktion verdoppelte (Abb. 24C), stieg die A β 42-Menge um das Vierfache an (Abb. 24B). Zusätzlich wurde die Menge von A β 38 bestimmt, wobei die A β 38-Menge aus APPsw auf 100% gesetzt wurde, da die A β 38-Menge aus APP-wt unter der Detektionsgrenze des ELISAs lag (Abb. 24D). Im Vergleich zu APPsw wurde APParc um ca. 60% weniger zu A β 38 prozessiert.

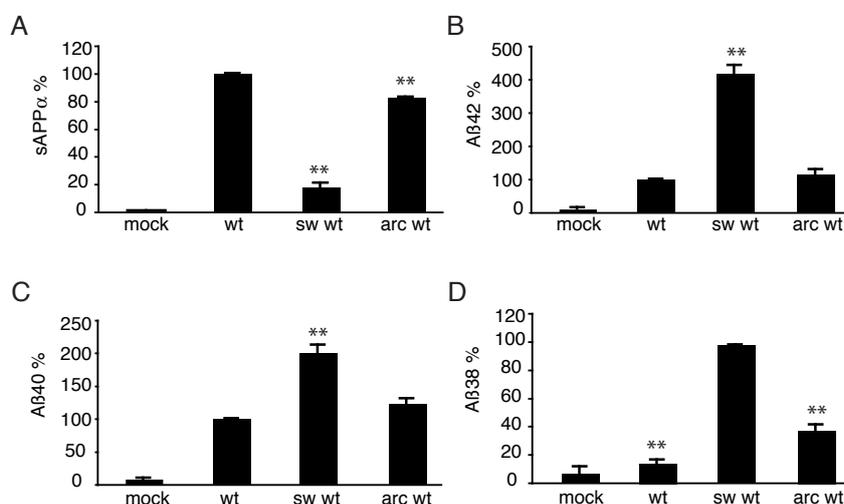


Abb. 24: Prozessierung von APPsw und APParc im Vergleich zu APP-wt. Aus konditioniertem Medium wurden mittels ELISA die Mengen von sAPP α , A β 42, A β 40 und A β 38 quantifiziert. (A) sAPP α -ELISA. Die Mutationen APPsw und APParc bewirkten verringerte sAPP α -Mengen im Vergleich zu APP-wt (wurde gleich 100% gesetzt, n=2–4). (B) A β 42-spezifischer ELISA. Die Prozessierung von APPsw führt zur vierfachen A β 42-Menge im Vergleich zu APP-wt (wurde gleich 100% gesetzt, n=8–10). (C) A β 40-spezifischer ELISA. A β 40-Menge aus APP-wt wurde gleich 100% gesetzt, n=8–12. (D) A β 38-spezifischer ELISA. Die A β 38-Menge aus APPsw wurde gleich 100% gesetzt, n=6–8. (A–D) Sterne geben einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Vergleichswert von 100% an (**p < 0,00001, Student t-Test), gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

2.3.3. A β -Entstehung aus APPsw- und APParc-GxxxG-Mutationen

Aus dem Zellkulturüberstand von SH-SY5Y-Zellen, die APParc-GxxxG-Mutationen oder APPsw-GxxxG-Mutationen exprimieren, wurde die Menge von sAPP α bestimmt (Abb. 25A, B). Die Prozessierung der APPsw-GxxxG-Mutationen und der APParc-GxxxG-Mutationen (im Folgenden als FAD-GxxxG-Mutationen abgekürzt) veränderte nicht die Menge an gebildetem sAPP α im Vergleich zu den FAD-Mutationen alleine (APP-wt wurde gleich 100% gesetzt; Abb. 25A, B). Die GxxxG-Mutationen beeinflussen folglich auch in Kombination mit der schwedischen oder der arktischen Mutation nicht die α - oder β -Sekretase Schnittstelle, was die Western Blot-Analyse in Abbildung 23 bestätigt.

