

## 6. Methoden

### 6.1. Nukleinsäuremethoden

#### 6.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Reagenzien für eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden wie folgt eingesetzt:

- 1 x Pfu-Puffer (Promega, USA oder Stratagene, USA)
- 0,3 mM dNTPs (Bioline, Mannheim)
- 15 pmol je synthetischem Oligonukleotid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 5 U/µl Pfu-Polymerase (Promega, USA oder Stratagene, USA)
- 20 ng Ausgangs-DNA

Die PCR wurde immer nach der Methode der „Hot-start“-PCR gestartet, d.h. die PCR-Ansätze wurden auf Eis gekühlt gehalten bis sie in die auf 95°C vorgeheizte PCR-Maschine gebracht wurden. Die Temperatur-Programme der einzelnen PCRs sind in den jeweiligen Klonierungsstrategien erwähnt.

#### 6.1.2. Klonierungsstrategien

##### 6.1.2.1. Herstellung der ToxR-Vektor-Konstrukte

Nach der Methode der Kassetten-Klonierung wurde der für die zu untersuchende Transmembransequenz kodierende DNA-Abschnitt in den ToxR-Vektor ligiert. Dazu wurden je zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet. Diese wurden phosphoryliert und zur komplementären Hybridisierung im Wasserbad erhitzt und langsam abgekühlt (von 90°C auf 45°C). Dabei wurden die Oligonukleotide so ausgewählt, dass nach der Hybridisierung überhängende Enden einer NheI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende gebildet wurden. Über diese Enden konnte das Insert gerichtet in den ToxR-Vektor ligiert werden.

##### 6.1.2.2. Klonierungsstrategie Flag-„tag“

Ausgehend von dem Konstrukt pBS-II-APP695-N-Myc (in diesem Konstrukt ist APP N-terminal bereits mit einem Myc-„tag“ markiert) wurde die kodierende Sequenz von APP C-terminal mit einem Flag-„tag“ versehen. Dazu wurde die Megaprimer-Methode verwendet. Es wurde ein Amplifikat mit den Primern EcoRI-F und Flag-R erstellt und dieses Amplifikat

in einer neuen PCR als 5'-Primer zusammen mit dem 3'-Standardprimer T7-R eingesetzt. Das entstandene Amplifikat enthält den Flag-„tag“ und wurde über die EcoRI- und ClaI-Schnittstellen gegen das entsprechende Fragment aus dem oben genannten Konstrukt ausgetauscht. Anschließend wurde die kodierende Sequenz von APP über XbaI und Sall aus pBS-II herausgeschnitten und über kompatible kohäsive Enden in den mit NheI und XhoI linearisierten pCEP4-Vektor ligiert, bezeichnet pCEP4-APP695-N-Myc-C-Flag. Ausgehend von dem Konstrukt pCEP4-SPA4CT (Dyrks et al., 1992) wurde analog der Flag-„tag“ C-terminal an die kodierende Sequenz von SPA4CT angehängt. Die verwendeten Primer waren KpnI-F und Flag-R zur Herstellung des Megaprimer, der in einer zweiten PCR mit dem Primer EBV-R eingesetzt wurde. Über KpnI- und XhoI-Schnittstellen wurde das entsprechende Fragment in dem Konstrukt pCEP4-SPA4CT gegen das Amplifikat ausgetauscht, bezeichnet pCEP4-SPA4CT-C-Flag. Es wurde folgendes Programm zur Durchführung der ersten und zweiten PCR beider Konstrukte verwendet: 1. 94°C für 30 sec, 2. 55°C für 45 sec, 3. 72°C für 30 sec, 30 Zyklen und abschließend Inkubation bei 72°C für 10 min, Lagerung bei 4°C.

#### 6.1.2.3. Klonierungsstrategie nach der Megaprimer-Methode

Alle bis auf die gesondert ausgewiesenen Punktmutationen wurden nach der Megaprimer-Methode eingeführt. Die Punktmutation wurde in einen entsprechenden 5'-Primer eingefügt und in der ersten PCR ein Megaprimer mit dem 3'-Standardprimer T7 (Punktmutationen in APP) oder 3'-Primer EBV-R (Punktmutationen in SPA4CT) erzeugt. Dieser Megaprimer wurde als 3'-Primer in einer zweiten PCR mit den 5'-Primern APP-2061-F (für APP) oder KpnI-F (für SPA4CT) verwendet. Über die Schnittstellen PmlI und ClaI bei APP-Konstrukten bzw. XhoI und KpnI bei SPA4CT-Konstrukten wurde das Amplifikat, das die Punktmutation trägt, gegen die entsprechende Sequenz in den Ausgangs-Vektoren ausgetauscht. Die kodierende Sequenz von APP wurde über XbaI und Sall aus pBS-II herausgeschnitten und in den mit NheI und XhoI linearisierten pCEP4-Vektor ligiert. Doppelmutationen wurden erzeugt, indem ein Plasmid als „Template“ eingesetzt wurde, das bereits eine Mutation trägt.

