

# **Expression und Charakterisierung von A $\beta$ -Peptiden und deren Spaltung durch die Acylpeptidhydrolase**

## **Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften-

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Anka Thümmler

geb. am 01.09.1980 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter:

Prof. Dr. G. Reuter  
Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth  
Prof. Dr. Dieter Willbold

Datum der Verteidigung: 24.05.2018



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Alzheimer Krankheit .....	1
1.1.1 Tau-Protein-Fibrillen.....	2
1.1.2 Amyloid-Plaques .....	3
1.1.3 APP-Prozessierung.....	3
1.1.4 Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit .....	5
1.1.5 Amyloid-Kaskaden-Hypothese .....	6
1.1.6 Heterogenität der A $\beta$ -Peptide.....	7
1.1.7 Die Rolle der Glutaminylzyklase.....	9
1.1.8 Rekombinante Herstellung von A $\beta$ -Peptiden.....	10
1.1.9 Alzheimer Therapien .....	11
1.1.10 Amyloid-degradierende Enzyme .....	12
1.2 Acylpeptidhydrolase (APH).....	13
1.3 Zielstellung .....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Vektoren.....	17
2.2 Plasmide.....	17
2.3 Verwendete Bakterienstämme .....	18
2.4 Bakterielle Nährmedien .....	18
2.5 Molekularbiologische Standardmethoden .....	18
2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	18
2.5.2 Agarosegelelektrophorese .....	20
2.5.3 Restriktionsverdau und Ligation .....	20
2.5.4 Transformation von <i>E.coli</i> .....	20
2.5.5 Isolierung von rekombinanten Plasmiden.....	21
2.6 Zellbiologische Methoden.....	21
2.6.1 Verwendete Zelllinien .....	21
2.6.2 Kultivierung der Zelllinien .....	21
2.6.3 Plasmidtransfektion von COS-7, HEK293, CHO-Zellen .....	22
2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung von APH in stabil transfizierten CHO-Zellen .....	23
2.6.5 Baculovirus-System.....	23
2.6.6 Quantitative PCR (qRT-PCR).....	24
2.7 Proteinbiochemische Methoden .....	25
2.7.1 Expressionsanalyse in <i>E.coli</i> .....	25
2.7.2 Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisation .....	26
2.7.3 Proteinreinigung .....	27
2.7.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.7.5 <i>Western Blot</i> -Analyse.....	34
2.7.6 UV/VIS Spektroskopie.....	36
2.7.7 Konzentrationsbestimmung nach der Bradford Methode .....	36

2.8	Enzymatische Methoden .....	37
2.8.1	Fluoreszenzgekoppelter Aktivitätstest und Bestimmung kinetischer Parameter .....	37
2.9	Analytische Methoden .....	38
2.9.1	HPLC .....	38
2.9.2	MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	38
2.9.3	ELISA .....	39
2.9.4	Thioflavin-T (Th-T) – Assay .....	40
2.9.5	Transmissions Elektronenmikroskopie .....	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1	Acylpeptidhydrolase (APH) .....	41
3.1.1	Rekombinante Expression der APH in CHO-Zellen .....	41
3.1.2	Rekombinante Expression der APH in Sf21 Zellen .....	43
3.1.3	Rekombinante Expression der APH in HighFive™-Zellen .....	46
3.1.4	Rekombinante Expression der APH in <i>E.coli</i> -Zellen .....	47
3.2	Rekombinante Expression von A $\beta$ -Peptiden in <i>E.coli</i> .....	50
3.2.1	Rekombinante Expression von A $\beta$ -Peptiden mit dem Champion™ pET-SUMO Expressionssystem .....	50
3.2.2	Rekombinante Expression von A $\beta$ -Peptiden mit dem (NANP) <sub>19</sub> -Expressionssystem .....	56
3.3	Untersuchungen an APH und A $\beta$ .....	64
3.3.1	Spaltung von A $\beta$ -Peptiden durch APH .....	64
3.3.2	Gewebelokalisation der APH .....	66
3.3.3	Überexpression von APP und APH in HEK293 Zellen .....	67
3.4	Vergleichende Untersuchungen an synthetisch und rekombinant hergestellten A $\beta$ -Peptiden .....	69
3.4.1	Vergleich des Aggregationsverhaltens: Thioflavin-T-Assay .....	69
3.4.2	Untersuchung der Fibrillen Morphologie der A $\beta$ -Peptide mittels Transmissionselektronenmikroskopie .....	71
3.4.3	BrdU Zell-Proliferationsassay .....	74
3.5	Untersuchung des Einflusses der pE-Modifikation auf die fibrilläre Peptidkonformation von A $\beta$ mittels NMR-Spektroskopie .....	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1	Rekombinante Expression der Acylpeptidhydrolase (APH) .....	78
4.2	Rekombinante Expression der A $\beta$ -Peptide .....	82
4.3	APH als A $\beta$ -spaltendes Enzym .....	85
4.3.1	Spaltung von A $\beta$ -Peptiden durch APH .....	85
4.3.2	APH Expression in der Alzheimer Erkrankung .....	87
4.3.3	Einfluss der APH auf APP in HEK293 Zellen .....	89
4.4	Vergleichende Untersuchungen von synthetisch und rekombinant hergestellten A $\beta$ -Peptiden: Aggregationsuntersuchungen und Elektronenmikroskopie .....	90
4.5	Untersuchung des Einflusses der pE-Modifikation auf die fibrilläre Peptidkonformation von A $\beta$ mittels NMR-Spektroskopie .....	92
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>120</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>122</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung	mQC	Murine Glutaminylzyklase
A $\beta$	Amyloid $\beta$	mRNA	<i>messenger RNA</i>
AD	Alzheimer Demenz	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Ac-Ala-AMC	N-Acetyl-alanyl-AMC	OD	Optische Dichte
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
AP	Alkalische Phosphatase	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
APH	Acylpeptidhydrolase	pE	Pyroglutamat
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>	Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
APS	Ammoniumpersulfat	pfu	<i>Plaque-forming units</i>
bp	Basenpaare	pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin	QC	Glutaminylzyklase
BSA	Rinder-Serum-Albumin	RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
bzw.	beziehungsweise	rpm	Umdrehungen pro Minute
°C	Grad Celsius	RT	Raumtemperatur
ca.	zirka	s	Sekunde
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	sw	<i>Swedish (Mutation APP)</i>
CV	<i>Column volume</i> (Säulenvolumen)	Red-X	Rhodamin Red-X Antikörper
Da	Dalton	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	Tab.	Tabelle
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
DMF	Dimethylformamid	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	U	<i>Units</i> (Einheiten) in $\mu\text{M}/\text{min}$
DNA	Desribonukleinsäure	u.a.	unter anderem
dNTP	Desribonukleosidtriphosphat	UV	Ultraviolett
DTT	Dithiothreitol	VIS	Sichtbares Licht
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	v/v	Volumen pro Volumen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	WB	<i>Western Blot</i>
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>	w/v	Masse je Volumen
ESI	Elektrospray-Ionisation	wt	Wildtyp
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere	w/w	Gewicht pro Gewicht
FBS	Fötales Kälberserum	z.B.	zum Beispiel
g	Gravitationskonstante		
GOI	Gene of interest		
h	Stunde		
H	<i>Heavy Chain</i> – schwere Antikörperkette		
His <sub>6</sub>	6 x Histidin		
hQC	Humane Glutaminylzyklase		
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>		
i.a.	Im allgemeinen		
IF	Immunofluoreszenz		
k	Kilo		
L	<i>Light Chain</i> – Leichte Antikörper-Kette		
LB-Medium	Luria-Bertani Medium		
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung		
min	Minute		
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>		

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Neuropathologische Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung .....	2
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins .....	4
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese .....	7
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- und Glutamylresten .....	9
Abbildung 3-1: APH Expression in CHO-Zellen .....	42
Abbildung 3-2: APH-Aktivität im Überstand transfizierter Sf21 Zellen und untransfizierter Sf21 Zellen .....	44
Abbildung 3-3: SDS PAGE und Western Blot-Analyse gereinigter APH .....	45
Abbildung 3-4: APH-Expression in Sf21 Zellen unter Verwendung verschiedener Zusätze .....	46
Abbildung 3-5: APH Expression in HighFive Zellen .....	47
Abbildung 3-6: APH Expression in <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) Zellen .....	48
Abbildung 3-7: Reinigung APH aus <i>E.coli</i> .....	49
Abbildung 3-8: Reinigung der scULP aus <i>E.coli</i> .....	52
Abbildung 3-9: Reinigung des Fusionsproteins SUMO-A $\beta$ 40 aus <i>E.coli</i> und anschließende Spaltung .....	53
Abbildung 3-10: Abtrennung des A $\beta$ 40-Peptids vom SUMO-Fusionspartner .....	55
Abbildung 3-11: Schematische Darstellung des Fusionsproteins (NANP) <sub>19</sub> -A $\beta$ .....	56
Abbildung 3-12: Reinigung der TEV-Protease aus <i>E.coli</i> .....	57
Abbildung 3-13: Reinigung und Spaltung des Fusionsproteins (NANP) <sub>19</sub> -A $\beta$ 42 aus <i>E.coli</i> .....	58
Abbildung 3-14: Analytische Reinigung des Peptids pE3-A $\beta$ 40 .....	60
Abbildung 3-15: Präparative Reinigung des Peptids pE3-A $\beta$ 40 .....	61
Abbildung 3-16: Präparative Reinigung von <sup>15</sup> N markiertem pE3-A $\beta$ 40 aus Minimalmedium .....	63
Abbildung 3-17: Untersuchung des möglichen Abbaus von A $\beta$ -Peptiden durch rekombinante APH mittels Maldi-TOF-MS .....	65
Abbildung 3-18: Untersuchung des Abbaus von A $\beta$ -Peptiden durch kommerziell erhältliche APH (Takara) mittels Maldi-TOF-MS .....	66
Abbildung 3-19: Untersuchung der relativen APH Transkriptmenge .....	67
Abbildung 3-20: ELISA-Untersuchung zur Bestimmung des A $\beta$ -Gehaltes bei der Co-Transfektion von APH mit verschiedenen APP Varianten in HEK293 Zellen .....	68
Abbildung 3-21: Thioflavin-T-Fluoreszenzuntersuchung der Aggregationskinetik von rekombinanten und synthetischen A $\beta$ -Peptiden .....	70
Abbildung 3-22: Transmissions-Elektronenmikroskopie verschiedener A $\beta$ (x-42)-Peptide .....	72
Abbildung 3-23: Transmissions-Elektronenmikroskopie verschiedener A $\beta$ (x-40)-Peptide .....	73
Abbildung 3-24: BrdU Assay: Einfluss von A $\beta$ 42-Oligomeren auf die Proliferation kortikaler Neuronen .....	75
Abbildung 3-25: NMR-Strukturuntersuchungen des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs von <sup>15</sup> N-markierten A $\beta$ -Peptid-Varianten .....	77

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2-1: Verwendete Vektoren.....	17
Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide .....	17
Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme .....	18
Tabelle 2-4: Zusammensetzung von Standard-PCR Reaktionen.....	19
Tabelle 2-5: Exemplarisches Temperaturprogramm für eine Polymerase-Kettenreaktion .....	19
Tabelle 2-6: Ansatz zur Ligation des DNA-Fragmentes in den Zielvektor .....	20
Tabelle 2-7: Verwendete Zelllinien (Life Technologies) .....	21
Tabelle 2-8: Primer der qRT-PCR.....	25
Tabelle 2-9: Rekombinante Expression in <i>E.coli</i> : Verwendete Plasmide und Expressionsbedingungen .....	26
Tabelle 2-10: Reinigung der Acylpeptidhydrolase aus Sf21 Zellen .....	28
Tabelle 2-11: Reinigung der rekombinanten Acylpeptidhydrolase aus <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) .....	28
Tabelle 2-12: Reinigung der rekombinanten scULP aus <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) .....	30
Tabelle 2-13: Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins SUMO-A $\beta$ 40 aus <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) .....	31
Tabelle 2-14: Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins (NANP) <sub>19</sub> -A $\beta$ aus <i>E.coli</i> BL21 .....	32
Tabelle 2-15: Reinigung der rekombinanten TEV-Protease <i>E.coli</i> BL21 (DE3) .....	33
Tabelle 2-16: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels .....	34
Tabelle 2-17: Für <i>Western Blot</i> -Analysen verwendete Puffer .....	35
Tabelle 2-18: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der verwendeten Proteine und Peptide .....	36



# 1. Einleitung

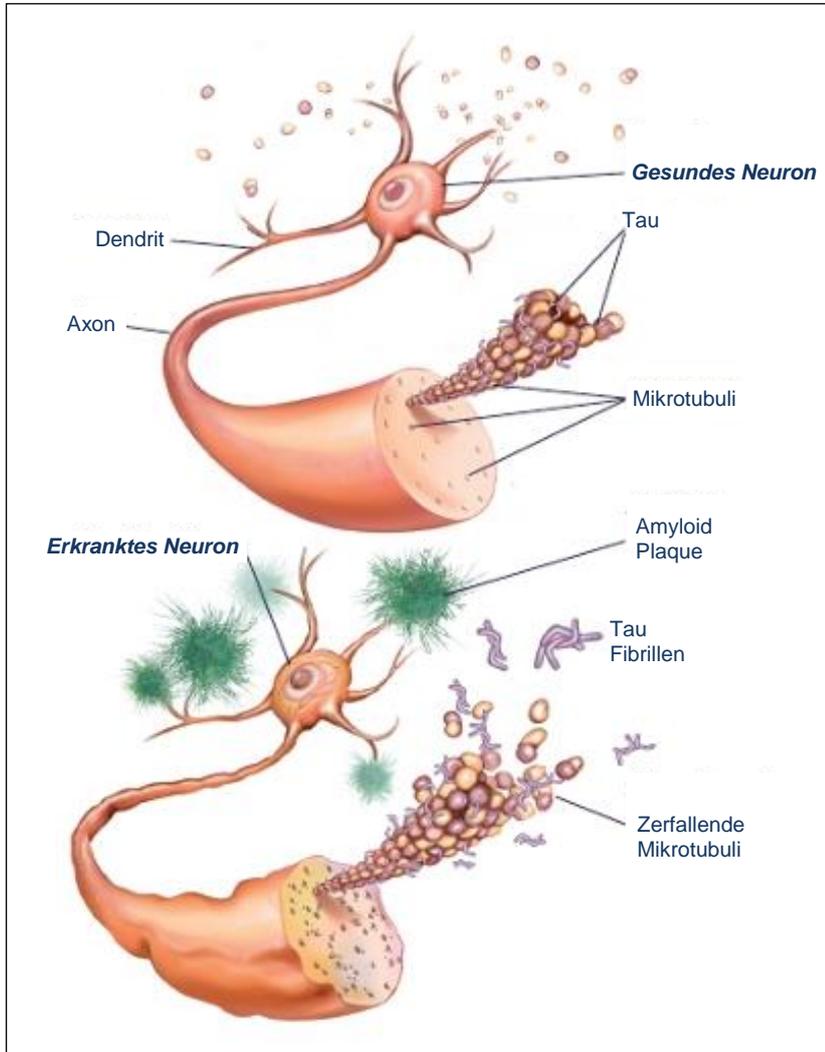
## 1.1 Alzheimer Krankheit

In Deutschland leben ca. 1,2 Millionen Patienten, die von einer Demenzerkrankung betroffen sind. Medizinisch versteht man unter einer Demenz die fortschreitende Erkrankung des Gehirns, bei der eine Minderung des Gedächtnisses, der Intelligenz, der Orientierung, der Urteilskraft und der Auffassungsgabe auftritt. Die Alzheimer Krankheit stellt die häufigste Form der Demenz dar und wurde erstmals 1906 von Alois Alzheimer beschrieben. Das Risiko einer Alzheimer Erkrankung erhöht sich mit zunehmendem Alter. Vor allem Menschen von über 60 Jahren sind von der Krankheit betroffen, und aufgrund der steigenden Lebenserwartung ist in den nächsten Jahren eine weitere Verbreitung der Erkrankung zu erwarten. Die Alzheimer Demenz (AD) ist gekennzeichnet durch den zunehmenden Verlust von cholinergen Nervenzellen und den damit verbundenen Mangel an Acetylcholin. Dies hat Auswirkungen auf die geistige Leistungsfähigkeit der Betroffenen, wobei kontinuierlich fortschreitende kognitive Störungen spezifisch für die Krankheit sind. Dabei treten unter anderem Symptome wie Vergesslichkeit und zeitliche bzw. räumliche Orientierungslosigkeit auf, sowie Störungen der Sprache und des Denkvermögens.

Es werden drei Stadien der Alzheimer-Demenz unterschieden: Das Prä-Demenz-Stadium, das Früh-/Mittelstadium und die fortgeschrittene Demenz. Das Prä-Demenz-Stadium beginnt zum Teil Jahre vor einer diagnostizierbaren Demenz und äußert sich nicht nur durch Gedächtnisstörungen, sondern auch durch unspezifische Symptome wie Depressionen oder Sprachverständnisstörungen (Linn *et al.* 1995). Im Früh- und Mittelstadium kommt es bei den meisten Alzheimer-Patienten zur Diagnosestellung, da Lernprozesse und das Kurzzeitgedächtnis eingeschränkt sind. Kommunikation und emotionales Erleben sind hiervon nicht immer mitbetroffen (Carlesimo und Oscar-Berman 1992; Jelicic *et al.* 1995). An das Früh- und Mittelstadium schließt sich die fortgeschrittene Demenz an, in der die Patienten nahestehende Personen nicht mehr wiedererkennen und alltägliche Fertigkeiten verlernen. Hinzu kommen vegetative Probleme wie Muskulaturabbau, Inkontinenz und eine zunehmende Immobilität. In diesem Stadium sind die Patienten vollkommen auf fremde Hilfe angewiesen und benötigen intensive Betreuung, da tägliche Routineaufgaben wie Nahrungsaufnahme und Hygiene unmöglich werden.

Neuropathologisch ist die Krankheit durch eine Gehirnatrophie des Kortex, besonders in frontalen, parietalen und temporalen Bereichen gekennzeichnet. Das Vorhandensein extrazellulärer Plaques aus  $\beta$ -Amyloiden, sowie intrazellulärer Neurofibrillenbündel aus inkorrekt phosphoryliertem Tau-Protein stellen die wichtigsten pathologischen Merkmale dar (Braak & Braak, 1991, Selkoe, 2001) (Abbildung 1-1). Die Akkumulierung von A $\beta$ -Peptiden

und hyperphosphorylierten Tau-Proteinen führt zu entzündlichen Prozessen und oxidativen Schäden, welche in synaptischen Fehlfunktionen und dem Verlust von Neuronen resultieren (Querfurth & LaFerla, 2010).



**Abbildung 1-1:**  
**Neuropathologische Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung, Vergleich eines gesunden und eines erkrankten Neurons:** Im gesunden Neuron liegen Tau Proteine Mikrotubuli-assoziiert vor spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilität des Cytoskeletts sowie dem vesikulären Transport. Im erkrankten Neuron assoziieren die hyperphosphorylierten Tau-proteine zu unlöslichen Fibrillen wodurch keine Mikrotubuli-Bindung mehr vorliegt. Diese verlieren dadurch ihre Stabilität und zerfallen. Des Weiteren sind erkrankte Neuronen durch extrazelluläre Amyloide Plaques gekennzeichnet, bestehend aus akkumulierten A $\beta$ -Peptiden. (Abbildung modifiziert: <https://www.Alzheimer-Forschung.de>)

### 1.1.1 Tau-Protein-Fibrillen

In gesunden Neuronen liegen Tau-Proteine in den Axonen Mikrotubuli-assoziiert vor und gewährleisten die Stabilität des Cytoskeletts, den vesikulären Transport und somit die neuronale Funktion. Durch Kinasen hyperphosphoryliertes Tau-Protein hingegen lagert sich zu unlöslichen paarigen Helices zusammen, wodurch es die Affinität zu den Mikrotubuli verliert (Illenberger *et al.* 1998). Dies führt zum Stabilitätsverlust und Zerfall der Mikrotubuli, was die betroffenen Neuronen in ihrer Funktion stark einschränkt und schließlich zur Degeneration führen kann (Iqbal *et al.* 2005). Neurofibrilläre Ablagerungen können nicht nur bei AD-Patienten nachgewiesen werden, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, welche als Tauopathien bezeichnet werden (Lee *et al.* 2001).

### 1.1.2 Amyloid-Plaques

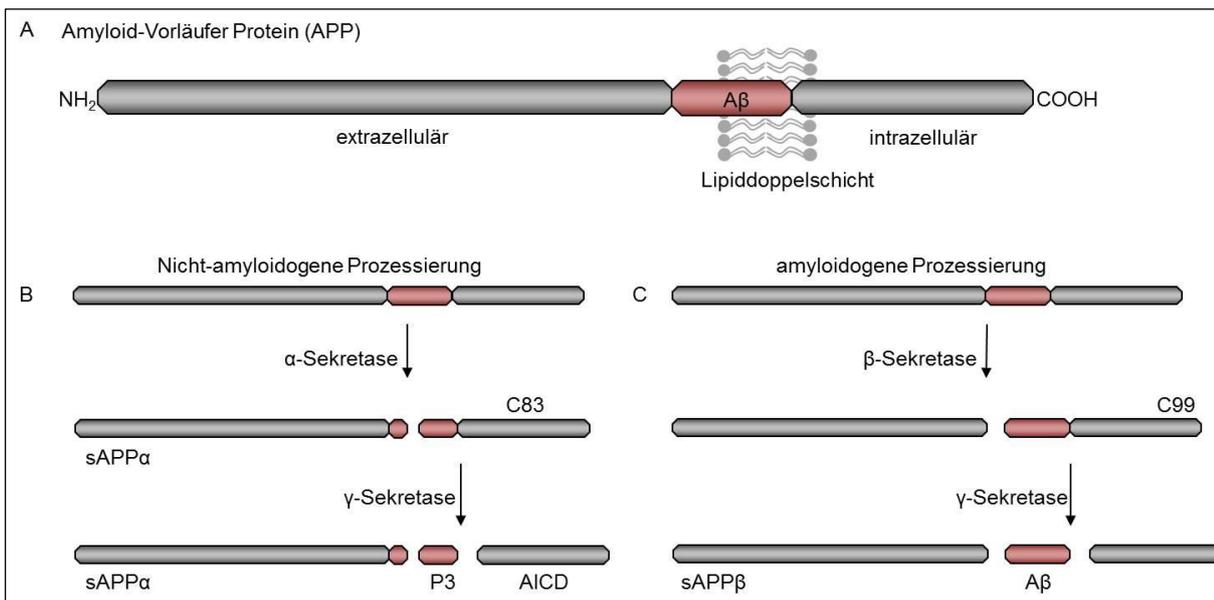
Ein weiteres Kennzeichen der Alzheimer Krankheit sind Amyloide Plaques, bestehend aus akkumulierten A $\beta$ -Peptiden. In gesunden Menschen ist A $\beta$  ein Produkt des neuronalen Zell-Metabolismus und Bestandteil des Plasmas und Liquors. Besteht jedoch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau von A $\beta$ -Peptiden, führt dies zu einer abnormalen und erhöhten Akkumulation von A $\beta$ , was nach der Theorie der Amyloid-Kaskade als Hauptereignis für die Neurotoxizität und die extrazelluläre Ablagerung von  $\beta$ -amyloiden Fibrillen im Gehirn angesehen (Hardy & Selkoe, 2002).

### 1.1.3 APP-Prozessierung

A $\beta$ -Peptide werden durch die enzymatische Spaltung des transmembranen Amyloidvorläuferproteins APP (*Amyloid Precursor Protein*) freigesetzt, welches insbesondere in neuronalen Zellen gebildet wird. Durch alternatives Spleißen entstehen aus dem APP Transkript 8 verschiedene Isoformen, wobei die drei häufigsten eine Größe von 695, 751 bzw. 770 Aminosäuren aufweisen. APP695 stellt die Hauptisoform im humanen ZNS dar (Bayer *et al.* 1999). APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein, dessen größerer Amino-terminaler Bereich außerhalb der Zelle liegt (Ektodomäne), während sich der Carboxy-Terminus innerhalb der Zelle befindet (intrazelluläre Domäne). Der Bereich, der später das A $\beta$ -Peptid bildet (A $\beta$ -Domäne), liegt sowohl in der Ektodomäne als auch in der Zellmembran (Abbildung 1-2). Durch Sekretasen wird das APP proteolytisch gespalten, wodurch es zur Freisetzung des A $\beta$ -Peptids kommen kann. APP kann auf zwei verschiedene Arten prozessiert werden (Abbildung 1-2): den Amyloidogenen und den Nichtamyloidogenen Weg. Bei beiden wird das APP in zwei Schritten durch Sekretasen gespalten, wobei sich nur der erste Schritt unterscheidet. Beim nicht-amyloidogenen Weg spaltet die  $\alpha$ -Sekretase (ADAM 10, ADAM17/TACE) das APP innerhalb der A $\beta$ -Domäne zwischen den Aminosäuren 16 und 17, was zur Freisetzung des löslichen APP-Fragments sAPP $\alpha$  führt. Da die amyloidogene Prozessierung von APP dabei verhindert wird, kann sAPP $\alpha$  eine neuroprotektive Wirkung zugewiesen werden (Selkoe, 2001; Esler und Wolfe, 2001). Im zweiten Schritt spaltet ein als  $\gamma$ -Sekretase bezeichneter Enzymkomplex, der aus den vier Komponenten Präsenilin, Nicastrin, APH-1 (*anterior pharynx defective 1*) und PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) besteht (Wolfe, 2008), den in der Transmembranregion verbliebenen Anteil des APP. Dabei wird das sezernierte Peptid P3 freigesetzt, dem eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird, sowie ein intrazellulär verbleibendes Fragment, das AICD (*amyloid intracellular domain*) (Haass und Selkoe 1993). AICD wird anschließend über das Zytoplasma zum Kern transportiert, wo es als Transkriptionsaktivator fungiert (Esler und Wolfe, 2001). Die Rolle des AICD in der Alzheimer Erkrankung ist Gegenstand der aktuellen Forschung. So beschreiben Ceglia *et al.*, dass AICD die A $\beta$ -Bildung reduziert, indem es das Gen für WAVE1

reguliert. WAVE1 ist ein Protein, welches für den Transport des APP vom Golgi-System zur Zellmembran notwendig ist. AICD unterdrückt die Bildung von WAVE1, wodurch der Transport von APP zur Zellmembran verringert wird damit weniger A $\beta$  freigesetzt werden kann (Ceglia *et al.* 2015). AICD wird in der Literatur ebenfalls als möglicher Transkriptionsregulator für die A $\beta$ -spaltende Metalloprotease Nephrilysin diskutiert (Belyaev *et al.* 2009, Grimm *et al.* 2013).

Im Amyloidogenen Weg führt die Spaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase und die  $\gamma$ -Sekretase zur Freisetzung von A $\beta$ -Peptiden mit einer Länge von vorwiegend 40 (A $\beta$ 40) oder 42 (A $\beta$ 42) Aminosäuren. Die Aspartatprotease BACE I (*beta-site APP cleaving enzyme I*) wurde dabei als ein Enzym mit  $\beta$ -Sekretase-Aktivität charakterisiert und generiert den N-Terminus von A $\beta$  (Vassar *et al.* 1999). Die Spaltung erfolgt zwischen den Aminosäuren 596 und 597 des APP, wodurch das lösliche APP $\beta$  (sAPP $\beta$ ) entsteht. Die C-terminale Domäne verbleibt in der Membran und wird  $\beta$ -C-terminales Fragment ( $\beta$ CTF, C99) genannt. Die Freisetzung von A $\beta$  aus dem C99 wird wiederum durch die  $\gamma$ -Sekretase vermittelt. Dabei entstehen hauptsächlich zwei Formen von A $\beta$  mit einer Länge von 40 beziehungsweise 42 Aminosäuren.



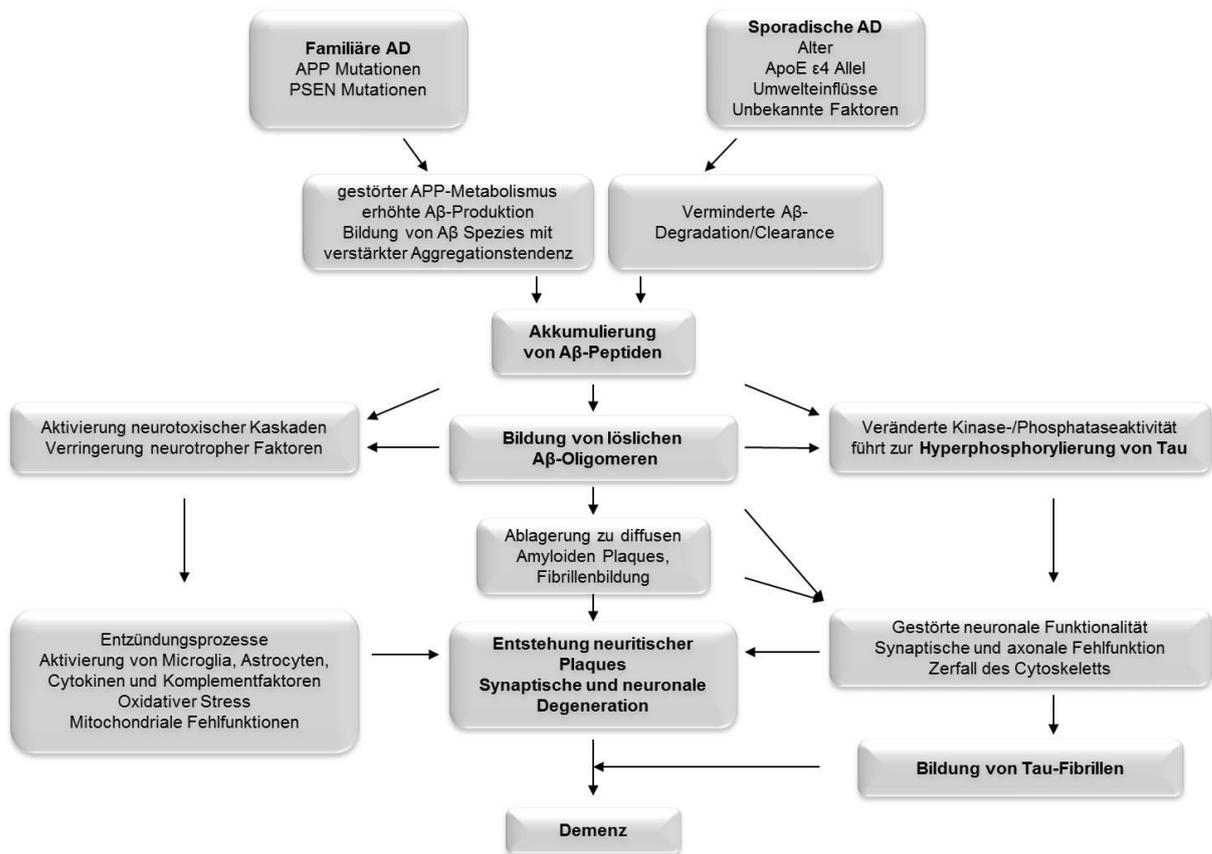
**Abbildung 1-2**  
**Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins (APP).**  
**A)** APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer größeren N-terminalen extrazellulären Domäne und einer Carboxy-terminalen intrazellulären Domäne.  
**B)** Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird durch die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung des APP lösliches sAPP $\alpha$  gebildet. Ebenfalls entstehen bei der Spaltung das sezernierte Peptid P3 und eine intrazellulär verbleibende Domäne.  
**C)** Bei der Amyloidogenen Prozessierung kommt es bei der APP Spaltung durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase zur Entstehung amyloidogener Peptide (A $\beta$ -Peptide) mit einer Länge von vorwiegend 40-42 Aminosäuren.  
 (Abbildung modifiziert nach Bayer & Wirths, 2008)

### 1.1.4 Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit

Es werden zwei Arten der Alzheimer-Erkrankung unterschieden: die sporadische und die familiäre (vererbare) Form der Alzheimer-Krankheit. Mutationen im APP bzw. in den Präsenilin Genen gelten bei der familiär vererbaren Alzheimer Form als Ausgangspunkt für ein frühes Auftreten der Krankheit (Kumar-Singh *et al.* 2000; Wolfe 2007). Die meisten bekannten APP Mutationen befinden sich in der Nähe der Sekretase-Spaltstellen und führen zu einer Überproduktion von A $\beta$ -Peptiden oder in der Generierung von A $\beta$ -Spezies mit erhöhter Aggregationsneigung. Die Doppelmutation KM596/596NL beispielsweise liegt innerhalb der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle des Amyloidvorläuferproteins und wird als Schwedische Mutation (APP-SW) bezeichnet. Sie resultiert in einer erhöhten Spaltaktivität der  $\beta$ -Sekretase, was eine verstärkte A $\beta$ -Entstehung zur Folge hat (Selkoe, 2001). Die London Mutation V642I liegt dagegen C-terminal der  $\gamma$ -Sekretasespaltstelle und führt zu einer verstärkten Bildung von A $\beta$ 42 (Eckmann *et al.* 1997). Die familiär vererbaren, früh beginnenden Alzheimer Formen, die vor dem 65. Lebensjahr auftreten, stellen nur einen Bruchteil der Gesamtzahl an Erkrankungen dar. Eine weitaus größere Rolle spielen die in späterem Lebensalter (65 Jahre und älter) auftretenden sporadischen Formen, welche 95% der Alzheimer Patienten betreffen (Bayer & Wirths, 2010). Bei der sporadischen Alzheimer Form sind außer dem hohen Lebensalter auch Risikofaktoren wie z.B. Bluthochdruck und Übergewicht bekannt. Als einziger bisher bekannter genetischer Risikofaktor für die sporadische Variante gilt das  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein-E (ApoE)-Gens auf dem Chromosom 19. ApoE ist als Plasmaprotein in den Cholesterol-Transport und Fettstoffwechsel involviert. In Menschen treten drei wichtige ApoE-Allele auf: ApoE  $\epsilon$ 2, ApoE  $\epsilon$ 3 und ApoE  $\epsilon$ 4 (Nickerson *et al.* 2000). ApoE  $\epsilon$ 3 tritt bei etwa 75% der europäischen Bevölkerung auf und wird als der neutrale ApoE-Genotyp bezeichnet (Zannis *et al.* 1993). Das Allel  $\epsilon$ 2 kommt mit 8% selten vor und spielt eine Rolle bei der Erbkrankheit Typ-III-Hyperlipoproteinämie und sowohl bei erhöhtem als auch bei vermindertem Risiko für Atherosklerose. Diesem Allel wird jedoch ebenfalls eine protektive Wirkung und ein vermindertes Risiko für eine Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben, wenn der Genotyp  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3 auftritt (Farrer *et al.* 1997, Karren *et al.* 2011). Der Besitz des ApoE  $\epsilon$ 4 Allels, was ca. 15% der europäischen Bevölkerung betrifft, wird mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, früher an Alzheimer zu erkranken, in Verbindung gebracht (Corder *et al.* 1993). Als Ursache vermutet man dabei unter anderem eine verstärkte Amyloid-Fibrillenbildung und Neuritendegeneration (Holtzmann *et al.* 2000). Etwa 60% der Patienten mit klinisch diagnostizierter Alzheimer Krankheit sind ApoE  $\epsilon$ 4-Träger.

### 1.1.5 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die ursprüngliche Amyloid-Hypothese der Alzheimer Krankheit geht von einer zentralen Rolle des A $\beta$ -Peptids in der pathologischen Kaskade aus, dem weitere neuropathologische Veränderungen, wie die Bildung von neurofibrillären Bündeln, nachgeschaltet sind (Hardy and Allsop 1991). Es wurde postuliert, dass das Krankheitsauslösende Ereignis die extrazelluläre Aggregation von A $\beta$ -Peptiden zu amyloiden Plaques sei, die durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau von A $\beta$ -Peptiden hervorgerufen wird und über Dysfunktion von Nervenzellen und Synapsen, Nervenzellverlust, sowie einer Atrophie spezieller Hirnregionen zur Ausprägung der Alzheimer Demenz mit ihren typischen klinischen Symptomen führt. Mit dieser Hypothese ist beispielsweise vereinbar, dass Tau-Pathologien allein nicht zu Alzheimer-spezifischen Symptomen führen. Spätere Forschungsergebnisse führten zu einer Überarbeitung der Amyloid-Hypothese. Es hatte sich gezeigt, dass die Anzahl extrazellulärer A $\beta$ -Plaques schlecht mit dem Neuronenuntergang (Casas *et al.* 2004) und dem Verlust kognitiver Fähigkeiten korrelieren (McLean *et al.* 1999). Neuere Forschungen gehen davon aus, dass intrazelluläre lösliche A $\beta$ -Peptide und kleinere Aggregate, sogenannte A $\beta$ -Oligomere, eine zentrale Rolle in der pathologischen Kaskade einnehmen (Wirhth *et al.* 2004). Demzufolge gehen der extrazellulären Plaque-Pathologie erhöhte Spiegel an intrazellulären A $\beta$ -Peptiden voraus, was insbesondere in einer vermehrten Akkumulation der schlechter sekretierbaren und toxischeren A $\beta$ 42-Varianten resultiert. Dies führt ebenfalls zu synaptischer und neuronaler Dysfunktion und den weiteren pathologischen Veränderungen, die bereits in der klassischen Amyloid-Hypothese beschrieben wurden (Bayer und Wirhth, 2009).



**Abbildung 1-3**  
**Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese**

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese geht von einer zentralen Rolle des A $\beta$ -Peptids und einem Ungleichgewicht zwischen dessen Produktion und Abbau in der Alzheimer-Pathogenese aus. Bei der familiären Alzheimer Form führt ein gestörter APP-Metabolismus zu erhöhter A $\beta$ -Produktion. Bei der sporadischen Alzheimer Form gelten fortgeschrittenes Lebensalter sowie das Vorhandensein des ApoE  $\epsilon$ 4 Allels als Hauptrisikofaktoren, die zu einer Alzheimer Demenz führen können. Die Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden führt zur Bildung löslicher Oligomere, denen Fibrillenbildung und das Entstehen diffuser Plaques und später neuritischer Plaques folgt. Es wird postuliert, dass A $\beta$ -Oligomere ebenfalls zu gestörter neuronaler Funktionalität führen und Entzündungsprozesse hervorrufen, die in neuronaler Degeneration und Mangel an Neurotransmittern führen.

Die Tau Pathologie wird als ein nachfolgendes Ereignis betrachtet, wobei durch A $\beta$ -Akkumulation Kinase- und Phosphataseaktivitäten modifiziert werden, die zur Hyperphosphorylierung von Tau und Bildung neurofibrillärer Bündel führen. (Abbildung modifiziert nach Forlenza *et al.* 2010, Blennow *et al.* 2010 und 2015)

### 1.1.6 Heterogenität der A $\beta$ -Peptide

Innerhalb der Amyloid-Ablagerungen in den senilen Plaques konnten verschiedene A $\beta$ -Formen identifiziert werden. Diese Heterogenität zeigt sich schon bei der APP-Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase, die den C-Terminus des Peptids definiert, was zur Entstehung von A $\beta$ 40 bzw. A $\beta$ 42 führt. A $\beta$ 42 weist im Vergleich zu A $\beta$ 40 zwei zusätzliche hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus auf. Dadurch ist die Aggregationsneigung sowie die Neurotoxizität von A $\beta$ 42 höher als die des A $\beta$ 40. Deswegen wird A $\beta$ 42 als die stärker amyloidogene Spezies angesehen und spielt eine größere Rolle in der Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit, obwohl sie *in vivo* 10fach geringer konzentriert als A $\beta$ 40 vorkommt (Irie *et al.* 2005). Zusätzlich treten N-terminal heterogene Spezies zum Beispiel durch die alternative BACE I Spaltstelle auf, wodurch neben A $\beta$ 40/42 auch A $\beta$ (11-40/42) entstehen kann. Weitere N-terminal verkürzte Formen, die aus einer Spaltung des APP hervorgehen können, sind beispielsweise A $\beta$ (2-40/42) und A $\beta$ (3-40/42). Es wird vermutet, dass diese

Spezies durch die kombinierte Aktivität von BACE I und der Aminopeptidase A freigesetzt werden (Wiltfang *et al.* 2001; Sevalle *et al.* 2009). Generell zeigen die verkürzten A $\beta$ -Peptide eine erhöhte Aggregationsneigung im Vergleich zu A $\beta$ 40/42 (Pike *et al.* 1995; He & Barrow, 1999; Schilling *et al.* 2006).

In den Plaques treten ebenfalls N-terminale posttranslationale Modifikationen der A $\beta$ -Peptide auf. Dazu zählt die spontane, nicht-enzymatische Isomerisierung von Aspartat zu Isoaspartat (isoAsp) an den Positionen 1, 7 und 23. Diese strukturell veränderten A $\beta$ -Peptide zeigten in *in-vitro*-Experimenten eine erhöhte Tendenz zur  $\beta$ -Faltblatt- (Fabian *et al.* 1994) und Aggregatbildung (Fukuda *et al.* 1999), sowie eine verringerte Löslichkeit und verstärkte Resistenz gegenüber enzymatischer Degradierung (Fonseca *et al.* 1999).