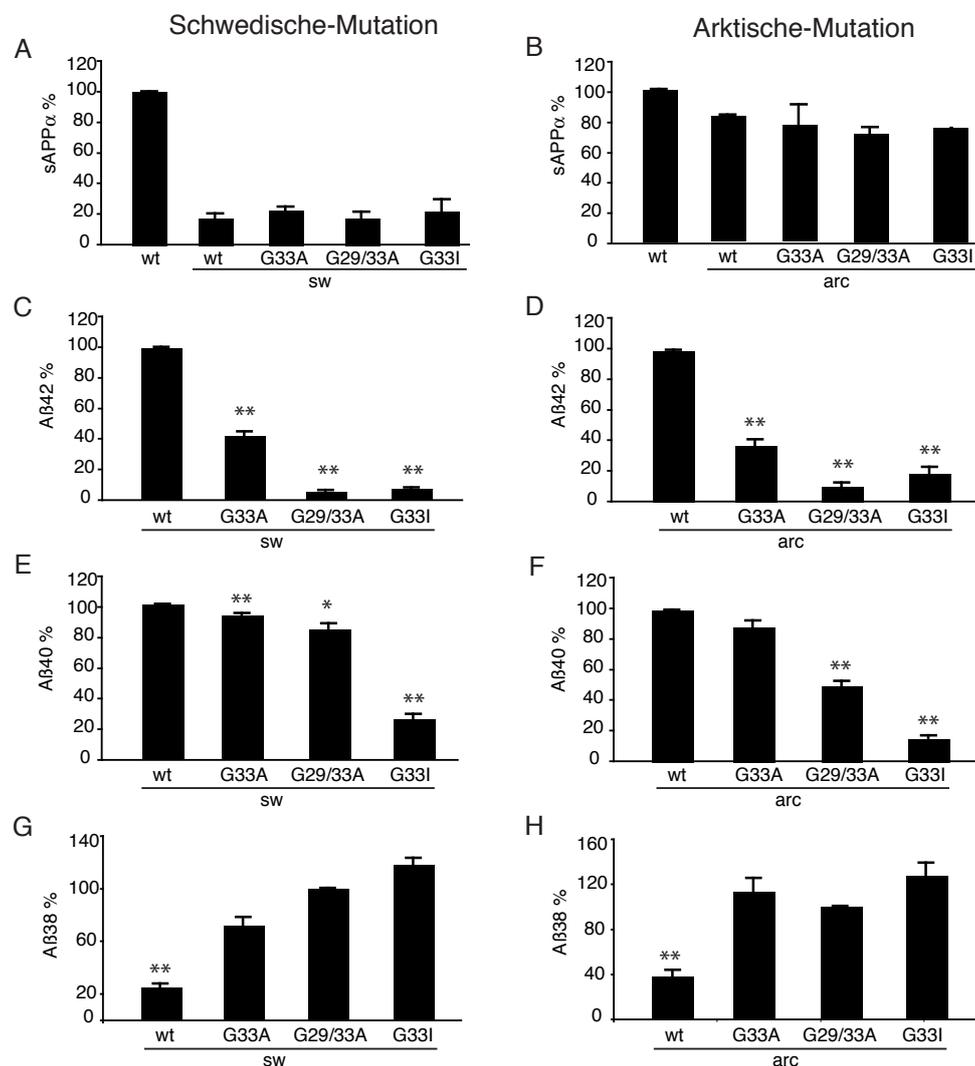


Abb. 25: GxxxG-Mutationen beeinflussen die APP-Prozessierung auch in Kombination mit APPsw oder APParc.

GxxxG-Mutationen G33A, G29/33A und G33I wurden in einem Konstrukt mit APPsw (A, C, E, G) oder APParc (B, D, F, H) kombiniert. Mittels ELISA wurden sAPP α , A β 42, A β 40 und A β 38 aus konditioniertem Medium quantifiziert. (A, B) sAPP α -ELISA. sAPP α -Menge von APP-wt-transfizierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt, n=2–4 außer APParc-G33I: n=1. (C, D) A β 42-spezifischer ELISA. A β 42-Mengen aus APPsw- bzw. APParc-transfizierten Zellen wurden gleich 100% gesetzt, n=6–10. (E, F) A β 40-spezifischer ELISA. Gebildetes A β 40 aus APPsw bzw. APParc wurden gleich 100% gesetzt, n=6–10. (G, H) A β 38-spezifischer ELISA. Generierte A β 38-Mengen aus APPsw-G29/33A bzw. APParc-G29/33A wurden gleich 100% gesetzt, n=3–10. (A–H) Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Referenzwert von 100% an (*p < 0,001, **p < 1*10⁻⁵, Student t-Test), gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Um die Effekte der FAD-GxxxG-Mutationen auf die Entstehung von A β mit den Ergebnissen der GxxxG-Mutationen alleine vergleichen zu können, wurden die gebildeten A β 42- und A β 40-Mengen aus APPsw und APParc gleich 100% gesetzt bzw. bei der Quantifizierung von A β 38 wurden die A β 38-Mengen aus APPsw-G29/33A oder APParc-G29/33A gleich 100% gesetzt (Abb. 25). Die Prozessierung von APPsw-G33A und APParc-G33A führte zu einer Verminderung der A β 42-Menge um etwa 60%. Die Prozessierung von sowohl APPsw-G29/33A und APPsw-G33I als auch von den entsprechenden APParc-Mutationen lieferte kein A β 42 mehr (Abb. 25C, D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die FAD-GxxxG-Mutationen die A β 42-Menge in einem vergleichbaren Maß verringern können wie die GxxxG-Mutationen allein. Die Prozessierung von APPsw-G33A und APParc-G33A führte im Vergleich zu APPsw oder APParc zu leicht verminderten A β 40-Mengen mit 93% und 89% (Abb. 25E, F). Im Zellkulturüberstand von APPsw-G29/33A oder APParc-G29/33A wurden signifikant geminderte A β 40-Mengen nachgewiesen (APPsw-G29/33A 84% und APParc-G29/33A 50% im Vergleich zu APPsw oder APParc). Die Prozessierung von APPsw-G33I und APParc-G33I verstärkte diesen Effekt. Gesteigerte A β 38-Mengen waren in den Zellkulturüberständen aller FAD-GxxxG-Mutationen im Vergleich zu den FAD-Mutationen allein nachzuweisen (Abb. 25G, H). Dabei wurde aus den Mutationen APPsw-G33I, APParc-G33I und APParc-G33A mehr A β 38 gebildet als aus den Mutationen APPsw-G29/33A oder APParc-G29/33A. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Prozessierung von APPsw oder APParc erhöhte A β 42-, A β 40- und A β 38-Mengen nachzuweisen sind. Durch die Kombination der FAD-Mutationen mit GxxxG-Mutationen können die erhöhten A β 42- bzw. A β 40-Mengen jedoch wieder gesenkt werden bzw. die erhöhten A β 38-Mengen weiter gesteigert werden. Dabei verändern die GxxxG-Mutationen in Kombination mit APPsw oder APParc die A β -Mengen in einem vergleichbaren Maß, wie es die GxxxG-Mutationen im APP allein bewirken können.