#### 6.1.2.4. Klonierungsstrategie nach der „Quick-Change“-Methode

Um eine Punktmutation nach dieser Methode in ein Plasmid einzuführen, wurden je komplementäre Primer-Paare entworfen, die etwa 30–40 Nukleotide lang sind und die

Punktmutation enthalten. Diese Primer wurden HPLC-gereinigt von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen. In einer PCR wurde das vollständige Plasmid amplifiziert (PCR-Programm: 1. 95°C für 30 sec, 2. 55°C für 1 min, 3. 68°C für je 1 min pro 1 kb Plasmidgröße, 20 Zyklen, abschließend 68°C für 10 min, Lagerung bei 4°C). Das „Template“ wurde aus Bakterien aufgereinigt und enthält methylierte Basen, wohingegen das PCR-erzeugte Plasmid keine Methylierungen trägt. Mit dem Restriktionsenzym DpnI wurde die „Template“-DNA verdaut und chemisch kompetente Bakterien (Biolone, Mannheim) mit dem verbleibenden PCR-erzeugte Plasmid, das die Punktmutation enthält, transformiert. Nach dieser Methode wurden die Mutanten APP-I31V, APP-I32V, APP-L34A, APP-L17C, SPA4CT-L17C und SPA4CT-L17C/G33I sowie die ToxR-Konstrukte I31V, I32V, L34A erzeugt. Doppelmutationen wurden hergestellt, indem das Plasmid als „Template“ eingesetzt wurde, das bereits eine Mutation trägt.

#### 6.1.2.5. Klonierungsstrategie zum Erstellen der YFP-/CFP-markierten Konstrukte

Verwendet wurden die modifizierte Vektoren pcDNA3.1-YFP und pcDNA3.1-CFP (Quelle: AG Prof. Dr. Michael Schaefer). Um die kodierenden Sequenzen von APP bzw. SPA4CT im Leserahmen von YFP oder CFP in den Vektor einzubringen, wurden Primer entworfen, die einen Überhang mit einer passenden Restriktionsschnittstelle erzeugen. Aus dem „Template“ pBS-II-APP695-N-Myc bzw. pCEP4-SPA4CT wurde die kodierende Sequenz mit den Primern FRET-NotI-F und FRET-XbaI-R amplifiziert (PCR-Programm: 1. 95°C 30 sec, 2. 60°C 45 sec, 3. 72°C 2 min für APP, 30 sec für SPA4CT, 30 Zyklen, abschließend 72°C 10 min, Lagerung bei 4°C). Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI verdaut und in die entsprechend linearisierten Vektoren ligiert.

#### 6.1.2.6. Sequenzierung der Konstrukte

Alle erzeugten Konstrukte wurden mit fluoreszierenden Primern auf Basis der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977).

#### 6.1.3. Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli*-Zellen

DNA wurde mit der Methode der Elektrotransformation in *E. coli* eingebracht. Um elektrokompetente *E. coli* herzustellen, wurden die Bakterienstämme DH5 $\alpha$  oder Top10 in 1 l LB-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,4 bei 620 nm kultiviert. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem H<sub>2</sub>O

gewaschen und in 10% Glycerin (w/v) aufgenommen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und wieder in 3 ml 10% Glycerol aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch photometrische Bestimmung bei 620 nm gemessen und auf eine Zelldichte von  $2-3 \times 10^{10}$  Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt, auf flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 6.1.4. Elektrotransformation

50 ng Vektor-DNA oder 2–4  $\mu$ l eines Ligationsansatzes wurden mit 50  $\mu$ l elektrokompeter Zellen vermischt und 5 min in einer Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) auf Eis inkubiert. Die Elektrotransformation erfolgte bei 25  $\mu$ F, 1,8 kV und 200  $\Omega$  unter Verwendung eines Elektroporator Gene Pulser II (BioRad, München). Danach wurde sofort LB-Medium auf die Zellen gegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 100–200  $\mu$ l des Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin bzw. 100  $\mu$ g/ml Kanamycin entsprechend dem Selektionsmarker des Vektors ausgestrichen. Die Agar-Platten wurden für 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Einzelne Klone wurden gepickt und die DNA für weitere Analysen präpariert.