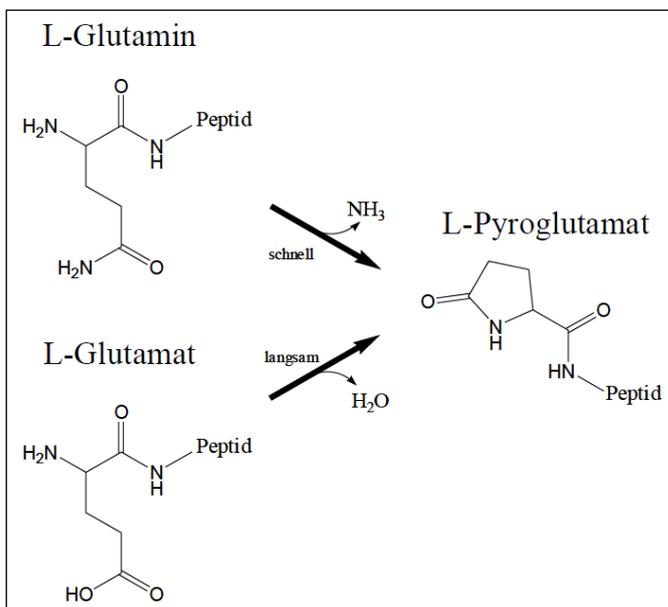
Zusätzlich kann die Bildung von Pyroglutamat (pE) bei N-terminal verkürztem A $\beta$  an den Positionen 3 oder 11 stattfinden (Roher *et al.* 1993, Saido *et al.* 1995). Die pE-Modifikation entsteht durch die Zyklisierung von N-terminalem Glutamat, welche von dem Enzym Glutaminylzyklase (QC) katalysiert wird (Schilling *et al.* 2004, Cynis *et al.* 2008).

Die Pyroglutamat-Modifikation hat einen Einfluss auf die pH-abhängige Löslichkeit, Aggregationsneigung und Fibrillenmorphologie (Schilling *et al.* 2006, Schlenzig *et al.* 2009). Die pE-Modifikation schützt die Peptide vor dem proteolytischen Abbau durch Aminopeptidasen und geht mit einem N-terminalen Ladungsverlust einher, weshalb pE3-A $\beta$ 40/42 hydrophober als A $\beta$ 40/42 ist. Die daraus resultierende geringere Löslichkeit von pE-A $\beta$  im physiologischen pH-Bereich führt zu einer erhöhten Aggregationsneigung (Schlenzig *et al.* 2009). Die Bildung der Aggregate ist hierbei bis um das 250fache gegenüber A $\beta$ 40/42 beschleunigt (Schilling *et al.* 2006). Die pGlu-Modifikation führt zu einer schnelleren Bildung von Oligomeren und kurzen fibrillären Aggregaten. Des Weiteren zeigen die pE-Abeta-Peptide eine erhöhte Neurotoxizität in neuronalen und glialen Zellkultur-Experimenten (Russo *et al.* 2002). In LTP Experimenten (*hippocampal long term potentiation of synaptic response*) wurde außerdem gezeigt, dass sich pE-modifiziertes A $\beta$  negativ auf die synaptische Funktion auswirkt, während der Einfluss anderer A $\beta$ -Spezies auf die LTP nicht signifikant oder nur mit höheren Konzentrationen nachweisbar war (Schlenzig *et al.* 2012).

Post-mortem Analysen neuritischer Plaques von Alzheimer Patienten zeigten, dass N-terminal verkürzte A $\beta$ -Peptide und dabei im Besonderen pE-modifizierte A $\beta$ -Peptide den Hauptanteil der A $\beta$ -Spezies bilden (Saido *et al.* 1996). Bis zu 45 % der Gesamtheit der A $\beta$ -Peptide tragen dabei einen N-terminalen pyro-Glutamatrest (Wu *et al.* 2014). Zudem gibt es Hinweise, dass pE3-A $\beta$ 42 die eigentlich toxische Form in der Amyloidkaskade ist (Schilling *et al.* 2006; Güntert *et al.* 2006) und die keimbildende Spezies neurotoxischer Aggregate darstellt. Dadurch wird pE-Abeta eine entscheidene Rolle bei der Initiierung der Alzheimer Krankheit zugeschrieben wird (Saido, 1998; Hosoda *et al.* 1998).

### 1.1.7 Die Rolle der Glutaminylzyklase

Die Inhibierung der Pyroglutamat-Entstehung bei N-terminal verkürzten A $\beta$ -Peptiden stellt demnach einen wichtigen Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer Krankheit dar. Die Ausbildung des N-terminalen Pyroglutamats wird unter schwach sauren Bedingungen katalysiert durch die Glutaminylzyklase (QC) (Schilling *et al.* 2004), wodurch sie als ein potientes Zielenzym der Wirkstoffentwicklung gilt. Die Katalyse folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik (Fischer and Spiess, 1987). Die Zyklisierung des Glutaminyl- bzw. Glutamylrestes ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Der Stickstoff der freien  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutamins greift den  $\gamma$ -Carbonylkohlenstoff der Seitenkette nukleophil an, woraufhin es zum Ringschluss und zur Abspaltung von Ammoniak kommt. Trägt das Substrat ein Glutamat, welches die natürlich vorkommende Aminosäure im A $\beta$ -Peptid darstellt, erfolgt die Zyklisierung langsamer, und anstelle von Ammoniak wird Wasser freigesetzt. In der Forschung der Probiobdrug AG werden spezifische Inhibitoren der Glutaminylzyklase entwickelt, um die Ausbildung von Pyroglutamat zu verhindern und eine AD-Behandlung zu ermöglichen (Schilling *et al.* 2008). Dadurch wären die A $\beta$ -Peptide zudem wieder zugänglich für den Abbau durch Aminopeptidasen. Die Plaques-Entstehung könnte unterbunden oder zumindest verlangsamt werden.



**Abbildung 1-4:**  
Schematische Darstellung der Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- und Glutamylresten.

Es wurde bereits in Zellkulturexperimenten an Säugerzellen gezeigt, dass bei einer Inhibierung der Glutaminylzyklase eine verminderte Bildung von pE-A $\beta$  auftrat (Cynis *et al.* 2006). Weiterhin konnten Schilling *et al.* Erfolge durch die orale Applikation eines QC-Inhibitors bei transgenen Mäusen, welche unter anderem die Schwedische Mutation des APP trugen, erzielen (Schilling *et al.* 2008). Bei Mäusen, die den Inhibitor vor der

nachweisbaren Plaquebildung (in einem Alter zwischen 10 und 12 Monaten) erhielten, wurden über 50 % weniger Plaques detektiert als in der Kontrollgruppe. Ebenfalls konnte eine reduzierte Plaquezahl für behandelte Mäuse gezeigt werden, welche den Wirkstoff erst nach dem Einsetzen der Plaquebildung erhielten.

Während durch die Inhibierung der Glutaminylyklase die Entstehung von pE-A $\beta$  unterdrückt werden soll, stellen bereits gebildete N-terminal pE-modifizierte A $\beta$ -Isoformen einen weiteren wichtigen Ansatzpunkt zur Therapieentwicklung dar. Da bei einer Diagnose der Alzheimer Erkrankung schon ein signifikanter Anteil an pE-modifizierten A $\beta$ -Peptiden vorliegt, steht dabei unter anderem die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen diese Peptide im Vordergrund (Acero *et al.* 2009; Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013).

### 1.1.8 Rekombinante Herstellung von A $\beta$ -Peptiden

Um Therapieansätze weiter zu entwickeln, ist es von Bedeutung, A $\beta$  als pathogenes Agens näher zu charakterisieren und weitere Einblicke in den Metabolismus des Peptids zu erzielen. Dazu gehört auch die Erweiterung und Verfeinerung bereits existierender struktureller Daten von A $\beta$ -Oligomeren, um Verbindungen zwischen der Struktur und der Toxizität der Peptide abzuleiten. Die Verfügbarkeit von A $\beta$ -Peptiden stellt dabei die Grundvoraussetzung für die Untersuchungen dar. Der Großteil der Forschung an A $\beta$  in den Bereichen der Biochemie, Biophysik und Zellbiologie wird mit synthetisch hergestellten Peptiden durchgeführt. Die chemische A $\beta$ -Synthese ist zwar Routine, jedoch relativ zeitaufwendig. Spezielles Equipment ist zudem erforderlich und besonders bei der Isotopenmarkierung gestaltet sich die Synthese kostenintensiv. Zusätzlich können steigende Peptidlängen zu Aggregationen oder zu Abbaufragmenten führen (Zarandi *et al.*, 2007; Tickler *et al.* 2001).

Eine Alternative zur chemischen Synthese ist die rekombinante Herstellung der Peptide in *Escherichia coli*. Die Expression in Prokaryoten bietet mehrere Vorteile. Es kann bei geringen Kosten eine hohe Wachstums- und Expressionsrate erzielt werden und auf standardisierte Klonierungs- und Expressionsprotokolle zurückgegriffen werden (Sørensen & Mortensen, 2005). Die rekombinante Expression ist ebenfalls für Strukturanalysen attraktiv, da Isotopenmarkierte Peptide im großen Maßstab produziert und für NMR-Strukturuntersuchungen eingesetzt werden können.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der rekombinanten Expression von A $\beta$ -Peptiden im großen Maßstab, im besonderen N-terminal verkürzte Pyroglutamat-modifizierte A $\beta$ -Peptide. Rekombinante und synthetische Peptide sollten anschließend charakterisiert und verglichen werden. Ein weiteres Ziel war die Herstellung von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem pE3-A $\beta$ 40, um den Einfluss des Pyroglutamatrestes auf die fibrilläre A $\beta$ -Struktur mittels NMR-Strukturuntersuchungen zu analysieren.

### 1.1.9 Alzheimer Therapien

Die Therapie der Alzheimer Patienten richtet sich nach Stadium, Ausprägung und vordergründigem Symptom ihrer Erkrankung. Die Therapiemöglichkeiten reichen von einer antidepressiven Therapie im Frühstadium bis hin zu einer primär palliativen Therapie im Spätstadium.

Eine symptomatische Therapie der Alzheimer Erkrankung beinhaltet zum Beispiel die Behandlung mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren. Die Verfügbarkeit von Acetylcholin wird erhöht, um die Menge an cholinergen Neurotransmittern zu modulieren, wodurch das Erinnerungs- und Denkvermögen verbessert wird. Donepezil, Rivastigmin und Galantamin sind zugelassene Medikamente und werden zur Behandlung von leichter bis mittelschwerer Alzheimer Erkrankung eingesetzt (Bayer und Wirths, 2008). Ein Medikament zur Behandlung von mittelschwerer bis schwerer Alzheimer Krankheit stellt Memantin dar. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wird über verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel A $\beta$ , die Konzentration des Neurotransmitters Glutamat erhöht, was eine beständige Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors zur Folge hat und eine Signalweiterleitung unterbindet. Memantin wirkt als ein nichtkompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors und es wird angenommen, dass Memantin die Neuronen vor glutamatinduziertem Zelltod schützt, ohne dass die physiologische Funktion der NMDA-Aktivierung, die für kognitive Funktionen nötig ist, gestört wird. Lern- und Gedächtnisvorgänge können weiter ablaufen (Wilcock 2003).

Neben der symptomatischen Behandlung gibt es auch Therapiestrategien mit krankheitsmodifizierendem Potential. Das Konzept der  $\beta$ -Amyloid-Kaskade besteht seit ca. 25 Jahren und ist bis heute die bedeutendste Hypothese zur Entwicklung von AD-Therapiestrategien (Hardy and Allsop 1991). Die Inhibierung der Glutaminylyklase zur Reduktion von Pyroglutamat-modifizierten A $\beta$ -Peptiden und die Immunotherapie mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene A $\beta$ -Formen stellen Beispiele dieser Behandlung der Alzheimer Erkrankung dar, um die Bildung von A $\beta$  zu regulieren. Wie zuvor erwähnt, ist Amyloid- $\beta$  ein normales Produkt des zellulären Metabolismus (Haass *et al.* 1993), dass durch die Aktivität der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen aus APP freigesetzt wird. Wie bei anderen Peptiden wird die Produktion von A $\beta$  normalerweise ausgeglichen durch seine gleichzeitige Eliminierung. Dafür sind verschiedene parallel ablaufende Mechanismen verantwortlich, die proteolytische Degradation, Zell-vermittelten Abbau, passiven und aktiven Transport, sowie die Aggregation und Ablagerung unlöslicher Aggregate umfassen (Saido and Leissring 2012). Einerseits stellen Biosynthetische Enzyme wie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen primäre Ziele der Wirkstoffentwicklung dar, um die Bildung von A $\beta$  zu regulieren.  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren beispielsweise vermindern die A $\beta$ -Produktion im Tiermodell (Chang *et al.* 2004). Aber auch katabolische Enzyme sind wichtige Ziele, um die A $\beta$ -Akkumulation zu

verhindern oder rückgängig zu machen (Nalivaeva *et al.* 2012, Hersh and Rodgers 2008). Dabei geht es nicht um die komplette Eliminierung von A $\beta$ , da dem Peptid wichtige physiologische Funktionen zugeschrieben werden. Es gilt unter anderem als regulatorisches Peptid und auch als Transkriptionsfaktor in neuronalen Zellen (Pearson and Peers, 2006, Bailey *et al.* 2011). Die Vielzahl der Funktionen von A $\beta$  ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch geht man davon aus, dass physiologische Mengen wichtig für den normalen Zell-Metabolismus sind und es erst als toxisch angesehen wird, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Degradation auftritt. Der stabile Zustand der Konzentration an A $\beta$ -Peptiden ist essentiell und Amyloid-degradierende proteolytische Enzyme, sowie perivaskuläre Drainage des Zentralen Nervensystems spielen eine große Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts. Diese Mechanismen verschlechtern sich im Alter und Krankheit (Weller *et al.* 2008, Nalivaeva *et al.* 2012, Hawkes *et al.* 2014). Es besteht die Hypothese, dass der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit der ungenügende Abbau von A $\beta$  zugrunde liegt (Selkoe 2001). Die Rate der Produktion und des Abbaus von A $\beta$  konnte in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) quantifiziert werden (Bateman *et al.* 2006). Es zeigte sich, dass Patienten, die an der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit leiden, signifikante Defekte in der Reduktion von A $\beta$  im CSF aufwiesen (Mawuenyega *et al.* 2010). Diese Experimente können nicht exakt charakterisieren, welche Prozesse der A $\beta$ -Reduktion in diesen Patienten beeinträchtigt sind, jedoch deuten sie stark darauf hin, dass ein fehlerhafter proteolytischer Abbau von A $\beta$  diesen Mechanismen zugrunde liegt (Saido and Leissring 2012). Amyloid-degradierende Enzyme sind somit als ein weiterer Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit in den Fokus der Forschung gerückt.

### **1.1.10 Amyloid-degradierende Enzyme**

Bis Anfang des 21. Jahrhunderts war das Interesse an A $\beta$ -Degradation als mögliche Behandlung der Alzheimer Erkrankung noch nicht weit verbreitet. Ein Wendepunkt in diesem Forschungsfeld kam durch die erste Studie, die sich explizit mit dem Abbau von A $\beta$  beschäftigte (Iwata *et al.* 2000). Mit der Identifizierung von Neprilysin (NEP) als eine der wichtigsten A $\beta$ -abbauenden Proteasen hob diese Studie ebenfalls die Signifikanz von A $\beta$ -Degradation bei der Alzheimer Pathogenese hervor. Weitere wichtige A $\beta$ -abbauende Enzyme sind unter anderem Plasmin (Van Nostrand and Porter 1999; Tucker *et al.* 2000), Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1; Eckmann *et al.* 2001), Angiotensin-converting enzyme (ACE; Hu *et al.* 2001) und das Insulin-degrading enzyme (IDE; Vekrellis *et al.* 2000). Diese Proteasen, die aus verschiedenen Zelltypen stammen, degradieren A $\beta$  unterschiedlicher Konformationen und in verschiedenen Zellkompartimenten. Sie reduzieren die A $\beta$ -Akkumulation in AD-Maus-Modellen, wodurch die kognitive Leistungsfähigkeit erhöht wurde. Von Yamin *et al.* wurde in aktuellen Studien die Serinprotease Acylpeptidhydrolase

(APH) als ein A $\beta$ -abbauendes Enzym postuliert, welches monomeres und oligomeres A $\beta$  degradieren kann (2007, 2009). Sie zeigten außerdem, dass die APH-Menge im Gehirngewebe bei einer Alzheimer Erkrankung im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Kontroll-Probanden erniedrigt ist (Yamin et al. 2007). Um dieses Enzym näher zu charakterisieren, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die rekombinante Herstellung und Reinigung der APH, sowie die Untersuchung der Kinetik der A $\beta$ -Spaltung. Die APH, die möglicherweise einen weiteren Therapieansatz in der Behandlung der Alzheimer Krankheit darstellt, wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

## 1.2 Acylpeptidhydrolase (APH)

Proteasen sind Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten, indem sie die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Anhand ihres Katalyse-Mechanismus und der funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum können sie in die Gruppen der Serinproteasen, Cysteinproteasen, Threoninproteasen, Aspartatproteasen, sowie Metalloproteasen klassifiziert werden. Das Enzym APH (EC 3.4.19.) gehört zur Familie der Prolyl-Oligopeptidasen (Clan SC, Familie S9), die eine Gruppe der Serinproteasen darstellt. Zu dieser Familie gehören ebenfalls die Dipeptidyl Peptidase IV, Oligopeptidase B, sowie die Prolyl-Oligopeptidase selbst (Polgár, 2002). Tsunasawa *et al.* (1975) beschrieben erstmals die Isolierung und Reinigung der APH aus Rattenleber. Der APH wird als vorwiegend cytoplasmatisches Protein eine wichtige Rolle im Katabolismus intrazellulärer, N-terminal acetylierter Proteine zugeschrieben (Perrier *et al.* 2005). Das Enzym katalysiert dabei die Hydrolyse der N-terminalen Peptidbindung, bei der als Spaltprodukte eine N-acetylierte Aminosäure und ein Peptid mit freiem N-Terminus entstehen (Rosenblum and Kozarich, 2003). Des Weiteren spielt die APH eine Rolle bei der Entfernung oxidierter Proteine. In der Literatur wird die Acylpeptidhydrolase auch als OPH (*oxidized protein hydrolase*) bezeichnet, da sie die Eigenschaft besitzt, durch Oxidation modifizierte Proteine wie z.B. Rinderserumalbumin proteolytisch abzubauen (Fujino *et al.* 2000a, Fujino *et al.* 2000b). Shimizu *et al.* (2003, 2004) beschrieben ebenfalls die *in vitro* Degradation oxidativ beschädigter Proteine durch die APH in Koordination mit dem Proteasom System, was zum Schutz der Zelle bei oxidativem Stress beiträgt. Zudem stellt sie ein sensibles Target für phosphoorganische Verbindungen dar und wurde deshalb, wie auch andere Mitglieder der Prolyl-Oligopeptidase-Familie, als ein mögliches Target für Acetylcholinesterase-Inhibitoren zur Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei der Behandlung von Alzheimer genannt (Richards *et al.* 2000).

Das APH-codierende Gen konnte auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 3p21 lokalisiert werden. Eine Deletion an dieser Stelle wird mit Lungenkrebs assoziiert, weswegen

vermutet wird, dass die APH in der Bildung oder Veränderung dieser Tumore involviert ist (Jones *et al.* 1991, Scaloni *et al.* 1992b).

Die Verbreitung der APH ist ubiquitär und wurde von mehreren Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Spezies und Geweben nachgewiesen, unter anderem in der Leber (Rind, Ratte), dem Gehirn (Ratte), der Skelettmuskulatur (Kaninchen), der Darmschleimhaut (Schwein), der Augenlinse (Rind), sowie im Cytosol von humanen und Schafserythrozyten und im Plasma (Tsunasawa *et al.* 1975, Gade and Brown 1981, Marks *et al.* 1983, Witheiler and Wilson 1972, Schönberger and Tschesche 1981, Radakrishna and Wold 1989, Sharma and Ortwerth 1993, Raphel *et al.* 1999, Fujino *et al.*, 2000a).

Die native APH besitzt ein Molekulargewicht von etwa 300 kDa und setzt sich aus vier identischen, nicht kovalent verbundenen Untereinheiten zusammen, die jeweils ein Molekulargewicht von 75-80 kDa aufweisen. N-terminal besitzt die APH die für die Prolyl-Oligopeptidase-Familie charakteristische  $\beta$ -Propeller Domäne, welche für die spezifische Erkennung von kleinen Peptiden notwendig ist (Bartlam *et al.* 2004). Die C-terminale Protease-Domäne der APH weist eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung auf, mit einer von  $\alpha$ -Helices umgebenen zentralen  $\beta$ -Faltblattstruktur. Diese beinhaltet das aktive Zentrum, bestehend aus der für Serinproteasen charakteristischen katalytischen Triade Serin, Aspartat und Histidin.

Die Primärstrukturen der Ratten- und Schweine-APH konnten bereits in den 80er Jahren aufgeklärt werden, wobei zwischen den Spezies eine 90%ige Sequenzidentität besteht (Mitta *et al.* 1989, Kobayashi *et al.*, 1989). Die Nukleotidsequenz der humanen APH wurde erstmals 1996 von Mitta *et al.* beschrieben. Sie weist eine 91,5%ige Sequenzidentität zu den Primärstrukturen der APH aus Ratte und Schwein auf. Eine weitere Strukturaufklärung der humanen APH erfolgte 1999 von Scaloni *et al.* Eine Untereinheit besteht aus 732 Aminosäuren und das Protein ist am N-Terminus acetyliert. Alle 17 Cysteinreste liegen in reduzierter Form vor, es werden keine Disulfidbrücken innerhalb des Proteins ausgebildet.

Der aus der Aminosäuresequenz abgeleitete theoretische isoelektrische Punkt eines Monomers beträgt 5,46, der mittels isoelektrischer Fokussierung experimentell bestimmte pI-Wert des aus humanen Erythrozyten isolierten Homotetramers ist mit 4,1 beschrieben (Scaloni *et al.* 1994).

Hinsichtlich der Substratspezifität bevorzugt die APH acetylierte N-Termini von Alanin, Methionin, Serin und Glycin. Positiv geladene Aminosäuren (Lysin, Histidin, Arginin) haben einen negativen Effekt auf die APH-Aktivität (Jones and Manning 1985, Sokolik *et al.* 1994). Das Enzym degradiert vorwiegend Peptide mit einer Länge von 20-50 Resten (Tsunasawa and Sakiyama 1984), mit steigender Peptidlänge verringert sich die enzymatische Aktivität (Scaloni *et al.* 1992a, 1994). Das pH-Optimum der APH ist abhängig vom verwendeten Substrat: Mit Acetyl-Glutamat p-Nitroanilin beispielsweise liegt das Optimum bei pH 6,

während es sich im Fall von Acetyl-Alanin p-Nitroanilin bei pH 8,4 befindet (Jones *et al.* 1986; Raphel *et al.* 1999). Da dieses Enzym eine Seringruppe im aktiven katalytischen Zentrum besitzt, lässt es sich durch DFP (Diisopropylfluorophosphat) irreversibel inhibieren. Acetyl-Leucin-Chloromethylketon (Ac-Leu-CMK) wirkt ebenfalls als ein Inhibitor (Scaloni *et al.* 1992a).

2007 wurde die APH von Yamin und Kollegen erstmals als ein A $\beta$ -degradierendes Enzym beschrieben. Man vermutet eine Endopeptidase-Aktivität, wie sie zum Beispiel für die APH aus den Prokaryoten *Pyrococcus horikoshii* und *Aeropyrum pernix* beschrieben wurde (Szeltner *et al.* 2009) und bisher bei APH aus Säugetieren nicht nachweisbar war. Yamin *et al.* beschrieben, dass die vorwiegend intrazellulär auftretende APH durch einen bisher unbekanntem Mechanismus ebenfalls in geringen Mengen sekretiert und aus dem konditionierten Medium von Neuroblastoma-Zellen isoliert werden konnte. Die hydrolytische Spaltung des A $\beta$ -Peptids fand an den Positionen 13, 14 und 19 statt (Yamin *et al.* 2009). Dabei degradiert das Enzym vorwiegend monomeres und oligomeres A $\beta$ . Ein starker Einfluss in der Alzheimer Krankheit wird vermutet, da man in AD Gehirnen weniger APH nachweisen konnte als in Gehirnen gleichaltriger gesunder Probanden, was die Hypothese untermauert, dass eine fehlerhafte oder ungenügende Degradation zu einem Ungleichgewicht in der Homöostase der A $\beta$ -Peptide im Gehirn führt und die Amyloid-Aggregation verstärkt.

### 1.3 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss der APH auf die Homöostase der A $\beta$ -Peptide untersucht werden. Dieser Ansatz beruht auf der Veröffentlichung von Yamin *et al.*, die eine Spaltung der A $\beta$ -Peptide durch die APH beschreiben, was sie zu einem potentiellen Zielenzym für einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Alzheimer Demenz macht. In diesem Zusammenhang soll auch die in der Literatur diskutierte Fragestellung adressiert werden, inwiefern Unterschiede in den Eigenschaften von chemisch synthetisierten bzw. biologisch generierten A $\beta$ -Peptiden bestehen. Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit waren somit die Etablierung der rekombinanten Expression der APH sowie verschiedener A $\beta$ -Peptide und deren Charakterisierung.

Zur rekombinanten Expression der APH sollte ein System etabliert werden, welches eine möglichst hohe Expression des Enzyms gewährleistet. Im folgenden Schritt sollte eine Reinigungsstrategie etabliert werden und anschließend die APH hinsichtlich ihrer Substratspezifität charakterisiert werden und mit kommerziell erhältlichem Enzym sowie mit Literaturdaten verglichen werden. Die rekombinante Herstellung verschiedener A $\beta$ -Peptide stellt einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Arbeit dar. In einem geeigneten System sollte die Expression im mg-Maßstab etabliert werden, woraufhin sich die Optimierung der Reinigung der Peptide anschließt. Darauffolgend sollte die Charakterisierung der Peptide durchgeführt werden. Dabei steht die Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen synthetisch hergestellten und rekombinant exprimierten A $\beta$ -Peptiden im Vordergrund. Die Aggregationskinetik der Peptide wird mittels Thioflavin-T-Assay untersucht und die Fibrillen-Morphologie der Aggregate durch Elektronenmikroskopische Aufnahmen visualisiert.

Bezugnehmend auf bereits publizierte Daten wird die APH hinsichtlich ihrer postulierten A $\beta$ -spaltenden Eigenschaft untersucht. Die Kinetik dieser Spaltung, sowie Unterschiede hinsichtlich verschiedener A $\beta$ -Varianten sollten im Rahmen dieser Arbeit betrachtet werden. Bei der Untersuchung der enzymatischen Spaltung durch die APH soll ebenfalls auf Unterschiede zwischen rekombinant exprimierten und synthetisch hergestellten A $\beta$ -Peptiden eingegangen werden. Die APH-Verteilung im humanen Gewebe wird ebenfalls analysiert. Dabei werden zusätzlich vergleichende Untersuchungen von Gewebe gesunder Probanden und von Alzheimer Patienten durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der APH auf die Pathologie der Alzheimer Demenz zu charakterisieren.

Die Anwendbarkeit der rekombinant hergestellten Peptide in der Praxis wird mittels eines BrdU-Assays untersucht. In einem letzten Schritt sollte die rekombinante Expression einer Variante der A $\beta$ -Peptide, pE3-A $\beta$ 40, dazu genutzt werden, dieses Peptid isopenmarkiert herzustellen, und es in NMR-Strukturanalysen hinsichtlich des Einflusses des Pyroglutamatrestes bei N-terminal verkürzten A $\beta$ -Peptiden zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, Puffer, Antikörper, Oligonukleotide, sowie industriell gefertigte Präparationsmaterialien (Kits) befinden sich im Anhang.

### 2.1 Vektoren

Die in der Arbeit eingesetzten Vektoren sind unter Angabe des jeweiligen Verwendungszwecks aufgelistet.

**Tabelle 2-1: Verwendete Vektoren**

Vektor, Hersteller	Merkmale	Verwendung
pET28a+ (Life Technologies)	5369 bp, N-terminaler 6 x His- <i>tag</i> T7 Promotor, lacI-codierende Region, Kan <sup>r</sup>	Expression in <i>E.coli</i>
pcDNA3.1+ (Life Technologies)	5428 bp, Polyhedrin Promotor Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	Expression in CHO-Zellen/COS-7- Zellen
pFastBac <sup>TM</sup> 1 (Life Technologies)	4775 bp, Polyhedrin Promotor Amp <sup>r</sup> , Gentamycin <sup>r</sup>	Donor-Plasmid im Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem
pET-SUMO (Life Technologies)	5643 bp, N-terminaler 6x His- <i>tag</i> T7 Promotor, lacI-codierende Region TA cloning site, Kan <sup>r</sup>	Expression in <i>E.coli</i>
pET41a+ (GST-Fusions Vektor) (Novagen)	5929 bp, T7-Promotor, GST- <i>tag</i> , 6x His- <i>tag</i> , lacI-codierende Region Kan <sup>r</sup>	Expression in <i>E.coli</i>
pJET1.2/blunt (Life Technologies)	2974 bp, T7 Promotor, lacI- codierende Region Amp <sup>r</sup>	Zwischenklonierungen in <i>E.coli</i>

### 2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Merkmale	Verwendung
APH in pOTB7 (ImaGenes GmbH, Berlin)	4613 bp Chloramphenicol <sup>r</sup> Gengröße 2199 bp	Klonierung in pcDNA 3.1+ zur Expression in CHO- /COS7-Zellen Klonierung in pFastBac1 zur Expression im Bac-to-Bac <sup>®</sup> Baculovirus System Klonierung in pET28a(+) zur Expression in <i>E.coli</i>
A $\beta$ 40 in pET- SUMO (Klonierung durch Dr. Schlenzig, Probiodrug AG)	5583 bp Kan <sup>r</sup> Gengröße SUMO- A $\beta$ 40 474 bp	Expression in <i>E.coli</i> Klonierung in pET41a+ zur Expression in <i>E.coli</i>

(NANP) <sub>19</sub> -Aβ42 in pMK-RQ (Life Technologies)	2715 bp Kan <sup>r</sup> Gengröße 437 bp	Klonierung in pET28a(+) zur Expression in <i>E.coli</i> , (Herstellung weiterer Aβ Varianten in diesem Vektor)
TEV-Protease in pEX-A (Eurofins MWG)	2450 bp Amp <sup>r</sup> Gengröße 782 bp	Klonierung in pET28a(+) zur Expression in <i>E.coli</i> ,

## 2.3 Verwendete Bakterienstämme

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

**Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>E.coli</i> DH5α (Life Technologies)	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Allgemeine Klonierungsarbeiten
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) (Novagen)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm me131</i> (DE3)	Stamm für rekombinante Genexpression
<i>E.coli</i> Rosetta (DE3) (Merck)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Stamm für rekombinante Genexpression
<i>E.coli</i> Max Efficiency® DH10Bac™ (Life Technologies)	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK λ-rpsL nupG</i> /pMON14272/pMON7124	Produktion von rekombinantem Bacmid im Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem

## 2.4 Bakterielle Nährmedien

Die Kultivierung der *E.coli* Bakterien erfolgte entweder unter Schütteln als Suspensionskultur (180-220 rpm) in Luria-Bertani (LB)-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) oder auf Petrischalen mit LB-Agar (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 10 g/l Agar-Agar) bei 37 °C. Zur Selektion rekombinanter Bakterienklone wurden je nach Zielvektor verschiedene Antibiotika und/oder Substrate in folgenden Konzentrationen (soweit nicht anders angegeben) verwendet: Kanamycin (50 µg/ml), Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), Gentamycin (7µg/ml), Tetracyclin (10 µg/ml). IPTG als Induktor des *Lac*-Operons wurde in einer Endkonzentration von (40 µg/ml) eingesetzt, das Substrat X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion mit 100 µg/ml.

## 2.5 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* oder PCR; Mullis *et al.* 1986) wird eine ausgewählte DNA-Sequenz gezielt *in vitro* vervielfältigt. Für die Reaktion ist neben einer DNA Polymerase, einem geeigneten Puffer, einer Ausgangs-DNA

und einem Nukleotidmix das Vorhandensein von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) notwendig. Diese wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und sind im Anhang aufgeführt. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur anschließenden Klonierung wurde die thermostabile *Pfu*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* verwendet. Zum Nachweis positiver Transformanten (Kolonie PCR) erfolgte die PCR-Reaktion mit der Thermostabilen *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Die Mutagenese-PCR Reaktionen wurden mit Hilfe des *Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zusammensetzung der Standard-PCR Reaktionen ist in Tabelle 2-4 dargestellt.

**Tabelle 2-4: Zusammensetzung von Standard-PCR Reaktionen**

Komponente	PCR für Klonierung	Kolonie PCR
Ausgangs-DNA (50 ng/µl)	1 µl	1 µl Plasmid oder DNA aus der Kolonie
Reaktionspuffer	5 µl 10x <i>Pfu</i> Polymerase Reaktionspuffer	3 µl 5x Green GoTaq®-Reaktionspuffer
Polymerase	1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase (3U/µl)	0,1 µl GoTaq® (5U/µl)
5'-Primer ( <i>Forward</i> Primer) 20 pmol/µl	1 µl	0,25 µl
3'-Primer ( <i>Reverse</i> Primer) 20 pmol/µl	1 µl	0,25 µl
Nukleotidmix (10 mM)	1 µl	0,25 µl
Wasser	40 µl	Auf 10 µl aufgefüllt

Die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktionen erfolgte mit dem *Master Cycler* von Eppendorf bzw. Bio-Rad. Für die unterschiedlichen PCRs wurden verschiedene Temperaturprogramme benutzt (Tabelle 2-5).

**Tabelle 2-5: Exemplarisches Temperaturprogramm für eine Polymerase-Kettenreaktion**

(\* Die Temperaturen zur Primer Hybridisierung wurden variiert)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zweck
1	95 °C	2 min	Denaturierung
2	95 °C	45 sec	Denaturierung
3	55-65 °C*	45 sec	Primer Hybridisierung
4	72 °C	<i>GoTaq</i> ® DNA-Polymerase: 0,7-1 kb/min <i>Pfu</i> DNA-Polymerase: 0,4-0,6 kb/min	Elongation
Wiederholung der Schritte 2-4, ca. 25-30 Zyklen			
5	72 °C	7 min	Abschließende Elongation

### 2.5.2 Agarosegelelektrophorese

Zur horizontalen elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Dabei wurden Agarosekonzentrationen je nach Fragmentgröße zwischen 0,8-2% gewählt und Spannungen zwischen 1 bis 6 V/cm angelegt. Zum Anfärben der DNA enthielten die Agarosegele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Den DNA-Proben wurde zum Auftragen auf das Gel 0,2 Volumen Ladepuffer zugesetzt, welcher Glycerol und Bromphenolblau enthält. Als Referenz wurde je nach Fragmentgröße ein 1kb bzw. 100 bp Größenmarker verwendet. Zur Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente kam das BioDoc-It™ Geldokumentationssystem in Verbindung mit einem Transilluminator zur Anwendung. DNA-Fragmente, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden aus dem Agarosegel isoliert und mit dem *Gel Extraction Spin Kit / 50 JETquick* von Genomed nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde in 30 µl sterilem und RNase freiem Wasser aufgenommen.

### 2.5.3 Restriktionsverdau und Ligation

Zur Klonierung wurden das jeweilige gereinigte DNA Fragment und der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (NEB, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers verdaut. Der Reaktionsansatz für die anschließende Ligation ist in Tabelle 2-6 dargestellt. Die Inkubation erfolgte für 1h bei Raumtemperatur.

**Tabelle 2-6: Ansatz zur Ligation des DNA-Fragmentes in den Zielvektor**

Komponente	Menge
DNA-Fragment (100ng/µl)	3 µl
Vektor (50ng/µl)	1 µl
10 x T4 DNA Ligase Puffer	1 µl
T4 DNA Ligase (3 U/ml)	1 µl
Wasser	4 µl

### 2.5.4 Transformation von *E.coli*

Nach der Ligation schloss sich die Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen des Stammes DH5α mit dem entstandenen, rekombinanten Plasmid an. Dafür wurde ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen im Eisbad aufgetaut und 5 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Nach der Inkubation im Eisbad für 30 min erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C. Anschließend wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion auf transformierte Zellen wurde der Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektiv-Antibiotikum ausplattiert und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.5 Isolierung von rekombinanten Plasmiden

Nach der Anzucht transformierter *E.coli*-Zellen über Nacht in einem Maßstab von 5 ml (siehe 2.4) wurde die Plasmid-DNA mit dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) entsprechend des Herstellerprotokolls aus den Zellen isoliert. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA fand mit 30 µl sterilem und RNase freiem Wasser statt. Für die spätere Transfektion in der Zellkultur (von CHO-/COS Zellen oder Insektenzellen) wurde die Plasmid-DNA mit dem *EndoFree® Plasmid Maxi Kit* von Qiagen aus einer 100 ml-Übernachtskultur gewonnen. Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei 260 nm mit dem NanoDrop2000 von Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA führte die Firma GATC Biotech AG in Konstanz durch. Zur Auswertung der Sequenzen kam das Programm ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>), sowie die Chromas Lite Software zum Einsatz.

## 2.6 Zellbiologische Methoden

### 2.6.1 Verwendete Zelllinien

Die in der Zellkultur verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-7 aufgeführt.

Tabelle 2-7: Verwendete Zelllinien (Life Technologies)

Zelllinie	Bedeutung	Ursprungs-Spezies	Ursprung	Referenz
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i>	<i>Cricetulus griseus</i> (Chinesischer Zwerghamster)	Ovarien (Epithelzellen)	Puck <i>et al.</i> 1958
COS7	<i>Cercopithecus aethiops</i> , origin-defective SV-40	<i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze)	Niere (Fibroblasten)	Gluzman, 1981
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovarien	Vaughn <i>et al.</i> 1977
High Five™ (BTI-Tn-5B1-4)	<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	Ovarien	Wickham <i>et al.</i> 1992

### 2.6.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte in T-Kulturflaschen, Zellkulturplatten mit 6, 24 oder 96 Vertiefungen (*wells*) oder Schüttelkolben bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für Säugerzell-Linien, bzw. 28 °C und 5% CO<sub>2</sub> für Insektenzell-Linien. CHO- und COS7-Zellen wurden in D-MEM:F12 (Life Technologies), 5% FBS und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert, Sf21- und High5-Zellen in SFM-900. Zum Passagieren wurden die Zellen entweder abgeklopft, mit Trypsin/EDTA oder Accutase behandelt und standardmäßig zweimal pro Woche nach Angaben des Herstellers verdünnt. Dazu wurde die Lebendzellzahl mittels Casy® Zellzähler bestimmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte maximal bis Passage 30, anschließend wurde ein neuer Kryostock der entsprechenden Zelllinie in Kultur genommen.

## 2.6.3 Plasmidtransfektion von COS-7, HEK293, CHO-Zellen

### 2.6.3.1 Transiente Transfektion von CHO- und COS7-Zellen

24 h vor der Transfektion wurden  $6 \times 10^5$  Zellen pro *well* einer unbeschichteten 6-*well*-Platte mit 2 ml D-MEM:F12 mit 5% FBS eingesetzt und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Transfektion erfolgte nach dem Erreichen von 80-90% Konfluenz. Dafür wurden 3-4 µg DNA sowie 10 µl Lipofectamin 2000 (Life Technologies) jeweils in 250 µl Opti-MEM gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend mischte man beide Ansätze und inkubierte sie für weitere 20 min bei Raumtemperatur, wodurch sich ein DNA-Lipid-Komplex ausbildete. Nachfolgend wurden aus dem jeweiligen *well* 500 µl des Mediums entfernt und 500 µl des Transfektionsgemisches auf die Zellen pipettiert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Analyse der Expression erntete man die Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h. Dafür erfolgte zunächst das Waschen mit PBS und das Ablösen mit 800 µl Trypsin pro *well*. Die Reaktion wurde nach ca. 5 min durch Zugabe von 800 µl Medium gestoppt, und die Suspension für 5 min bei 600×g zentrifugiert. Nach dem Waschen des Pellets mit PBS erfolgte der Aufschluss der Zellen. Dafür wurde das Pellet in 200 µl Puffer (30 mM Tris, pH 7,4) aufgenommen und 3×10 sek mit Ultraschall behandelt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000×g zum Abtrennen der Zelltrümmer, der Überstand (= Zell-Lysat) wurde für weitere Untersuchungen verwendet. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der APH wurden 20 µl des Lysats verwendet und die Ergebnisse auf das Gesamtvolumen normiert.

### 2.6.3.2 Transiente Co-Transfektion von APH und APP in HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurde vergleichbar wie in CHO- und COS7-Zellen durchgeführt. Bei der Co-Transfektion wurden insgesamt 6 µg DNA eingesetzt. 24 h nach der Transfektion ersetzte man das Medium durch frisches phenolrotfreies D-MEM ohne FBS. Nach weiteren 24 h Inkubation erfolgte das Abnehmen des Mediums zur Analyse und das Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 500×g. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Die Anzahl der verbliebenen Zellen der Kavitäten wurde für die spätere Normierung der Ergebnisse (ELISA siehe 2.9.3) mittels Casy® Zellzähler ermittelt.