2.4. Bedeutung der GxxxG-Motive in A β -Peptiden

A β -Peptide formen schnell Oligomere und neigen zur Aggregation und Fibrillenbildung, wie in der Einleitung beschrieben (Iwatsubo et al., 1994; Jarrett and Lansbury, 1993; Walsh et al., 2002). Die Bedeutung der GxxxG-Motive in der Faltung und Fibrillenbildung von A β wurde im Folgenden experimentell untersucht.

2.4.1 Fibrillenbildung synthetischer A β -Peptide mit GxxxG-Mutationen

Um die Rolle des GxxxG-Motivs auf die A β -Struktur und die Aggregation zu untersuchen, wurden A β 42-Peptide mit den Mutationen G33A und G33I synthetisiert. Die Peptide wurden alkalisch gelöst, wobei die Löslichkeit von A β -G33A und A β -G33I besser war als die Löslichkeit von A β -wt. Mittels SDS-PAGE und anschließender Western Blot-Analyse wurde festgestellt, dass sich die A β -G33A- und A β -G33I-Peptide in der SDS-PAGE anders auftrugen als A β -wt (Abb. 26). Bei den Mutanten wurden SDS-stabile Oligomere mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 34 kDa bis 100 kDa nachgewiesen, wobei die Oligomere von A β -G33I durchschnittlich etwas höhere Molekulargewichte erreichten (Molekulargewichte von etwa 50 kDa bis 100 kDa) als die Oligomere von A β -G33A. Darüber hinaus zeigten A β -G33A und A β -G33I deutliche Banden, die nieder-oligomeren Strukturen zugeordnet werden konnten (Abb. 26B). Diese Strukturen wurden auch bei A β -wt nachgewiesen, sind jedoch in dem gezeigten Blot wegen einer zu gering-aufgetragenen Peptidmenge nicht detektiert worden.

Die Fibrillenbildung der mutierten Peptide wurde mittels Elektronenmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. Rudi Lurz, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, untersucht. Für diese Experimente wurden zusätzlich die Mutanten A β -G29A und A β -G29/33A eingesetzt. Hierbei wurden gleiche Mengen der Peptide sauer gelöst und 72 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Ansätze zeigten, dass sich A β 42-wt Fibrillen mit einer Länge von 300–800 nm und einem Durchmesser von 11–13 nm gebildet haben (Abb. 27A). Diese Fibrillen wurden bereits beschrieben (Walsh et al., 1997). Die Ansätze mit den Peptiden A β 42-G29A und A β 42-G33A formten Fibrillen mit einem vergleichbaren Durchmesser, die aber mit 100–300 nm

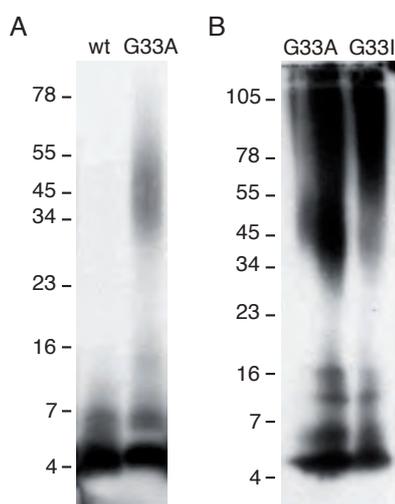


Abb. 26: Migration von synthetischen A β 42-Peptiden im SDS-Polyacrylamid (PA)-Gel. Die Peptide A β -wt, A β -G33A und A β -G33I wurden gelöst und auf einem Tris-Tricin-PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Im Vergleich zu A β -wt bildet A β -G33A SDS-stabile Oligomere. (B) A β -G33A im Vergleich zu A β -G33I. Beide Peptide formen SDS-stabile Oligomere.