#### 6.1.5. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Es wurden 2–4  $\mu$ l der zu transformierenden DNA mit 50  $\mu$ l chemisch kompetenter CH3-Blue-Zellen (Bioline, Mannheim) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 1,5 min ausgesetzt, danach für 2 min auf Eis abgekühlt und in 500  $\mu$ l vorgewärmten LB-Medium aufgenommen. Nach Inkubation der Bakterien für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden wie unter 6.1.4. beschrieben 100–200  $\mu$ l des Ansatzes auf LB-Agar-Platten ausgestrichen.

#### 6.1.6. DNA-Präparation

Kleine Mengen DNA (etwa 5  $\mu$ g) wurden von 1,5 ml großen Bakterienkulturen präpariert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in 100  $\mu$ l S1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A) resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200  $\mu$ l S2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) aufgeschlossen. Die Zugabe von 200  $\mu$ l S3-Puffer (2,8 M KAc, pH 5,1) neutralisierte den pH-Wert der Lösung, die Proteine fielen aus und konnten somit abzentrifugiert werden. Die im Überstand enthaltene DNA wird durch Zugabe von Isopropanol (7/10 des Überstandsvolumen) gefällt, abzentrifugiert und mit 500  $\mu$ l 70%

EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

Große Mengen DNA (Maxi-Präparation) wurden mit dem Maxi-Präp-„Kit“ von Macherey-Nagel, Düren nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### 6.1.7. Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die DNA der Maxi-Präparation wurde 1:100 in  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und die Absorption in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm (Photometer SmartSpec 3000, Bio-Rad, München) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten wurde über den Näherungswert für doppelsträngige DNA:  $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$ , die DNA-Konzentration nach

$c = \text{Absorption} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$  berechnet.

Verunreinigungen der DNA-Präparation mit Proteinen wurden mittels des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm kontrolliert, wobei der Quotient meist um die Werte 1,8 bis 1,9 lag.

#### 6.1.8. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für analytische und präparative Zwecke genutzt. Die Agarose wurde von Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen wurde ein 0,8–1,2%iges Gel verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (1  $\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration) konnte die DNA auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht werden.

Puffer: 1x TBE-Laufpuffer: 90 mM Tris, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 0,1 mM EDTA  
6x DNA-Probenpuffer 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin,  
0,1 mM EDTA, pH 8,0

#### 6.1.9. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Glasmilch-„Kit“ von Biozym, hess. Oldendorf, nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

## 6.2. Proteinchemische Methoden

#### 6.2.1. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen-Lösungen wurde nach der BCA-Methode (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Auf einer 96-„well“-Mikrotiterplatte wurde eine

Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) von 1 µg–20 µg Protein hergestellt sowie die zu testenden Protein-Lösungen in Mehrfachbestimmung verschiedener Volumina aufgetragen. Die Proben wurden mit 200 µl des BCA-Reagenzes nach Angaben des Herstellers versetzt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm gemessen. Anhand der Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der Protein-Lösungen entsprechend bestimmt.

### 6.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung eines Proteingemischs wurden die Proben in 4 x SDS-Protein-Probenpuffer (250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,008% Bromphenolblau) wahlweise mit oder ohne 20% (v/v) β-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamid (PA)-Gel aufgetragen. Entsprechend des Molekulargewichts der erwarteten Proteine wurden 8%ige bis 15%ige SDS-PA-Gele verwendet. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 25–35 mA aufgetrennt.

Zur Analyse von Aβ-Peptiden mittels SDS-PA-Gelen wurde das Tris-Tricin-Gelsystem verwendet. Die Nutzung von Tricin als Leitton führt zu einer wesentlich besseren Auftrennung im niederen Molekulargewichtsbereich (Schagger and von Jagow, 1987). Proben für die Tris-Tricin-Gelelektrophorese wurden mit SDS-Protein-Probenpuffer aufgenommen und auf 10–20%ige Tris-Tricin-Gradientengele (Anamed, weils besser geht, Darmstadt) aufgetragen.