### 2.6.3.3 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Die Voraussetzung für eine stabile Expression der Fremd-DNA ist die Integration dieser in das Wirtsgenom. Die aufgenommene DNA wird in der Zelle innerhalb von wenigen Tagen größtenteils abgebaut. Aus diesem Grund erfolgte die Selektion der stabil-transfizierten Zellen über die Geneticin-Resistenz des Plasmids. Die Transfektion wurde zunächst wie in Abschnitt 2.6.3.1 durchgeführt. Nach ca. 3 Tagen Wachstum erfolgte die Zugabe des Selektionsantibiotikums G418 (800 µg/ml), wodurch die nicht-transfizierten Zellen abstarben. Nach 3-5-maligem Passagieren der Zellen wurden diese geerntet, die

Zellzahl bestimmt und mit einer errechneten Verdünnung von einer Zelle/*well* in eine 96-*well* Platte eingesetzt. Nach ca. 5 Tagen werden die *wells* auf Einzelklone hin überprüft und markiert. Nach dem Erreichen von 90% Konfluenz erfolgte das Überführen von 30 Einzelklonen in 6-*well*-Platten. Nach mehrmaligem Passagieren wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.6.3.1 beschrieben, geerntet und die Zell-Lysate der einzelnen Klone hinsichtlich ihrer APH-Aktivität untersucht. Dazu wurden 20 µl des Lysats zur Messung der enzymatischen Aktivität mit dem fluorogenen Substrat Ac-Ala-AMC eingesetzt. Die Zellzahl jedes *wells* wurde bestimmt und die Ergebnisse anschließend für eine bessere Vergleichbarkeit auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen normiert. Die Klone, welche die höchste APH-Aktivität aufwiesen, wurden selektiert und für weitere Untersuchungen in vergrößertem Maßstab unter Zusatz von 400 µg/ml G418 weiter kultiviert.

#### 2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung von APH in stabil transfizierten CHO-Zellen

Die stabil transfizierten CHO-Zellen wurden zur zellulären Lokalisation der APH folgendermaßen untersucht: Am Vortag der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte das Auftragen von  $1 \times 10^5$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 500 µl D-MEM:F12 mit 5% FBS auf ein Deckgläschen, welches vorher in einer Kavität einer 24-*well* Platte platziert wurde. Am folgenden Tag entfernte man das Medium und wusch die Zellen mit 500 µl gekühltem PBS. Die Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Membran erfolgte durch die Zugabe von 500 µl gekühltem Methanol. Nach der Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Zellen 2×15 min mit PBS auf dem Schüttelinkubator gewaschen. Anschließend wurden 2,5 µl anti-*Flag-tag* Antikörper gelöst in 250 µl PBS auf die Zellen gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion mit Hilfe von 2,5 µl Goat-anti-Rabbit-RedX-Antikörper in 250 µl PBS. Dies wurde auf die Zellen pipettiert und für zwei Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen vorsichtig aus der Kavität entfernt und auf einen Objektträger platziert, der mit einem Tropfen *Fluorescent Mounting Medium* (Dako) vorbereitet wurde. Mit Lack wurde das Deckglas auf dem Objektträger fixiert und zum Trocknen bei 4 °C gelagert. Die Analyse der subzellulären Lokalisation der gefärbten Proteine erfolgte mithilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (LSM; Carl Zeiss Jena).

#### 2.6.5 Baculovirus-System

Das *Bac-to-Bac*® *Baculovirus-Expressionssystem* der Firma Life Technologies ist ein virales Transfektionssystem zur effizienten Produktion rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Nach der Klonierung der APH mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-*tag* und einem N-terminalen *Flag-tag* in den Vektor pFastBac<sup>TM</sup>1 wurden kompetente *E.coli*-Zellen des Stammes DH10Bac<sup>TM</sup> nach Angaben des Herstellers mit dem rekombinanten Plasmid transformiert. Diese enthalten den Baculovirus-Transfervektor (Bacmid), sowie ein Helferplasmid zur korrekten

Insertion des Fremdgens. Dies wurde mittels Kolonie-PCR überprüft und eine Einzelkolonie in einem 100 ml-Maßstab mit den entsprechenden Selektivantibiotika vermehrt. Nach der Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA aus den Zellen (Maxiprep siehe Abschnitt 2.5.5) erfolgte die Liposom-vermittelte Transfektion der Insektenzellen der Linie Sf21 nach Angaben des Herstellers. Rekombinante Baculoviren wurden nach 72 h geerntet. Dieser sogenannte P1-Stock hat einen relativ geringen Virus-Titer von ca. von  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  *plaque forming units* (pfu) pro Milliliter. Sf21 Zellen wurden damit erneut infiziert, um die Virusmenge und den Virustiter zu erhöhen. Die Generierung des P2- bzw. P3 Stocks erfolgte nach folgender Formel: Menge P1 Stock [ml] = (MOI [pfu/Zelle] × Zellzahl)/Virustiter [pfu/ml]. Die MOI (*Multiplicity of infection*) ist definiert als die Anzahl der Viruspartikel pro Zielzelle. Die Amplifizierung erfolgte mit einer MOI von 0,1 und einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Titerbestimmung der viralen Stocks wurde mit dem *End point dilution assay* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die viralen Stocks P2 und P3 erreichen einen Virustiter von ca.  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$ . Mit dem viralen P3-Stock wurden nun neue Sf21-Zellen oder HighFive™-Zellen zur Proteinexpression infiziert. Dafür fand zunächst ein Expressionstest in einer unbeschichteten 6-well-Platte statt. Pro Kavität wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Gesamtvolumen eingesetzt und P3-Virusstock mit einer MOI von 1 zugegeben (Virustiter  $1$ - $1,5 \times 10^7$  pfu/ml). Nach der Kultivierung der infizierten Zellen wurde der Zellkulturüberstand nach 48 h, 72 h bzw. 96 h analysiert. Für die Ernte des Überstandes erfolgte die Zentrifugation der Zellen für 5 Minuten bei 500xg. Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität der APH (siehe 2.8.1) wurden jeweils 20 µl des Überstandes eingesetzt. Nach der Bestimmung der optimalen Bedingungen erfolgte die Expression des Zielproteins im 100 ml-Maßstab im Schüttelkolben.

### 2.6.6 Quantitative PCR (qRT-PCR)

Um die Transkriptmenge der APH in verschiedenen humanen Geweben zu untersuchen, wurden quantitative PCR (qRT-PCR)-Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Geweben bezogen (*FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel*, Life Technologies). Des Weiteren sollten vergleichende Untersuchungen an Gehirngewebe (Temporallappen) von an Alzheimer erkrankten Patienten und dem Gewebe gesunder Probanden durchgeführt werden. Die dafür verwendeten RNA-Proben wurden von Banner Health, Arizona, bezogen. Nach der Reversen Transkription der RNA (1 µg) in cDNA erfolgte die quantitative PCR, bei der die *SYBR® Green I*-Technologie angewendet wurde. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* wird dabei zur Detektion und Quantifizierung der entstandenen doppelsträngigen DNA eingesetzt. Es wurden 1 µl cDNA mit 0,75 µl Primer 1 (Konzentration 100 pmol/µl), 0,75 µl Primer 2 (Konzentration 100 pmol/µl), 7,5 µl qPCR Mastermix *Rotor-Gene®-SYBR®-Green* versetzt. Die Messung der Proben erfolgte im *Cycler Rotor-Gene™ 3000* unter Verwendung des folgenden PCR-Programms: Initialer Aktivierungsschritt (5 min, 95 °C), Denaturierung (5 sek, 95 °C) und

Anlagerungs- und Extensionsschritt (15 sek, 60 °C). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-8 dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit der *Rotor-Gene Operating-Software* mit der komparativen Methode ausgewertet. Dabei erfolgte eine Auswertung der relativen mRNA-Expressionsrate im Vergleich zu einer Kontrolle, beziehungsweise zu den Referenzgenen YWHAZ, Sys1 und TTI2.

**Tabelle 2-8: Primer der qRT-PCR**

Genname	Verwendete Primer	Primer Sequenz
APH ( <i>Homo sapiens</i> N-acylaminoacyl-peptide hydrolase (APEH), mRNA) NM_001640.3	hAPEH-Forward hAPEH-Reverse	GGCAACATCTCTGTGCTTGA AAGAGACAGCCAGGGAGTCA
YWHAZ ( <i>Homo sapiens</i> tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ), transcript variant 1, mRNA) NM_003406.2	hYWHAZ-Forward hYWHAZ-Reverse	AGCAGGCTGAGCGATATGAT TCTCAGCACCTTCCGTCTTT
hSys1 ( <i>Homo sapiens</i> SYS1 Golgi-localized integral membrane protein homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (SYS1), transcript variant1, mRNA), NM_033542.3	hSys1-Forward hSys1-Reverse	GGCTGTGCTGATAGTGCTGA AAAGGGAGAAGGTGGCCTAA
hTTI2 ( <i>Homo sapiens</i> tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2), mRNA), NM_006528.2	hTTI2-Forward hTTI2-Reverse	GGGCCCTACTTCTCCGTTAC CACACTGGTCGTCCACACTC

## 2.7 Proteinbiochemische Methoden

### 2.7.1 Expressionsanalyse in *E.coli*

Der Expressionstest in den *E.coli* Stämmen BL21 (DE3) und Rosetta™ (DE3) erfolgte in einem Maßstab von 3 ml. Dazu wurde eine Vorkultur mit LB-Medium verdünnt und Kulturen mit einer OD600 von 0,3 angesetzt und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD600 von ca. 0,8 schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression mit IPTG-Konzentrationen in einem Bereich von 10 µM bis 1 mM im Ansatz. Bei dem Expressionstest wurden verschiedene Inkubationszeiten nach der Induktion getestet, die zwischen 4 und 16 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur, 30 °C, 37 °C) lagen. Eine mögliche Optimierung der Expression wurde auch durch die Zugabe von 1% Glukose und/oder 2% Ethanol untersucht. Zur Analyse der Expression erfolgte die Aufnahme der *E.coli* Zellen in 500 µl Lyse-Puffer (50 mM Kaliumphosphat, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton, 10 mM Imidazol), gefolgt von einem dreimaligen Frost-Tau-Zyklus zur Lyse (Trockeneis, 42 °C Wasserbad). Anschließend wurden die Proben sonifiziert (3 Zyklen, 75%, 10 sec). Nach der Zentrifugation bei 13.000xg für 20 min bei 4 °C wurde der

Überstand (lösliche Fraktion) abgenommen. Das Zellpellet (unlösliche Fraktion) resuspendierte man in 400 µl Puffer (30 mM Tris, pH 7,5). Überstand und Pellet wurden zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität, sowie zur Analyse mittels SDS-PAGE und *Western Blot* verwendet.

Nach der Bestimmung der optimalen Bedingungen zur Proteinexpression, erfolgte diese im vergrößerten Maßstab von 6 L *E.coli* Schüttelkultur. Dazu wurde eine Vorkultur aus 3x100 ml LB Medium aus dem entsprechenden Glycerolstock unter Zugabe des Selektivantibiotikums angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde daraus eine Hauptkultur mit einem Volumen von 6 L mit einer Ausgangs-OD600 von 0,3 angesetzt. Diese inkubierte man schüttelnd bei 37 °C (Infors HAT multitron bei 90-120 rpm), beim Erreichen einer OD600 von 0,8 erfolgte die Induktion mit der beim Expressionstest ermittelten optimalen IPTG-Konzentration sowie die Zugabe von Ethanol und/oder Glukose. Die Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2-9 dargestellt.

**Tabelle 2-9: Rekombinante Expression in *E.coli*: Verwendete Plasmide und Expressionsbedingungen**

Plasmid	<i>E.coli</i> Expressionsstamm	IPTG	Expressionsbedingungen	Zusätze
APH (pET28a+)	Rosetta (DE3)	10 µM	Raumtemperatur 16 Stunden	2% Ethanol
SUMO-Aβ40 (pET-SUMO)	Rosetta (DE3)	50 µM	Raumtemperatur 16 Stunden	---
GST-Aβ (pET41a+)	BL21 (DE3)	Aβ42, Q3-Aβ40: 100µM	Raumtemperatur 16 Stunden	---
NANP-Aβ (pET28a+)	BL21 (DE3)	Aβ40, Aβ42, Q3-Aβ42: 100 µM Q3-Aβ40: 500 µM	Raumtemperatur 16 Stunden	---
scULP (pET28a+)	Rosetta (DE3)	750 µM	37 °C, 4 Stunden	---
TEV-Protease (pET28a+)	BL21 (DE3)	1 mM	Raumtemperatur 16 Stunden	1% Glukose

## 2.7.2 Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisation

Die *E.coli* Suspensionskulturen wurden nach der Expression im großen Maßstab (6L) folgendermaßen aufgeschlossen: Nach der Zentrifugation der Kultur (Beckmann Avanti J20; 8000xg, 15 min, 20 °C, Rotor JLA 8.1000) wurde das Zellpellet in ca. 250 ml Puffer (Auftragspuffer/Equilibrierungspuffer für die folgende Reinigung) resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss mittels Hochdruck-Homogenisation (*French Pressure Cell Press*, Thermo Scientific) bei 1000-1200 psi in drei Wiederholungen nach Angaben des Herstellers. Dazwischen wurde die Suspension auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden

durch anschließende Zentrifugation (4 °C, 1 h, 108.000×g) entfernt, die Reinigung des Überstandes erfolgte entsprechend der Beschreibung im jeweiligen Abschnitt.

### 2.7.3 Proteinreinigung

Bei der Reinigung der rekombinanten Proteine nach dem Zellaufschluss wurden folgende chromatographische Verfahren angewendet: Die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule beruht auf der reversiblen Bindung der Histidinreste des Zielproteins (6x His-tag) an die Nickel-Ionen des Säulenmaterials. Die Elution erfolgt unter Zusatz von Imidazol. Bei der Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) handelt es sich um ein nicht-adsorptives Chromatographieverfahren, das auf der Trennung von Proteinen oder Peptiden aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Größe beruht. Große Moleküle durchlaufen die Gelmatrix schneller, kleine Moleküle eluieren später, da sie in die Poren des Gelfiltrationsmaterials eindringen können. Bei der Ionenaustausch-Chromatographie werden Proteine anhand ihrer Interaktion mit dem geladenen Säulenmaterial getrennt. Bei der Anionenaustausch-Chromatographie binden negativ geladene Proteine oder Puffermoleküle an positive Ladungsträger der Matrix. Die Elution erfolgt durch Erhöhung der Salzkonzentration, was die Verdrängung des gebundenen Proteins zur Folge hat. Bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie beruht die Trennung auf Wechselwirkungen unpolare Oberflächenregionen des Proteins mit der hydrophoben stationären Phase. Die Wechselwirkungen entstehen dabei durch eine erhöhte Salzkonzentration (Ammoniumsulfat), die Elution wird anschließend mit einem sinkenden Salz-Konzentrationsgradienten durchgeführt.

#### 2.7.3.1 Expression und Reinigung von APH aus Sf21 Zellen (Baculovirus-Expressionssystem)

Die Reinigung der rekombinanten Acylpeptidhydrolase erfolgte aus 100 ml Suspensionskultur transfizierter Sf21 Zellen. Dazu wurden  $1,5 \times 10^8$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 ml mit APH-P3-Virusstock mit einer MOI von 1 (Virustiter  $1 \times 10^7$  pfu/ml) infiziert. Der Überstand wurde nach 72 Stunden durch Zentrifugation bei 500×g geerntet und auf eine Endkonzentration von 15% Ammoniumsulfat eingestellt. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 30.000×g für 30 min wurde der Überstand mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration, wie in Tabelle 2-10 beschrieben, gereinigt. Anschließend erfolgte das Aliquotieren der gereinigten APH und das Einfrieren bei -20 °C unter Zusatz von 10% Glycerol (v/v).

**Tabelle 2-10: Reinigung der Acylpeptidhydrolase aus Sf21 Zellen**

Reinigungsschritt	1	2
Chromatographische Methode	Ni-NTA Affinitätschromatographie	Gelfiltration
Säulenmatrix (Amersham Biosciences)	Chelating Sepharose Fast Flow	Superdex 200 (10 mm x 300 mm)
Säulenvolumen	20 ml	24 ml
Equilibrierung		
Puffer	40 mM Tris 300 mM NaCl 15% Ammoniumsulfat	40 mM Tris 50 mM NaCl
pH	7,4	7,4
Volumen	5 CV	5 CV
Probenauftrag	100 ml	500 µl (von ca. 15 ml)
Waschen		
Puffer	40 mM Tris 50 mM NaCl 15% Ammoniumsulfat	
pH	7,4	
Volumen	4 CV	
Elution		
Puffer	40 mM Tris 50 mM NaCl 15% Ammoniumsulfat 500 mM Imidazol	40 mM Tris 50 mM NaCl
pH	7,4	7,4
Volumen	Gradient über 6 CV	5 CV
Probenvorbereitung für den folgenden Schritt	Konzentrierung der Probe mittels Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussvolumen 10.000 Da)	

### 2.7.3.2 Expression und Reinigung von APH aus *E.coli*

Die Expression der rekombinanten Acylpeptidhydrolase in *E.coli* Suspensionskultur fand im 6 L Maßstab unter den zuvor optimierten Bedingungen statt (siehe Tabelle 2-9). Nach dem anschließenden Aufschluss der Zellen mittels Hochdruck Homogenisation (siehe Abschnitt 2.7.2) erfolgte die Reinigung des Überstandes mittels Ni-NTA-Affinitäts- und Anionenaustausch-Chromatographie wie in der folgenden Tabelle 2-11 beschrieben. Die gereinigte APH wurde bei 4°C aufbewahrt.

**Tabelle 2-11: Reinigung der rekombinanten Acylpeptidhydrolase aus *E.coli* Rosetta (DE3)**

Reinigungsschritt	1	2	3
Chromatographische Methode	Ni-NTA Affinitätschromatographie	Ni-NTA Affinitätschromatographie	IEX Anionenaustausch-Chromatographie
Säulenmatrix (Amersham Biosciences)	EBA Streamline Column	Chelating Sepharose Fast Flow	Mono Q (GE Healthcare)
Säulenvolumen	Volumen expandiert 245 ml (Auftrag, Waschen) Volumen verdichtet 100 ml (Elution)	20 ml	8 ml

Equilibrierung	Puffer	50 mM Tris 300 mM NaCl	50 mM Tris 100 mM NaCl	30 mM Bis-Tris
	pH	7,4	pH 7,4	7,0
	Volumen	5 CV	5 CV	5 CV
Probenauftrag		1 L	90 ml	100 ml
Waschen 1	Puffer	50 mM Tris 300 mM NaCl 10 mM Imidazol	50 mM Tris 300 mM NaCl 10 mM Imidazol	30 mM Bis Tris
	pH	7,4	7,4	7,4
	Volumen	5 CV	5 CV	3 CV
Waschen 2	Puffer	50 mM Tris 50 mM NaCl 10 mM Imidazol	50 mM Tris 50 mM NaCl 50 mM Imidazol	
	pH	7,4	7,4	
	Volumen	5 CV	5 CV	
Elution	Puffer	50 mM Tris 50 mM NaCl 500 mM Imidazol	50 mM Tris 50 mM NaCl 350 mM Imidazol	30 mM Bis-Tris 500 mM NaCl
	pH	7,4	7,4	7,0
	Volumen	90 ml	Gradient über 10 CV 90 ml	Gradient über 10 CV 15 ml
Anschließende Dialyse	Puffer	50 mM Tris 100 mM NaCl	30 mM Bis-Tris	40 mM Tris 50 mM NaCl
	pH	7,4	7,0	7,4

### 2.7.3.3 Expression und Reinigung der SUMO-Protease scULP aus *E.coli*

Die Isolation der C-terminalen katalytischen Domäne der Ulp1 (EC=3.4.22.68, 621 AA), welche als scULP bezeichnet wird (gi 8569259) und eine Größe von 221 Aminosäuren hat, erfolgte aus dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*. Dazu wurde eine Hefekolonie in 20 µl 0,25% DMSO in Wasser (v/v) aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die anschließende PCR zur Amplifikation der scULP, wobei man gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen für die Klonierung einfügte, wurde mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt (siehe Anhang). Das entstandene Konstrukt mit einer Länge von 681 bp wurde in den Vektor pJET nach Angaben des Herstellers zwischenkloniert. Nach der Überprüfung der Sequenz wurde diese mittels der eingefügten Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* gerichtet in den Expressionsvektor pET28a+ kloniert, sodass die Sequenz zusätzlich den vektorinternen N- und C-terminalen His-tag beinhaltet und eine Größe von 750 bp aufweist (249 Aminosäuren, Molekulargewicht 28995.9 Da). Nachdem die optimalen Bedingungen ermittelt wurden (Tabelle 2-9), erfolgte die Expression in einer *E.coli* Suspensionskultur mit einem Volumen von 1 L. Nach dem Zellaufschluss (Abschnitt 2.7.2) wurde der Überstand mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie über den N- und C-terminalen His-tag gereinigt, wie in Tabelle 2-12 beschrieben. Nach der Reinigung wurde die scULP durch Dialyse in den

Reaktionspuffer (Malakhov *et al.* 2003) überführt und bei -80 °C unter Zusatz von 50% (v/v) Glycerol gelagert.

**Tabelle 2-12: Reinigung der rekombinanten scULP aus *E.coli* Rosetta (DE3)**

Reinigungsschritt		1
Chromatographische Methode		Ni-NTA Affinitätschromatographie
Säulenmatrix (Amersham Biosciences)		Chelating Sepharose Fast Flow
Säulenvolumen		5 ml
Equilibrierung		
	Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl
	pH	7,2
	Volumen	5 CV
Probenauftrag		150 ml
Waschen		
	Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
	pH	7,2
	Volumen	4 CV
Elution		
	Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 200 mM Imidazol
	pH	7,2
	Volumen	Stufengradient: 100 mM Imidazol 6 CV 150 mM Imidazol 6 CV
Dialyse		
	Puffer	50 mM Tris 300 mM NaCl 1mM DTT 0,2% Triton
	pH	8,0
	Volumen	2 x 2L

#### 2.7.3.4 Expression und Reinigung von SUMO-A $\beta$ 40 aus *E.coli*

Die kodierende Sequenz des Peptids A $\beta$ 40 lag bereits als Fusionskonstrukt im Vektor pET-SUMO vor, die Klonierung wurde zuvor von Dr. D. Schlenzig (Probiobdrug AG) durchgeführt. Nachdem die optimalen Bedingungen ermittelt wurden (Tabelle 2-9), erfolgte die Expression in einer *E.coli* Suspensionskultur mit einem Volumen von 6 L. Nach dem Zellaufschluss (Abschnitt 2.7.2) erfolgte eine Zwei-Schritt-Reinigung bestehend aus Ni-NTA-Affinitätschromatographie über den vektorinternen N-terminalen His-*tag* und anschließender Hydrophober Interaktionschromatographie, wie in Tabelle 2-13 beschrieben. Nach der abschließenden Dialyse wurde die Probe mittels Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussvolumen 10.000 Da) auf 75 ml konzentriert und bei -20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 2-13: Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins SUMO-A $\beta$ 40 aus *E.coli* Rosetta (DE3)**

Reinigungsschritt	1	2
Chromatographische Methode	Ni-NTA Affinitätschromatographie	Hydrophobe Interaktionschromatographie
Säulenmatrix (Amersham Biosciences)	EBA Streamline Columnn	Butylsepharose (GE Healthcare)
Säulenvolumen	Volumen expandiert 245 ml (Auftrag, Waschen) Volumen verdichtet 100 ml (Elution)	10 ml
Equilibrierung	Puffer 50 mM Tris 500 mM NaCl pH 8,0 Volumen 5 CV	50 mM Tris 1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,0 5 CV
Probenauftrag	1 L	180 ml
Waschen	Puffer 50 mM Tris 500 mM NaCl 50 mM Imidazol pH 8,0 Volumen 4 CV	50 mM Tris 1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,0 5 CV
Elution	Puffer 50 mM Tris 350 mM Imidazol pH 8,0 Volumen 120 ml	50 mM Tris 8,0 Ammoniumsulfat Stufengradient (1 M, 0,9 M, 0,8 M, 0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) über 210 ml
Probenaufbereitung	Zugabe von 60 ml 3 M Ammoniumsulfatlösung (1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> im Ansatz)	Dialyse gegen folgenden Puffer 30 mM Tris pH 8,0

Zur anschließenden Abspaltung des SUMO-Fusionspartners und Freisetzung des A $\beta$ 40-Peptids wurde die scULP1-Protease in einem molaren Verhältnis von 1:80 eingesetzt und die Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Reinigung der A $\beta$ -Peptide wurde mittels Umkehrphasen-HPLC durchgeführt, beschrieben in Abschnitt 3.2.1.2.

### 2.7.3.5 Expression und Reinigung von (NANP)<sub>19</sub>-A $\beta$ aus *E.coli*

Die A $\beta$ -Fusionsproteine wurden rekombinant im Vektor pET28a+ im *E.coli* Expressionsstamm BL21(DE3) mit N-terminalem His-tag exprimiert. Nach der Ermittlung der optimalen Bedingungen (Tabelle 2-9), erfolgte die Expression in einer *E.coli* Suspensionskultur mit einem Volumen von 6 L. Nach dem Zellaufschluss (Abschnitt 2.7.2) wurde der Überstand mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter Zusatz von 6M Guanidiniumchlorid über den N-terminalen His-tag gereinigt, wie in Tabelle 2-14 beschrieben.

**Tabelle 2-14: Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins (NANP)<sub>19</sub>-A $\beta$  aus *E.coli* BL21**

Reinigungsschritt	1	2
Chromatographische Methode	Ni-NTA Affinitätschromatographie	Entsalzung (Größenausschlusschromatographie)
Säulenmatrix (Amersham Biosciences)	EBA Streamline Column	Sephadex G25 („Hi Prep 26/10 Desalting Column“)
Säulenvolumen	Volumen expandiert 245 ml (Auftrag, Waschen) Volumen verdichtet 100 ml (Elution)	53 ml
Equilibrierung		
Puffer	30 mM Tris 6 M Guanidiniumchlorid	10 mM Tris 0,5 mM EDTA 1 mM DTT 0,1 M NaCl
pH	8,0	8,0
Volumen	5 CV	5 CV
Probenauftrag	1000 ml	Ca. 10 ml
Waschen		
Puffer	30 mM Tris 6 M Guanidiniumchlorid 20 mM Imidazol	
pH	6,0	
Volumen	4 CV	
Elution		
Puffer	30 mM Tris 6M Guanidiniumchlorid 250 mM Imidazol	
pH	6,0	
Volumen	Ca. 250 ml	
Probenvorbereitung für den folgenden Schritt	Konzentrierung der Probe mittels Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussvolumen 10.000 Da)	

Um die Proben mittels SDS-PAGE zu analysieren, erfolgte eine Ethanol-fällung zur Entfernung des Guanidiniumchlorids. 25  $\mu$ l Probe wurden dazu mit 225  $\mu$ l kaltem Ethanol versetzt, durchmischt und für 20 min auf Trockeneis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C (15.000 $\times$ g). Die Pellets wurden mit 250  $\mu$ l kaltem, 90%igem Ethanol gewaschen. Danach wurden sie getrocknet, in Probenpuffer gelöst, denaturiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Probe wird anschließend entsalzt, um das Guanidiniumchlorid zu entfernen und das Fusionsprotein in den TEV-Protease-Reaktionspuffer zu überführen. Für die folgende Spaltung wurde die rekombinant hergestellte TEV-Protease in einem molaren Verhältnis von 1:20 eingesetzt. Zur Erzeugung des N-terminalen Pyroglutamats bei Q3-A $\beta$ 40/42 erfolgte gleichzeitig die Zugabe der Glutaminylzyklase im molaren Verhältnis von 1:2000. Die Inkubation fand für 12-16h bei Raumtemperatur statt. Durch die Aggregation der A $\beta$ -Peptide nach der Abspaltung können diese durch Zentrifugation (10 min, 9000 $\times$ g) sedimentiert werden. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die weitere Reinigung der A $\beta$ -Peptide erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC/Umkehrphasen-Chromatographie (siehe Abschnitt 3.2.2.2).

### 2.7.3.6 Expression und Reinigung der TEV-Protease aus *E.coli*

Die TEV-Protease wurde rekombinant im Vektor pET28a+ im *E.coli* Stamm BL21(DE3) mit N-terminalem His-tag und C-terminalem Flag-tag exprimiert. Nach dem Expressionstest und der Optimierung der Bedingungen (Tabelle 2-9), erfolgte die Expression in einer *E.coli* Suspensionskultur mit einem Volumen von 6 L. Nach dem Zellaufschluss (Abschnitt 2.7.2) wurde der Überstand mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie über den N-terminalen His-Tag gereinigt, wie in Tabelle 2-15 beschrieben. Es schloss sich eine Dialyse (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 7,5), sowie ein Aufkonzentrierungsschritt mittels Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussvolumen 10.000 Da) auf ca. 5 mg/ml an. Die TEV-Protease wurde bei -80 °C aufbewahrt.

**Tabelle 2-15: Reinigung der rekombinanten TEV-Protease *E.coli* BL21 (DE3)**

Reinigungsschritt		1
Chromatographische Methode		Ni-NTA Affinitätschromatographie
Säulenmatrix (Amersham Biosciences)		EBA Streamline Column
Säulenvolumen		Volumen expandiert 245 ml (Auftrag, Waschen) Volumen verdichtet 100 ml (Elution)
Equilibrierung	Puffer	50 mM HEPES 800 mM NaCl 10% Glycerol 10 mM Imidazol
	pH	7,5
	Volumen	5 CV
Probenauftrag		700 ml
Waschen	Puffer	50 mM HEPES 50 mM NaCl 10% Glycerol Schritt 1: 50 mM Imidazol Schritt 2: 100 mM Imidazol
	pH	7,5
	Volumen	5 CV
Elution	Puffer	50 mM HEPES 50 mM NaCl 10% Glycerol 250 mM Imidazol
	pH	7,5
	Volumen	Ca. 200 ml

### 2.7.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinen, die entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Durch den Zusatz des Detergens SDS werden die Proteine denaturiert, außerdem wird die Eigenladung

der Proteine durch die Anlagerung des negativ geladenen SDS (ca. 1 Molekül pro 1,6 Aminosäuren) überdeckt. Dadurch bewegen sich die Proteine im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenen prozentige Polyacrylamidgels mit einer Stärke von 1 mm zur Analyse von Proteinen verwendet (Tabelle 2-16). Für die reduzierende Elektrophorese wurden die Proben mit 4 x SDS-Probenpuffer (Roti®-Load 1, Roth) im Verhältnis 1:3 (v/v) versetzt und 5-10 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese fand in einer mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS) gefüllten vertikalen Trennkammer bei einer konstanten Spannung von 120 V statt.

**Tabelle 2-16: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels**

Komponente	Sammelgel 3 %	Trenngel		
		10 %	12 %	17,5 %
Wasser	4,85 ml		3,95 ml	1,95 ml
Sammelgel-Puffer (500 mM Tris/HCl, pH 6,8)	1,85 ml	-----	-----	-----
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8)	-----	2,8 ml	2,80 ml	2,8 ml
Acrylamid	0,75 ml	3,75 ml	4,50 ml	6,5 ml
10 % APS	40 µl	60 µl	60 µl	60 µl
10 % SDS	150 µl	225 µl	225 µl	225 µl
TEMED	12 µl	18 µl	18 µl	18 µl

Zur Untersuchung der A $\beta$ -Peptide kamen zusätzlich Novex® 10-20% Tris-Tricin Fertiggele (Life Technologies) zum Einsatz. Die Proben wurden dazu mit 2x Novex® Tricin Probenpuffer versetzt und 5-10 bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 100 V mit dem Tris-Tricin SDS Puffer (Biorad) durchgeführt. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation des Gels für 10-20 min in Coomassie Färbelösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,025 % Serva blue W), die Entfärbung des Hintergrundes fand durch mehrmaliges Waschen in 10 % Essigsäure statt. Zur sensitiveren Detektion geringer Protein- und Peptidmengen wurde alternativ eine Silberfärbung nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Thermo Scientific, Pierce)

### 2.7.5 Western Blot-Analyse

Beim *Western Blot* wurden die zuvor über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektrophorese im *Semi-Dry* Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um das immobilisierte Zielprotein anschließend durch Antikörper spezifisch detektieren zu können. Es kam ein diskontinuierliches Puffersystem zur Anwendung (Kyhse-Andersen, 1984). Filterpapier und Membran wurden auf die jeweilige Gelgröße zugeschnitten und im dazugehörigen Lösungsmittel für fünf Minuten equilibriert. Auf die Anode der Blotapparatur (BioRAD) wurden anschließend in folgender Reihenfolge aufeinandergelegt: Filterpapier (Anodenpuffer 1), Filterpapier (Anodenpuffer 2), Nitrocellulosemembran (Wasser), Gel,

Filterpapier (Kathodenpuffer). Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran fand bei einer konstanten Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  über einen Zeitraum von 90 min statt. Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für 2 h in TBS mit 0,1% Tween-20 mit 5% Trockenmilch (Blockierlösung) inkubiert. Der primäre Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers in Blockierlösung verdünnt (siehe Anhang) und entweder über Nacht im Kühlraum oder für 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nach dem mehrmaligen Waschen mit TBS mit 0,1% Tween-20 erfolgte die Zugabe des spezifischen, in Blockierlösung verdünnten, sekundären Antikörpers. Dieser bindet spezifisch an den konstanten Bereich des primären Antikörpers und ist mit Meerrettich-Peroxidase (*Horse radish Peroxidase*, HRP) bzw. Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt. Darauf folgend konnte die Detektion der Zielproteine abhängig vom verwendeten Enzym durch das Hinzufügen der jeweiligen Substrate stattfinden. Bei der Reaktion mit der alkalischen Phosphatase wurde die Membran zunächst für 5 min mit AP-Puffer equilibriert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Substrate: 33  $\mu\text{l}$  BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat; 50 mg/ml, in 100% DMF) und 66  $\mu\text{l}$  NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid; 50 mg/ml, in 70% DMF) wurden dazu in 10ml AP-Puffer gelöst. Bei der Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase entsteht daraufhin ein violett-blauer Farbstoff. Die *horse radish Peroxidase* katalysiert die Umsetzung von Luminol zu seiner oxidierten Form. Es kam der *SuperSignal® West Pico* bzw. *Femto Chemiluminescent Substrate Kit* der Firma Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers zur Anwendung. Die entstandene Chemolumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgen-Films (Thermo Scientific) visualisiert.

**Tabelle 2-17: Für Western Blot-Analysen verwendete Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
TBS	20 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl
Anodenpuffer 1	300 mM Tris, pH 10,4 5% (V/V) Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris, pH 10,4 5% (V/V) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris, pH 9,4 40 mM 6-Aminohexansäure 5% (V/V) Methanol
AP-Puffer	100 mM Tris, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
Waschen	3 x 10 min in TBS-Tween 20

## 2.7.6 UV/VIS Spektroskopie

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde mit Hilfe des Nanodrop ND-2000 (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Dabei erfolgte die Aufnahme des UV-Spektrums für den Wellenlängenbereich von 220 nm bis 340 nm. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum der Proteine, bedingt durch die Absorption der beiden aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie vorhandener Disulfidbrücken. Die Proteinkonzentration ließ sich aus der Absorption bei 280 nm unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten bestimmen. Der molare Extinktionskoeffizient wurde zuvor aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms ExPASy- Prot Param ([us.expasy.org](http://us.expasy.org)) ermittelt. Der 280 nm Wert wurde zusätzlich um den 320 nm Wert korrigiert, da hier Proteinaggregationen durch Streulichteffekte sichtbar werden. Die molaren Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 280 nm aller im Verlauf dieser Arbeit exprimierten Proteine und Peptide sind in Tabelle 2-18 zusammengestellt.

**Tabelle 2-18: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der verwendeten Proteine und Peptide** (alle Cysteinreste werden als gepaarte Cystine angenommen)

Peptid/ Protein	$\epsilon_{280\text{nm}} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	Abs 0,1% (=1 g/l)	Molekulargewicht [Da]
TEV-Protease	33710	1,166	28918,6
APH (pET28a+)	121780	1,460	83387,8
APH (pcDNA3.1)	123270	1,484	83042,3
scULP1	31525	1,087	28995,9
SUMO-A $\beta$ 40	2980	0,168	17727,8
(NANP) <sub>19</sub> -A $\beta$ 42	2980	0,207	14413,2
(NANP) <sub>19</sub> -A $\beta$ 40	2980	0,209	14229,0
(NANP) <sub>19</sub> -Q3-A $\beta$ 42	2980	0,209	14226,1
(NANP) <sub>19</sub> -Q3-A $\beta$ 40	2980	0,212	14041,8
A $\beta$ 40	1490	0,344	4329,8
A $\beta$ 42	1490	0,330	4514,4
pE3-A $\beta$ 40	1490	0,360	4126,7
pE3-A $\beta$ 40	1490	0,344	4309,9

## 2.7.7 Konzentrationsbestimmung nach der Bradford Methode

Proteinkonzentrationen wurden mittels *Smart Spec Plus* Spectrophotometer (Bio-Rad) und der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Reaktion des Farbstoffes Coomassie Blau mit den basischen Aminosäuren eines Proteins, und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit der Proteinkonzentration von 470 nm zu 595 nm. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung mit Hilfe einer Standardgeraden bestimmt werden. Diese wurde mit bekannten Proteinkonzentrationen an Rinderserumalbumin erstellt. Im Konzentrationsbereich von 0-1 mg/ml lag eine lineare Abhängigkeit der Absorption bei 595nm von der Proteinkonzentration vor. Zur Bestimmung

wurden 750 µl Bradford Reagenz mit 25 µl einer wässrigen Probe gemischt und vor der Messung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

## 2.8 Enzymatische Methoden

### 2.8.1 Fluoreszenzgekoppelter Aktivitätstest und Bestimmung kinetischer Parameter

Die Aktivitätsbestimmung der APH beruht auf der katalytischen Abspaltung des AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) vom Substrat Ac-Ala-AMC. Das freigesetzte AMC fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und Emissionswellenlänge von 460 nm. Der zeitliche Verlauf der AMC-Freisetzung wurde am Mikroplattenphotometer *FLUOstar Optima* verfolgt. Das Substrat wurde in einer Stammlösung von 0,432 M in DMF gelöst und vor der Verwendung mit Messpuffer (30 mM Tris, pH 7,4) auf eine Konzentration von 0,02 M verdünnt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 270 µl pro Kavität einer 96-well Platte. Zunächst wurden 200 µl Messpuffer und 20 µl Probe (Enzym) pro well pipettiert und für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Enzymkonzentration wurde dabei so gewählt, dass während des gesamten Messzeitraums ein linearer Anstieg der AMC-Fluoreszenz zu beobachten war. Nach der Vorinkubation erfolgte die Zugabe von 50 µl Substrat mit einer Endkonzentration von 4 mM im Ansatz. Während der anschließenden Messung bei 37 °C wurde der zeitliche Verlauf der freigesetzten relativen fluoreszierenden Einheiten (RFU) bei 460 nm bei definierter Detektorempfindlichkeit (*Gain* 1511 bzw. 1244) über 15 min aufgezeichnet. Mit Hilfe einer AMC-Standardgerade lässt sich aus den RFU die freigesetzte Menge AMC berechnen. Zur Erstellung dieser Standardgerade wurde die Fluoreszenz verschiedener AMC-Konzentrationen im Messpuffer ermittelt. Dafür wurde eine 0,1 M Stammlösung AMC in 100 % DMSO hergestellt und mit dem Puffer 30 mM Tris, pH 7,4 1:500 verdünnt. Die Erstellung der AMC-Standardgerade erfolgte im Konzentrationsbereich zwischen  $3 \times 10^{-5}$  M bis  $3,9 \times 10^{-8}$  M. Da eine Unit die Enzymmenge ist, die unter Standardbedingungen in 1 min 1 µmol Substrat umsetzt, ließen sich mit Hilfe der Standardgeraden aus den erhaltenen RFU die Units und damit die Spezifische Aktivität der APH berechnen.

Zur Charakterisierung rekombinant hergestellter APH wurden außerdem die kinetischen Parameter  $k_{cat}$ ,  $K_m$  sowie  $k_{cat}/K_m$  mit dem Substrat Ac-Ala-AMC bestimmt. Die Michaeliskonstante  $K_m$  gibt die Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Grundlage für die Ermittlung ist die Bestimmung der enzymatischen Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Bereich von ca.  $0,25 \times K_m$  bis  $10 \times K_m$  des erwarteten  $K_m$ -Wertes. 50 µl Substrat Ac-Ala-AMC, welches in Messpuffer (50 mM Tris, pH 7,4) gelöst war, wurde in den verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Messpuffer und 50 µl APH, die ebenfalls in Messpuffer vorlag. Durch die Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet

und über einen Zeitraum von 25 min bei 37°C dokumentiert. Eine Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte anhand des Modells nach Michaelis-Menten (Software Grafit, Version 5.0.4 für Windows; *Erithacus Software Ltd.*, Horley, GB).