bzw. 100–500 nm Länge deutlich kürzer waren als A β 42-wt Fibrillen (Abb. 27B, C). Die Fibrillen aus A β 42-G29A wirkten eher starr und unbeweglich, wohingegen die A β 42-G33A Fibrillen gebogen und flexibler erschienen. Die Ansätze mit den Peptiden A β 42-G29/33A und A β 42-G33I bildeten keine Fibrillen. Es konnten jedoch kleinere Aggregate mit einem Durchmesser von 10–14 nm und einer Länge von 30–150 nm gefunden werden (Abb. 27D, E). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fibrillenbildung von A β -Peptiden mit einer GxxxG-Mutation erschwert ist.

Um dieses Ergebnis zu prüfen, wurde ein inhibitorisches Peptid mit der Sequenz RGTFEGKF-NH₂ zu den Ansätzen gegeben (Abb. 27F–J) (Liu et al., 2005). Dieses Peptid enthält ein GxxxG-Motiv und kann somit an andere GxxxG-Motive binden. Dies wurde bei Untersuchungen zur Inhibition der Fibrillenbildung der GpA-Transmembransequenz bereits gezeigt (Liu et al., 2005). Bei Zugabe eines 20fach molaren Überschusses des inhibitorischen Peptids verkürzten sich die A β 42-wt Fibrillen auf etwa 400 nm, was auf die Bindung des inhibitorischen Peptids an A β 42-wt zurückzuführen ist (Abb. 27F). Das Erscheinungsbild der Fibrillen und Aggregate der mutierten A β 42-Peptide wurde jedoch durch das inhibitorische Peptid nicht beeinflusst (Abb. 27G–J). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das inhibitorische Peptid nicht an die mutierten GxxxG-Motive binden und in Folge davon die Aggregation nicht beeinflussen konnte. Das GxxxG-Motiv in A β spielt demnach bei der Fibrillenbildung eine Rolle, wobei besonders A β -Peptide mit einer Mutation an Position G33 die Aggregation zu langen Fibrillen stören.

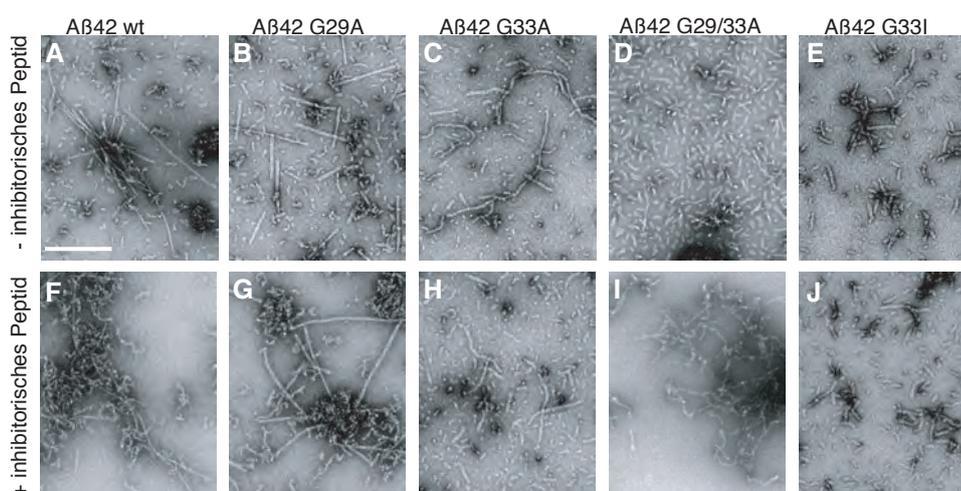


Abb. 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von A β -Fibrillen. Die Peptide A β 42-wt, -G29A, -G33A, -G29/33A und -G33I wurden gelöst und bei Raumtemperatur für 72 h inkubiert. (A-E) Die Fibrillenbildung der A β -Peptide mit einer GxxxG-Mutation ist erschwert. (F-J) Fibrillenbildung in Anwesenheit des inhibitorischen Peptids in 20fach molarem Überschuss. Nur die Fibrillenbildung von A β -wt Peptiden wurde beeinflusst, die Fibrillen und Aggregate der GxxxG-Mutanten sind unverändert. Balken zeigt 200 nm an.