Laufpuffer: 100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS

### 6.2.3. Western Blot-Analyse

#### 6.2.3.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Zum Transfer der im SDS-PA-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, Macherey-Nagel wurde das SDS-PA-Gel zwischen Whatman-Papiere auf die Nitrocellulosemembran gelegt und Luftblasen ausgestrichen. Der Proteintransfer erfolgte im Tankblot-Verfahren in einer Transblot-Apparatur, Bio-Rad, München bei 380 mA für 3 h oder über Nacht bei 180 mA. Danach wurde die Nitrocellulosemembran für 1 min mit einer 2%igen Ponceau-Rouge-Lösung inkubiert, die die transferierten Proteine anfärbt. Damit wurde der gleichmäßige Proteintransfer auf die Membran kontrolliert. Durch Waschen mit PBS wurde die Färbung wieder entfernt. Sollten Aβ-Peptide auf der Membran nachgewiesen

---

werden, so wurde anschließend die Membran für 5 min in PBS erhitzt.

#### 6.2.3.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Freie Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden mit einer 10%igen Magermilchlösung für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Darauf wurde der Primärantikörper in PBS oder TBST in der entsprechenden Verdünnung für 1 h auf dem Blot inkubiert und danach wieder durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der Primärantikörper wurde von einem Maus- oder Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörper detektiert, der mit einer Meerrettich-Peroxidase (Promega, USA) konjugiert ist und in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde. Danach wurde auch der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die gebundenen Antikörper und damit indirekt das Protein, das vom Primärantikörper erkannt wird, werden nach Zugabe des ECL-Reagenzes (Amersham-Pharmacia, GB) mittels Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen (Amersham-Pharmacia, GB) detektiert.

#### 6.2.4. Herstellung von Zelllysaten

Der Zellkulturüberstand kultivierter eukaryotischer Zellen wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt, in ein Reagiergefäß überführt und bei 2000 g, 3 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Zellen wurden mit einem Detergenz-haltigen Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% NP-40 and 1% Triton X-100, 1 x Complete-Protease-Inhibitor von Roche, Grenzach-Wyhlen) aufgeschlossen. Dazu wurden die Ansätze bei 4°C für 30 min in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht aufgeschlossene Zellreste wurden danach bei 10000 g, 4°C für 10 min abzentrifugiert, das Pellet verworfen und mit dem Überstand weitergearbeitet.

#### 6.2.5. Immunpräzipitationen

Zur Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberständen wurde 1 ml des Überstandes (gewöhnlich für 24 h konditioniert) versetzt mit 30 µl Protein-A- oder Protein-G-Sepharose und einem geeigneten Antikörper. Zur Präzipitation von Proteinen aus Zelllysaten wurde das Lysat mit PBS verdünnt, Complete-Protease-Inhibitor (Roche, Grenzach-Wyhlen) zugesetzt und ebenfalls Protein-A- oder Protein-G-Sepharose und ein geeigneter Antikörper gemischt. Die Ansätze wurden entweder für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Sepharose durch Zentrifugation bei 2000 g für 2 min sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Sepharose dreimal

mit PBS gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden eluiert, indem auf das trockene Sepharosematerial 20  $\mu$ l 2 x SDS-Protein-Probenpuffer wahlweise mit oder ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben wurden. Dieser Ansatz wurde bei 95°C gekocht und der Überstand für die SDS-PAGE verwendet.

#### 6.2.6. Präparation von A $\beta$ -Proben für MALDI-MS-Analysen

Um die verschiedenen A $\beta$ -Spezies einer Probe mit MALDI-MS analysieren zu können, wurde A $\beta$  aus 24 h konditionierten Zellkulturüberständen mit dem Antikörper W0-2 präzipitiert. Das Sepharose-Material wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und einmal mit 1 ml 100 mM Ammoniumacetat, pH 7. Das Präzipitat wurde durch zweimalige Zugabe von 500  $\mu$ l 50%ige Essigsäure, jeweils 10 min bei 40°C, eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedampft.