## 2.9 Analytische Methoden

### 2.9.1 HPLC

Die Umkehrphasen-HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) ist ein weiteres chromatographisches Trennverfahren und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Reinigung und Detektion der A $\beta$ -Peptide verwendet. Dabei wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch (Eluent oder mobile Phase) unter hohem Druck über eine Trennsäule transportiert. Diese enthält die stationäre Phase, bestehend aus chemisch modifizierten Kieselgelen, die an ihrer Oberfläche bestimmte hydrophile Gruppen wie zum Beispiel n-Octadecyl (C18) oder n-Octyl (C8) tragen. Je nachdem wie stark die Bestandteile der zu trennenden Probe mit der stationären Phase wechselwirken, verbleiben sie unterschiedlich lange in der Säule. Die Trennung kann durch den Einsatz verschiedener stationärer Phasen, Lösungsmittelgemische sowie Temperatur beeinflusst werden. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gradienten-Elution wird das Laufmittel während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt, was im jeweiligen Abschnitt detaillierter beschrieben wird. Die Detektion der Peptide bei 214 nm nach der Trennung erfolgte über den UV-Vis-spektrophotometrischen Detektor (Hitachi L-7455). Die Stofftrennung wurde dabei in einem Chromatogramm dargestellt, das die Retentionszeit und die Intensität der jeweiligen Probenkomponente zeigt. Die aus der Umkehrphasen-HPLC resultierenden Fraktionen wurden mittels Massenspektrometrie (siehe 2.9.2) bzw. SDS-PAGE-Analyse (siehe 2.7.4) auf das Vorhandensein des rekombinanten A $\beta$ -Peptids überprüft. Positive Fraktionen wurden bei -80 °C eingefroren und anschließend durch Lyophilisierung im Vakuum (Gefriertrocknungsanlage, Christ) getrocknet, um zu gewährleisten, dass Lösungsmittel und Wasser der Probe im Vakuum verdampfen und das A $\beta$ -Peptid in pulverisierter Form zurückbleibt.

### 2.9.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren zur Bestimmung der Masse eines Proteins und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Überprüfung der korrekten Größe der A $\beta$ -Peptide nach der Spaltung vom Fusionspartner bzw. nach der Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der die Proteine ionisiert werden, einem Analysator, in dem die Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt werden und einem Detektor, der die Signale der Ionenströme empfängt, verstärkt und aufzeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Voyager DE Pro Biospectrometry*

*Workstation* (Applied Biosystems) benutzt (Stickstofflaser, 337 nm, Pulshalbwertsbreite 3 ns, max. Folgefrequenz 20 Hz). Die jeweilige Probe wurde 1:1 mit gesättigter 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-Zimtsäure, (SA *sinapic acid*, in 50 % Acetonitril) gemischt, in der *Dried Droplet*-Methode auf die Messplatte aufgetragen und im positiven Reflektormodus gemessen. Für ein Spektrum wurden die Ergebnisse aus 300 Laserpulsen angereichert, gemittelt und geglättet und der Mittelwert aus 6 validen Spektren bestimmt.

### 2.9.3 ELISA

Zur Bestimmung des A $\beta$ -Peptid-Gehalts des Zellkultur-Überstandes nach der transienten Co-Expression von APH und APP Varianten in HEK293-Zellen wurde ein ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt. Pro Kavität einer 96-*well* Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp) erfolgte zunächst die Zugabe von 100  $\mu$ l Primärantikörper 4G8 (Firma Chemikon) mit einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml in PBS. Die Immobilisierung der Antikörper an der Oberfläche der Mikrotiterplatte erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt und 200  $\mu$ l ELISA-Blocker (Fa. Thermo Scientific, PIERCE) pro Kavität zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin folgte die Entfernung ungebundener Antikörper durch 6maliges Waschen mit je 300  $\mu$ l TBS + 0,1% Tween20 pro *well*. Je 100  $\mu$ l des 1:10 verdünnten Zellkultur-Überstandes wurden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 4 °C erfolgte ein erneuter Waschschrift, wobei 6mal je 300  $\mu$ l TBS + 0,1% Tween20 in die *wells* gegeben wurde. HRP-konjugierter 6E10 anti- $\beta$ -Amyloid Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) diente als Detektionsantikörper und wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml in ELISA-Blocker verwendet. 100  $\mu$ l wurden pro Kavität appliziert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem erneuten 6maligen Waschen mit TBS + 0,1% Tween20 erfolgte die Entwicklung der Farbreaktion durch die Zugabe von 100  $\mu$ l Peroxidase Substrat *SureBlue* (Fa. KPL). Dieses Substrat enthält den Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB), welcher nach Umsatz durch die Peroxidase eine blaue Färbung aufweist. Die Mikrotiterplatte wurde 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und die Peroxidase-Reaktion anschließend durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stopp-Lösung (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet. Durch Zugabe der Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag zu gelb, wonach die Lösung ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Die Signalstärke des Reaktionsprodukts ist proportional zur A $\beta$ -Peptidkonzentration in der Probe und wurde mit dem TECAN Sunrise Mikrotiterplatten Photometer erfasst.

### 2.9.4 Thioflavin-T (Th-T) – Assay

Der Thioflavin-T-Assay wurde durchgeführt, um die Aggregationskinetik von synthetischen und rekombinanten A $\beta$ -Peptiden zu untersuchen. Der Fluoreszenzfarbstoff wird zur Visualisierung und Quantifizierung sich bildender amyloider Strukturen eingesetzt. Thioflavin-T lagert sich dabei an  $\beta$ -Faltblattreiche Strukturen an, die in der Quartärstruktur amyloider Fibrillen vorhanden sind, was in einer starken Fluoreszenz resultiert.

Die lyophilisierten A $\beta$ -Peptide wurden für die Untersuchung zunächst in HFIP gelöst und die Konzentration anschließend im Spektrophotometer (BioRad) bei 280 nm bestimmt (siehe auch Konzentrationsbestimmung 2.7.6). Das Aliquotieren der Proben erfolgte so, dass die Konzentration bei einem späteren Lösen in 1 ml Puffer 40  $\mu$ M betrug. Die in HFIP gelösten Peptide wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach dem Abdampfen des HFIP über Nacht wurde das jeweilige Peptid in 100  $\mu$ l 0,1 M NaOH gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 800  $\mu$ l Puffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0) und die Titration auf pH 8,0 mit ca. 100  $\mu$ l 100 mM HCl, wodurch die Stammlösung eine Konzentration von 40  $\mu$ M aufwies. Für die anschließende Messung wurden noch weitere Verdünnungen im Puffer hergestellt (20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M). Das Lösen des Farbstoffs Thioflavin-T erfolgte in einer Konzentration von 40  $\mu$ M in 0,01% NaN<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O. 100  $\mu$ l der jeweiligen Peptidlösung und 100  $\mu$ l Th-T-Lösung wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (MicroWell™ 96-well-Platte schwarz, Nunc™) pipettiert. Die Messung der Thioflavin-T-Fluoreszenz erfolgte bei 37°C im *microplate reader* (NOVOstar, BMG) bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und Emissionswellenlänge von 440 nm und einer definierten Detektorempfindlichkeit (*Gain* 1600). Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 250 Stunden, wobei alle 30 min ein Messpunkt datiert wurde.

### 2.9.5 Transmissions Elektronenmikroskopie

Die aggregierten A $\beta$ -Peptide des Th-T-Tests (siehe 2.9.4) wurden zusätzlich mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Dazu wurde ein Tropfen der jeweiligen Probe auf ein Formvar-(Polyvinylformal) beschichtetes Kupfernetzchen (Plano GmbH, Wetzlar) aufgetragen. Nach 5 min wurde der Tropfen mittels Filterpapier entfernt und das Netzchen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde es mit Kontrastmittel (1% Uranylacetat) 2 min gefärbt. Es erfolgte die Untersuchung der Aggregate mit dem TEM 900 (Carl Zeiss SMT, Oberkochen) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Die Bilder wurden mit einer Slow-Scan-Kamera (Variospeed SSCCD camera SM-1k-120, TRS, Moorenweis) aufgenommen.

### 3. Ergebnisse

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Herstellung der Serinprotease APH in einem geeigneten Expressionssystem und die Etablierung einer Reinigungsstrategie. Anschließend sollte die APH enzymatisch charakterisiert werden, im Speziellen hinsichtlich ihrer publizierten Eigenschaft der A $\beta$ -Spaltung (Yamin *et al.* 2007, 2009).

Ebenfalls sollte die rekombinante Herstellung verschiedener A $\beta$ -Peptide in einem geeigneten Expressionssystem erfolgen, welche nach der optimierten Reinigung mit synthetisch hergestellten A $\beta$ -Peptiden z.B. hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens oder der Spaltung durch die APH verglichen werden sollten.

#### 3.1 Acylpeptidhydrolase (APH)

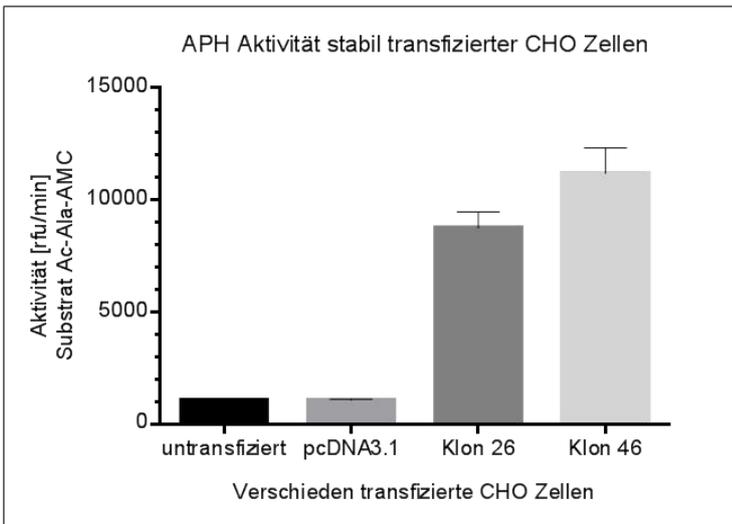
Um die Acylpeptidhydrolase zu charakterisieren und unter anderem hinsichtlich ihrer A $\beta$ -spaltenden Fähigkeit zu untersuchen, wurde die rekombinante Expression in verschiedenen Systemen getestet und optimiert. Die Expression wurde zunächst mit Hilfe eukaryotischer Systeme durchgeführt, um ein möglichst authentisches Protein zu generieren. Diese bieten einige Vorteile gegenüber der Expression in Prokaryoten, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Mechanismen zur posttranslationalen Modifikation. Des Weiteren war die Expression verwandter Proteasen im eukaryotischen System in der Probiodrug AG bereits gut etabliert, dazu gehörten die transiente und stabile Expression in *Chinese Hamster Ovary Cells* (CHO-Zellen). Diese Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) ist eine der am häufigsten verwendeten Zelllinien, die zur Produktion von rekombinanten Proteinen genutzt wird (Puck *et al.* 1958). Weiterhin sollte die Expression mit Hilfe des Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystems der Firma Life Technologies in Insektenzellen etabliert werden. Die Expression in Insektenzellen bietet im Vergleich zu Säugerzellen den Vorteil, dass einfache Kulturmedien ohne Additive verwendet werden können. Es wurden Zellen vom Typ Sf21 (*Spodoptera frugiperda*, Vaughn *et al.* 1977) bzw. High-Five (*Trichoplusia ni*, Wickham *et al.* 1992) genutzt. Die Expression der APH wurde dabei jeweils mittels *Western Blot* überprüft und hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität im Fluoreszenzgekoppeltem Aktivitätstest mit dem spezifischen Substrat Ac-Ala-AMC untersucht.

##### 3.1.1 Rekombinante Expression der APH in CHO-Zellen

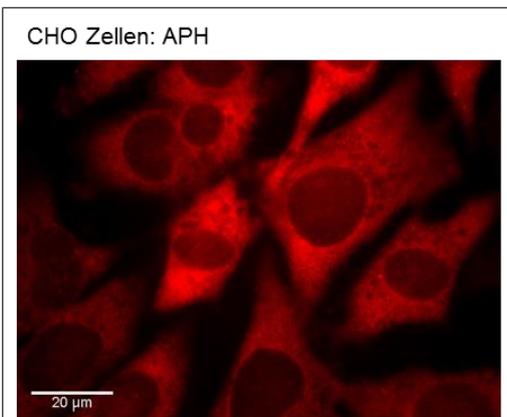
Zur APH-Expression wurde die Sequenz der humanen Acylpeptidhydrolase mit einem zusätzlichen N-terminalen His-tag und C-terminalen Flag-tag in den Vektor pcDNA3.1+ kloniert und intrazellulär in CHO-Zellen zunächst transient exprimiert. Nachdem mittels Fluoreszenzgekoppeltem Aktivitätstest mit dem spezifischen Substrat Ac-Ala-AMC und

*Western Blot* die Expression der enzymatisch aktiven APH bestätigt wurde, erfolgte die Herstellung stabil transfizierter APH-exprimierender CHO-Zellen wie in Abschnitt 2.6.3.3 beschrieben. Das Vorhandensein und die enzymatische Aktivität der APH im Zell-Lysat konnte auch hier mittels Aktivitätstest und *Western Blot* Analyse verifiziert werden (Abbildung 3-1 A/C). Die enzymatische APH-Aktivität war im Vergleich zu untransfizierten Zellen, bzw. zu mit pcDNA3.1+-Leervektor transfizierten Zellen um ca. das 10fache gesteigert (Abbildung 3-1 A).

A



B



C

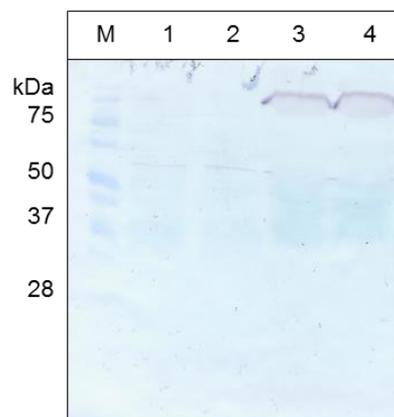


Abbildung 3-1:

**APH Expression in CHO-Zellen.**

**A) APH-Aktivität im Zell-Lysat stabil transfizierter CHO-Zellen:** Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der APH im Zell-Lysat von CHO- Zellen wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrats Ac-Ala-AMC mit einer Konzentration von 4 mM im Ansatz im Puffer bestehend aus 30 mM Tris, pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf  $1 \times 10^7$  Zellen normiert. Die Untersuchung erfolgte mit APH-exprimierenden, stabil transfizierten CHO-Zellen (Klon 26, 46), sowie untransfizierten CHO-Zellen und mit pcDNA3.1+-Leervektor stabil transfizierten CHO-Zellen.

**B) Immunfluoreszenz stabil transfizierter CHO-Zellen:** Detektion der APH mittels anti-*Flag-tag* Antikörper, als Sekundärantikörper wurde der Rhodamin Red-X Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden jeweils 1:100 in PBS verdünnt.

**C) Western Blot-Analyse stabil transfizierter CHO-Zellen:** Untersucht wurden je 20  $\mu$ l des entsprechenden Zell-Lysats. Als Primärantikörper wurde anti-*Flag-tag* Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Kaninchen-IgG (AP) (1:10000). M = Marker; 1 = CHO-Zellen, untransfiziert; 2 = CHO-Zellen, stabil transfiziert mit pcDNA3.1+; 3 und 4 = CHO-Zellen, stabil transfiziert mit APH Klon26/46.

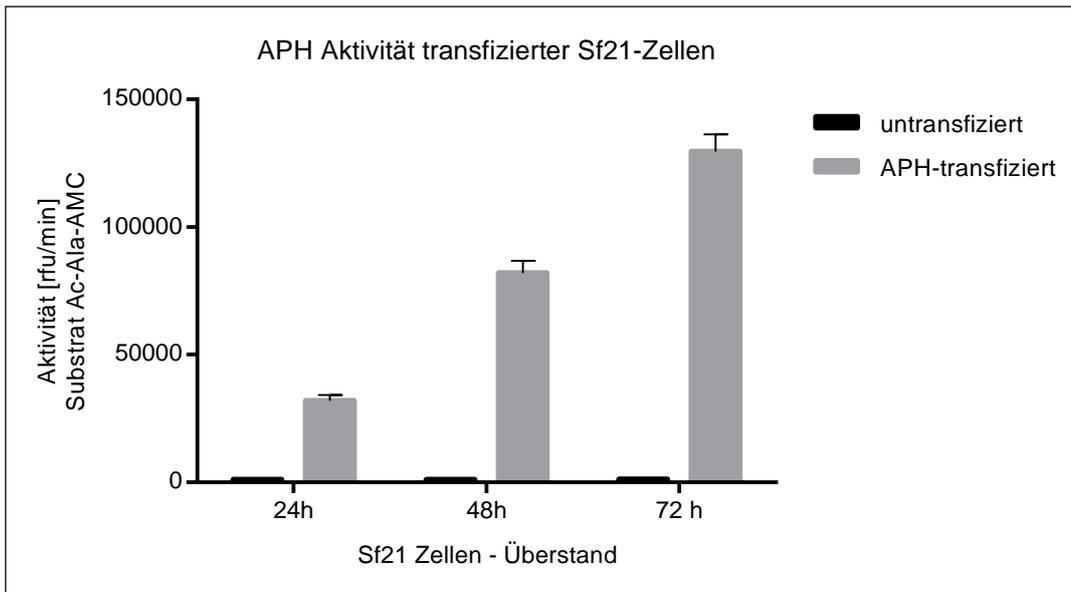
Um die Lokalisation der rekombinanten APH zu untersuchen, wurde Immunozytologische Diagnostik unter Verwendung eines anti-*Flag-tag* Antikörpers und dessen Detektion durch den Rhodamin-Sekundärantikörper Rhodamin Red-X durchgeführt, wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die rekombinante APH intrazellulär vorliegt (Abbildung 3-1 B).

Zur Maßstabsvergrößerung und Expressionsoptimierung wurde die stabil transfizierte APH-CHO-Zelllinie in Suspensionskultur überführt, jedoch war die Expressionsrate der APH im Vergleich zur adhärenenten Kultur geringer. Zusätzliche Versuche zur Fermentation führten nicht zum Erfolg, sodass keine Proteinreinigung durchgeführt wurde.

Da das Baculovirus-Expressionssystem die Möglichkeit der Proteinherstellung in Insektenzellen mit hohen Ausbeuten bietet (Smith *et al.* 1983), sollte die APH nachfolgend mit Hilfe dieses Systems hergestellt werden.

### 3.1.2 Rekombinante Expression der APH in Sf21 Zellen

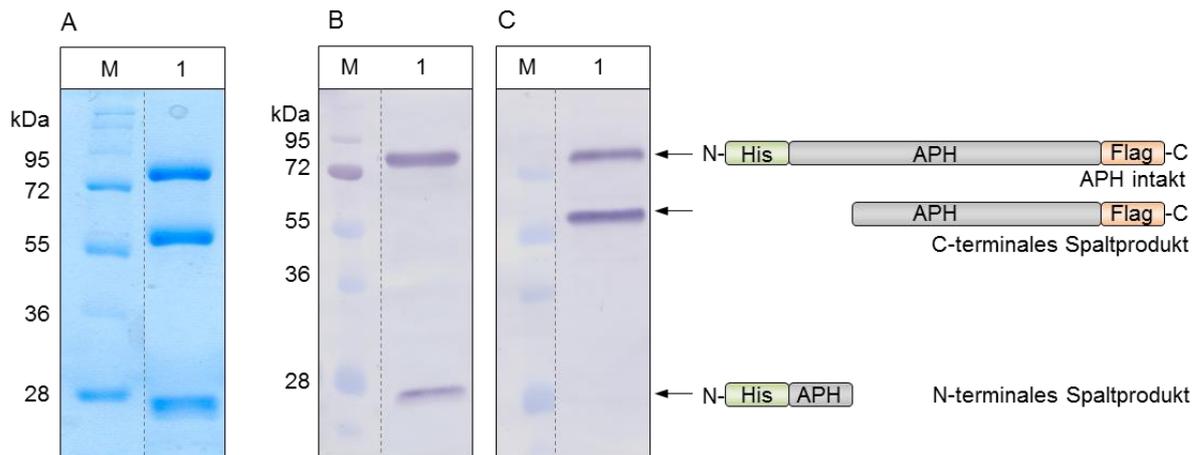
Das Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystem der Firma Life Technologies ist ein virales Transfektionssystem zur effizienten Produktion rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Dabei wird das *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) verwendet, welches in der Natur Insekten der Ordnung *Lepidoptera* befällt. Zur Nutzung des Virus als Expressionsvektor wird das für das Hüllprotein Polyhedrin codierende Gen durch ein Fremdgen ersetzt. Die Expression des eingefügten Gens steht somit unter der Kontrolle des viralen Polyhedrin-Promotors und ermöglicht die Produktion der virusfremden Proteine in hohem Maßstab. Das für die humane APH kodierende Gen wurde mit einem N-terminalen *His-tag* und einem C-terminalen *Flag-tag* im Vektor pFastBac™1 kloniert und in Sf21 Zellen exprimiert. Diese immortalisierte Zelllinie stammt aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.* 1977), der zur Familie der Eulenfalter gehört. Für den Expressionstest wurden Sf21-Zellen im 6-well Format mit APH-enthaltendem Virusstock infiziert (P3 Stock, MOI 1,  $1 \times 10^7$  pfu/ml), wie in Abschnitt 2.6.5 beschrieben. Die Aktivität der APH im Zell-Überstand konnte durch den Fluoreszenzgekoppeltem Aktivitätstest mit dem Substrat Ac-Ala-AMC bestätigt werden. Im Vergleich zu untransfizierten Zellen steigt die enzymatische Aktivität über den Zeitraum von 72 h bis auf das einhundertfache an (Abbildung 3-2). Da Sf21 Zellen sowohl in adhärenenter als auch in Suspensionskultur kultiviert werden können, war eine Vergrößerung auf ein Volumen von 100 ml im Schüttelkolben problemlos möglich und damit eine Herstellung rekombinanter APH im vergrößerten Maßstab.



**Abbildung 3-2:**

**APH-Aktivität im Überstand transfizierter Sf21 Zellen und untransfizierter Sf21 Zellen:** Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der APH im Überstand der Sf21 Zellen wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrates Ac-Ala-AMC mit einer Konzentration von 4 mM im Ansatz im Puffer bestehend aus 30 mM Tris, pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem P3-Virusstock mit einer MOI von 1 infiziert (Titer =  $1 \times 10^7$  pfu/ml). Die Überprüfung der Expression erfolgte 24 h, 48 h und 72 h nach der Infektion. Für die Messung wurden jeweils 20 µl des 2 ml-Überstandes aus einer Kavität einer 6-well Platte eingesetzt.

Für die Expression im Schüttelkolben wurden 100 ml Sf21-Suspensionskultur mit P3-Virusstock infiziert (MOI 1,  $1 \times 10^7$  pfu/ml) und die APH nach 72h aus dem Überstand mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 2.7.3.1). Die gereinigten Fraktionen wurden mittels Coomassie gefärbtem SDS-Gel und *Western Blot* analysiert (Abbildung 3-3). Es konnten 1 mg gereinigte APH mit ca. 25 U/mg (Ac-Ala-AMC) erhalten werden. Aus dem SDS-Gel wird ersichtlich, dass während der Expression bzw. Reinigung offenbar ein proteolytischer Abbau der APH stattgefunden hat, da zusätzlich zur distinkten Bande bei ca. 80 kDa, welche die APH repräsentiert, zwei weitere Banden bei ca. 55 kDa und 25 kDa auftreten (Abbildung 3-3 A). Mit dem His-tag-Antikörper konnte mittels *Western Blot* Analyse eine Bande bei 80 kDa detektiert werden, welche die intakte APH repräsentiert, sowie eine Bande auf einer Höhe von 25 kDa (Abbildung 3-3 B), die dem N-terminalen Spaltprodukt der APH zugeordnet werden kann. Durch die Verwendung des *Flag-tag* Antikörpers konnte im *Western Blot* ebenfalls die intakte APH bei 80 kDa nachgewiesen werden, sowie das putative C-terminale Fragment der APH mit einer Größe von 55 kDa (Abbildung 3-3 C).



**Abbildung 3-3:**

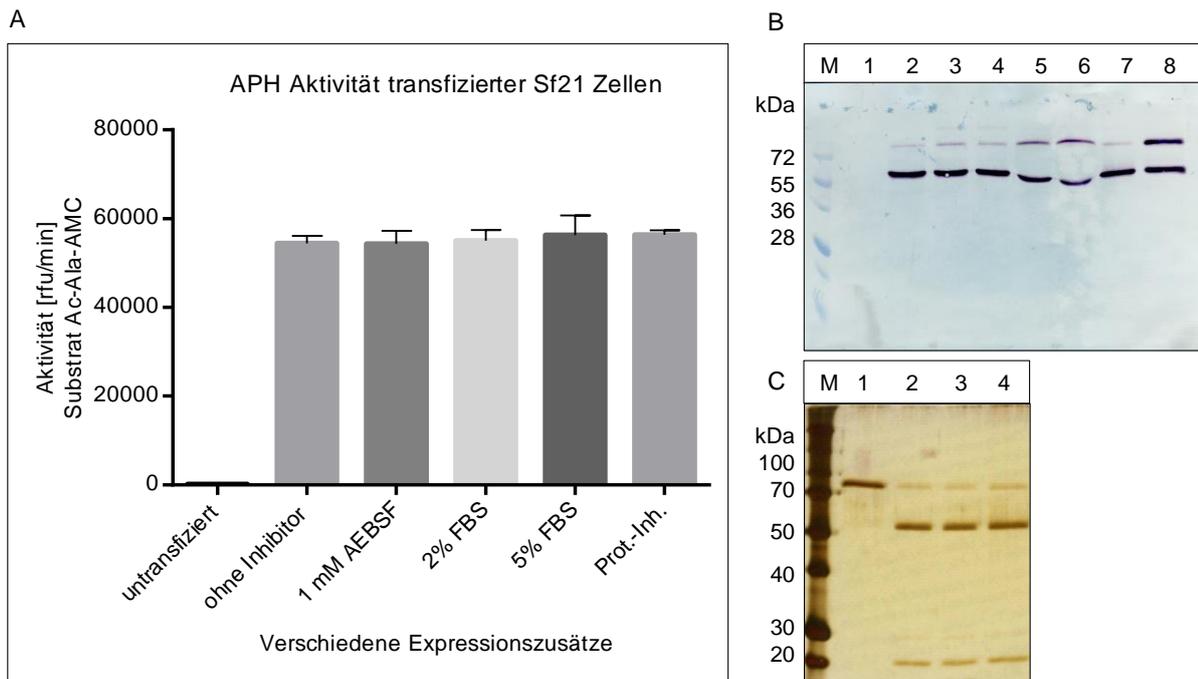
**SDS PAGE und Western Blot-Analyse gereinigter APH:** M = Marker; 1 = gereinigte APH, aufgetragen wurden 8 µg Protein

**A) SDS-PAGE:** 12%iges Gel, Coomassie gefärbt

**B) Western Blot-Analyse:** Als Primärantikörper wurde anti-penta-His Antikörper (1:1000) eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Maus IgG (AP) (1:10000)

**C) Western Blot-Analyse:** Als Primärantikörper wurde anti-Flag-tag Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Kaninchen IgG (AP) (1:10000). Zur besseren Anschaulichkeit wurden in der Abbildung zwei separate Gele bzw. Membranen fusioniert, was durch die gepunktete Linie gekennzeichnet ist.

Um eine Spaltung der APH zu verhindern, wurde während der Expression der APH der Protease-Inhibitor AEBSF (1mM) bzw. Roche Complete™ Proteaseinhibitor-Cocktail hinzugefügt. AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid) ist ein wasserlöslicher Serinprotease-Inhibitor, welcher Proteasen wie Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin und Trypsin hemmt. Der Roche Complete™ Proteaseinhibitor-Cocktail inhibiert Serin-, Cystein- und Metalloproteasen. Des Weiteren wurde die Zugabe von FBS (2% FBS, 5% FBS) getestet, um möglichen vorhandenen Proteasen ein Substrat bereitzustellen. Wie aus Abbildung 3-4 A ersichtlich ist, wurde die APH-Aktivität durch den Einsatz der verschiedenen Inhibitoren bzw. FBS nicht beeinträchtigt. Die Spaltung konnte jedoch nicht verhindert werden (Abbildung 3-4 B). So ist innerhalb der *Western Blot* Analyse unter Verwendung des *Flag tag* Antikörpers neben der Bande bei 80 kDa, die die intakte APH repräsentiert, jeweils zusätzlich das putative APH Abbauprodukt 55 kDa zu detektieren. Scalon *et al.* (1999) beschreiben eine Trypsin-spezifische Spaltung der humanen APH, bei der ebenfalls Produkte mit der Größe ca. 53 kDa und 22 kDa entstehen. Bei dieser Spaltung tritt kein Aktivitätsverlust auf, die APH Fragmente bleiben auch nach der Hydrolyse eng assoziiert. Mittels Edman Degradierung wurde dabei das 53 kDa große Fragment als C-terminaler Bereich identifiziert, was mit den Beobachtungen des zuvor gezeigten *Western Blots* übereinstimmt. Auch bei der in dieser Arbeit durchgeführten Reinigung konnten die intakte APH und die hydrolytisch abgebauten Fragmente nicht mittels Gelfiltration voneinander getrennt werden. Es wurde zur Charakterisierung der Spaltung noch ein Trypsinverdau von kommerziell erhältlicher APH (Takara) durchgeführt. Wie aus dem SDS-Gel in Abbildung 3-4 C ersichtlich wird, trat das gleiche Spaltungsmuster wie bei rekombinanter APH auf.

**Abbildung 3-4:**

**APH-Expression in Sf21 Zellen unter Verwendung verschiedener Zusätze zur Inhibierung der Spaltung:** Die Expression wurde im 6-well Format durchgeführt (Expression für 48 h mit P3 Stock, MOI1, Titer =  $1 \times 10^7$  pfu/ml). Für *Western Blot*-Analyse und Aktivitätsbestimmung wurden jeweils 20  $\mu$ l des Überstandes verwendet. Verschiedene Zusätze wurden während der Expression getestet.

**A) APH-Aktivität im Überstand transfizierter Sf21 Zellen:** Die enzymatische Aktivität der APH im Überstand von Sf21 Zellen wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrats Ac-Ala-AMC mit einer Konzentration von 4 mM im Ansatz im Puffer bestehend aus 30 mM Tris, pH 7,4 bei 37 °C über einen Zeitraum von 15 min durchgeführt.

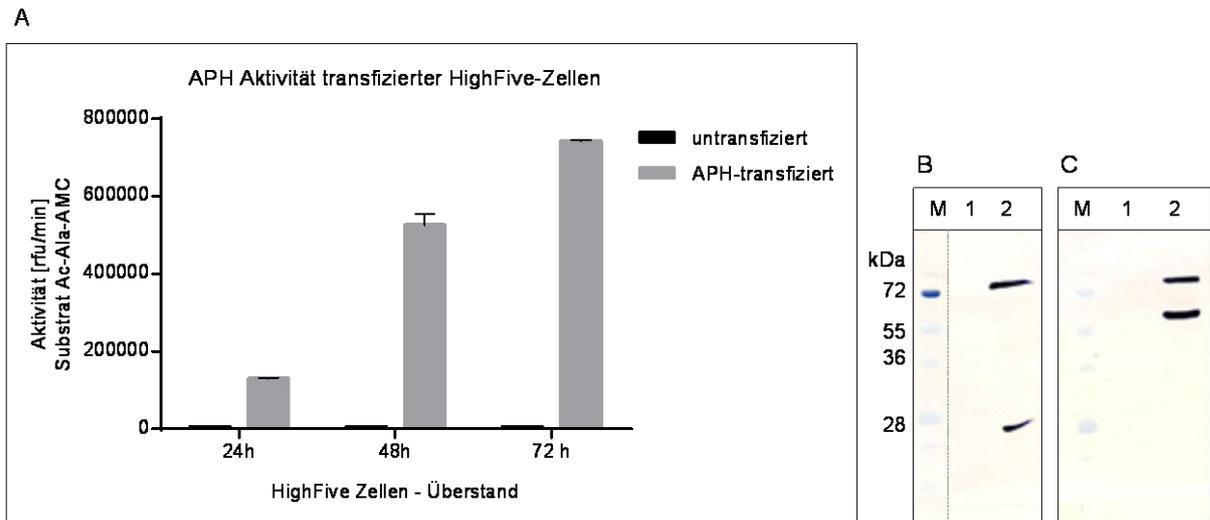
**B) *Western Blot*-Analyse der Expressionsüberstände:** Als Primärantikörper wurde anti-*Flag-tag* Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Kaninchen IgG (AP) (1:10000). M = Marker, 1 = untransfizierte Sf21 Zellen, 2 = APH ohne Inhibitor, 3 und 4 = APH + 1 mM AEBSF, 5 = APH + 2% FBS, 6 = APH + 5% FBS, 7 = APH + Protease-Inhibitor, 8 = *Flag-tag* Positivkontrolle

**C) SDS-PAGE-Analyse des Trypsinverdaus kommerziell erhältlicher APH (Takara):** 12%iges Gel, Silberfärbung; Trypsin wurde im Masse-Verhältnis 1:10 zur APH eingesetzt, die Inkubation fand bei 37 °C statt. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten durch Kochen der Probe gestoppt (5 min bei 95°C). 1 = APH ohne Trypsin, 2 = APH + Trypsin (1 min), 3 = APH + Trypsin (10 min), 4 = APH + Trypsin (60 min)

### 3.1.3 Rekombinante Expression der APH in HighFive™-Zellen

Um die Spaltung der APH möglicherweise zu verhindern, wurde die Expression mit dem Baculovirus-System zusätzlich in einer anderen Zelllinie durchgeführt. Die hierfür verwendeten HighFive™-Zellen (Life Technologies) stammen aus Ovarien von *Trichoplusia ni* (Wickham *et al.* 1992), einem weiteren Vertreter der Familie der Eulenfalter. Sie zeichnen sich durch eine schnellere Wachstumsrate aus, und sind laut Herstellerangaben dazu in der Lage, bis zu zehnmal mehr rekombinantes Protein im Vergleich zu Sf9/Sf21 Zellen zu produzieren. Für den Expressionstest wurden HighFive™-Zellen im 6-well Format mit APH-enthaltendem Virusstock aus Sf21 Zellen infiziert (P3 Stock, MOI 1,  $1 \times 10^7$  pfu/ml). Die enzymatische Aktivität der APH im Zellüberstand wurde mittels Aktivitätstest mit dem Substrat Ac-Ala-AMC überprüft und war im Vergleich zur Expression in Sf21 Zellen um das 5-7fache gesteigert (Abbildung 3-5 A). Jedoch konnte auch in diesem Zellsystem der proteolytische Abbau der APH nicht verhindert werden, was aus dem *Western Blot* in Abbildung 3-5 B/C hervorgeht. Wie bei der Expression in Sf21-Zellen waren auch hier

zusätzliche Banden bei 25 kDa und 55 kDa detektierbar, welche das N- bzw. C-terminale Spaltprodukt der APH repräsentieren.



**Abbildung 3-5:**

**APH Expression in HighFive™ Zellen:** Die Expression wurde im 6-well Maßstab durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem P3-Virusstock mit einer MOI von 1 infiziert (Titer =  $1 \times 10^7$  pfu/ml). Die Expression wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion überprüft. Für die Aktivitätsmessung sowie die *Western Blot*-Analyse wurden 20 µl des 2 ml-Überstandes aus einer Kavität einer 6-well-Platte eingesetzt.

**A) APH-Aktivität im Überstand transfizierter HighFive™ Zellen:** Die enzymatische Aktivität der APH im Überstand von HighFive™ Zellen wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrats Ac-Ala-AMC mit einer Konzentration von 4 mM im Ansatz im Puffer 30 mM Tris, pH 7,4 bei 37 °C für 15 min durchgeführt.

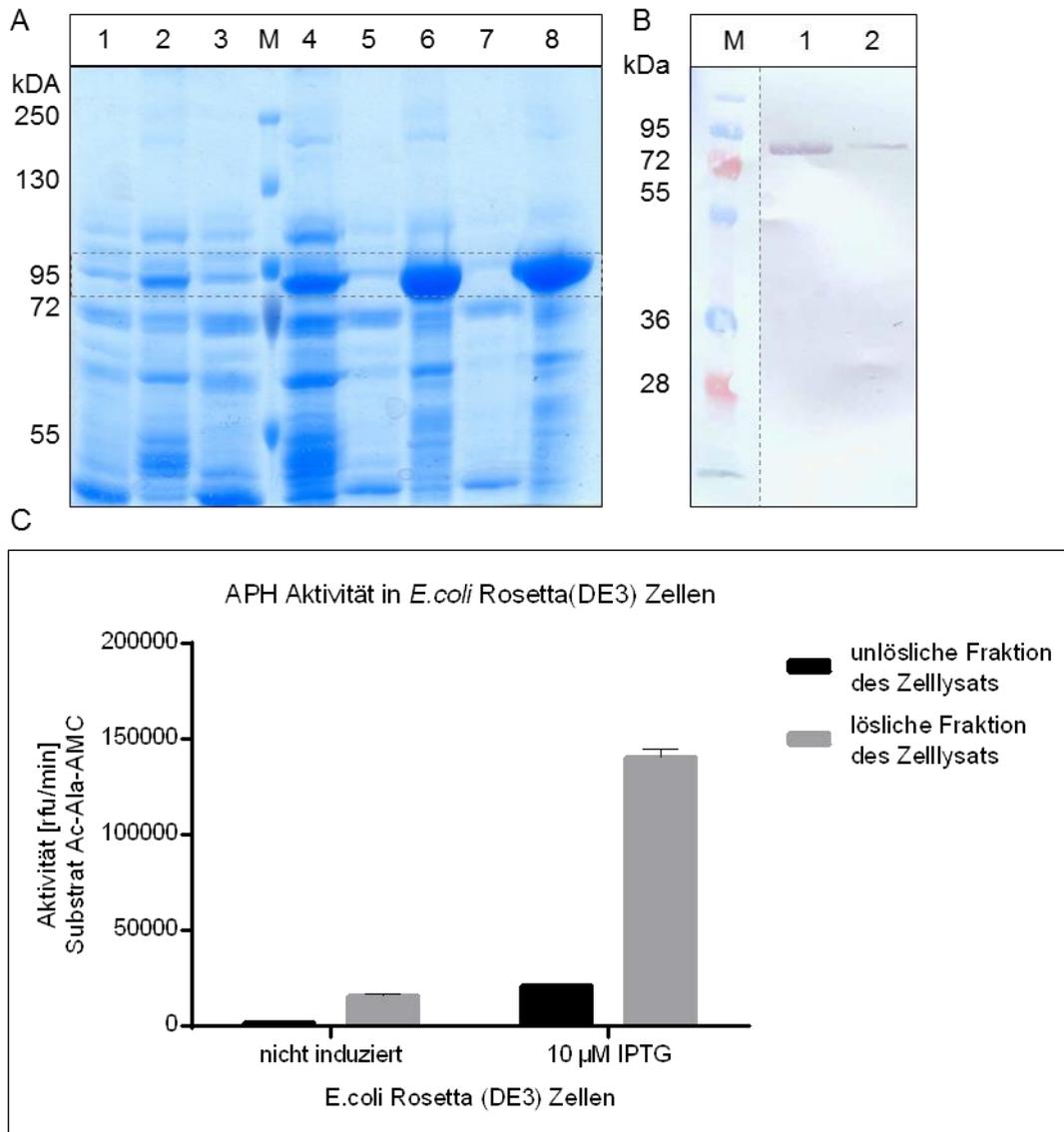
**B) *Western Blot*-Analyse der Expressionsüberstände:** Als Primärantikörper wurde anti-penta-His Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:10000). Zur besseren Anschaulichkeit wurden in der Abbildung zwei separate Membranen fusioniert, was durch die gepunktete Linie gekennzeichnet ist.

**C) *Western Blot*-Analyse der Expressionsüberstände:** Als Primärantikörper wurde anti-Flag-tag Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Kaninchen IgG (AP) (1:10000). M = Marker, 1 = untransfizierte Zellen, 2 = Überstand APH-transfizierter HighFive™ Zellen.

### 3.1.4 Rekombinante Expression der APH in *E.coli*-Zellen

Aufgrund der unbefriedigenden Ausbeute bei der Expression in CHO-Zellen und der auftretenden Spaltung der Acylpeptidhydrolase bei der Expression mittels des Baculovirus-Expressionssystems wurde anschließend ein prokaryotisches Expressionssystem getestet. Prokaryoten, insbesondere *E. coli*, zeichnen sich durch geringe Anforderungen an das Nährmedium, sowie hohe Wachstums- und Expressionsraten aus. Durch die Verwendung dieses Expressionssystems erhoffte man sich eine höhere Proteinausbeute, sowie geringere proteolytische Aktivität während der Expression und damit die Produktion intakter enzymatisch aktiver APH. Das für die APH kodierende Gen mit einer Größe von 2250 bp wurde in den pET28a+-Vektor (Life Technologies) kloniert, welcher einen N-terminalen His-tag enthält. Der Expressionstest in den *E.coli* Stämmen BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) erfolgte in einem Maßstab von 3 ml. Die Induktion der Expression wurde mit IPTG-Konzentrationen in einem Bereich von 10 µM bis 200 µM im Ansatz durchgeführt. Bei dem Expressionstest wurden verschiedene Inkubationszeiten nach der Induktion getestet, die zwischen 4 und 16 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur, 30 °C, 37 °C) lagen. Eine mögliche Optimierung der Expression wurde auch durch die Zugabe von 1% Glukose und/oder 2% Ethanol untersucht. In Abbildung 3-6: A ist exemplarisch der

Expressionstest in *E. coli* Rosetta (DE3) bei Raumtemperatur für 16 Stunden unter Zugabe von 2% Ethanol und verschiedenen IPTG-Konzentrationen dargestellt.