### 6.3. MALDI-MS-Messungen

Die getrockneten Proben wurden in 10  $\mu$ l TA<sub>20</sub>-Puffer (20% Acetonitril, 0,1% Tri-fluoressigsäure in H<sub>2</sub>O) aufgenommen und für 20 min im Ultraschallbad gelöst. Als Matrix wurde 4-Hydroxy- $\alpha$ -cyano-Zimtsäure (CCA) verwendet. Es wurde eine gesättigte CCA-Lösung in 30% Acetonitril und 0,1% Tri-fluoressigsäure hergestellt und ebenfalls für 20 min in das Ultraschallbad gestellt. Danach wurde die CCA-Lösung zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet. Zum Probenauftrag wurde ein Stahl-Probenteller verwendet. Nach der „Dry-Droplet“-Methode wurde 1  $\mu$ l der gelösten Probe mit 1  $\mu$ l CCA-Lösung gemischt und davon 1  $\mu$ l auf den Probenteller aufgetragen. Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden sie mit einem Ultraflex II-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im Reflektor-Modus mit dem Programm RP\_PepMix gemessen.

### 6.4. Zellkultur

#### 6.4.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

SH-SY5Y-Zellen und HEK293-Zellen wurden im Brutschrank unter Zusatz von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.



#### 6.4.2. Herstellung stabiler Zelllinien

Etwa  $9 \times 10^5$  SH-SY5Y-Zellen wurden in 6-„well“ Schalen verteilt, so dass am nächsten Tag die Zelldichte eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hat. Zur Transfektion wurde das Transfektin-Reagenz (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden  $3 \mu\text{l}$  DNA und  $7 \mu\text{l}$  Transfektin-Reagenz eingesetzt. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen auf 60-mm-Platten umgesetzt. 24 h später wurde das Wildtyp-Medium gegen das Hygromycin-enthaltende Selektionsmedium ausgetauscht. Nach etwa 14 Tagen waren die Zellen selektioniert und konnten für weitere Experimente eingesetzt werden.

#### 6.4.3. Transiente Transfektionen

Es wurden  $1,8 \times 10^5$  SH-SY5Y-Zellen in 24-„well“ Platten verteilt, so dass am nächsten Tag die Zelldichte etwa 80%ige Konfluenz erreicht hat. Es wurden je „well“  $1 \mu\text{g}$  DNA und  $4 \mu\text{l}$  Transfektin-Reagenz (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Am darauf folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium gegen  $200 \mu\text{l}$  frisches Wildtyp-Medium ausgetauscht. Nach 24 h konnte der Zellkulturüberstand für weitere Analysen wie ELISA verwendet werden. Um eine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse überprüft.

Für FRET-Messungen wurden HEK293-Zellen am Vortag transfiziert. Dazu wurden  $4 \mu\text{l}$  des Fugene 6-Reagenz (Roche, Grenzach-Wyhlen) und eine Gesamtmenge von  $2 \mu\text{g}$  DNA verwendet.

### 6.5. ELISA

Es wurden  $1,8 \times 10^5$  Zellen der stabile Zelllinien ausgezählt und in Vierfachbestimmung in einer 24-„well“ Platte kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und mit  $300 \mu\text{l}$  neuem Medium ersetzt. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium für den ELISA (The Genetics Company, Schlieren, Schweiz) verwendet. Bei transienten Transfektionen wurde verfahren wie unter 6.4.3. beschrieben. Es wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  der Überstände für den ELISA eingesetzt und der ELISA nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Quantifizierung von A $\beta$ 38 und sAPP $\alpha$  wurde analog verfahren, mit der Ausnahme, dass der A $\beta$ 38-spezifische Antikörper BAP-29 (M. Brockhaus, Roche, Grenzach-Wyhlen) oder ein monoklonaler anti-Myc-Antikörper (New England Biolabs, USA) als Fangantikörper verwendet wurden.

## 6.6. Immunfluoreszenz

Die stabilen Zelllinien wurden im 24-, „well“ auf Glas-Deckgläschen verteilt und für 48 h kultiviert. Für Immunfluoreszenzen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS für 15 min fixiert. Danach wurde zweimal mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS für je 5 min gewaschen, um reaktive Paraformaldehyd-Reste zu beseitigen. Die Zellen wurden mit einem Permeabilisierungspuffer (2 mM EDTA, 5 mM PMSF, 0,3% Triton X-100 in PBS) behandelt und in PBS gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit 5% FCS in PBS für 2 h blockiert. Der Primärantikörper wurde für 45 min in 5% FCS in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 5% FCS in PBS entfernt. Der Sekundärantikörper wurde für 30 min in 5% FCS in PBS bei Raumtemperatur im Dunkeln auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit 5% FCS in PBS wurden die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung (Roche, Grenzach-Wyhlen) 1:1000 in PBS für 5 min bei Raumtemperatur angefärbt und viermal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  gehalten und mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) auf Objektträgern fixiert.

## 6.7. Konfokale Mikroskopie

Für konfokale Mikroskopieaufnahmen wurde ein invertiertes konfokales „laser scanning“ Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Plan-Apochromat Objektiven, 63x/1,4, verwendet.

In lebenden HEK293-Zellen wurde YFP bei 488 nm angeregt und die Emission mit einem 505 nm-Breitbandfilter aufgenommen. Dabei wurden die Zellen in einem HBS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5,5 mM Glukose und 0,2% BSA) gehalten.

Für die Aufnahmen der Immunfluoreszenzen wurden folgenden Anregungswellenlängen und Detektionsfilter verwendet: DAPI: Anregung bei 364 nm, Detektion mit 385-470 nm Breitbandfilter. Cy3 and Alexa594: Anregung bei 543 nm, Detektion bei 560 nm Breitbandfilter.

## 6.8. FRET

FRET ist ein physikalisches Phänomen, das bei Fluorophor-Paaren auftritt, wenn die Emissionswellenlänge des Donors (CFP) überlappt mit der Anregungswellenlänge des Akzeptors (YFP). Im angeregten Zustand überträgt CFP einen Teil seiner Energie strahlungslos auf YFP. FRET kann nur stattfinden, wenn CFP und YFP nicht weiter als maximal 8–10 nm voneinander entfernt sind und kann damit dazu genutzt werden, eine Interaktion zweier Proteine zu untersuchen. Für FRET-Messungen ist es wichtig, dass 2- bis 4-mal mehr YFP-markiertes Protein als CFP-markiertes Protein exprimiert werden. Dies wird erreicht, indem entsprechende Mengen Plasmid-DNA eingesetzt wurden.

Für FRET-Messungen der APP-Konstrukte wurden in der Regel 1,5 µg APP-YFP-kodierende DNA und 0,5 µg APP-CFP-kodierende DNA verwendet. Zur Kompetition der FRET-Effizienz wurde weniger APP-YFP/-CFP-kodierende DNA eingesetzt und die Gesamtmenge von 2 µg DNA mit mock-DNA oder dem Plasmid pCEP4-APP695-N-Myc-C-Flag aufgefüllt.

Die Deckgläschen mit transient transfizierten HEK293-Zellen wurden in einen Teflon-Ring eingespannt und die Zellen in HBS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glukose und 0,2% BSA) gehalten. FRET-Messungen wurden mit einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100 Carl Zeiss, Oberkochen) mit Plan-Apochromat Objektiven, 63x/1.4, durchgeführt. Mit monochromatischem Licht (Xenon-Lampe, Polychrome IV, TILL Photonics) und wurde CFP bei 410 nm und YFP bei 515 nm angeregt. Die emittierten Fluoreszenz-Signale wurden mit einem 475–505 nm Filter für CFP oder einem 535–565 nm Filter für YFP geleitet. Die Filter konnten mit einem motorisierten Filter-Rad (Lambda 10/2, Sutter Instruments) schnell gewechselt werden. Die Fluoreszenz-Signale wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (Imago, TILL Photonics) detektiert. Die FRET-Effizienz wurde mit der Methode des Akzeptor-Photobleichens ermittelt. Dazu wurden zunächst CFP und YFP in Intervallen von 2 sec angeregt und für die Signale für 15 Zyklen verfolgt. Danach wurde YFP schrittweise gebleicht, indem es in 60 Zyklen für jeweils 1,8 sec bei 512 nm angeregt wurde, wobei zwischendurch in Intervallen von 2 sec die Fluoreszenz von YFP und CFP aufgenommen wurde. Gewöhnlich konnte YFP zu 95% gebleicht werden. Die FRET-Effizienz (E) wurde nach der Gleichung  $E = 1 - (F_{DA}/F_D)$  berechnet, wobei  $F_{DA}$  der CFP-Fluoreszenz vor dem Bleichen von YFP und  $F_D$  der Fluoreszenz von CFP in Abwesenheit von YFP entspricht. Der Wert für  $F_D$  wurde aus der

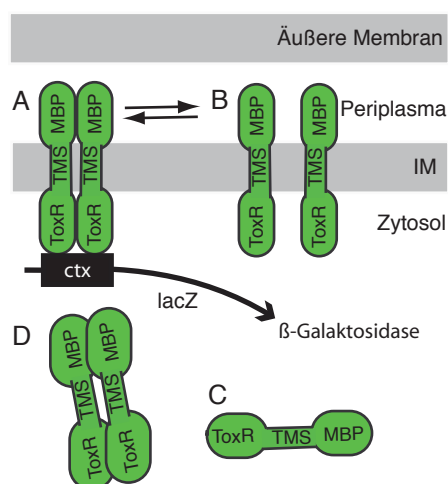
linearen Regressions-Analyse erhalten, in der die Zunahme der CFP-Fluoreszenz über der Abnahme der YFP-Fluoreszenz dargestellt wurde und der Wert der CFP-Fluoreszenz bei null YFP-Fluoreszenz extrapoliert wurde.