**Abbildung 3-6:**

**APH Expression in *E. coli* Rosetta (DE3) Zellen:** Die Expression wurde in einer 3 ml Schüttelkultur durchgeführt. Induziert wurde mit IPTG bei OD600=0,8, die Inkubation erfolgte anschließend bei Raumtemperatur (120 rpm) für 16 Stunden. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden 20  $\mu$ l der löslichen Fraktion (aus 500  $\mu$ l) und ebenfalls 20  $\mu$ l der unlöslichen Fraktion (Pellet wurde zuvor in 400  $\mu$ l Puffer gelöst) für Aktivitätsbestimmung und *Western Blot*-Analyse verwendet.

**A) SDS-PAGE Analyse der APH-Expression in *E. coli* Rosetta (DE3):** 12%iges Gel, Coomassie gefärbt; Abgebildet ist der Expressionstest im Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) bei Raumtemperatur für 16 Stunden unter Zugabe von 2% Ethanol. Unterschiedliche IPTG Konzentrationen wurden verwendet: 1,2 = ohne IPTG, 3,4 = 10  $\mu$ M IPTG, 5,6 = 50  $\mu$ M IPTG, 7,8 = 200  $\mu$ M IPTG. 1,3,5,7 stellen jeweils die lösliche Fraktion des Zellysats dar, 2,4,6,8 die dazugehörige unlösliche Fraktion des Zellysats.

**B) Western Blot-Analyse:** Die Expression der APH erfolgte für 16 Stunden bei Raumtemperatur nach einer Induktion mit 10  $\mu$ M IPTG im Ansatz und Zugabe von 2% Ethanol. Als Primärantikörper wurde anti-APH Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Esel-anti-Ziege IgG (AP) (1:10000). M = Marker, 1 = lösliche Fraktion des Zellysats, 2 = Positivkontrolle (kommerziell erworbene APH (Takara)). Zur besseren Anschaulichkeit wurden in der Abbildung zwei separate Membranen fusioniert, was durch die gepunktete Linie gekennzeichnet ist.

**C) APH-Aktivität in *E. coli* Rosetta (DE3):** Dargestellt ist die enzymatische Aktivität der APH nach der Expression für 16 h bei RT unter Zugabe von 10  $\mu$ M IPTG und 2% EtOH. Es wurde das fluorogene Substrat Ac-Ala-AMC mit einer Konzentration von 4mM im Ansatz im Puffer bestehend aus 30 mM Tris, pH 7,4 verwendet. Die Messung erfolgte bei 37 °C für 15 min.

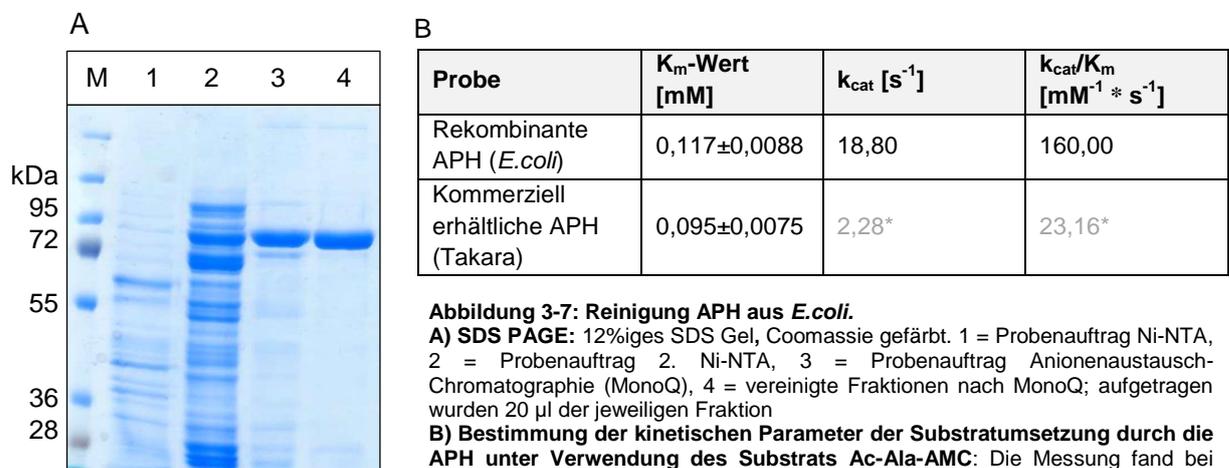
Das beste Ergebnis konnte dabei nach einer Induktion mit 10  $\mu$ M IPTG erreicht werden (Spur 3). Mit steigender IPTG Konzentration erhöht sich die APH Expression, jedoch steigt auch

der Anteil exprimierten Proteins, der in der unlöslichen Fraktion des Zellysats vorliegt (Spur 8).

Die enzymatische Aktivität der APH wurde durch den Fluoreszenzgekoppeltem Aktivitätstest mit dem Enzym Ac-Ala-AMC bestätigt (Abbildung 3-6: C). Gegenüber nicht-induzierten Zellen war die Aktivität deutlich gesteigert. Zusätzlich zeigte sich im *Western Blot* mit anti-His-tag Antikörper ausschließlich die intakte APH durch eine distinkte Bande bei 80 kDa (Abbildung 3-6: B). Somit ließ sich nachweisen, dass bei der Expression der APH in *E.coli* kein Abbau stattfindet. Durch die hohen Ausbeuten an aktivem Enzym war dieses Expressionssystem für die Herstellung rekombinanter APH geeignet.

Für die Proteinreinigung wurde eine Expression der APH in einem Maßstab von 6L *E.coli* Schüttelkultur durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nach dem Aufschluss der *E.coli* Zellen mittels Hochdruck-Homogenisation (Abschnitt 2.7.2) durch Ni-NTA- und Anionen-Austausch-Chromatographie und ist im Abschnitt 2.7.3.2 beschrieben. Die Fraktionen sind im Coomassie-gefärbten SDS-Gel dargestellt (Abbildung 3-7 A). Es konnten 9 mg gereinigte APH mit einer enzymatischen Aktivität von ca. 10 U/mg (Ac-Ala-AMC) produziert werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gereinigte APH bei 4 °C aufbewahrt.

Mit dem gereinigten Enzym wurden die kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/K_m$  für das Substrat Ac-Ala-AMC im Vergleich zur kommerziell erhältlichen APH (Takara) bestimmt (Abbildung 3-7 B). Für die rekombinante APH konnte ein  $K_m$ -Wert von 117  $\mu\text{M}$  ermittelt werden, welcher mit der bei Takara erhältlichen APH vergleichbar ist (95  $\mu\text{M}$ ). Beim Vergleich der Spezifitätskonstanten ( $k_{cat}/K_m$ ) wurde für die rekombinante APH ein Wert von  $160 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ermittelt, der deutlich niedrigere Wert der kommerziell erhältlichen APH ist möglicherweise auf eine Verringerung der katalytischen Effizienz durch einmaliges Einfrieren zurückzuführen. Nach der erfolgreichen Etablierung der Expression und Reinigung der humanen rekombinanten APH in *E.coli* wurde das Enzym für weitere Untersuchungen eingesetzt.



### 3.2 Rekombinante Expression von A $\beta$ -Peptiden in *E.coli*

Viele Daten zur *in vitro* Aggregation von A $\beta$  basieren auf Untersuchungen mit synthetisch hergestellten Peptiden. Die entsprechenden Ergebnisse sind teilweise kontrovers oder schlecht reproduzierbar. Ein Grund für diese Problematik bei der Alzheimer-Forschung ist unter anderem auf Verunreinigungen während der A $\beta$ -Synthese zurückzuführen (Dobeli *et al.* 1995; Zagorski *et al.* 1999). Aggregations-Kinetiken von synthetisch hergestelltem A $\beta$  variieren oft zwischen verschiedenen Herstellungs-Chargen, sowie auch innerhalb unterschiedlicher Lagerungs- oder Löslichkeitsbedingungen (Soto *et al.* 1995). Zusätzlich ist das Rohmaterial bei der chemischen Fest-Phasen-Synthese sehr teuer, besonders bei der Herstellung isotope markierter Peptide. Durch die Möglichkeit der preiswerten Herstellung von Proteinen in *E.coli*, sowie hoher Ausbeuten, die dabei erzielt werden können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, verschiedene A $\beta$ -Spezies für weiterführende Untersuchungen herzustellen. Diese wurden zur allgemeinen Charakterisierung sowie zum Vergleich mit synthetischen Peptiden hergestellt, unter anderem hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens. Weiterhin sollten mit den Peptiden Spaltungsuntersuchungen durch die Acylpeptidhydrolase durchgeführt werden. Rekombinantes Isotopenmarkiertes Peptid sollte außerdem für Strukturanalysen mittels Festphasen-Kernresonanzspektroskopie (ssNMR-*solid state Nuclear Magnetic Resonance*) hergestellt werden.

Die Peptide wurden mit einem N-terminalen Fusionspartner exprimiert, wodurch die Löslichkeit und Stabilität der Peptide während der Expression erhöht werden sollte. Zusätzlich sollte dies die mögliche Aggregation und Toxizität der Peptide während der Expression verringern. Der His-tag des Fusionspartners ermöglicht eine vereinfachte Reinigung und Detektion. Die Expression wurde zunächst mit dem pET-SUMO Expressionssystem (Life Technologies) durchgeführt. Neben A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 sollten außerdem Q3-A $\beta$ 40 und Q3-A $\beta$ 42 rekombinant hergestellt werden. Dazu wurde das natürlich vorkommende Glutamat an dritter Position der A $\beta$ -Sequenz durch ein Glutamin ersetzt, um nach der Expression eine schnellere Konvertierung zu Pyroglutamat durch die Zugabe der Glutaminylylase zu ermöglichen.

#### 3.2.1 Rekombinante Expression von A $\beta$ -Peptiden mit dem Champion<sup>TM</sup>pET-SUMO Expressionssystem

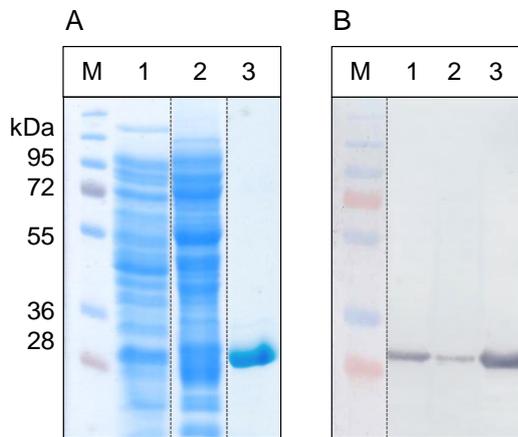
Im Champion<sup>TM</sup> pET-SUMO Expressionssystem (Life Technologies) wird ein SUMO Protein (*Small Ubiquitin-like Modifier*) als N-terminaler Fusionspartner genutzt, um die Expression und Reinigung nativer Proteine in *E.coli* zu ermöglichen. SUMO ist das 11 kDa große *Saccharomyces cerevisiae* Smt3 Protein, welches homolog zum Säuger SUMO-1-Protein (Saitoh *et al.* 1997) ist. SUMO gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine und kann durch eine kovalente Bindung an die Lysin-Seitenketten von Proteinen oder Peptiden deren Eigenschaften und Funktionen beeinflussen. Dabei beeinflusst es unter anderem zelluläre

Prozesse wie den nukleären Transport oder die Zellzyklus-Progression (Muller *et al.* 2001). Das pET-SUMO System wurde im Rahmen dieser Arbeit zur rekombinanten Expression von A $\beta$ -Peptiden in *E.coli* genutzt. Die Fusion mit SUMO am N-Terminus erhöht dabei die Expressionsrate und die Stabilität der Peptide (Malakhov, 2004) und schützt vor Abbau durch Peptidasen/Proteasen. Weiterhin wirkt SUMO als Löslichkeitsvermittler und vereinfacht damit u.a. die anschließende Reinigung (Malakhov, 2004). Nach der Expression wird die Tertiärstruktur des SUMO-Proteins durch eine Cysteinprotease, die SUMO-Protease (scULP) spezifisch erkannt und gespalten. Zwischen der Spaltstelle und der ersten Aminosäure des Proteins befinden sich keine zusätzlichen Aminosäuren, wodurch der natürlich vorkommende definierte N-Terminus der A $\beta$ -Peptide vorliegt. Anschließend werden SUMO und scULP über den Histidin-Tag mittels Nickelaffinitätschromatographie aus der Lösung entfernt.

### 3.2.1.1 Rekombinante Expression der SUMO-Protease scULP

In Hefezellen existieren zwei SUMO-Proteasen Ulp1 (= SUMO Protease 1) und Ulp2, die eine Rolle bei der SUMO-Prozessierung spielen. Das SUMO-Protein liegt als Vorläuferprotein in der Zelle vor. Durch die Proteasen erfolgte eine Hydrolyse der  $\alpha$ -Peptidbindung die Sequenz –GGATY am C-Terminus des SUMO-Vorläuferproteins zu –GG, wodurch das reife SUMO-Protein freigesetzt wird. Eine weitere Reaktion beinhaltet bei einem Fusionsprotein die Dekonjugation des SUMOs vom Zielprotein durch die Spaltung einer  $\epsilon$ -Peptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des SUMO-Proteins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Zielproteins (Li and Hochstrasser, 1999; Mossessova and Lima, 2000). Zwischen Ulp1 und Ulp2 besteht eine 27%ige Sequenzhomologie, welche die C-terminale Cysteinproteasedomäne mit einer Größe von 221 AS umfasst und als scULP bezeichnet wird (Mossessova and Lima, 2000; Eckhoff and Dohmen, 2015). Die scULP1 wurde im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt, um nach der Expression des SUMO-A $\beta$  Fusionsproteins das A $\beta$ -Peptid abzuspalten. Hierzu wurde die scULP aus kompetenten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* – Bäckerhefe) durch PCR amplifiziert und so in den Vektor pET28a+ kloniert, dass sie nach der Expression zusätzlich einen vektorcodierten N- und C-terminalen His-tag aufweist. Die Expression wurde im Stamm *E.coli* Rosetta (DE3) optimiert. Das beste Ergebnis konnte bei einer Expression für 4 Stunden bei 37°C nach einer Induktion mit 750 $\mu$ M IPTG erzielt werden. Nach dem Zellaufschluss durch Hochdruck-Homogenisation (Abschnitt 2.7.2) wurde der Überstand mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung des His-tags gereinigt, wie in Abschnitt 2.7.3.3 beschrieben. Abbildung 3-8 A zeigt die Fraktionen der NiNTA-Reinigung. Die scULP ist bei einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa sichtbar. Der Nachweis der scULP erfolgte durch *Western Blot* Analyse unter Verwendung eines His-tag Antikörpers (Abbildung 3-8 B). Aus 1L *E.coli* Suspensionskultur konnten 60 mg scULP1 gewonnen werden. Nach der Reinigung wurde die scULP mittels

Dialyse in den Reaktionspuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2% Triton, pH 8,0; Malakhov *et al.* 2003) überführt. Zur Lagerung bei -80 °C wurden außerdem 50% Glycerol zugegeben.

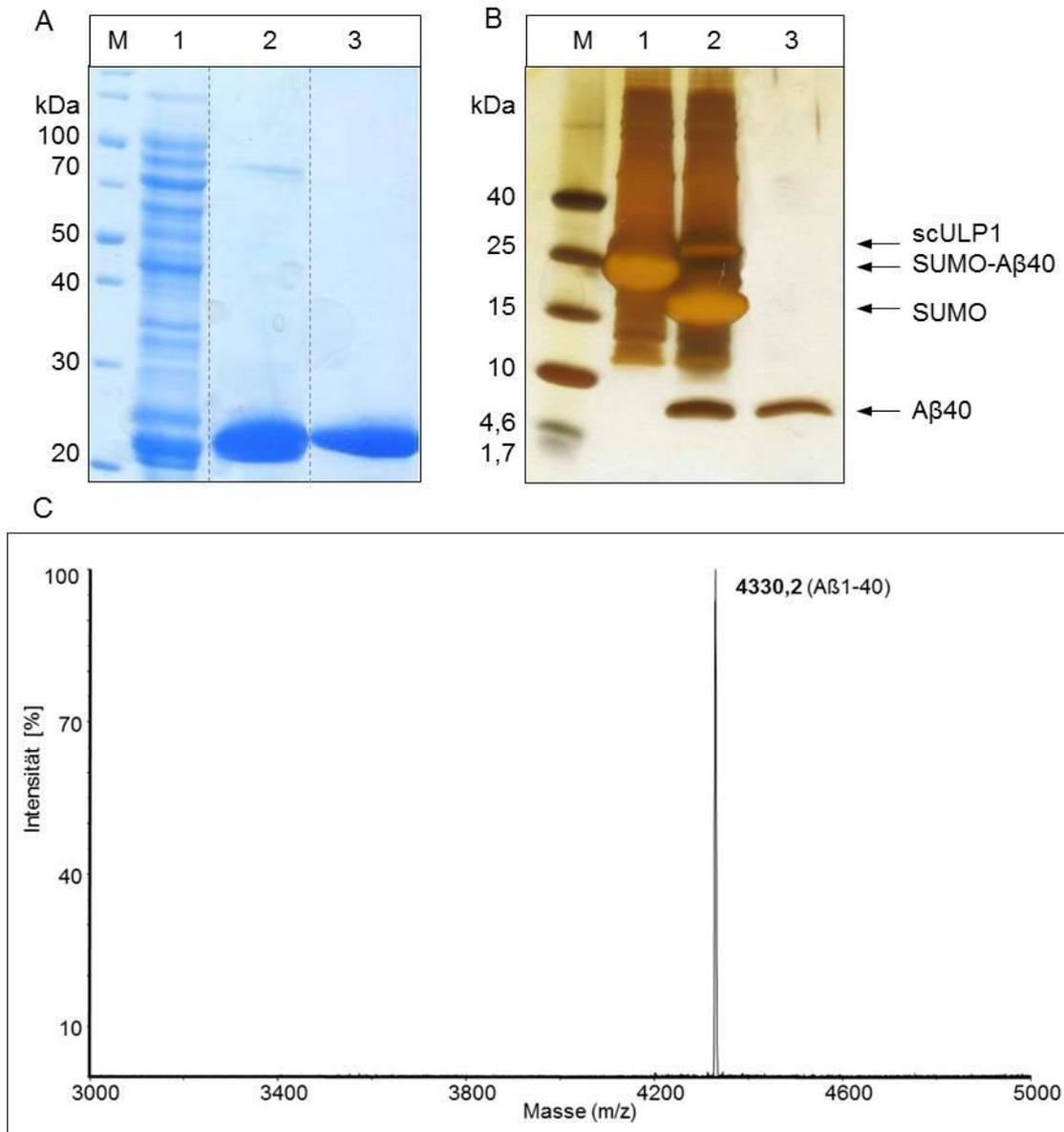


**Abbildung 3-8:**  
**Reinigung der scULP aus *E. coli* – SDS-PAGE und Western Blot-Analyse:** M = Marker; 1 = Probenauftrag Ni-NTA, 2 = Waschschritt mit Zusatz von 20 mM Imidazol, 3 = Elution mit 200 mM Imidazol; Aufgetragen wurden 20 µl der jeweiligen Fraktion, die zuvor mit Probenpuffer versetzt wurde.  
**A) SDS-PAGE:** 12%iges SDS Gel, Coomassie gefärbt  
**B) Western Blot-Analyse:** Als Primärantikörper wurde anti-penta-His Antikörper (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Maus IgG (AP) (1:10000). Zur besseren Anschaulichkeit wurden in der Abbildung zwei separate Gele bzw. Membranen fusioniert, was durch die gepunktete Linie gekennzeichnet ist.

### 3.2.1.2 Rekombinante Expression von SUMO-A $\beta$ 40

Zunächst wurde das A $\beta$ 40-Peptid als SUMO-Fusionsprotein mit einer Größe von 17,7 kDa in *E. coli* exprimiert. Der dafür genutzte Vektor pET-SUMO-A $\beta$ 40 wurde von Dr. D. Schlenzig (Probiodrug AG) zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte anschließend die Bestimmung der optimalen Expressionsbedingungen in *E. coli*. Das beste Ergebnis konnte bei einer Expression im Stamm Rosetta (DE3) bei Raumtemperatur für 16 Stunden bei 120 rpm nach einer Induktion mit 50 µM IPTG (bei OD600 = 0,8) erzielt werden. Die Reinigung des Fusionsproteins SUMO-A $\beta$ 40 erfolgte in einem 2-Schritt-Protokoll, wie in Abschnitt 2.7.3.4 beschrieben. Nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie mittels Butylsepharose konnten aus einem Expressionsvolumen von 6 L Schüttelkultur 150 mg homogenes Protein erhalten werden (Abbildung 3-9 A). Dieses wurde anschließend mittels Dialyse in einen Puffer bestehend aus 30 mM Tris, pH 8,0 überführt. Durch die folgende Spaltung mit der scULP sollte das A $\beta$ 40 vom Fusionspartner abgetrennt werden. Ein optimales Spaltungsergebnis erzielte man, wenn die scULP in einem molaren Verhältnis von 1:80 (scULP:SUMO-A $\beta$ 40) eingesetzt wurde und die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur stattfand. In Abbildung 3-9 B sieht man in der ersten Spur das ungespaltene Fusionsprotein mit einer Größe von 17,7 kDa. In Spur 2 ist die SUMO-Protease bei ca. 29 kDa sichtbar. SUMO und A $\beta$ 40 zeigen ein leicht verändertes Laufverhalten im Vergleich zu ihrer theoretischen Größe: SUMO ist mit einer molekularen Masse von 13,4 kDa im Tricin-Gel bei ca. 15 kDa sichtbar und A $\beta$ 40 mit einer erwarteten Masse von 4,3 kDa bei ca. 5 kDa. Als Positivkontrolle wurde synthetisches A $\beta$ 40 genutzt (Spur 3), welches ebenfalls bei einer apparenten Molekularmasse von ca. 5-6 kDa auftritt. Die korrekte Abspaltung des A $\beta$ 40 vom SUMO Fusionspartner wurde zusätzlich

mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie verifiziert (Abbildung 3-9 C). Die theoretische Masse von A $\beta$ 40 mit 4329,8 Da wurde durch das MALDI-TOF Massenspektrum bei  $[M+H]^+ = 4330,2$  bestätigt.



**Abbildung 3-9:**

**A) Reinigung des Fusionsproteins SUMO-A $\beta$ 40 aus *E. coli*:** SDS-PAGE, 12%iges Gel, Coomassie gefärbt; M = Marker, 1 = Zellaufschluss, 2 = Elution Ni-NTA, 3 = Elution Butylsepharose. Aufgetragen wurden 20  $\mu$ l der jeweiligen Fraktion, die zuvor mit Probenpuffer versetzt wurde. Zur besseren Anschaulichkeit wurden in der Abbildung zwei separate Gele fusioniert, was durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet ist.

**B) Spaltung des Fusionsproteins SUMO-A $\beta$ 40:** 10-20% Tricin-Gradienten Gel, silbergefärbt; M = Marker, 1 = Fusionsprotein SUMO-A $\beta$ 40, 2 = SUMO und A $\beta$ 40 nach der Spaltung, 3 = Positivkontrolle synthetisches A $\beta$ 40, die Auftragsmenge betrug ca. 15  $\mu$ g

**C) MALDI-TOF Massenspektrum** von rekombinantem A $\beta$ 40 nach der Spaltung des SUMO-A $\beta$  Fusionsproteins durch die scULP1. Die detektierte Masse von  $[M+H]^+ = 4330,2$  stimmt mit der berechneten Masse des A $\beta$ 40 (4329,8 Da) innerhalb des Toleranzbereiches von  $\pm 5$  Da überein. Sinapinsäure wurde als Matrix verwendet.

Durch diese Untersuchung ließ sich die erfolgreiche Spaltung nachweisen. Die anschließende Abtrennung des A $\beta$ -Peptids vom SUMO-Fusionspartner erwies sich als problematisch. Eine Reinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie zum Entfernen des

SUMO über den vorhandenen His-tag erfolgte mit einer Säule mit einem Volumen von 5 ml. Hierbei war jedoch keine deutliche Abtrennung sichtbar, weshalb im zweiten Reinigungsschritt eine Umkehrphasen-HPLC im analytischen Maßstab durchgeführt wurde. Verschiedene Säulen (C12, C18), Gradienten und Pufferbedingungen kamen zum Einsatz, jedoch wiesen SUMO und A $\beta$ 40 nahezu gleiche Retentionszeiten in der HPLC auf, was eine eindeutige Trennung nicht möglich machte. Es wurde weiterhin die Größenausschlusschromatographie getestet, auch hier war trotz des unterschiedlichen Molekulargewichts des A $\beta$ -Peptids und des SUMO keine eindeutige Trennung möglich. Mit Hilfe des Zusatzes von 6M Guanidiniumchlorid konnten beide Proteine getrennt werden, jedoch waren die Ausbeuten sehr gering.

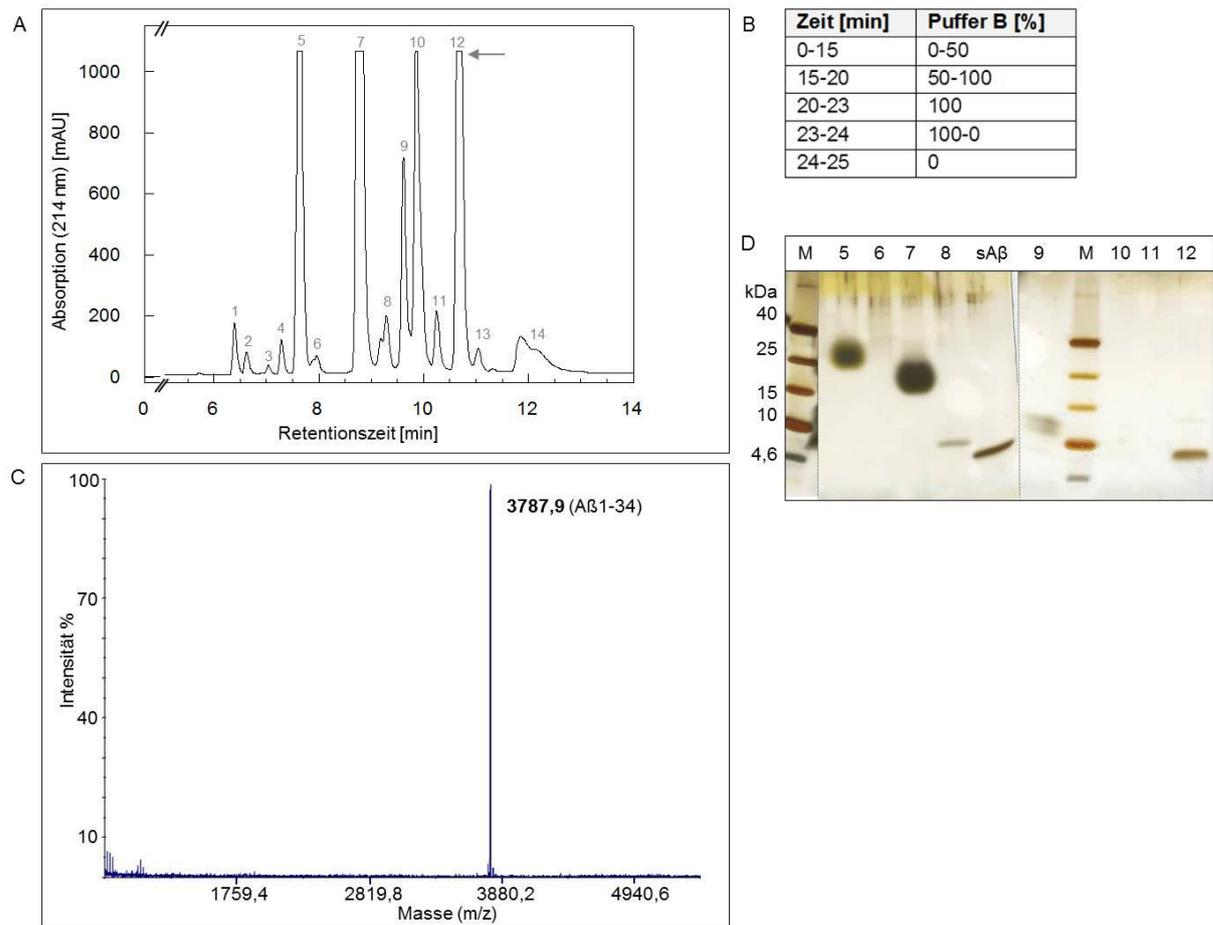
Eine direkte Trennung mittels Umkehrphasen-HPLC unmittelbar nach der Spaltung erbrachte auch keine zufriedenstellende Trennung des A $\beta$ 40 vom SUMO-Fusionspartner, da sie ähnliche Retentionszeiten aufwiesen. Eine direkte Fällungsreaktion mit anschließender Zentrifugation zur Trennung wurde mit Ammoniumsulfat, Aceton sowie über Veränderung des pH-Wertes durchgeführt, auch hier war die Trennung nicht möglich.

Im kleineren Maßstab mittels *His SpinTrap* Säulen (GE Healthcare) wurden anschließend noch einmal Versuche zur Trennung unter Verwendung des His-tags durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Zusätze wie Triton, Tween,  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie Arginin benutzt, um eine mögliche Bindung bzw. Aggregation zwischen SUMO und A $\beta$  zu lösen bzw. um SUMO zu denaturieren. Als eine zusätzliche Methode zur Denaturierung des SUMO-Proteins erfolgte das Erhitzen der Probe auf 100°C. Das beste Ergebnis erzielte man, wenn die Probe 5 min bei 100 °C inkubiert wurde, sowie mit dem Zusatz von 20 mM Imidazol im Auftragspuffer/Equilibrierungspuffer.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine erfolgreiche Trennung unter Verwendung einer Ni-NTA Säule mit einem Volumen von 1 ml und einer anschließenden Reinigung des Eluats mittels Umkehrphasen-HPLC mit einer C18-Säule (Luna, Phenomenex) erzielt werden. Die Trennung erfolgte mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min und einem Gradienten aus Laufmittel A (Wasser + 0,1% TFA) und B (Acetonitril + 0,1% TFA), der in Abbildung 3-10 B dargestellt ist. Wie aus dem Chromatogramm der Reinigung und der Analyse der Fraktionen mittels Tricin-SDS PAGE ersichtlich wird (Abbildung 3-10 A/D), konnte das A $\beta$ 40-Peptid abgetrennt werden und ist durch den Peak 12 repräsentiert.

Nach der Reinigung wurde jedoch bei der Überprüfung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ein zusätzliches Produkt mit einer Masse von  $[M+H]^+ = 3787,9$  detektiert, welches mit der kalkulierten Masse von A $\beta$ 34 übereinstimmt (Abbildung 3-10 D). Auch durch die Zugabe der Protease-Inhibitoren AEBSF (Pefablock™, Serinprotease-Inhibitor, Sigma, 1mM im Ansatz), EDTA (1mM im Ansatz), E64 (Cysteinprotease Inhibitor, Sigma, 10  $\mu$ M im Ansatz), Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche), oder

Bovines Serum Albumin (10% im Ansatz) während des Aufschlusses und der Reinigung, konnte der partielle Abbau nicht verhindert werden.



**Abbildung 3-10:**

**Abtrennung des A $\beta$ 40-Peptids vom SUMO-Fusionspartner.**

**A) Chromatogramm der analytischen HPLC-Reinigung unter Verwendung einer C18 Säule.**

**B) Bei der HPLC-Reinigung verwendeter Gradient:** Flussrate 1 ml/ml; Laufmittel A (Wasser + 0,1% TFA), Laufmittel B (Acetonitril + 0,1% TFA)

**C) MALDI-TOF Massenspektrum** nach der Reinigung und Abtrennung des A $\beta$ 40 vom SUMO. Ein Produkt mit der Masse  $[M+H]^+ = 3787,9$  entstand, welches mit der berechneten Masse von A $\beta$ 34 übereinstimmt (innerhalb des Toleranzbereiches  $\pm 5$  Da). Sinapinsäure wurde als Matrix verwendet.

**D) 10-20% Tricin-Gradienten Gel:** Das Gel wurde silbergefärbt. Aufgetragen wurden jeweils 15  $\mu$ l der mit Probenpuffer versetzten Fraktionen, die während der HPLC gewonnen wurden

Um die Retentionszeit von SUMO zu erhöhen und die Reinigung zu vereinfachen, wurde ebenfalls der Vektor pET41a+ mit internem GST-tag als Expressionssystem für SUMO-A $\beta$  getestet. Das SUMO-A $\beta$ 40-Konstrukt wurde dabei C-terminal an den GST-tag kloniert, um den Fusionspartner zu vergrößern, und damit möglicherweise die Retentionszeit während der HPLC zu beeinflussen. Die Expression und Reinigung mittels Affinitätschromatographie (Ni-NTA, Glutathion-Sepharose) wurden auch hier optimiert, sowie die Spaltung durch die scULP. Dabei wurde jedoch ebenfalls ein partieller Abbau des A $\beta$ 40 zu A $\beta$ 34 beobachtet, der auch nicht durch die Zugabe der zuvor aufgeführten Protease-Inhibitoren unterbunden werden konnte. Es wurde außerdem ein Spaltungstest mit kommerziell erworbener scULP Protease durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich um eine Verunreinigung der

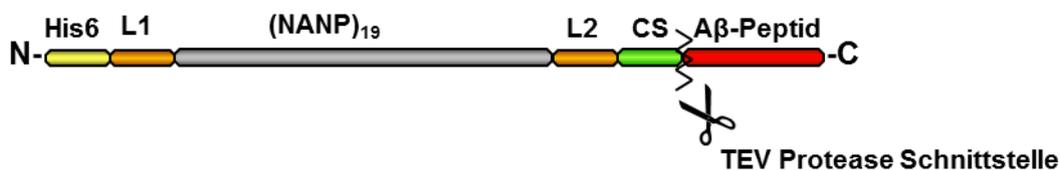
rekombinanten scULP handelt, welche für das Auftreten von x-A $\beta$ 34 verantwortlich ist. Auch dabei wurde ein Abbau des rekombinanten A $\beta$ 40 zu A $\beta$ 34 beobachtet.

Für zukünftige Untersuchungen war es essentiell, intaktes und stabiles rekombinantes A $\beta$  herzustellen, deshalb wurde diese Methode an dieser Stelle beendet und ein alternatives Expressionssystem zur Herstellung der A $\beta$ -Peptide getestet.

### 3.2.2 Rekombinante Expression von A $\beta$ -Peptiden mit dem (NANP)<sub>19</sub>-Expressionssystem

In Anlehnung an Finder *et al.* (2010) wurden die A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 40/42 und Q3-A $\beta$ 40/42 als Fusionsprotein mit einem löslichkeitsvermittelnden Polypeptidsegment exprimiert, welches aus 19 Wiederholungen der Aminosäuresequenz NANP und einem N-terminalen His-*tag* besteht (Abbildung 3-11). Daran schließt sich die spezifische Erkennungssequenz der TEV-Protease ENLYFQ↓ (der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle) und die Sequenz des humanen A $\beta$ 40/42 beziehungsweise der verkürzten Q3-A $\beta$ 40/42 Form an. Die natürlich auftretende TEV-Erkennungssequenz beinhaltet ein C-terminales Glycin in P1' Position, welches die erste Aminosäure des C-terminalen Spaltprodukts darstellt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Effizienz der Protease auch bei 90% liegt, wenn Aspartat statt Glycin vorliegt (Kapust *et al.* 2002). Da Aspartat die erste Aminosäure der humanen A $\beta$ -Sequenz darstellt, wurde diese Eigenschaft genutzt, wodurch das A $\beta$ -Peptid nach der Spaltung in seiner nativen Sequenz vorliegt.

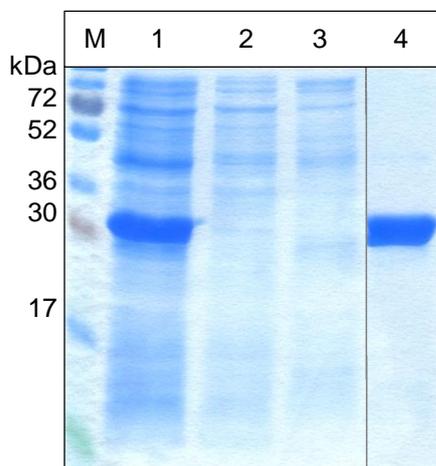
Es wurden ebenfalls die N-terminal verkürzten A $\beta$ -Varianten Q3-A $\beta$ 40/42 hergestellt, bei denen das Glycin der TEV-Protease Erkennungsstelle durch ein Glutamin ausgetauscht ist. Glutamin wird dabei statt dem in der humanen A $\beta$ -Sequenz vorkommenden Glutamat verwendet, um eine spätere Zyklisierung zum Pyroglutamat durch Zugabe der Glutaminylzyklase zu beschleunigen. Für die Expression in *E.coli* wurde der Vektor pET28a+ (Life Technologies) benutzt. Außerdem wurde die TEV-Protease rekombinant hergestellt und gereinigt, um sie für die Spaltung einzusetzen.



**Abbildung 3-11:**  
**Schematische Darstellung des Fusionsproteins (NANP)<sub>19</sub>-A $\beta$ :** L1 – Linkersequenz 1 = GS (Glycin-Serin); L2 – Linkersequenz 2 = RS (Arginin-Serin); (NANP)<sub>19</sub> – Löslichkeitsvermittelnder A $\beta$  Fusionspartner (Asparagin-Alanin-Asparagin-Prolin)<sub>19</sub>; CS – *Cleavage site* – Spaltstelle der TEV-Protease ENLYFQ↓

### 3.2.2.1 Expression und Reinigung der TEV-Protease

Als TEV-Protease wird die 27 kDa große katalytische Domäne des *Nuclear Inclusion a (Nia) Proteins des Tobacco Etch Virus* (TEV) bezeichnet, die verwendet wird, um den Fusionspartner vom N- oder C-Terminus eines rekombinanten Zielproteins abzuspalten. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Expression der TEV-Protease in *E.coli*. Die Originalsequenz der TEV-Protease wurde durch drei Mutationen optimiert: S219V, wodurch eine Autolyse verhindert wird (Lucast *et al.* 2001), sowie L56V und S135G, was die Löslichkeit und Thermostabilität des Proteins erhöht (Cabrita *et al.* 2007). Die entsprechende Sequenz mit zusätzlichem N-terminalem His-tag und C-terminalem Flag-tag wurde von MWG Eurofins synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit in den Vektor pET-28a+ kloniert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optimalen Expressionsbedingungen in *E.coli*. Das beste Ergebnis konnte bei einer Expression im Schüttelkolben im Stamm BL21 (DE3) bei Raumtemperatur für 16 Stunden bei 120 rpm nach einer Induktion mit 1 mM IPTG (bei OD600 = 0,8) und dem Zusatz von 1% Glukose erzielt werden. Anschließend wurde das Zell-Lysat mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 3-12), wie in Abschnitt 2.7.3.6 beschrieben. Aus einem Expressionsvolumen von 6L Schüttelkultur konnten 130 mg gereinigte rekombinante TEV-Protease gewonnen werden. Diese wurde anschließend mittels Dialyse in den Reaktionspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10% Glycerol) überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.



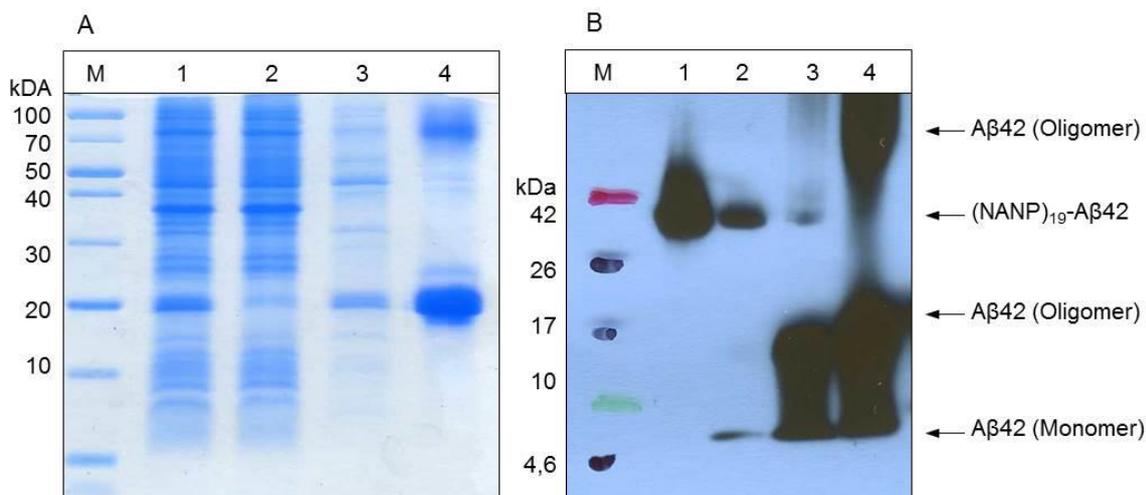
**Abbildung 3-12:**

**Reinigung der TEV-Protease aus *E.coli*:** SDS-PAGE, 12%iges Gel, Coomassie gefärbt; M = Marker; 1 = Probenauftrag Ni-NTA, 2 = Durchlauf, 3 = Waschen mit 50 mM Imidazol, 4 = Elution mit 250 mM Imidazol; Aufgetragen wurden 20 µl der jeweiligen Fraktion, die zuvor mit Probenpuffer versetzt wurden. Zur besseren Anschaulichkeit sind in der Abbildung zwei separate Gele fusioniert, was durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet ist.