## 6.9. ToxR-System

### 6.9.1. Bestimmung der relativen Affinität der Dimerisierung

Zur Untersuchung von dimerisierenden Transmembransequenzen in der Umgebung einer biologischen Membran wurde das ToxR-System entwickelt (Langosch et al., 1996). Dieses experimentelle System ist gegenwärtig die einzige Methode, um sowohl selektiv die Dimerisierung als auch die relative gegenseitige Affinität einer kurzen Transmembransequenz innerhalb einer biologischen Membran nachzuweisen und zu quantifizieren. Dazu werden Fusionsproteine bestehend aus dem periplasmatisch lokalisierten Maltose-bindenden Protein (MBP), der zu untersuchenden Transmembransequenz und dem cytoplasmatisch lokalisierten ToxR-Transkriptionsaktivator-Protein in FHK12-Zellen exprimiert (Abb. 31). Nur über die Transmembransequenz-vermittelte Dimerisierung der chimären Proteine kommt es zur räumlichen Annäherung von zwei ToxR-Domänen, die ausschließlich als Dimer die Expression des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase initiieren können (Abb. 31). Die Menge der so erzeugten  $\beta$ -Galaktosidase konnte durch den Umsatz eines Farbstoff-bildenden Substrats photometrisch bestimmt werden. Die Menge der gebildeten  $\beta$ -Galaktosidase korreliert dabei mit der relativen Stärke der Dimerisierung der Transmembransequenz.

Es wurden jeweils 50 ng Plasmid mittels Elektrotransformation in elektrisch kompetente FHK12-Zellen eingebracht. Die Transformationsansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. In



**Abb. 31: Darstellung des ToxR-Systems.** Chimäre Proteine bestehend aus dem Maltose-bindenden Protein MBP, der zu untersuchenden Transmembransequenz (TMS) und der ToxR-Transkriptionsaktivator Domäne werden in *E. coli* exprimiert. Nur wenn die Chimäre über die TMS dimerisieren (A), kann das Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase aktiviert werden. Monomere können weder in der Membran (B) noch im Zytosol (C) die Reportergen-Transkription initiieren. Um eine Reportergen-Transkription durch Dimere im Zytosol auszuschließen (D), werden die Chimäre in dem MBP-defizienten Stamm PD28 exprimiert (nicht gezeigt), die nur wachsen können, wenn das Protein korrekt in die Membran inseriert wird und die MBP-Defizienz durch die MBP-Domäne des chimären Proteins ausgeglichen wird.

einer 24-„well“ Platte wurden jeweils 1 ml FHK-Medium mit 10 µl des Transformationsansatzes in Vierfachbestimmung angeimpft. Die Platten wurden bei 160 rpm auf einem Schüttelinkubator für 12–16 h bei 37°C inkubiert. Jeweils 10 µl eines 24-„wells“ wurden in eine 96-„well“ Mikrotiterplatte überführt und in 100 µl Z-Puffer/Chloroform aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch eine photometrische Messung bei 620 nm festgestellt. Durch Zugabe von 50 µl Z-Puffer/SDS und 10minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden 50 µl der ONPG-Lösung zugegeben, so dass die gebildete β-Galaktosidase das Substrat ONPG umsetzen konnte. Der Substratumsatz setzt einen gelben Farbstoff frei, welcher photometrisch bei 405 nm verfolgt werden konnte. Je mehr β-Galaktosidase gebildet wurde, umso mehr ONPG wurde über die Zeit umgesetzt. In der Regel wurde der Test bei Erreichen einer Absorption von 1 beendet, spätestens jedoch nach 20 min. Die gemessene β-Galaktosidase Aktivität wurde in „Miller units“ berechnet nach der Gleichung:  $OD_{405\text{ nm}} / (OD_{620\text{ nm}} \times \text{Zeit [min]}) = \text{„Miller units“}$ . Es wurde ein Mittelwert aus der Vierfachbestimmung gebildet. Um einen Mittelwert aus mehreren ToxR-Tests bilden zu können, wurden die „Miller units“ eines Referenzkonstrukts gleich 100% gesetzt und weitere Konstrukte prozentual zum Referenzkonstrukt verglichen.

Zur Überprüfung gleicher Expressionsspiegel der Fusionsproteine wurden jeweils 200 µl der Bakteriensuspension der Vierfachbestimmung vereinigt und die Bakterien abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 µl SDS-Protein-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 95°C gekocht und davon 5 µl auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen.

#### 6.9.2. Kontrolle der Membraninsertion der Fusionsproteine

Bei dem ToxR-System muss sichergestellt werden, dass die Fusionsproteine korrekt in der bakteriellen Membran insertiert werden und nicht im Zytosol der Zellen dimerisieren (Abb 31). Dazu wurden die Fusionsproteine in dem *E. coli*-Stamm PD28 exprimiert, der sich durch eine MBP-Defizienz auszeichnet. Werden transformierte PD28-Zellen in einem Minimalmedium mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle kultiviert, werden diejenigen Transformanten selektioniert, deren MBP des Fusionsproteins in das Periplasma gerichtet ist. Diese zeigen damit die korrekte Lokalisation der Fusionsproteine in *E. coli*-an.

Es wurden jeweils 50 ng der Plasmide in elektrokompetente PD28-Zellen eingebracht und die Zellen über Nacht in 4 ml LB-Medium bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 800 µl PBS aufgenommen. Es wurden

---

in einer 12-,„well“ Platte jeweils 2 ml M9-Minimalmedium mit 20  $\mu$ l der Bakteriensuspension in Dreifachbestimmung angeimpft. Diese Ansätze wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurden 200  $\mu$ l der Ansätze abgenommen und in einer 96-,„well“ Mikrotiterplatte das Zellwachstum durch photometrische Messung bei 620 nm verfolgt.

### 6.10. Molekulares Modell

Es wurden fünf unterschiedliche, nicht-symmetrische Startkonformationen mit identischem Peptidrückgrat, aber zufällig variierender Seitenketten-Konformation generiert. Von jeder Startkonformation wurden 65000 Strukturen durch zufälliges Rotieren der Helices um die Helixachse von 0-360° hergestellt. Die Helices wurden von -2 bis +6 Å um ihr geometrisches Zentrum sowie  $\pm 10$  Å entlang der Helixachse bewegt. Die Helices wurden relativ zur Diadenachse um  $\pm 20^\circ$  gekippt. Eine Dielektrizitätskonstante von 20 wurde verwendet, um die Elektrostatik zu berechnen. Für jede Sorte der Helixbewegung wurde eine unabhängige Energie-Karte erstellt. Dazu wurden mehrere Helixbewegungen in Gruppen zusammengefasst und die Energie mittels Boltzmann-Mittelung berechnet. Aus der Energie-Karte wurden nur symmetrische Konformationen mit einem Energie-Minimum ausgewählt.

### 6.11. Elektronenmikroskopie

A $\beta$ -Peptide wurden mit Ameisensäure gelöst und wieder zur Trockne in der Speed-Vac eingedampft. Dadurch sollten vorgeformte Aggregate wieder aufgelöst werden. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 40  $\mu$ M in 0,2% Essigsäure, pH 3 gelöst und für 78 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 2  $\mu$ l der Proben mit 2%iger Uranylacetat-Lösung gefärbt („negative staining“). Die Aufnahmen wurden mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop bei 100 kV und einer CCD-Kamera (Tietz Video und Image processing Systems GmbH, Gauting) gemacht.

### 6.12. Densitometrische Analysen

Zur Quantifizierung der Intensitäten von Signalen im Western Blot wurde aus Röntgenfilmen von mindestens drei unabhängigen Versuchen die relative optischen Dichte (ROD) der Signale mittels eines Bildanalysesystems (AlphaEase FC Software Version 3.2.1., Alpha Innotech Corporation) bestimmt.

### **6.13. Statistische Analysen**

Statistische Analysen wurden durchgeführt, indem von mindestens 3 unabhängigen Messungen der Mittlere Standardfehler (SEM) berechnet wurde. Die statistische Signifikanz wurde über den Student t-Test ermittelt.