### 3.2.2.2 Expression und Reinigung von (NANP)<sub>19</sub>-Aβ

Das Fusionskonstrukt (NANP)<sub>19</sub>-Aβ<sub>42</sub> mit N-terminalem His-tag und einer Größe von 14,4 kDa wurde von der Firma Life Technologies im Vektor pMK-RQ synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Klonierung dieses Konstrukts in den Expressionsvektor pET28a+. Außerdem erzeugte man durch Mutagenese die Varianten Aβ<sub>40</sub>, Q3-Aβ<sub>40</sub> und Q3-Aβ<sub>42</sub>. Die Expression in *E.coli* wurde für jede Aβ-Variante optimiert, das beste Ergebnis konnte mit dem Stamm BL21 (DE3) nach einer Induktion mit 100 µM IPTG (Aβ<sub>40/42</sub>, Q3-Aβ<sub>42</sub>) bzw.

500  $\mu$ M IPTG (Q3-A $\beta$ 40) erzielt werden. Die Inkubation erfolgte für 16 Stunden bei 23 °C im Schüttelkolben (120 rpm) in einem Maßstab von 6 L. Die Expression des Proteins fand zum einen in löslicher Form im Zytoplasma statt, zum anderen in unlöslicher Form in bakteriellen Einschlusskörpern. Um die Gesamtheit des rekombinanten Fusionsproteins zu isolieren, wurde ein denaturierender Aufschluss unter Zusatz von 6 M Guanidiniumchlorid durchgeführt. Anschließend erfolgte die Reinigung des Fusionsproteins mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Abbildung 3-13 A), wie in Abschnitt 2.7.3.5 beschrieben. In Spur 4 ist das gereinigte Fusionsprotein bei einer Größe von ca. 20 kDa sichtbar. In dieser Elutionsfraktion treten noch leichte Verunreinigungen bei einer Größe von ca. 80 kDa auf. Diese konnten mittels *Western Blot*-Analyse dem Fusionsprotein zugeordnet werden, wobei es sich vermutlich um Aggregate handelt. Anschließend erfolgte die Konzentrierung des Eluats der Ni-NTA-Reinigung mittels Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Amicon) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa auf ca. 5mg/ml. Zum Entfernen des Guanidiniumchlorids und Überführen der Probe in den TEV-Protease kompatiblen Puffer, der für die nachträgliche Spaltung und Zyklisierung notwendig ist, erfolgte die Entsalzung mit einer Sephadex G25 Säule. Aus einem Expressionsvolumen von 6L Schüttelkultur wurden 160 mg gereinigtes Fusionsprotein gewonnen.



**Abbildung 3-13:**

**A) Reinigung des Fusionsproteins (NANP)<sub>19</sub>-A $\beta$ 42 aus *E.coli*, SDS PAGE:** 12%iges Gel, Coomassie gefärbt; M = Marker; 1 = Probenauftrag Ni-NTA, 2 = Durchlauf, 3 = Waschen mit 20 mM Imidazol, 4 = Elution mit 250 mM Imidazol; Aufgetragen wurden 20  $\mu$ l der jeweiligen Fraktion, die zuvor mit Probenpuffer versetzt wurde.

**B) Spaltung des Fusionsproteins (NANP)<sub>19</sub>-A $\beta$ 42 mittels TEV-Protease, Western Blot-Analyse nach Tricin-SDS-PAGE:** Als Primärantikörper wurde anti- $\beta$ -Amyloid Antikörper (Positionen 17-24) (4G8) (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-Maus IgG (HRP) (1:10000). M = Marker, 1 = ungespaltenes Fusionsprotein, 2 = partiell gespaltenes Fusionsprotein (TEV-Protease im molaren Verhältnis 1:100), 3 = vollständig gespaltenes Fusionsprotein (TEV-Protease im molaren Verhältnis 1:20), 4 = synthetisches A $\beta$ 42

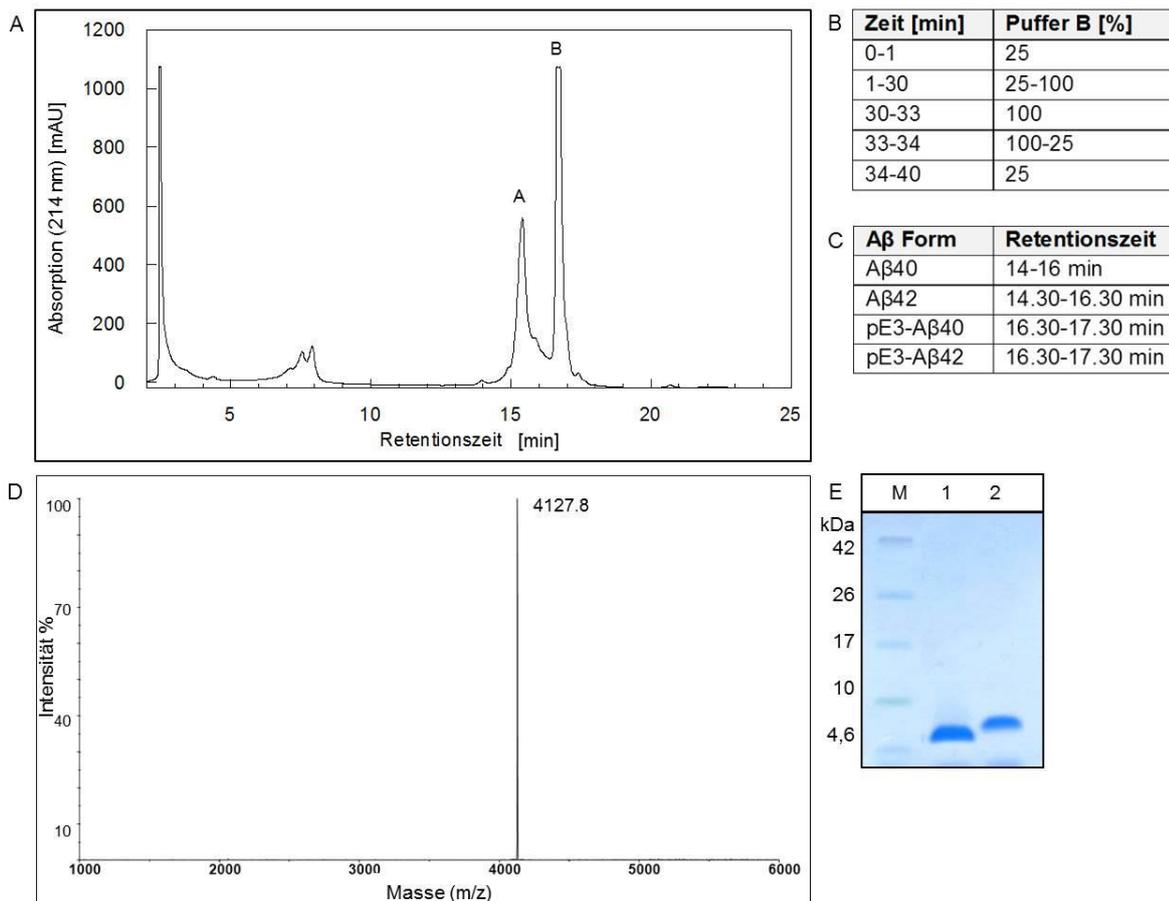
An die Reinigung schloss sich die Spaltung des Fusionsproteins durch die TEV-Protease an. Im Fall von A $\beta$ 40/42 ist die resultierende N-terminale Aminosäure Aspartat (P1'-Position der Spaltstelle), die N-terminal verkürzte Variante weist ein Glutamin in dieser Position auf. Da diese Aminosäuren nicht die optimale Schnittstelle darstellen, wurde die TEV-Protease in

einer erhöhten Konzentration eingesetzt, um eine optimale katalytische Aktivität der TEV-Protease zu gewährleisten und die Spaltung zu beschleunigen. Eine nahezu vollständige Spaltung konnte erzielt werden, wenn die Protease in einem molaren Verhältnis von 1:20 eingesetzt wurde und die Inkubation für 12 Stunden bei Raumtemperatur stattfand. Dies wird aus der *Western Blot*-Analyse mit dem A $\beta$ -spezifischen Antikörper 4G8 (Chemicon) in Abbildung 3-13 B ersichtlich. In Spur 1 ist das ungespaltene Fusionsprotein. Spur 2 zeigt partiell gespaltenes Fusionsprotein, wobei die TEV Protease im molaren Verhältnis 1:100 verwendet wurde. In Spur 3 ist die vollständige Spaltung sichtbar, bei der man die TEV Protease im molaren Verhältnis 1:20 einsetzte. Als Kontrolle wurde in Spur 4 synthetisch hergestelltes A $\beta$ 42 aufgetragen. Generell sieht man in der *Western Blot*-Analyse nach der Tricin-SDS-PAGE zusätzlich Aggregate des A $\beta$ 42-Peptids, sichtbar in Spur 3 und Spur 4. Diese SDS-induzierte Oligomerenbildung der A $\beta$ 42-Peptide in der Tricin-SDS-PAGE-Analyse wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kawooya *et al.* 2003, Bitan *et al.* 2005, Hepler *et al.* 2006). Zur Zyklisierung des Glutamins, wodurch das N-terminale Pyroglutamat (pE) entsteht, wurde bei Q3-A $\beta$ 40/42 während der Spaltung die Glutaminylzyklase (Maus QC, rekombinant hergestellt durch A. Stephan, Probiodrug AG) in einem molaren Verhältnis von 1:2000 zugegeben. Mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) gekoppelt mit LC/MS (M. Müller, Probiodrug AG) konnte die Zyklisierung quantitativ bestätigt werden. 99,5% der A $\beta$ -Peptide zeigten einen N-terminalen Pyro-Glutamat Rest. Somit konnte erstmalig modifiziertes, rekombinantes A $\beta$  hergestellt werden, dass den N-terminalen pGlu-Rest aufweist.

Während der Abspaltung vom Fusionspartner und gleichzeitiger Zyklisierung aggregierten die A $\beta$ -Peptide in der Lösung. Durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 9000 $\times$ g) konnte der Großteil des A $\beta$  im Pellet isoliert werden. Zur vollständigen Fällung des A $\beta$  wurde der pH-Wert des Überstandes auf den isoelektrischen Punkt des jeweiligen A $\beta$ -Peptids eingestellt und die Lösung über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 9000 $\times$ g) an. Für die weitere Reinigung mittels HPLC wurde das jeweilige Pellet in 0,1 M NaOH gelöst.

Für die Analyse sowie die Reinigung der A $\beta$ -Peptide nach der Abspaltung des Fusionspartners (NANP)<sub>19</sub> wurde die aus einer Polymermatrix bestehende Source 5RPC Säule (Amersham) mit einer Größe von 4,6 $\times$ 150 mm verwendet. In Abbildung 3-14 A ist das Chromatogramm der analytischen Reinigung beispielhaft für das Peptid pE3-A $\beta$ 40 dargestellt. Vor dem Auftrag auf die Säule wurde das Pellet (Fusionspartner und A $\beta$ -Peptid) in ca. 300  $\mu$ l 0,1 M NaOH gelöst. Der Proteingehalt betrug 4 mg, pro Lauf wurden 50-100  $\mu$ l auf die Säule appliziert. Die Trennung erfolgte mit einer konstanten Flussrate von 5 ml/min und einem Gradienten aus Laufmittel A (0,1 % Ammoniumhydroxid-Lösung, mit Ameisensäure auf pH 9 eingestellt) und Laufmittel B (60:40 Acetonitril:Laufmittel A) bei einer Säulentemperatur von ca. 37 °C. Der Gradient ist in Abbildung 3-14 B dargestellt. Für die

verschiedenen A $\beta$ -Varianten wurden dabei unterschiedliche Retentionszeiten ermittelt (Abbildung 3-14 C). Der erste Peak des Chromatogramms (Abbildung 3-14 A) bei einer Retentionszeit von ca. 15 Minuten stellt den Fusionspartner da, der zweite Peak bei ca. 17 Minuten zeigt pE3-A $\beta$ 40, dessen Reinheit im Tricin-Gel bestätigt wurde (Abbildung 3-14 E). Die kalkulierte Masse von 4326,9 Da stimmt mit dem mittels MALDI-TOF ermittelten Produkt mit einer Masse von [M+H]<sup>+</sup> = 4127,8 überein (Abbildung 3-14 D).



**Abbildung 3-14:**

**Analytische Reinigung des Peptids pE3-A $\beta$ 40.**

**A) Chromatogramm der analytischen RP-HPLC Reinigung des A $\beta$ -Peptids am Beispiel von pE3-A $\beta$ 40:** Es wurde eine 5 RPC Source Säule verwendet. Peak A = Fusionsprotein, Peak B = pE3-A $\beta$ 40.

**B) Bei der RP-HPLC-Reinigung verwendeter Gradient:** Laufmittel A (0,1% Ammoniumhydroxid-Lösung, pH 9,0), Elution mit Puffer B (60:40 Acetonitril: Laufmittel A), 37°C Säulentemperatur, Flussrate 5 ml/min

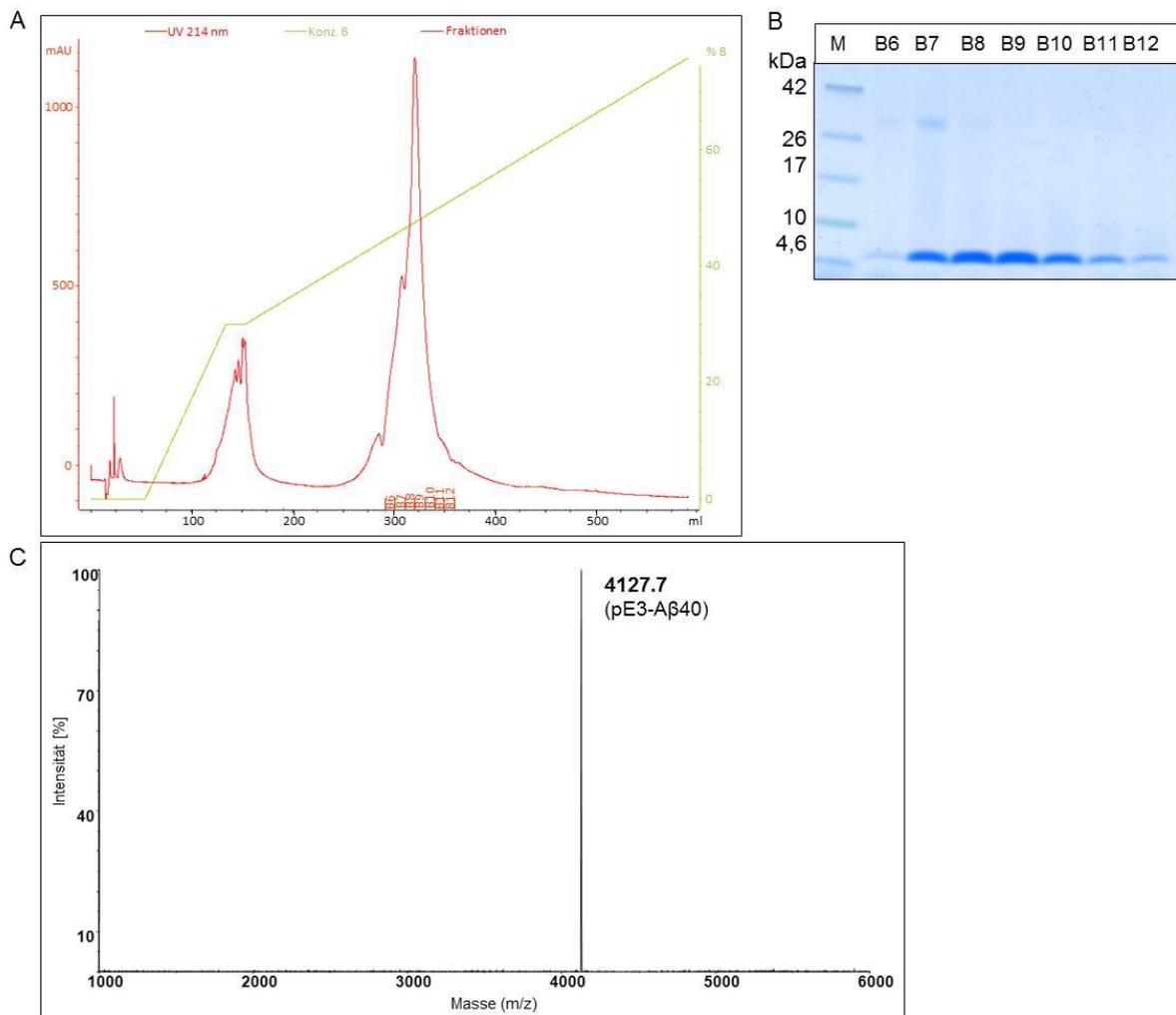
**C) Retentionszeiten der A $\beta$ -Peptide bei der analytischen 5RPC-Umkehrphasen-HPLC**

**D) MALDI-TOF Massenspektrum** des Produkts nach der Reinigung und Abtrennung des pE3-A $\beta$ 40. Das Produkt mit der Masse [M+H]<sup>+</sup> = 4127,8 stimmt mit der berechneten Masse von pE3-A $\beta$ 40 mit 4126,7 Da überein (innerhalb des Toleranzbereiches  $\pm$  5 Da). Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet.

**E) 10-20% Tricin-Gradienten Gel:** Coomassie gefärbt. M = Marker, 1 = rekombinantes pE3-A $\beta$ 40 (aus Peak B), 2 = synthetisches A $\beta$ 40

Die 5RPC-Säule wurde nicht ausschließlich zur Analyse verwendet, sondern auch zur Gewinnung des gereinigten A $\beta$ -Peptids. Aus 5-7 Läufen konnten ca. 1,5 mg gereinigtes A $\beta$  gewonnen werden. Die A $\beta$ -enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Um diesen Prozess der A $\beta$ -Gewinnung zu vereinfachen, wurde eine Maßstabsvergrößerung durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte die Reinigung und Optimierung im präparativen

Maßstab mit einer 15RPC (*Reversed phase*) Source Säule (GE Healthcare) mit einem Volumen von 20 ml als Umkehrphasen-Chromatographie in Verbindung mit einem Äkta Avant Purifier. Das Pellet aus abgespaltenem, N-terminal zyklisiertem pE3-A $\beta$ 40 (aus ursprünglich ca. 50 mg gespaltenem Fusionsprotein) wurde in 4 ml 0,1 M NaOH gelöst und auf die Säule appliziert. Es erfolgte die Verwendung der gleichen Laufmittel wie bei der analytischen Umkehrphasen-HPLC mit folgendem Gradienten: 0-30% B über 80 ml und anschließend 30-80% B über 500 ml. Dabei wurde mit einer Flussrate von 10-20 ml/min und einer Säulentemperatur von 37°C gearbeitet. pE3-A $\beta$ 40 eluierte bei ca. 48% B (ca. 29% Acetonitril) (Abbildung 3-15 A).



**Abbildung 3-15:**

**Präparative Reinigung des Peptids pE3-A $\beta$ 40.**

**A) Chromatogramm der präparativen Reinigung von pE3-A $\beta$ 40:** Umkehrphasen-Chromatographie unter Verwendung einer 15 RPC Source Säule. Laufmittel (A) 0,1% Ammoniumhydroxid-Lösung, pH 9,0, Elution mit Puffer (B) (60:40 Acetonitril: Laufmittel A) Gradient: 0-30% B über 80 ml, 30-80% B über 500 ml, Flussrate 10-20 ml/min, Säulentemperatur 37°C.

**B) 10-20% Tricin-Gradienten Gel:** Coomassie gefärbt. M = Marker, B6-B12 = Fraktionen der Reinigung

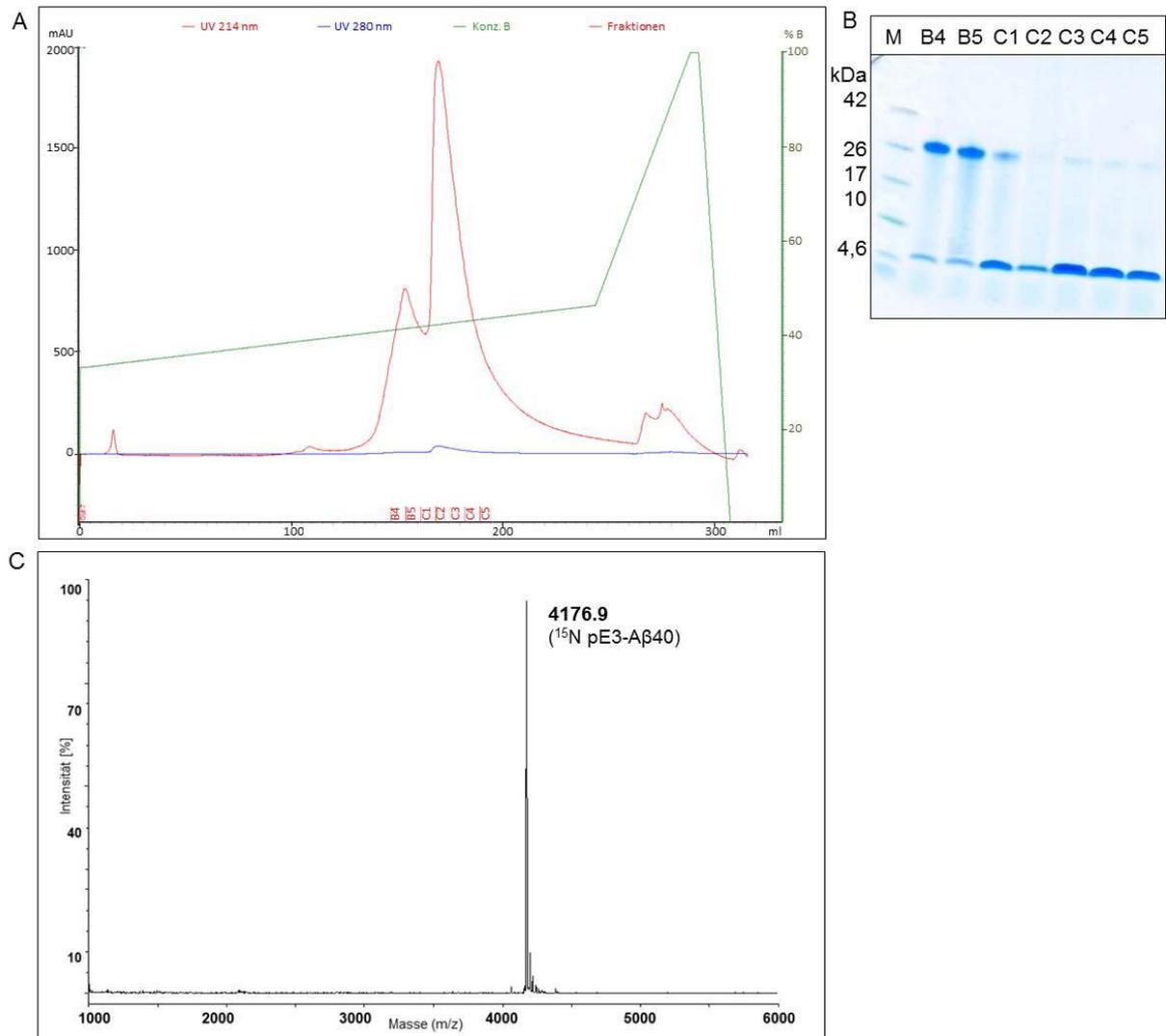
**C) MALDI-TOF Massenspektrum** des Produkts nach der Reinigung und Abtrennung des pE3-A $\beta$ 40. Das Produkt mit der Masse [M+H]<sup>+</sup> = 4127,7 stimmt mit der berechneten Masse von pE3-A $\beta$ 40 mit 4126,7 Da überein (innerhalb des Toleranzbereiches  $\pm$  5 Da). Sinapinsäure wurde als Matrix verwendet.

Mit dieser Umkehrphasen-Chromatographie konnten während einer Präparation ca. 7-8 mg A $\beta$  aus ursprünglich 50 mg Fusionsprotein gewonnen werden. Die A $\beta$ -enthaltenden

Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft (Abbildung 3-15 B/C).

### 3.2.2.3 Expression von $^{15}\text{N}$ -(NANP)<sub>19</sub>-Q3-A $\beta$ 40

Für spätere NMR-Strukturanalysen war es notwendig,  $^{15}\text{N}$ -markiertes A $\beta$  herzustellen. Dies erfolgte durch eine  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung der Proteine während der Expression in *E.coli*. Dazu wurde die Expression im Minimalmedium mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle durchgeführt. Nachdem überprüft wurde, dass das Fusionsprotein in ausreichenden Mengen im Minimalmedium exprimiert wird, erfolgte die Fermentation des  $^{15}\text{N}$ -markierten Fusionsproteins (NANP)<sub>19</sub>-Q3-A $\beta$ 40 in Jena (Dr. Uwe Horn, Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena). Die Reinigung des Fusionsproteins und anschließende Abspaltung sowie Zyklisierung des N-Terminus der A $\beta$ -Peptide erfolgte wie bereits in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben. Die Umkehrphasen-Chromatographie, welche den letzten Schritt der Reinigung und Abtrennung der A $\beta$ -Peptide darstellt, wurde nahezu analog durchgeführt. In diesem Fall erfolgte die Elution aber mit einem langsamer steigenden Acetonitril-Gradienten (0-30% B über 90 ml, 30-45% B über 350 ml, 45-100% B über 50 ml) und einer verringerten Flussrate von 3 ml/min, um die Abtrennung der A $\beta$ -Peptide noch zu verbessern (Abbildung 3-16 A). Peak 1 des Chromatogramms stellt den Fusionspartner dar, im Tricin-SDS-Gel in den Fraktionen B4 und B5 bei einer Größe von ca. 26 kDa sichtbar (Abbildung 3-16 B). Die Fraktionen C3-C5, die den zweiten Peak des Chromatogramms repräsentieren, weisen nahezu homogenes A $\beta$ -Peptid auf. Diese A $\beta$ -enthaltenden Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde zusätzlich zur Tricin-SDS-PAGE Analyse noch mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft (Abbildung 3-16 C). Das Peptid wies eine Größe von 4177 Da auf, es ist damit um 50 Masseinheiten größer als unmarkiertes pE3-A $\beta$ 40. Dies bestätigt, dass eine vollständige Anreicherung von  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff stattgefunden hat. Aus 100 g Zellmaterial wurden ca. 120 mg gereinigtes Fusionsprotein gewonnen. Daraus konnten anschließend ca. 15 mg  $^{15}\text{N}$ -markiertes pE3-A $\beta$ 40 erhalten werden.

**Abbildung 3-16:**

**Präparative Reinigung von <sup>15</sup>N markiertem pE3-Aβ40 aus Minimalmedium.**

**A) Chromatogramm der präparativen Reinigung von <sup>15</sup>N pE3-Aβ40:** Umkehrphasen-Chromatographie mit 15 RPC Source Säule, abgespaltenes und N-terminal zyklisiertes pE3-Aβ40 aus ursprünglich 50 mg Fusionsprotein wurde nach der Aggregation und dem Abzentrifugieren in 3 ml 0,1M NaOH gelöst und anschließend auf die Säule appliziert. Laufmittel (A) 0,1% Ammoniumhydroxid-Lösung, pH 9,0, Elution mit Puffer (B) (60:40 Acetonitril: Laufmittel A). Gradient: 0-30% B über 90 ml, 30-45% B über 350 ml, 45-100% B über 50 ml. Säulentemperatur 37°C, Flussrate 3 ml/min. Aβ eluierte bei ca. 45% B (27% Acetonitril).

**B) 10-20% Tricin-Gradienten Gel:** Coomassie gefärbt. M = Marker, B4-D3 = Fraktionen der Reinigung.

**C) MALDI-TOF Massenspektrum des Produkts nach der Reinigung und Abtrennung des <sup>15</sup>N-pE3-Aβ40:** Das Produkt mit der Masse [M+H]<sup>+</sup> = 4176,9 stimmt mit der berechneten Masse von <sup>15</sup>N-pE3-Aβ40 mit 4176,7 Da überein (innerhalb des Toleranzbereiches ± 5 Da). Sinapinsäure wurde als Matrix verwendet.

### 3.3 Untersuchungen an APH und A $\beta$

#### 3.3.1 Spaltung von A $\beta$ -Peptiden durch APH

Yamin *et al.* beschrieben 2007 erstmals die APH als ein A $\beta$ -degradierendes Enzym. Die Acylpeptidhydrolase wurde aus SK-N-MC Zellen isoliert. Nach der Inkubation der gereinigten APH mit iodiertem A $\beta$  ( $[^{125}\text{I}]$ -A $\beta$ 40) erfolgte die Auftrennung mittels SDS-PAGE. In der anschließenden Autoradiographie konnte keine A $\beta$ -Bande mehr detektiert werden, was auf eine Spaltung des Peptides hinweist. Unter zusätzlicher Verwendung des APH-spezifischen Inhibitors Ac-Leu-CMK konnte die Degradation von  $[^{125}\text{I}]$ -A $\beta$ 40 verhindert werden, was die Vermutung der APH-abhängigen Spaltung von A $\beta$  zusätzlich untermauerte. In einer späteren Studie zeigten Yamin *et al.* (2009) mittels ESI-FTICR-MS, dass die APH-Spaltung nach den Positionen 13,14 und 19 des A $\beta$ -Peptids stattfindet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der beschriebene Abbau von A $\beta$ -Peptiden durch die Acylpeptidhydrolase mittels MALDI-TOF-MS verifiziert werden. Dabei sollte auch auf mögliche Unterschiede zwischen synthetisch hergestelltem A $\beta$  und rekombinant hergestelltem A $\beta$  eingegangen werden. Für die Spaltungsuntersuchungen wurde rekombinante, gereinigte APH aus *E.coli* (siehe Abschnitt 3.1.4), sowie kommerziell erhältliche APH (Takara) verwendet. Die enzymatische Aktivität der APH wurde zuvor mit dem Substrat Ac-Ala-AMC bestätigt (siehe 2.8.1). Die folgenden synthetischen und rekombinanten A $\beta$ -Peptide wurden für die Untersuchung genutzt: A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und pE3-A $\beta$ 40. Die A $\beta$ -Peptide wurden im Spaltungsansatz in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt und die APH im molaren Verhältnis von 1:10 (2  $\mu\text{M}$  im Ansatz) zugegeben. Die Spaltung erfolgte in *Low Binding Tubes* (Eppendorf) in einem Volumen von 85  $\mu\text{l}$  im Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0) bei 37°C über einen Zeitraum von 20 Stunden. Nach 0 h, 3 h, 5 h, 8 h und 20 h wurden jeweils Proben entnommen und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Zu keinem Zeitpunkt konnte dabei eine Spaltung der A $\beta$ -Peptide detektiert werden. In

Abbildung 3-17 ist exemplarisch der Zeitpunkt nach 20 h Inkubation dargestellt. In Spalte A sieht man die Spaltungsuntersuchungen rekombinanter A $\beta$ -Peptide, in Spalte B sind die synthetisch hergestellten Peptide dargestellt. Aus der

Abbildung 3-17: wird deutlich, dass bei keinem der untersuchten A $\beta$ -Peptide eine Spaltung durch die APH auftritt. Es sind ausschließlich die Ausgangspeptide und keine Abbaufragmente sichtbar. Dabei bestanden keine Unterschiede zwischen rekombinantem und synthetischem A $\beta$ -Peptid. Diese Spaltungsuntersuchungen wurden ebenfalls mit kommerziell erhältlicher APH durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Ergebnisse erhalten, wie aus Abbildung 3-18 ersichtlich wird, in der exemplarisch der Zeitpunkt nach 20 h Inkubation dargestellt ist. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Spaltung der Peptide detektiert werden.

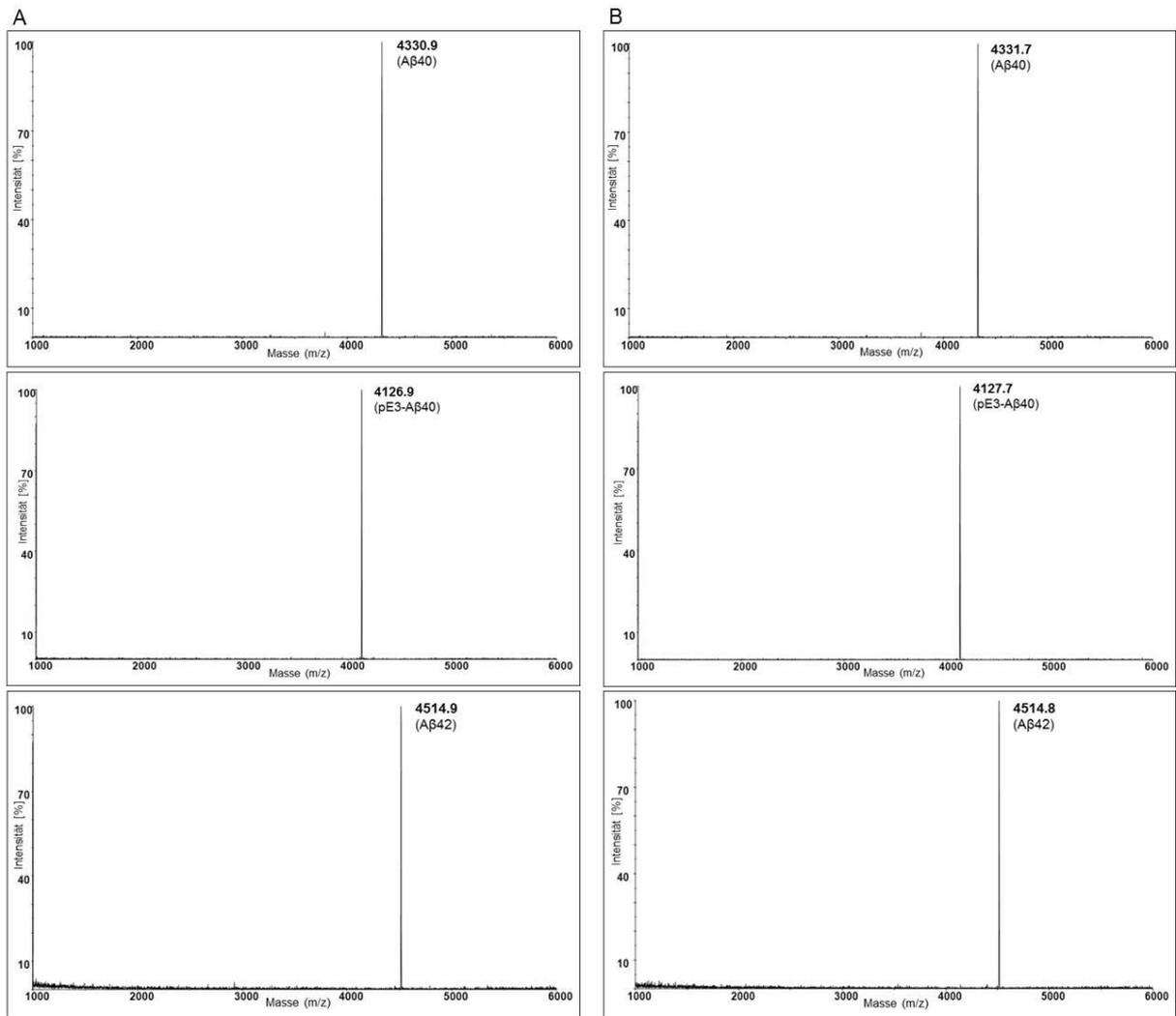
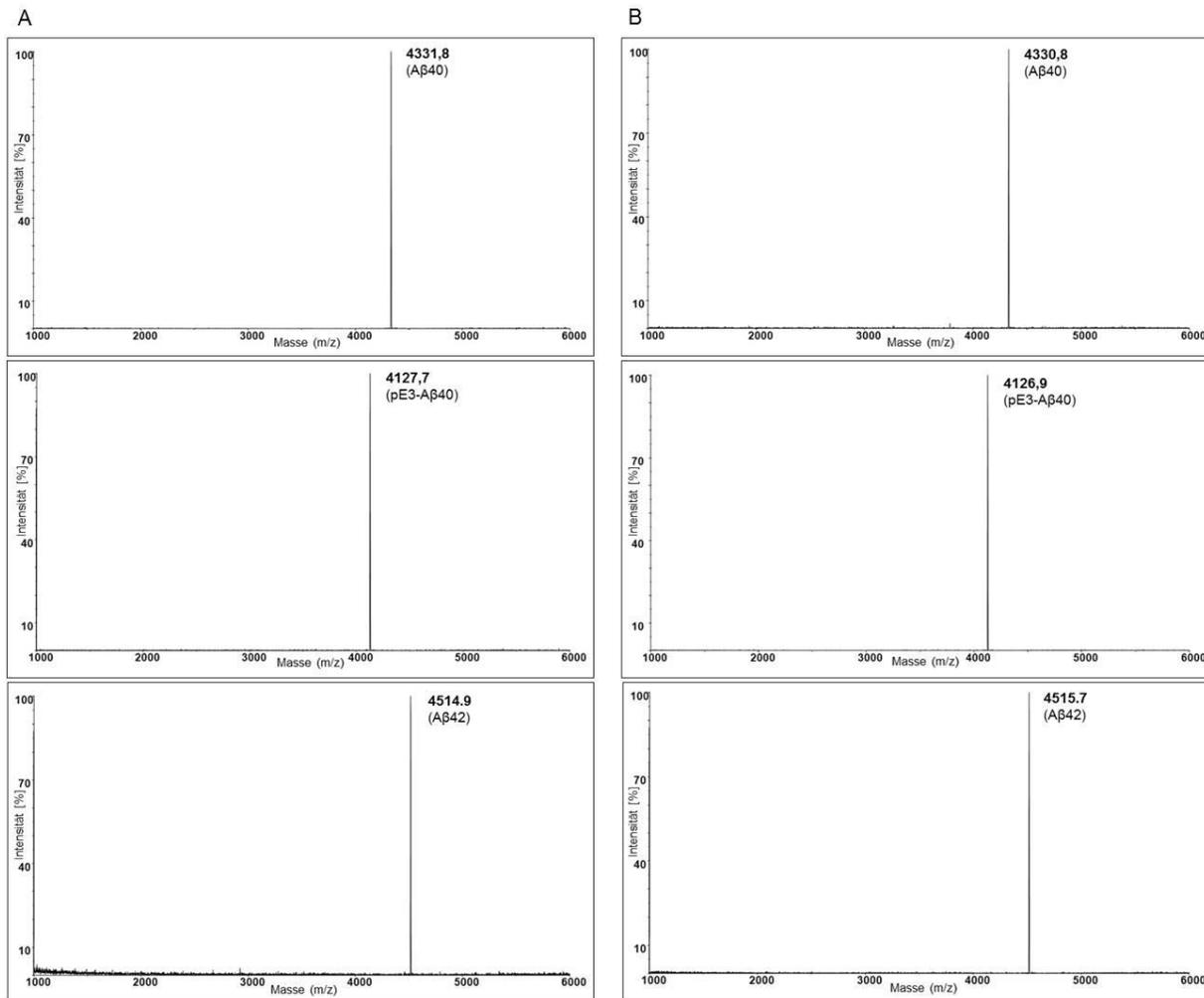


Abbildung 3-17:

**Untersuchung des möglichen Abbaus von A $\beta$ -Peptiden durch rekombinante APH mittels MALDI-TOF-MS.** A $\beta$ -Peptide wurden in einer Konzentration von 20  $\mu$ M im Ansatz eingesetzt, die APH im molaren Verhältnis 1:10 (2  $\mu$ M im Ansatz). Der Spaltungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 85  $\mu$ l wurde für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Exemplarisch ist in dieser Abbildung der Zeitpunkt nach 20 Stunden dargestellt.

**A) Analyse der Stabilität rekombinanter A $\beta$ -Peptide:** Es konnte keine Spaltung nachgewiesen werden.

**B) Analyse der Stabilität synthetischer A $\beta$ -Peptide:** Auch hier konnte keine Spaltung durch die APH nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-18:**

**Untersuchung des möglichen Abbaus von Aβ-Peptiden durch kommerziell erhältliche APH (Takara) mittels Maldi-TOF-MS.** Aβ-Peptide wurden in einer Konzentration von 20 μM im Ansatz eingesetzt, die APH im molaren Verhältnis 1:10 (2 μM im Ansatz). Der Spaltungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 85 μl wurde für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Exemplarisch ist in dieser Abbildung der Zeitpunkt nach 20 Stunden dargestellt.

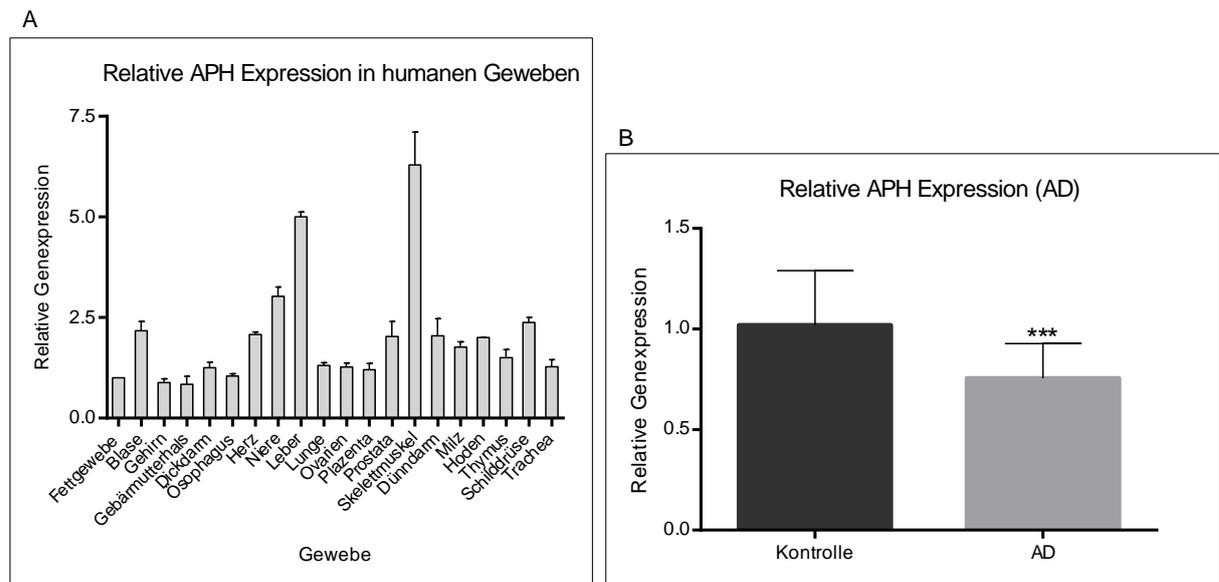
**A) Analyse der Stabilität rekombinanter Aβ-Peptide:** Es konnte keine Spaltung nachgewiesen werden.

**B) Analyse der Stabilität synthetischer Aβ-Peptide:** Unter Verwendung der kommerziell erhältlichen APH trat ebenfalls keine Spaltung bei synthetischen und rekombinanten Aβ-Peptiden auf.

### 3.3.2 Gewebelokalisation der APH

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Spaltung der Aβ-Peptide durch die APH *in vitro* nachgewiesen werden. Um jedoch einen möglichen Einfluss der APH auf Aβ-Peptide und die damit verbundene Alzheimer Krankheit *in vivo* zu untersuchen, wurden qPCR Untersuchungen (siehe 2.6.6) von Gehirngewebe (Temporallappen) von Alzheimer Patienten durchgeführt. Dazu erfolgte die Untersuchung des Gewebes von 12 AD-Patienten und 12 Kontroll-Probanden ohne AD. Die Proben wurden von *Banner Health*, Arizona bezogen. Die Normalisierung erfolgte auf die Referenzgene Sys1 und TTI1. Wie in Abbildung 3-19 B zu erkennen ist, wird in den AD-Patienten signifikant weniger APH exprimiert verglichen zu den Probanden, die keine Alzheimer Erkrankung aufwiesen. Anhand dieses Ergebnisses wird deutlich, dass ein Einfluss der APH auf Aβ *in vivo* nicht auszuschließen ist.

Um zusätzlich eine generelle Aussage über die Verteilung der APH in verschiedenen humanen Geweben zu erhalten, wurden mittels qPCR Experimenten noch weitere Organe überprüft. Zur Quantifizierung der APH-Transkriptmenge wurde Gesamt-RNA aus 20 verschiedenen humanen Geweben untersucht (*FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel*, Life Technologies). Wie aus Abbildung 3-19 A ersichtlich ist, wird die APH in den humanen Geweben generell ubiquitär exprimiert, im Skelettmuskel und in der Leber ist die Expression dagegen erhöht. Bei der allgemeinen Gewebeuntersuchung erfolgte eine Normalisierung auf das Referenzgen YWHAZ.



**Abbildung 3-19:**

**Untersuchung der relativen APH Transkriptmenge.**

**A) Relative APH-Expression in verschiedenen humanen Geweben** (Normalisierung auf das Referenzgen YWHAZ).

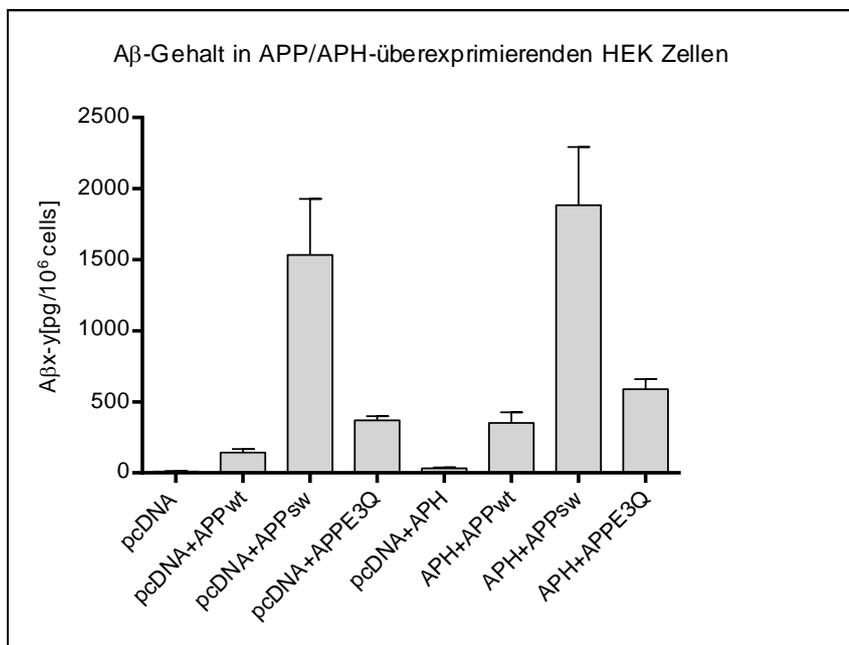
**B) Relative APH-Expression in Gehirngewebe von an Alzheimer erkrankten Patienten** im Vergleich zum Gehirngewebe von gesunden Probanden. Die Normalisierung erfolgte auf die Referenzgene *Sysl* und *TTI1*.

### 3.3.3 Überexpression von APP und APH in HEK293 Zellen

Aus den vorhergehenden Untersuchungen war ersichtlich, dass keine A $\beta$ -Spaltung durch die APH *in vitro* nachweisbar war, jedoch eine Reduktion der APH im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten auftrat. Um den Einfluss der Acylpeptidhydrolase auf A $\beta$  im Zellkultursystem *in vivo* zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit APH und verschiedenen Amyloid-Vorläufer Proteinen (APP Varianten) transient co-transfiziert (siehe 2.6.3.2). Für den Versuch wurden drei verschiedene APP-Formen benutzt: die APP Wildtyp-Form, die APP-SW-Mutante, und die APP-E3Q Variante. Die schwedische Mutante (APP-SW) weist eine Mutation im Bereich der  $\beta$ -Sekretase-Spaltstelle auf. Die Wildtyp-Sequenz (APP-WT) KMDAE ist dabei zu NLDAE mutiert. Dabei spaltet die  $\beta$ -Sekretase nach NL, wobei DAE die N-terminalen Aminosäuren des resultierenden A $\beta$ -Peptides darstellen. Die Schwedische Mutation (SW) bewirkt, dass das APP ein besseres  $\beta$ -Sekretase-Substrat darstellt, was eine

erhöhte A $\beta$ -Freisetzung zur Folge hat (Selkoe, 2001). Bei der APP-E3Q Mutante mit der Sequenz der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle KMQ wurden die ersten beiden Aminosäuren des A $\beta$ -Peptides DA aus der Sequenz entfernt, wodurch ein N-terminal verkürztes A $\beta$ -Peptid freigesetzt wird. An dritter Position befindet sich ein Glutamin anstelle des Glutamats, was nach der Freisetzung des A $\beta$ -Peptids eine verstärkte Pyroglutamatbildung des N-Terminus zur Folge hat. Die Bestimmung des A $\beta$ -Gehalts des Zellüberstands erfolgte anschließend mittels ELISA (siehe 2.9.3) unter Verwendung spezifischer A $\beta$ -Antikörper. Als Primärantikörper diente Anti-Amyloid- $\beta$  4G8, der die Aminosäuren 17-24 des humanen A $\beta$ -Peptids erkennt, als Sekundärantikörper wurde der HRP-gekoppelte Anti-Amyloid- $\beta$  Antikörper (6E10) verwendet, welcher die Positionen 1-17 detektiert.

Wie aus Abbildung 3-20 ersichtlich wird, konnte A $\beta$  in allen Proben detektiert werden. Die höchste Menge an A $\beta$ -Peptid trat nach der Co-Transfektion von APH mit der schwedischen APP-Variante auf. Eine leichte Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp-APP ist auch bei der Verwendung der E3Q Variante zu verzeichnen. Die A $\beta$ -Sekretion ist bei der Co-Transfektion aller APP-Konstrukte mit APH tendenziell erhöht. Ein Einfluss der APH auf die A $\beta$ -Sekretion *in vivo* ist somit nicht auszuschließen, müsste aber in weiterführenden Experimenten noch näher untersucht werden.

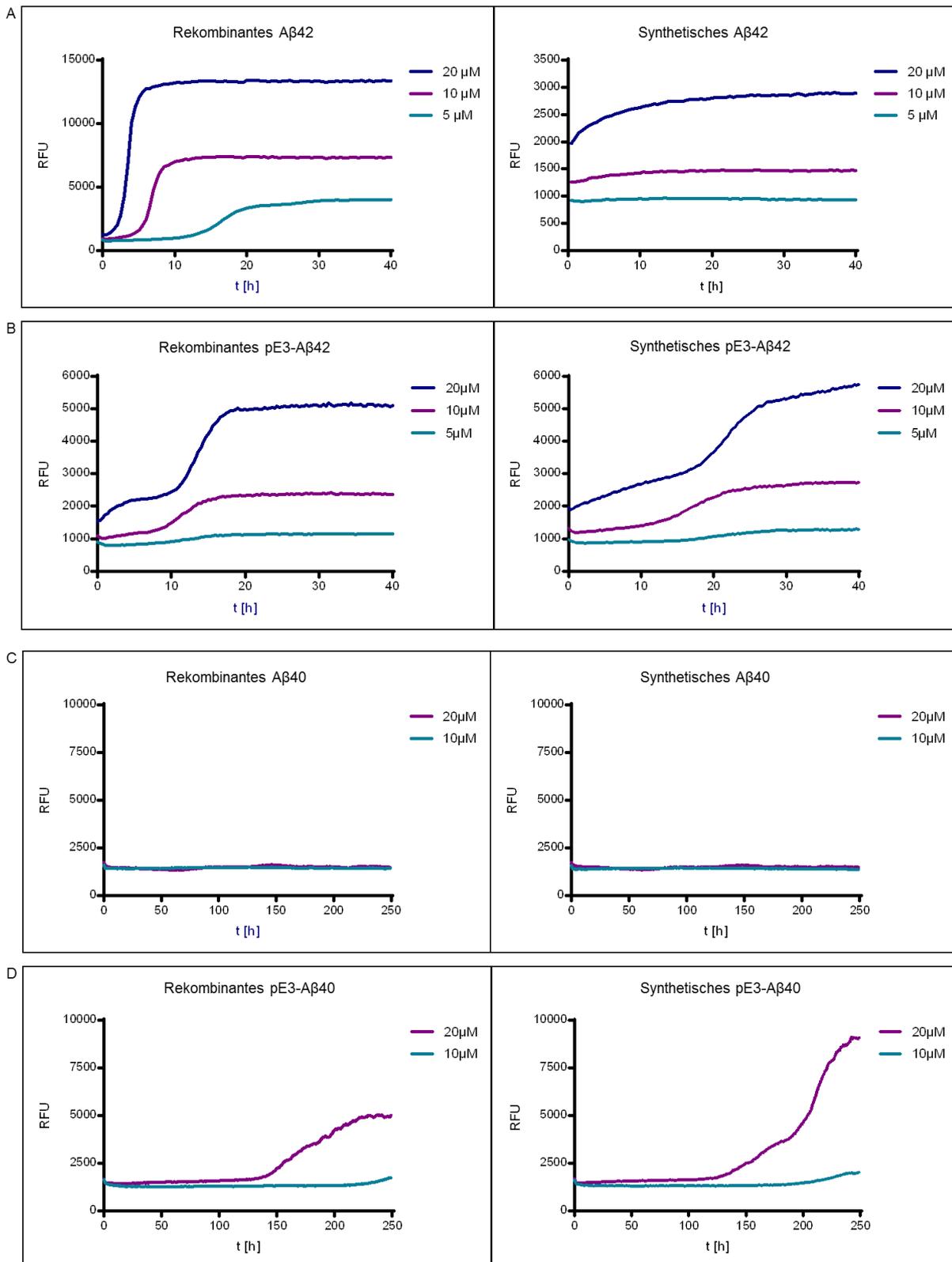


**Abbildung 3-20:** ELISA-Untersuchung zur Bestimmung des A $\beta$ -Gehaltes bei der Co-Transfektion von APH mit verschiedenen APP Varianten in HEK293 Zellen: Für den Versuch wurden folgende APP Varianten benutzt: APPE3Q, APPsw, APPwt. Nach der gemeinsamen Überexpression erfolgte ein ELISA unter Verwendung des 4G8-anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörpers als Fangantikörper (Primärantikörper) und HRP-konjugiertem 6E10-anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörper als Detektionsantikörper.

### 3.4 Vergleichende Untersuchungen an synthetisch und rekombinant hergestellten A $\beta$ -Peptiden

#### 3.4.1 Vergleich des Aggregationsverhaltens: Thioflavin-T-Assay

Um das Aggregationsverhalten von synthetischen und rekombinanten A $\beta$ -Peptiden miteinander zu vergleichen, wurde ein Thioflavin-T (Th-T) Assay durchgeführt (siehe 2.9.4). Mit dieser Methode ist es möglich, die Fibrillenbildung von A $\beta$ -Peptiden zu visualisieren und zu quantifizieren. Der Fluoreszenzfarbstoff Th-T lagert sich an  $\beta$ -Faltblattreiche Strukturen an, wie die Quartärstruktur amyloider Fibrillen, was in einer starken Fluoreszenz sichtbar wird. Die Reaktion erfolgte über einen Zeitraum von 250 h bei 37°C, alle 30 Minuten wurde die Absorption gemessen. Um die Konzentrationsabhängigkeit der Fibrillenbildung zu vergleichen, wurden die A $\beta$ -Peptide in Konzentrationen von 5  $\mu$ M - 20  $\mu$ M eingesetzt. Abbildung 3-21 A zeigt die vergleichende Aggregation von rekombinantem und synthetischem A $\beta$ 42. Das rekombinante A $\beta$ 42 weist dabei einen charakteristischen Kurvenverlauf auf. Bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M ist zunächst eine *Lag*-Phase erkennbar, an die sich ein starker Anstieg der Fluoreszenz anschließt. Nach dem Erreichen des Maximums bleibt die Fluoreszenz konstant, was darauf hindeutet, dass keine weiteren Fibrillen mehr gebildet werden. Bei einer A $\beta$ -Konzentration von 5  $\mu$ M des synthetischen Peptids A $\beta$ 42 ist keine Aggregation erkennbar, bei 20  $\mu$ M wird eine Fibrillenbildung sichtbar. Generell zeigt rekombinantes A $\beta$ 42 im hier dargestellten Zeitraum von 40 Stunden eine stärker ansteigende Fluoreszenz und damit eine schnellere Aggregation als synthetisches A $\beta$ 42. Bei einer Konzentration von 20  $\mu$ M wurden bei rekombinantem A $\beta$ 42 Fluoreszenzwerte von bis zu 13000 RFU ermittelt, während bei synthetischem A $\beta$ 42 das Maximum bei 2700 RFU verzeichnet wurde. Rekombinantes und synthetisches pE3-A $\beta$ 42 weisen hingegen nur leichte Unterschiede in der Aggregationskinetik auf (Abbildung 3-21 B). Bei beiden Peptiden ist ein biphasischer Verlauf der Peptidaggregation sichtbar, jedoch zeigt pE3-A $\beta$ 42 bei einer eingesetzten Konzentration von 20  $\mu$ M ein schnelleres Erreichen des Fluoreszenzmaximums. Bei der vergleichenden Untersuchung von rekombinantem und synthetischem A $\beta$ 40 ist im untersuchten Zeitraum von 250 h keine Fluoreszenz und damit keine Aggregation sichtbar (Abbildung 3-21 C). Die pE3-A $\beta$ 40 Peptide weisen im Gegensatz dazu eine leicht ansteigende Fluoreszenz und damit eine Fibrillenbildung auf. Bei synthetischem 3pE-40 ist der Anstieg bei einer A $\beta$ -Konzentration von 20  $\mu$ M leicht erhöht gegenüber rekombinantem A $\beta$ .

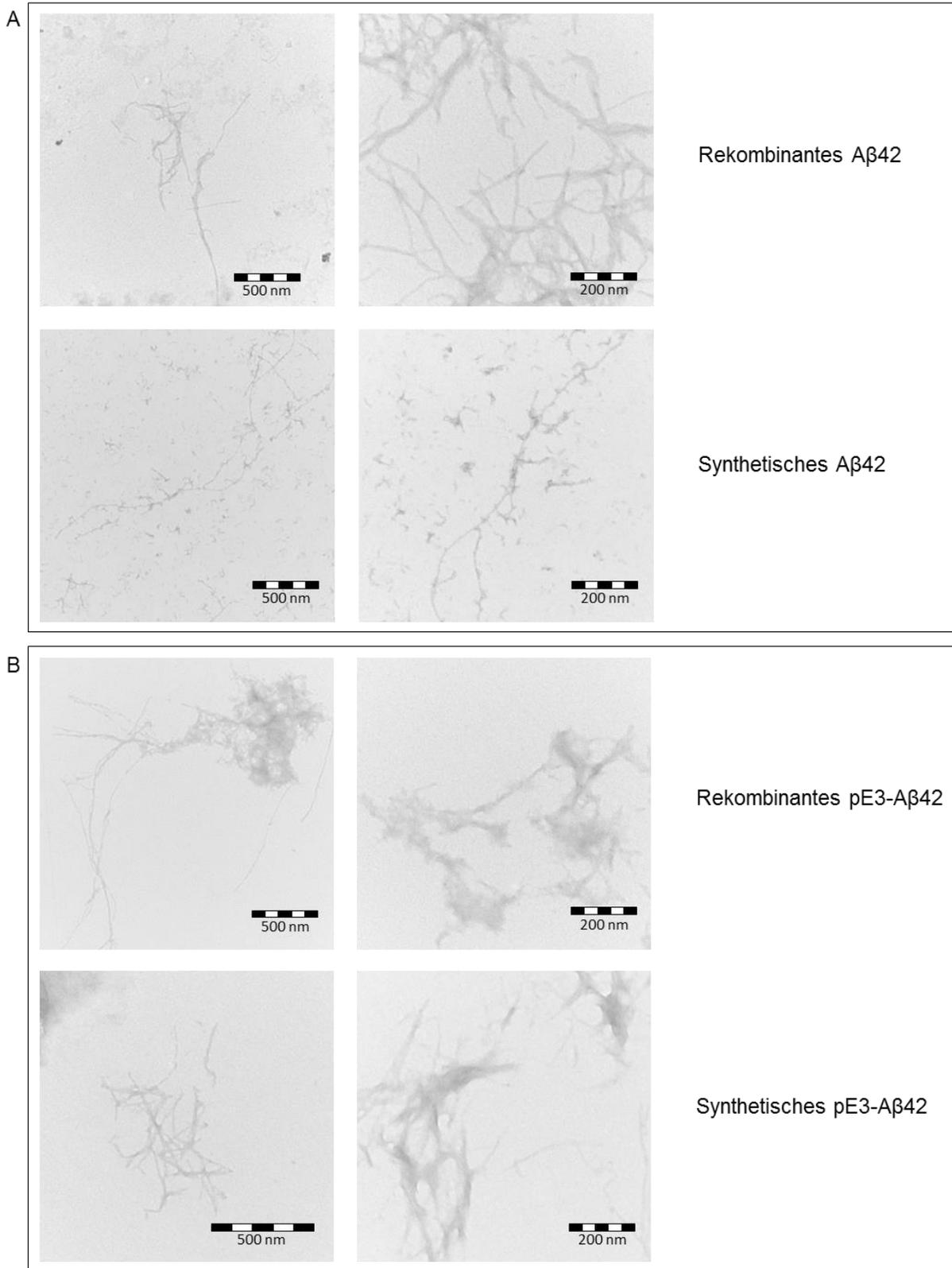


**Abbildung 3-21:** Thioflavin-T-Fluoreszenzuntersuchung der Aggregationskinetik von rekombinanten und synthetischen A $\beta$ -Peptiden: Verglichen wurden unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Peptide, welche im Puffer 25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0 gelöst wurden. Thioflavin-T wurde in einer Konzentration von 20  $\mu$ M im Ansatz zu den gelösten Peptiden gegeben und die Messung anschließend gestartet. Die Messung fand bei 37  $^{\circ}$ C über einen Zeitraum 250 h statt, Messpunkte wurden jede 30 min datiert. (Em 490 nm, Ex 440 nm, gain 1600)

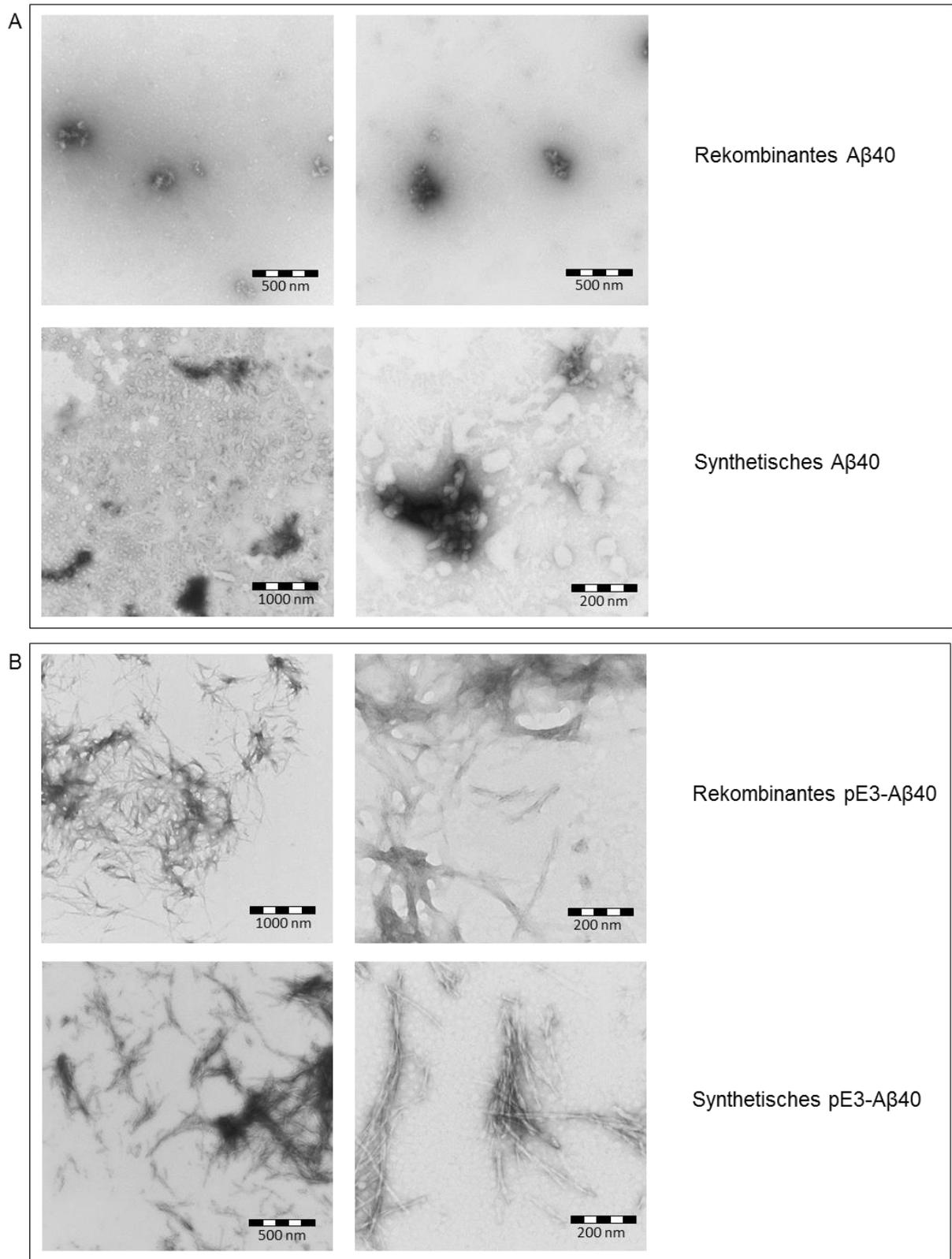
### **3.4.2 Untersuchung der Fibrillen Morphologie der A $\beta$ -Peptide mittels Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Morphologie der Fibrillen und Aggregate der A $\beta$ -Peptide des Th-T Tests wurde zusätzlich mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM 900, Zeiss) in Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause (MLU Halle-Wittenberg) untersucht.

In Abbildung 3-22 A sind die vergleichenden Aufnahmen von rekombinanten und synthetischen A $\beta$ 42 dargestellt. Korrelierend zum Ergebnis des ThT-Assays zeigt sich bei rekombinanten A $\beta$ 42 eine stärkere Fibrillen-Bildung mit deutlich abgrenzbaren und strukturierten Fibrillen. Beim synthetischen A $\beta$ 42 treten überwiegend kleine Bruchstücke auf. Die Fibrillen wirken schmäler und auch deren Anzahl ist im Vergleich zum rekombinanten A $\beta$ 42 reduziert. Die Fibrillen-Bildung erfolgte langsamer als bei rekombinanten A $\beta$ 42. Abbildung 3-22 B zeigt die aggregierten Strukturen von rekombinanten und synthetischen pE3-A $\beta$ 42-Peptiden. Rekombinantes pE3-A $\beta$ 42 zeigt in diesem Fall weniger Fibrillen, die schlechter voneinander abgrenzbar und weniger strukturiert erscheinen als die des rekombinanten A $\beta$ 42. Synthetisches und rekombinantes pE3-A $\beta$ 42 unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Morphologie. Synthetische und rekombinante A $\beta$ 40-Peptide sind im gemessenen Zeitraum unter den verwendeten Bedingungen nicht aggregiert (Abbildung 3-23 A), was auch im Th-T Assay sichtbar war. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind keine Aggregate oder Fibrillen sichtbar. Im Gegensatz dazu aggregierten die N-terminal verkürzten pE3-A $\beta$ 40-Peptide bei einer eingesetzten Konzentration von 20 $\mu$ M zu Fibrillen (Abbildung 3-23 B). Dies bestätigt wiederum den starken Einfluss des N-terminalen Pyroglutamatrests auf die Aggregation der Peptide. Die Fibrillen der synthetischen und rekombinanten pE3-A $\beta$ 40-Peptide zeigten dabei eine vergleichbare Morphologie. Verglichen mit den x-A $\beta$ 42 Peptiden waren die hier auftretenden Fibrillen jedoch kürzer und von geringerer Anzahl.



**Abbildung 3-22:**  
**Transmissions-Elektronenmikroskopie verschiedener A $\beta$ (x-42)-Peptide:** Die Fibrillen wurden im Puffer 50 mM Tris, 100mM NaCl, pH8.0 hergestellt, die Vergrößerung betrug 1:50.000 (200 nm Balken), 1:20.000 (kurzer 500 nm Balken), 1:30.000 (langer 500 nm Balken)



**Abbildung 3-23:**

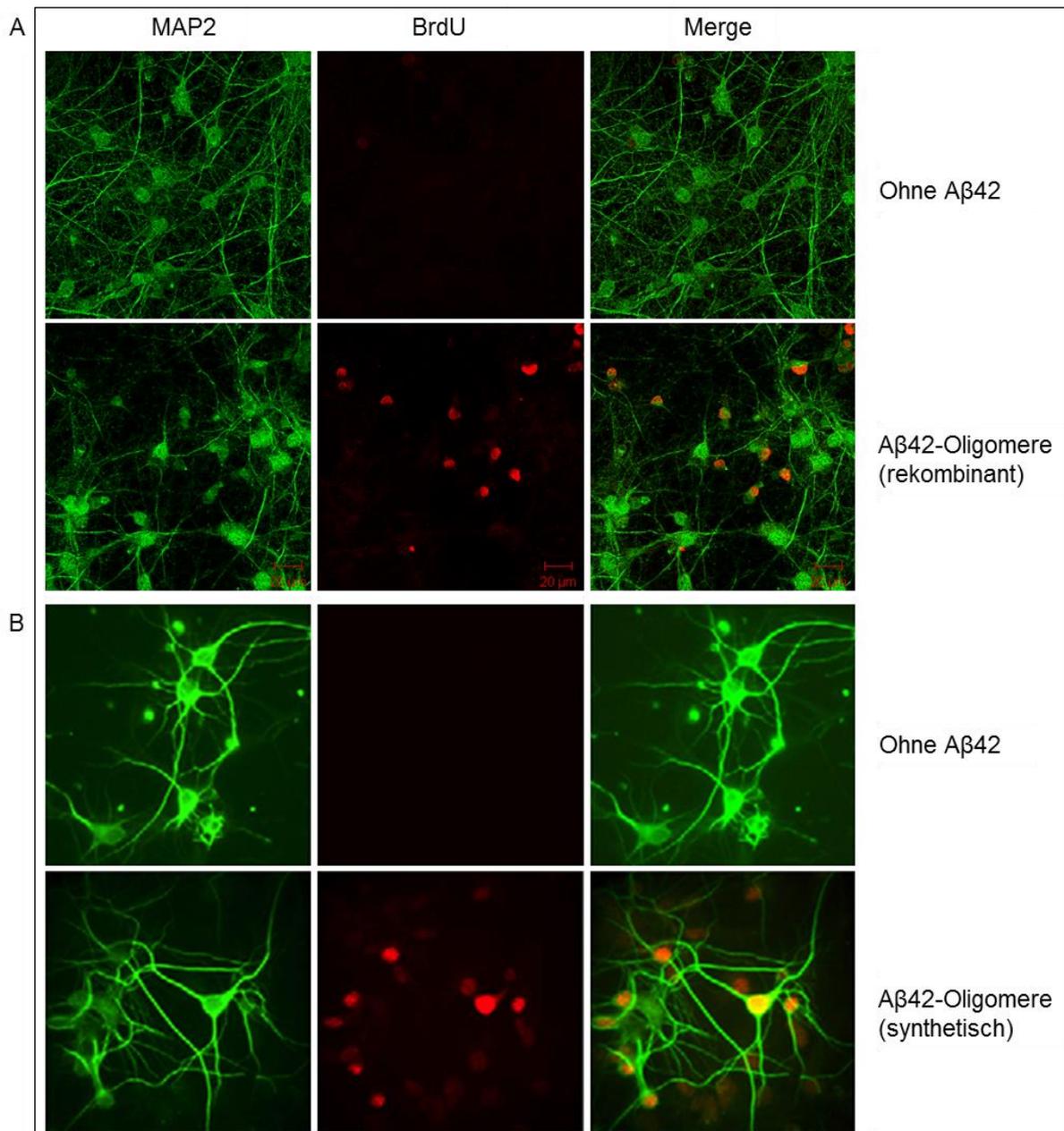
**Transmissions-Elektronenmikroskopie verschiedener A $\beta$ (x-40)-Peptide:** Die Fibrillen wurden im Puffer 50 mM Tris, 100mM NaCl, pH8.0 hergestellt. Die Vergrößerung betrug 1:50.000 (200 nm Balken), 1:20.000 (500 nm Balken)

### 3.4.3 BrdU Zell-Proliferationsassay

Die meisten Regionen des normalen erwachsenen menschlichen Gehirns sind nahezu frei von sich teilenden Neuronen. Die nicht-proliferierenden, ausdifferenzierten Zellen verbleiben in der Ruhephase ( $G_0$ -Phase) des Zellzyklus und führen als solche ihre Funktion bis zum Zelltod aus, ohne noch einmal teilungsaktiv zu werden. Bei einer Alzheimer Erkrankung treten post-mitotische kortikale Neuronen auf, die nach einer Ruhephase wieder in den Zellzyklus eintreten, jedoch ohne sich dabei zu teilen. Dieser ektopische Wiedereintritt in den Zellzyklus betrifft einen erheblichen Anteil von Neuronen, die während einer Alzheimer Erkrankung absterben (Arendt *et al.* 2010). Eine wichtige Erkenntnis in der Aufklärung der Mechanismen, die post-mitotische Neuronen dazu veranlassen, wieder in den Zell-Zyklus einzutreten, war der Nachweis, dass oligomerisiertes A $\beta$ 42 die Replikation genomischer DNA in der Zellkultur in primären kortikalen Neuronen induzieren kann (Varvel *et al.* 2008).

Um diesen Vorgang in der Zellkultur zu identifizieren, wird Bromdesoxyuridin (BrdU) verwendet. Dabei handelt es sich um ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. Es wird zur labordiagnostischen Markierung proliferierender Zellen in vitalen Geweben verwendet. BrdU kann von der Zelle aufgenommen werden und in phosphorylierter Form anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA als Markierung eingebaut werden.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob das rekombinant hergestellte A $\beta$ 42 vergleichbar wie das synthetische A $\beta$ 42 den ektopischen Wiedereintritt in den Zellzyklus in kortikalen Neuronen hervorruft. Der BrdU Zell-Proliferationsassay erfolgte durch A. Reimann (Probiobio AG) und wurde an der Universität von Virginia (Charlottesville, USA) unter der Leitung von Prof. Bloom durchgeführt. Kortikale Neuronen von WT Mäusen wurden dazu mit rekombinant hergestelltem, oligomerisiertem A $\beta$ 42 (6  $\mu$ M) und BrdU (10  $\mu$ M) behandelt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen MAP2 (*microtubule associated protein 2*) und BrdU, um Neuronen mit neu synthetisierter DNA zu identifizieren. Abbildung 3-24 zeigt kortikale Neuronen nach der Inkubation mit rekombinantem oligomerisiertem A $\beta$ 42 (Abbildung 3-24 A), die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, sowie mit synthetischem A $\beta$ 42 (Abbildung 3-24 B), welches Seward *et al.* (2012) darstellte. Es wird ersichtlich, dass nach der Inkubation der Neuronen mit oligomerisiertem rekombinanten A $\beta$ 42 eine Einlagerung von BrdU stattgefunden hat, die mit den für synthetisches A $\beta$ 42 erhobenen Daten übereinstimmt. Durch den Nachweis der Einlagerung von BrdU konnte gezeigt werden, dass das rekombinante A $\beta$ 42 die gleiche Wirkung auf die Zellen wie synthetisches A $\beta$ 42 aufwies und in den behandelten Neuronen den ektopischen Wiedereintritt in die S-Phase des Zellzyklus hervorrief.



**Abbildung 3-24:**

**BrdU Assay: Einfluss von Aβ42-Oligomeren auf die Proliferation kortikaler Neuronen.**

**A) rekombinantes oligomerisiertes Aβ42** wurde in einer Konzentration von 6 μM eingesetzt, BrdU in einer Konzentration von 10 μM. MAP2 Antikörper (polyklonal, Kaninchen 1:1000), BrdU Antikörper (monoklonal, Maus, 1:500, Sigma Aldrich) Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Neuronen.

**B) synthetisches A42:** Diese Abbildung wurde modifiziert nach Seward *et al.* 2013. Dargestellt sind primäre kortikale Neuronen nach der Inkubation mit synthetischem oligomerisiertem Aβ42

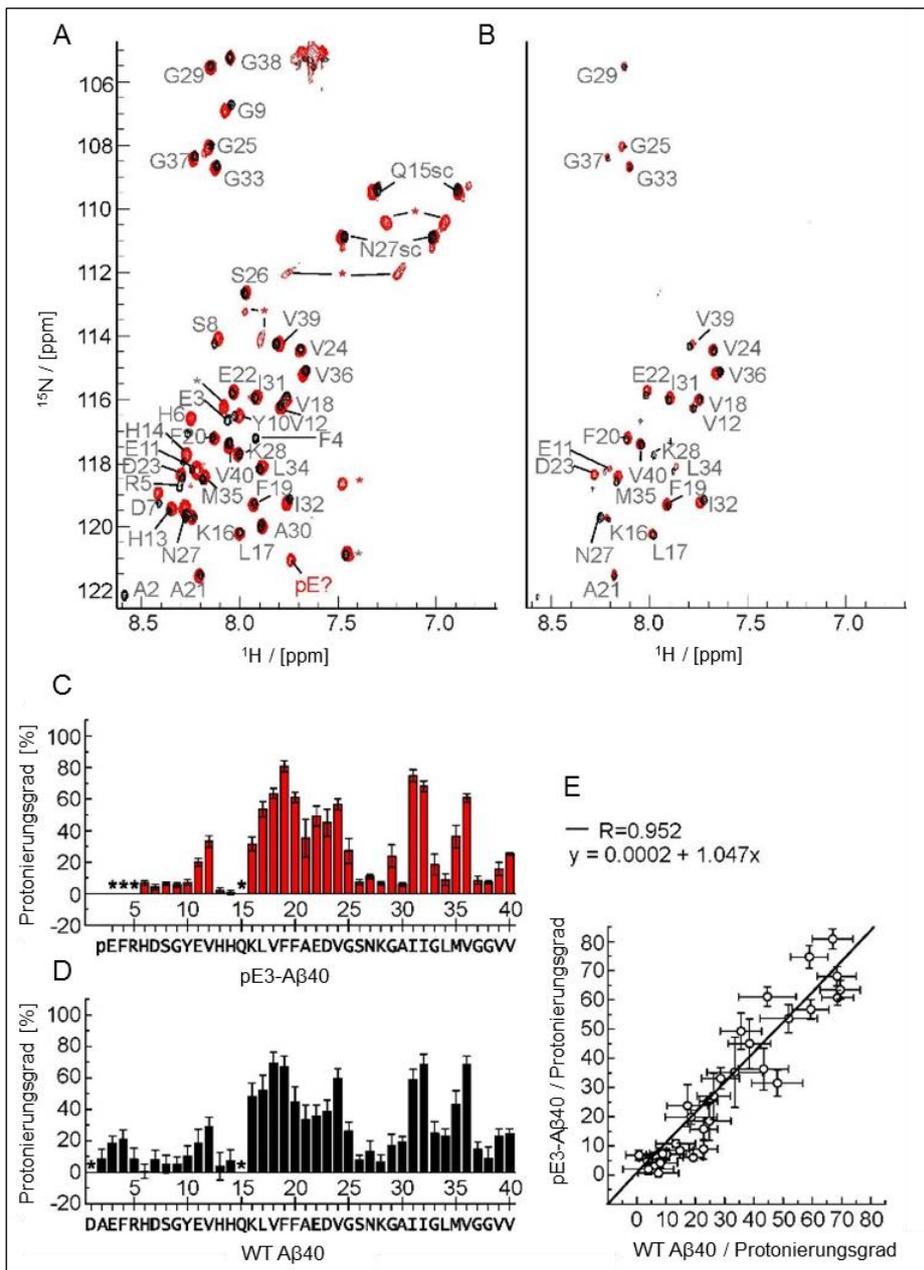
### 3.5 Untersuchung des Einflusses der pE-Modifikation auf die fibrilläre Peptidkonformation von A $\beta$ mittels NMR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung und Reinigung rekombinant exprimierter  $^{15}\text{N}$ -markierter pE3-A $\beta$ 40-Peptide etabliert. Dies ermöglichte die Durchführung von NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Strukturuntersuchungen mit Wasserstoff-Deuterium (H/D)-Austausch. Dadurch wurde der Einfluss der Pyroglutamat-Modifikation auf die Struktur der A $\beta$ -Fibrillen charakterisiert und konnte mit Wildtyp-A $\beta$  verglichen werden. Bei den H/D-Austausch-NMR-Messungen können  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen der A $\beta$ -Fibrillen identifiziert werden, da diese durch einen verzögerten Austausch der Rückgrat-Amid-Protonen gegen Deuterium gekennzeichnet sind. Die Untersuchungen fanden in Kooperation mit Prof. Fändrich (Pharmazeutische Biotechnologie Universität Ulm) statt. Die NMR-Messungen führte die Arbeitsgruppe um Prof. Balbach (Institut für Physik, MLU Halle) durch.

Zur Fibrillenbildung wurden die Peptide pE3-A $\beta$ 40 und A $\beta$ 40 mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in 50 mM Phosphat pH 7,4 eingesetzt und bei 37 °C (100 rpm) für 7 Tage inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (60 min bei 15.000xg) wurden die Fibrillen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 (protonierte Probe) oder 50 mM deuteriertem Phosphatpuffer pH 7,4 (deuterierte Probe) gelöst. Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch erfolgte bei 25 °C über einen Zeitraum von 100 Stunden.

In Abbildung 3-25 A/B ist das  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -fHSQC (*fast heteronuclear single quantum coherence*) Spektrum von pE3-A $\beta$ 40 (rot) und A $\beta$ 40 (schwarz) in deuteriertem DMSO dargestellt. Dieses zwei-dimensionale Spektrum stellt die Korrelation der chemischen Verschiebung der direkt gebundenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Atome dar. Ein Signal entsteht dabei für jedes einzelne Wasserstoff-Atom, das an die Amid-Gruppe einer Peptidbindung gebunden ist. Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ -Kerne aufgetragen, auf der y-Achse die chemische Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Kerne. Abbildung 3-25 A zeigt das Spektrum der protonierten Proben, in Abbildung 3-25 B ist das Spektrum der deuterierten Proben nach dem Wasserstoff-Deuterium-Austausch abgebildet. Fand ein Austausch des Wasserstoffs gegen Deuterium statt, ist kein Signal detektierbar und lässt darauf schließen, dass dieser Bereich des Peptids zugänglich für wässrige Lösungen ist und keine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweist. Die pE3-A $\beta$ 40 Fibrillen zeigten bei den NMR-Untersuchungen Bereiche, die vor einem Austausch geschützt sind und somit Bestandteil der  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen sind. Dies betraf im Speziellen die Positionen 17-25 und die Positionen 31, 32, 35 und 36 (Abbildung 3-25 C). Bei pE3-A $\beta$ 40 konnten für die Aminosäuren 3-5 keine Signale zugeordnet werden. Alle zusätzlich auftretenden Signale im Vergleich zu A $\beta$ 40, welche in der Abbildung A mit pE bzw. mit einem roten Stern gekennzeichnet sind, verschwinden nach 100 h H/D Austausch. Dieser N-terminale Bereich ist also nicht vor dem Austausch geschützt.

Die NMR-Strukturuntersuchungen von A $\beta$ 40-Fibrillen wiesen die gleichen vor einem Austausch geschützten Bereiche auf (Abbildung 3-25 D). In der vergleichenden Darstellung der Protonierungsdaten von pE3-A $\beta$ 40 und WT A $\beta$ 40 (Abbildung 3-25 E) wird dieses Ergebnis verdeutlicht. Es ist somit ersichtlich, dass die generelle fibrilläre Peptidkonformation bei pE3-A $\beta$ 40 mit der von A $\beta$ 40 übereinstimmt. Diese Ergebnisse konnten in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht werden (Wulff *et al.* 2016).



**Abbildung 3-25:**

**NMR-Strukturuntersuchungen des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs von  $^{15}\text{N}$ -markierten A $\beta$ -Peptid-Varianten.**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -fHSQC (*fast heteronuclear single quantum coherence*) Spektrum in deuteriertem DMSO von pE3-A $\beta$ 40 (rot dargestellt) und A $\beta$ 40 (schwarz dargestellt).

**A) Spektrum der vollständig protonierten Proben**

**B) Spektrum nach 100 h Wasserstoff-Deuterium-Austausch**

**C) Quantifizierter Aminosäurespezifischer Protonierungsgrad nach H/D-Austausch für pE3-A $\beta$ 40 und D) für A $\beta$ 40:** ein Stern markiert dabei die Aminosäuren, die nicht analysiert werden konnten.

**E) Vergleichende Darstellung der Protonierungsdaten.**

Abbildung modifiziert nach Wulff *et al.* 2016

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die rekombinante Expression der APH und verschiedener A $\beta$ -Peptide erfolgen. Geeignete Expressionssysteme, sowie Reinigungsstrategien wurden getestet und etabliert. Anschließend fanden die Charakterisierung der A $\beta$ -Peptide, sowie ein Vergleich mit synthetisch hergestellten Peptiden statt. Diese Untersuchungen beinhalteten unter anderem das Aggregationsverhalten, die Evaluierung der Funktion der APH als putatives A $\beta$ -spaltendes Enzym und die experimentelle Charakterisierung der rekombinanten Peptide.

### 4.1 Rekombinante Expression der Acylpeptidhydrolase (APH)

Die bisherigen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur APH beziehen sich vorwiegend auf Protein, das aus verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies, wie Ratte, Schwein und Mensch, isoliert wurde (Tsunasawa *et al.* 1975, Schönberger and Tschesche 1981, Jones and Manning 1985, Miyagi *et al.* 1995). Tsunasawa *et al.* beschrieben 1975 erstmals die Isolierung der APH aus der Rattenleber. 1981 erfolgte die Reinigung des Enzyms aus humanem Erythrozytenlysat von Schönberger und Kollegen. Ebenfalls fanden Untersuchungen der APH aus Gewebe von Rind (Gade and Brown, 1981), Schaf (Witheiler 1972 and Wilson) oder Kaninchen statt (Radhakrishna and Wold 1989). Um höhere Ausbeuten des Enzyms zu generieren, sowie die Anfügung eines Tags zur Optimierung der Reinigung zu ermöglichen, wurde die humane APH im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimiert.

Für die Produktion rekombinanter Proteine existieren verschiedene Expressionssysteme, von denen jedes sowohl Vor- als auch Nachteile gegenüber den anderen Systemen aufweist. So zeichnen sich beispielsweise bakterielle Expressionssysteme wie *E.coli* gegenüber eukaryotischen Systemen durch höhere Wachstumsraten und eine leichtere Kultivierung aus, sie sind hingegen für die Produktion großer, glykosylierter Proteine mit Disulfidbrücken nicht vorteilhaft. Als ein zusätzliches Argument gegen die Nutzung von *E.coli* stand neben dem Ausbleiben posttranslationaler Modifikationen auch die mögliche Bildung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) mit unlöslichem und inaktivem Protein. Eukaryotische Expressionssysteme bieten unter anderem den Vorteil der posttranslationalen Modifikation, was deren Verwendbarkeit für die Expression komplexer Moleküle ermöglicht. In der Probiodrug AG war die Expression APH-verwandter Proteasen in eukaryotischen Expressionssystemen sehr gut etabliert, weshalb dieses System zur Herstellung der Serinprotease APH zunächst favorisiert wurde. Es existieren wenige Literaturdaten zur rekombinanten Expression der humanen APH. Yamin *et al.* führten 2007 erstmals eine

transiente Überexpression der APH in COS7-Zellen, sowie in SK-N-MC Zellen (Humane Neuroblastom Zelllinie) durch. 48 h nach der Transfektion der SK-N-MC Zellen erfolgte die Untersuchung des Zellkulturüberstandes, sowie des Zellysats. Die enzymatische APH-Aktivität wurde überwiegend im Zellaufschluss nachgewiesen, nur ein geringer Anteil konnte im Zellüberstand detektiert werden. Analog zu dieser Arbeit wurde die APH Expression im Rahmen dieser Arbeit in einem verwandten Zellsystem durchgeführt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. So konnte enzymatisch aktives, intaktes Protein in CHO-Zellen generiert werden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung mit *Anti-Flag-Tag* Antikörper konnte eine intrazelluläre Lokalisation der APH nachgewiesen werden (Abbildung 3-1 B). Innerhalb dieser Untersuchungen ließ sich allerdings auch eine Grundaktivität gegenüber dem Substrat Ac-Ala-AMC in untransfizierten Zellen und in den mit Leervektor transfizierten Zellen detektieren (Abbildung 3-1 A). Dabei ist es möglich, dass es sich um intrinsische APH handelt, wie es unter anderem für K-562 Zellen (Humane Leukämiezelllinie) oder SK-N-MC Zellen beschrieben ist (Fujino *et al.* 2000a, Yamin *et al.* 1999, 2007). Es ist aber nicht auszuschließen, dass diese Aktivität auch auf eine weitere, unbekannte Protease zurückzuführen ist. Eine Fermentation der stabil transfizierten CHO-Zellen zur Maßstabsvergrößerung der Expression war nicht erfolgreich, wodurch die Ausbeute an rekombinantem Protein gering blieb.

Um höhere Mengen löslichen Proteins zu erhalten, wurde anschließend das Baculovirus Expressionssystem getestet, das ein virales Transfektionssystem zur effizienten Produktion rekombinanter Proteine in Insektenzellen darstellt. Bei der Expression der rekombinanten APH in Sf21 Zellen konnten hohe Ausbeuten des aktiven Enzyms im Überstand der transfizierten Zellen erzielt werden. Bei der anschließenden Reinigung wurden aus 100 ml Sf21-Suspensionskultur 1 mg gereinigte APH mit einer enzymatischen Aktivität von 25 U/mg erhalten werden, gemessen mit dem spezifischen Substrat Ac-Ala-AMC.

Problematisch bei der Expression in diesem System erwies sich die proteolytische Spaltung der APH. Im SDS Gel waren zusätzlich zu einer Bande von 80 kDa, welche die intakte APH repräsentiert, 2 Fragmente mit einer Größe von ca. 22 kDa und 55 kDa sichtbar, die durch *Western Blot* Untersuchungen eindeutig dem N- bzw. C-terminalen Bereich der rekombinanten APH zugeordnet werden konnten (Abbildung 3-3). Fragmente mit der gleichen Größe wurden von Scaloni *et al.* 1999 als Resultat einer Trypsin-spezifischen Spaltung der humanen APH beschrieben. Die Hydrolyse findet dabei zwischen Arg193 und Leu194 statt. Die enzymatische Aktivität des Enzyms wird nicht beeinträchtigt, weswegen man davon ausgeht, dass die Spaltung die generelle Struktur des Enzyms nicht zu verändern scheint. Es wird außerdem beschrieben, dass das Spaltungsmuster auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen erhalten bleibt, was darauf hinweist, dass es zwischen den zwei Fragmenten keine Disulfidbrücken gibt.

Dieses Spaltungsmuster konnte zusätzlich mit kommerziell erhältlicher APH nach Trypsinzugabe detektiert werden (Abbildung 3-4 C), wodurch die These einer Spaltung der APH durch eine Protease mit Trypsinähnlicher Substratspezifität während der Expression untermauert wird. Es liegt demnach nahe, dass die auftretende Spaltung zwischen Arg193 und Leu194 stattfindet, wie es von Scaloni *et al.* beschrieben wurde.

Ein weiteres Indiz für die Spaltung während der Expression ist das gleichbleibende Verhältnis der Fragmentbanden im SDS-Gel, die bereits direkt nach dem Aufschluss auftraten und auch über einen längeren Zeitraum hinweg nicht stärker wurden. Es wäre möglich, dass in den Insektenzellen eine intrinsische Protease vorliegt, welche die Spaltung der APH verursacht. 2005 wurde von Johnson und Jiang Cathepsin L charakterisiert, das von Sf21 Zellen sekretiert wird und homolog zum Säuger-Cathepsin L ist. Diese Cystein Protease der C1 Familie (Papain Familie) bevorzugt Arginin in P1 Position. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass die beobachtete Spaltung der APH in Sf21 Zellen durch das intrinsisch gebildete Cathepsin L hervorgerufen wird.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach der Expression der APH HighFive Zellen erhalten. Diese Zellen haben den Vorteil, dass sie eine schnellere Verdopplungszeit haben und laut Hersteller (Life Technologies) bis zu zehnmal mehr lösliches rekombinantes Protein verglichen mit Sf9/Sf21 Zellen produzieren. Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden, bei gleichen Ausgangs-Zellzahlen zeigten die HighFive Zellen im Expressionstest eine 5-7fach gesteigerte enzymatische Aktivität der APH. Jedoch wurde auch bei dieser Zelllinie das gleiche Spaltungsmuster der APH nach der Expression wie unter Verwendung der Sf21 Zellen beobachtet. Generell wird für High Five Zellen eine erhöhte proteolytische Aktivität gegenüber den rekombinant exprimierten Proteinen beschrieben (Hopkins *et al.* 2010). Zudem liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellen auch die Cysteinprotease Cathepsin L produzieren. Bei einem anderen Insekt, der Zecke, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* wurde beispielsweise ebenfalls Cathepsin L identifiziert, mit Substratspezifität für Leucin oder Arginin in P1 Position (Clara *et al.* 2011).

Die Zugabe von Inhibitoren während der Expression wurde getestet, was jedoch den proteolytischen Abbau nicht verhindern konnte. Der Roche Complete™ Proteaseinhibitor-Cocktail inhibiert Serin-, Cystein- und Metalloproteasen. Dieser hätte theoretisch auch die Cathepsin L-Aktivität während der Expression hemmen sollen, es ist aber möglich, dass die Inhibitor-Konzentration zu gering war oder der Inhibitor über den Zeitraum von 72 Stunden bei 28 °C instabil wurde. Ein Versuch zur Unterbindung der Spaltung bei der Expression in Insektenzellen wäre die Mutation der putativen Spaltstelle zwischen Arg193 und Leu194, wodurch möglicherweise intakte APH exprimiert werden könnte.

Ursprünglich sollten eukaryotische Expressionssysteme verwendet werden, um hohe Ausbeuten an löslichem, intaktem Protein zu erzielen. Bei der Expression in Insektenzellen

wurden hohe APH-Mengen erhalten, jedoch resultierte die Expression in proteolytisch gespaltenem Protein. Die Verwendung von CHO-Zellen erbrachte nicht die erwünschten Ausbeuten. Da die humane APH keine Glykosylierungsstellen oder Disulfidbrücken aufweist (Raphel *et al.* 1999), wurde im nächsten Schritt ein prokaryotisches Expressionssystem unter Verwendung von *E.coli* Zellen getestet.

Die Prokaryoten, insbesondere das Bakterium *E.coli* sind leicht kultivierbar und zeichnen sich durch geringe Anforderungen an das Nährmedium, sowie hohe Wachstums- und Expressionsraten aus. Allgemein ist es das am häufigsten genutzte Expressionssystem für die Produktion industrieller und pharmazeutischer Proteine, was unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass dieser Organismus sehr gut erforscht und in annähernd jedem Labor etabliert ist (Terpe, 2006). Zudem ist *E.coli* zur Produktion im industriellen Maßstab aufgrund des schnellen Wachstums, der geringen Kosten für Medien und der Kultivierbarkeit in großen Fermentern vorteilhaft (Huang *et al.* 2012). Unter Verwendung von *E.coli* (Rosetta) konnte die humane APH rekombinant hergestellt werden. Es ließen sich hohe Ausbeuten des enzymatisch aktiven, intakten Proteins generieren. Die Reinigung mittels Ni-NTA- und Anionen-Austausch-Chromatographie wurde optimiert, aus 6 L Schüttelkultur wurden 9 mg gereinigte APH mit einer enzymatischen Aktivität von ca. 10 U/mg (Ac-Ala-AMC) erhalten. Es erfolgte die Bestimmung kinetischer Parameter des gereinigten Enzyms. Zum Vergleich wurde die kommerziell erhältliche APH der Firma Takara verwendet, die aus der Schweineleber isoliert und gereinigt wurde, und eine 91,5%ige Sequenzidentität zur humanen APH aufweist. Die ermittelten  $K_m$ -Werte für das Substrat Ac-Ala-AMC sind vergleichbar, der  $K_m$ -Wert der rekombinanten APH lag bei 117  $\mu\text{M}$ , der ermittelte Wert für die APH von Takara betrug 95  $\mu\text{M}$ . 1999 beschrieben Raphel *et al.* die Reinigung der APH aus dem Dünndarm des Schweins. Der kalkulierte  $K_m$ -Wert aus den kinetischen Messungen der Hydrolyse von Ac-Ala-pNA lag bei 180  $\mu\text{M}$  und ist damit auch vergleichbar mit dem  $K_m$ -Wert für die rekombinante humane APH. Die ermittelten Daten entsprechen ebenfalls den  $K_m$  - Werten der APH für Ac-Ala-Substrate aus Rattenleber (Kobayashi *et al.* 1989) und humanen Erythrozyten (Jones *et al.* 1991). Die Spezifitätskonstante ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) der in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten APH beträgt  $160 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , bei der APH von Takara wurde ein deutlich niedrigerer Wert von  $23,16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ermittelt. Die Ursache dieser Diskrepanz und Verringerung der katalytischen Aktivität der kommerziell erhältlichen APH ist vermutlich auf einmaliges Einfrieren der Probe zurückzuführen.

Die Expression und Reinigung der humanen rekombinanten APH konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden und das Enzym wurde für weitere Untersuchungen, wie die mögliche Spaltung von A $\beta$ -Peptiden, eingesetzt.

## 4.2 Rekombinante Expression der A $\beta$ -Peptide

Besonders in der Alzheimer Forschung und der damit verbundenen Untersuchung der Struktur von A $\beta$ -Peptiden bzw. Peptid/Ligand-Verbindungen ergaben NMR Analysen wichtige Erkenntnisse und sind auch für zukünftige Forschungen essentiell. Für diese Studien ist die Verfügbarkeit großer Mengen isotopenmarkierter, reiner Peptide grundlegend. Problematisch bei der synthetischen Festphasen-Synthese von Peptiden sind hohe Kosten des Rohmaterials, insbesondere bei der Herstellung isotopenmarkierter Peptide, sowie teilweise auftretende Unreinheiten oder Inhomogenitäten. Mit zunehmender Kettenlänge des Peptids erhöht sich außerdem die Problematik der Aggregation und das Auftreten von Kettenabbrüchen. Die Reinigung längerer Peptide ist zudem aufwendiger, und es ergeben sich dabei häufig nur geringe Ausbeuten. Die rekombinante Expression in *E.coli* bietet eine kostengünstige Alternative zur Festphasen-Synthese. Die prokaryotische Expression und Reinigung von amyloidogenen Peptiden wie A $\beta$  hat sich aber aufgrund ihrer geringen Größe, ihrer Aggregationstendenz und der Toxizität der gebildeten Aggregate als kompliziert erwiesen. Ein weiteres Problem stellt die geringe Löslichkeit der Peptide dar, sowie ihre Anfälligkeit gegenüber dem Abbau durch Peptidasen. Durch die Verbindung mit einem Fusionspartner kann die Löslichkeit generell erhöht und ein Schutz gegen Proteolyse gewährleistet werden (Sharpe *et al.* 2005). Die Verwendung spezifischer Fusionspartner ermöglicht zudem die vereinfachte Reinigung mittels Affinitätschromatografie.

Die Expression von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 wurde bereits mit verschiedenen Fusionspartnern beschrieben. Dazu gehören unter anderem das Maltose-Bindeprotein (Hortschansky *et al.* 2005), Ubiquitin (Lee *et al.* 2005), GST (Zhang *et al.* 2008) oder das HEL (*Hen egg white lysozyme*) (Nagata-Uchiyama *et al.* 2007). Einige Nachteile der Expression unter Verwendung eines Fusionspartners sind aber beispielsweise die oft notwendige erhöhte Temperatur von 37°C zur Spaltung, sowie zusätzlich verbleibende N-terminale Aminosäuren am Zielpeptid (Macao *et al.* 2008). Bei der Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit gewählten Fusionspartner konnten diese Schwierigkeiten umgangen werden. Durch die Nutzung von SUMO, sowie (NANP)<sub>19</sub> und der damit verbundenen Spaltung durch die ULP1 bzw. die TEV-Protease wird das Peptid in diesem Fall keinen erhöhten Temperaturen ausgesetzt, da die Spaltung bei Raumtemperatur stattfinden kann. Ebenfalls wird nach der Spaltung die native humane A $\beta$ -Form ohne zusätzliche N-terminale Aminosäuren freigesetzt, was einen weiteren Vorteil dieser Fusionspartner darlegt.

Im Gegensatz zur Ubiquitinierung werden Proteine durch die Sumoylierung nicht für eine folgende Degradation gekennzeichnet, sondern SUMO erhöht die Stabilität der Proteine (Müller *et al.* 2001). Bei der Verwendung als Fusionspartner verstärkt es die Expressionsrate des Peptids und erhöht die Löslichkeit. Die Expression und Reinigung der für die Spaltung notwendigen SUMO-Protease ULP1 wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert. Die ULP1

erkennt die SUMO-Tertiärstruktur und spaltet am C-Terminus der konservierten Gly-Gly Sequenz des SUMOs (Mossessoiva and Lima, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Fusionsprotein SUMO-A $\beta$ 40 in *E.coli* exprimiert, sowie nachfolgend gereinigt und der Fusionspartner durch die ULP1-Protease abgespalten werden. Problematisch erwies sich darauffolgend jedoch die weitere Isolation des A $\beta$ -Peptids. So konnte mittels NiNTA-Affinitätschromatographie oder Größenausschlusschromatographie keine Trennung von SUMO und A $\beta$ 40 erreicht werden. Es ist vorstellbar, dass SUMO und A $\beta$  nach der Spaltung Aggregate bilden, die unter nativen Bedingungen nicht zu trennen sind. Es wäre möglich, die Temperatur bei der Spaltung zu erniedrigen, um eine Aggregation zwischen SUMO und A $\beta$  zu verringern. Mit einem vorhergehenden Denaturierungsschritt der Probe durch Zusatz von 6 M Guanidiniumchlorid oder Erhitzen auf 100 °C konnte eine partielle Isolation des A $\beta$ -Peptids erreicht werden, wobei die Ausbeuten sehr gering waren. Auch unter Verwendung der Umkehrphasen-HPLC konnten A $\beta$ -Peptid und der SUMO-Fusionspartner nach der Spaltung aufgrund ähnlicher Retentionszeiten nicht getrennt werden. Mit einer Kombination der zuvor beschriebenen Methoden war eine Isolation des A $\beta$ 40 möglich. Nach dem Denaturieren durch Erhitzen der Probe auf 100 °C und der partiellen Abtrennung mittels NiNTA-Affinitätschromatographie unter Zusatz von 20 mM Imidazol im Auftrags- und Equilibrierungspuffer, erfolgte im finalen Schritt die Isolation von A $\beta$ 40 mittels HPLC. Die Ausbeuten blieben jedoch gering und problematisch erwies sich ebenfalls das Auftreten verkürzter A $\beta$ -Peptide (Abbildung 3-10 C). Laut Kalkulation mit dem Programm GPMW handelte es sich hierbei um das Fragment A $\beta$ 34. Auch unter Verwendung eines anderen Expressionsvektors, dem pET41a mit zusätzlichem GST-tag wurde das verkürzte A $\beta$ -Fragment detektiert.

Eine Verunreinigung durch die rekombinant exprimierte ULP1, die zur C-terminalen Degradation des A $\beta$ -Peptids führt, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da auch bei der Spaltung mit kommerziell erhältlicher ULP1 das verkürzte A $\beta$ -Konstrukt auftrat. Wurde synthetisch hergestelltes A $\beta$  mit rekombinanter oder gekaufter ULP1 versetzt, fand keine Degradation statt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das C-terminal verkürzte A $\beta$ -Fragment durch eine alternative Spaltung der ULP1 hervorgerufen wird. Möglicherweise ist die Tertiärstruktur des SUMO-A $\beta$ -Fusionsproteins besser angreifbar für die Protease, als das synthetisch hergestellte A $\beta$ -Peptid ohne Fusionspartner. Das Auftreten der verkürzten A $\beta$ -Fragmente könnte ebenfalls in der Expression in *E.coli* Zellen begründet sein. Es ist denkbar, dass es teilweise zu verfrühten Translationsabbrüchen während der Expression kommt, oder das Fusionsprotein in seiner Struktur in der Zelle partiell instabiler und der C-Terminus angreifbarer für Proteasen ist. Da im Rahmen dieser Arbeit bei der Verwendung des SUMO-A $\beta$  Abbauprodukte entstanden und die Ausbeute gering blieb, wurde der Fusionspartner geändert, um sicher zu gehen, dass intakte A $\beta$ -Peptide für die kommenden

Versuche zur Verfügung stehen. Die Expression in *E.coli* mit dem Fusionspeptid (NANP)<sub>19</sub> wurde in Anlehnung an die Publikation von Finder *et al.* (2010) durchgeführt, in der die Herstellung von rekombinantem A $\beta$ 42 beschrieben ist. Die Expression und Reinigung der zur Spaltung benötigten TEV-Protease wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert, wodurch die Kosten zur Produktion von rekombinanten A $\beta$ -Peptiden weiter minimiert werden können. Durch Verwendung dieses Fusionspartners konnten alle in der Arbeit verwendeten A $\beta$ -Peptide exprimiert und gereinigt werden. Obwohl das Aspartat bei A $\beta$ 40/42, sowie das Glutamin im Fall der verkürzten A $\beta$ -Peptide Q3-A $\beta$ 40/42 nicht die optimalen Aminosäuren in P1'-Position zur Spaltung durch die TEV-Protease darstellen (Kapust *et al.* 2002), erfolgte die korrekte Freisetzung der A $\beta$ -Peptide. Die rekombinanten A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 40/42 und Q3-A $\beta$ 40/42 lagen nach dem finalen Reinigungsschritt intakt und stabil vor. Da die katalytische Aktivität der QC für Glutamin als Substrat mindestens drei Größenordnungen höher als für Glutamat ist, wurde bei Q3-A $\beta$ 40/42 Glutamin statt Glutamat eingesetzt (Seifert *et al.* 2009). Durch die Zugabe rekombinanter muriner QC während der Spaltung war es unter Verwendung dieses Expressionssystems möglich, kosteneffektiv qualitativ hochwertige Pyroglutamat-modifizierte A $\beta$ -Peptide herzustellen, die wegen ihrer erhöhten Neurotoxizität, Stabilität und Aggregationsneigung ein potentiell Ziel zur Wirkstoffentwicklung zur Behandlung der Alzheimer Krankheit darstellen (Harigaya *et al.* 2000, Saido 1998, He *et al.* 1999, Russo *et al.* 2002). Durch Verwendung der QC konnte die vollständige Zyklisierung (99,5 %) von Glutamin zu Pyroglutamat gewährleistet werden und wurde mittels Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit LC/MS bestätigt. 15 mg gereinigtes pE3-A $\beta$ 40 wurden aus 100 mg Fusionsprotein gewonnen. Bezogen auf die Menge von 1 L *E.coli* Schüttelkultur sind dies 4 mg A $\beta$ . Auch die rekombinante Expression von A $\beta$ 40, sowie der pathophysiologisch relevanteren Formen A $\beta$ 42 und 3pE-A $\beta$ 42 konnte ebenfalls mit vergleichbaren Ausbeuten in diesem System gewährleistet werden. Ähnliche Mengen beschrieb auch die Arbeitsgruppe um Macao (2008) für die rekombinante Expression von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 unter Verwendung des Affinitätsliganden Z<sub>A $\beta$ 3</sub>, einem aggregationshemmenden Bindeprotein.

Im Rahmen dieser Arbeit war es außerdem möglich, pE3-A $\beta$ 40 uniform isotonenmarkiert (<sup>15</sup>N) zu generieren, was die Grundlage für NMR-Strukturanalysen zur Untersuchung von Pyroglutamat-modifiziertem A $\beta$  darstellte. Aus 100 g Zellmasse einer 1 L *E.coli* Fermentation wurden 120 mg Fusionsprotein und daraus 15 mg pE3-A $\beta$ 40 (<sup>15</sup>N) gewonnen (Abbildung 3-16).

Dammers *et al.* (2015) nutzen ebenfalls dieses Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter pE-modifizierter A $\beta$ -Peptide. Die Ausbeute war ähnlich, aus 100 mg Fusionsprotein wurden 20 mg 3pE-A $\beta$ 40 erhalten. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit beschrieben Dammers *et al.* bei der Herstellung von 3pE-A $\beta$  die nicht-enzymatische

Zyklisierung des Glutamins zu Pyroglutamat unter schwach sauren Bedingungen in Acetat-Puffer bei pH 3,5 und einer Temperatur von 45 °C in einem Zeitraum von 24 h. In *In vitro*-Untersuchungen der spontanen und QC-katalysierten pGlu-Bildung aus Glutamin wurde jedoch gezeigt, dass die enzymkatalysierte Reaktion um 2-3 Größenordnungen schneller abläuft. Das im Rahmen dieser Promotion entwickelte enzymatische Verfahren unter Verwendung der QC ist jedoch vorteilhaft, da in diesem Fall eine schnellere und vollständige Zyklisierung gewährleistet ist und die A $\beta$ -Peptide keinen erhöhten Temperaturen ausgesetzt sind, die zur Aggregation führen könnten.

### 4.3 APH als A $\beta$ -spaltendes Enzym

#### 4.3.1 Spaltung von A $\beta$ -Peptiden durch APH

Bei einer Alzheimer Erkrankung ist der Gehalt an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 im Gehirn sehr viel höher als in der Peripherie (9.7 ng/ml im AD CSF vs. 0.14 ng/ml im Plasma für A $\beta$ 40, sowie 0.61 ng/ml im AD CSF vs. 0.009 ng/ml im Plasma für A $\beta$ 42; Mehta *et al.* 2001). Diese 70-fache Differenz reflektiert die Balance zwischen A $\beta$ -Produktion und A $\beta$ -Eliminierung im Gehirn verglichen mit der Peripherie (Yamin *et al.* 2007). Die Anreicherung von A $\beta$ -Peptiden im Gehirn kann durch verschiedene Mechanismen verhindert oder reduziert werden, die in drei Hauptgruppen unterteilt werden. Dazu gehört zum einen die direkte Rezeptor-vermittelte Absorption von A $\beta$  in das Blut beispielsweise über den ApoE-Rezeptor oder LRP-1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) (Weller *et al.* 2008). Ein weiterer Mechanismus ist die perivaskuläre Drainage von A $\beta$  mit anderen gelösten Stoffen und Interstitieller Flüssigkeit entlang der Kapillaren und Arterienwände (Weller *et al.* 1998, Preston *et al.* 2003). Dies geschieht zwar etwa sechsmal langsamer als bei der Rezeptor-vermittelten Absorption ins Blut über LRP, jedoch scheint die perivaskuläre Drainage beispielsweise einen geblockten oder defekten LRP-Mechanismus kompensieren zu können (Shibata *et al.* 2000). Eine weitere Möglichkeit, um die Akkumulierung von A $\beta$ -Oligomeren im Gehirn zu reduzieren, ist die Steigerung der Aktivität von A $\beta$ -spaltenden Enzymen. Besonders Neprilysin und IDE (*Insulin Degrading Enzyme*) zeigten *in vitro* und *in vivo* eine effektive Reduktion des A $\beta$ -Gehalts in Maus Gehirnen (Iwata *et al.* 2000, Vekrellis *et al.* 2000). Diese Proteasen sind jedoch nicht A $\beta$ -spezifisch. IDE reguliert zusätzlich Insulin und  $\beta$ -Endorphin, während Neprilysin verschiedene physiologische Peptide wie Substanz P, Bradykinin, Oxytocin, Leu- und Met-Enkephaline und Neurotensin spaltet (Bernstein *et al.* 2008, Sumitomo *et al.* 2005). Wegen der pleiotropen Effekte dieser Enzyme müssen IDE- und Neprilysin-Aktivatoren zur Behandlung der Alzheimer Erkrankung sehr potent und selektiv funktionieren, und zwar in der Form, dass die A $\beta$ -spaltende Aktivität erhöht wird, während die

Aktivität gegenüber anderen physiologischen Substraten nur minimal beeinflusst wird (Song *et al.* 2003, Song and Hersh 2005).

Durch die von Yamin *et al.* 2007 erstmalig postulierte A $\beta$ -spaltende Aktivität der APH stellte dieses Enzym ein mögliches neues Zielenzym für die Wirkstoffentwicklung zur Behandlung der Alzheimer Erkrankung dar. Würde A $\beta$  dabei ein spezifischeres Substrat für die APH darstellen als für IDE oder Neprilysin, könnte die Aktivierung der APH zu weniger Nebenwirkungen führen als die Aktivierung von IDE oder Neprilysin, die wie eingangs erwähnt ebenfalls Insulin oder verschiedene Neuropeptide degradieren (Yamin *et al.* 2007). Die Erkenntnis, dass die APH neben der enzymatischen Aktivität gegenüber dem acetylierten N-Terminus eines Peptids ebenfalls oxidierte Peptide mit einer Länge von 20-50 Aminosäuren degradieren kann (Fujino *et al.* 2000a, 2000b; Shimizu *et al.* 2003, 2004), würde einhergehen mit ihrer potentiellen Rolle in der A $\beta$ -Degradation, da das Methionin an Position 35 der A $\beta$ (1-x)-Peptide oxidiert ist (Varadarajan *et al.* 2001, Schöneich 2005). Weiterhin konnte bei bakterieller APH (*Pyrococcus horikoshii*) eine Endopeptidase Aktivität nachgewiesen werden (Szeltner *et al.* 2009), weshalb man davon ausging, dass diese auch bei der humanen APH nicht auszuschließen ist.

Die APH wurde von Yamin und Kollegen aus dem serumfreien konditionierten Medium der humanen Neuroblastoma Zelllinie SK-N-MC gewonnen und gereinigt. Für die Spaltungsuntersuchungen wurde das Tyrosin an Position 10 des A $\beta$ 40 Peptids radioaktiv markiert (iodiert) ([<sup>125</sup>I]-A $\beta$ 40) und über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden bei 37 °C mit den gereinigten APH Fraktionen inkubiert. Anschließend analysierten Yamin *et al.* die Ansätze mittels 4-12%iger Gradientengele und anschließender Autoradiographie, um die radioaktive Markierung zu visualisieren. Die radioaktive Markierung verschwand nach der Inkubation mit den Fraktionen der APH-Reinigung, weswegen man davon ausging, dass ein Abbau des A $\beta$ -Peptids stattgefunden hat. Da die radioaktive Markierung das Tyrosin an Position 10 betraf, schlussfolgerten Yamin und Kollegen, dass die Spaltung nach dieser Position auftrat. Unter Verwendung des APH-spezifischen Inhibitors Acetyl-Leucin-Chloromethylketon (Ac-Leu-CMK) fand keine Spaltung des A $\beta$ s statt.

2009 publizierten Yamin *et al.* erneut die A $\beta$ -Spaltung durch die APH und identifizierten die Positionen 13, 14 und 19 als Spaltungsstellen. Die Degradation erfolgte bei monomeren und oligomeren A $\beta$ -Peptiden. Die Detektion erfolgte mittels ESI-FTICR Massenspektrometrie nach einer Inkubation mit gereinigter APH für 5 Stunden bei 37°C im Wasserbad. Für die Untersuchungen wurde synthetisch hergestelltes A $\beta$ 40 (Bachem) benutzt. Nach 5 Stunden erfolgte die Detektion, nach 8 und 24 Stunden waren die Ergebnisse nicht mehr damit vergleichbar und man ging davon aus, dass ein Teil der A $\beta$ -Peptide zum Beispiel an den Wänden der Reaktionsgefäße haftete.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimierten und gereinigten APH aus *E.coli* wurden aufgrund der von Yamin *et al.* publizierten enzymatischen Degradation von A $\beta$  ebenfalls Spaltungsuntersuchungen durchgeführt. Zum Vergleich wurde außerdem kommerziell erhältliche APH (Takara) verwendet. Weiterhin wurden synthetisch und rekombinant generierte A $\beta$ -Peptide untersucht. Um ein mögliches Haften der Peptide an den Wänden der Reaktionsgefäße zu unterbinden, wurden *Low Binding Tubes* (Eppendorf) benutzt. Die Reaktionsbedingungen wurden vergleichbar zu Yamin und Kollegen durchgeführt. Die A $\beta$ -Peptide wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer Konzentration von 20  $\mu$ M eingesetzt und die APH im molaren Verhältnis von 1:10 (2  $\mu$ M im Ansatz), sowie 1:100 zugegeben. Die mögliche Spaltung wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels MALDI-TOF-Analyse untersucht. Jedoch konnten die Daten von Yamin und Kollegen nicht reproduziert werden, da zu keinem Zeitpunkt eine Spaltung der A $\beta$ -Peptide detektiert wurde. Es erfolgte ebenfalls eine Untersuchung mittels SDS-Tricin-Gelen, wobei auch kein Abbau sichtbar war. Die Bandenstärke blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Es konnte auch kein Unterschied zwischen synthetischen und rekombinanten Peptiden festgestellt werden. Die *in vitro* A $\beta$ -Spaltung durch die APH wurde bis zum heutigen Zeitpunkt ebenfalls von keiner weiteren Arbeitsgruppe publiziert. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte mit den verwendeten Methoden keine Spaltung der A $\beta$ -Peptide durch die APH detektiert werden.

#### 4.3.2 APH Expression in der Alzheimer Erkrankung

Um weiterhin einen möglichen Einfluss der APH auf A $\beta$  *in vivo* zu untersuchen, sollten die Expressionslevel der APH in Gehirngewebe von Alzheimer Patienten überprüft werden. Es wurden in einem ersten Schritt qPCR Experimente durchgeführt, um eine generelle Aussage über die relative Expression der APH in verschiedenen humanen Geweben zu erhalten. Dabei zeigte sich eine ubiquitäre Verbreitung der APH (Abbildung 3-19 A), die auch in der Literatur beschrieben wurde (Fujino *et al.* 2000). Eine Erhöhung der relativen Expression wurde im Gewebe des Skelettmuskels, sowie der Leber detektiert.

Nachfolgend wurden qPCR Experimente an Gehirngewebe von Alzheimer Patienten sowie gesunden Kontroll-Probanden durchgeführt. Verschiedene Bereiche des Gehirns sind bei einer Alzheimer-Erkrankung betroffen, unter anderem der Temporal- und Frontallappen, die je nach Krankheitsstadium erhöhte Mengen an A $\beta$ -Peptiden und Plaques aufweisen (Fein *et al.* 2008, Rowe *et al.* 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die APH Expression im Temporallappen von 12 AD-Patienten und 12 Kontroll-Probanden untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der APH Expression bei einer Alzheimer Erkrankung gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3-19 B). Diese signifikante Reduktion der internen APH bei einer Alzheimer Erkrankung legt nahe, dass die APH einen indirekten Einfluss auf die Homöostase der A $\beta$ -

Peptide hat. Es ist möglich, dass durch die verringerten APH-Mengen weniger A $\beta$ -Peptid abgebaut werden kann, was zur Akkumulierung und Plaquebildung führt. Können diese Daten bestätigt werden, wäre die APH möglicherweise auch im Plasma oder CSF ein potentieller Marker für eine frühzeitige Alzheimer Diagnose.

Yamin *et al.* beschrieben 2007 ebenfalls, dass die APH-Menge im Gehirngewebe (Frontallappen) bei Patienten mit einer Alzheimer Erkrankung im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Kontroll-Probanden erniedrigt ist. Yamin *et al.* verglichen ihre Ergebnisse mit früheren Daten (Yasojima *et al.* 2001; Cook *et al.* 2003), bei denen gezeigt wurde, dass auch die A $\beta$ -spaltenden Enzyme IDE und Nephilysin bei einer Alzheimer Erkrankung geringere Expressionslevel aufwiesen.

2009 veröffentlichten Yamin *et al.* erneut Daten hinsichtlich der APH-Menge im menschlichen Gehirngewebe, die den Daten von 2007 und den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen kontrovers gegenüberstehen. Die Untersuchung erfolgte hinsichtlich einer möglichen Korrelation zwischen APH-Expression und dem Plaque-Gehalt im Gehirngewebe bei einer Alzheimer Erkrankung. Dabei wurden 12 AD-Gehirnproben und 9 Proben gesunder Probanden verglichen. Die APH Expression wurde pro Probe in jeweils 3 Bereichen des Gehirngewebes bestimmt: im Cerebellum, welches bei einer Alzheimer Erkrankung generell wenig Plaques aufweist, und im Temporal- und Frontallappen, die bei der Krankheit eine erhöhte Menge an A $\beta$ -Peptid und Plaques enthalten (Fein *et al.* 2008, Rowe *et al.* 2008). Im Cerebellum zeigte die relative APH Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den AD-Proben und den Kontrollen. Das gleiche Ergebnis wurde für Proben des Frontallappens erhalten. Dieses Ergebnis widerspricht damit den Daten von 2007, bei denen eine signifikante Verringerung der APH Expression bei einer Alzheimer Erkrankung gegenüber der Kontrolle festgestellt wurde. Diese Diskrepanz wird von der Arbeitsgruppe so erklärt, dass bei der früheren Publikation weniger Proben verwendet wurden (6 AD und 6 Kontrollen). Bei Proben des Temporallappens wurde in der Publikation von 2009 eine signifikante Erhöhung der relativen APH Expression bei AD gegenüber der Kontrolle dargestellt, was den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten kontrovers gegenübersteht. Yamin *et al.* nehmen an, dass die erhöhten APH-Spiegel als Antwort auf gesteigerte A $\beta$ -Mengen und Plaques entstehen. Da die APH Expression nur im Temporallappen und nicht im Frontallappen erhöht ist, obwohl beide Bereiche hohe Mengen an Plaques aufweisen, vermutet die Arbeitsgruppe, dass die APH Level stärker mit den Mengen an löslichen A $\beta$  Monomeren und Oligomeren korrelieren statt mit der Anzahl der Plaques. Yamin und Kollegen postulieren ebenfalls, dass die erhöhten APH-Level auf deren Überexpression in Microglia Zellen und Astrocyten zurückzuführen sind, die bei einer Alzheimer Erkrankung aktiviert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit und in den Publikationen von Yamin *et al.* erhaltenen Daten sind kontrovers und lassen sich schwer vereinbaren. Es wäre beispielsweise möglich, dass sich die APH Expressionslevel während des Fortschreitens der AD Erkrankung verändern, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären würde. Weitere Untersuchungen und größere Probenzahlen sind notwendig, um einen möglichen Einfluss der APH auf die A $\beta$ -Homöostase zu bestätigen und aufzuklären. Man kann nicht ausschließen, dass APH einen Einfluss auf A $\beta$  hat, jedoch sind hier möglicherweise die *in vivo* und *in vitro* Daten nicht miteinander vergleichbar.

#### 4.3.3 Einfluss der APH auf APP in HEK293 Zellen

Eine Spaltung der A $\beta$ -Peptide war in dieser Arbeit *in vitro* nicht nachweisbar, jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion der internen APH im Temporallappen bei Patienten mit einer Alzheimer Erkrankung im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Kontroll-Probanden. Ein zusätzlicher Ansatzpunkt, um den Einfluss der APH auf A $\beta$  zu untersuchen, war die transiente Co-Expression der APH mit verschiedenen Amyloid-Vorläufer Proteinen (APP Varianten) im eukaryotischen Zellkultursystem unter Verwendung von HEK293-Zellen. Obwohl sie von Primärkulturen humaner embryonaler Nierenzellen abstammen, zeigen HEK293 Zellen Eigenschaften einer neuronalen Linie (Shaw *et al.* 2002, Gordon *et al.* 2013). Auch in früheren Arbeiten wurde diese Zelllinie zur Expression von APP genutzt (Cynis *et al.* 2006, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression verschiedener APP-Varianten zu signifikanten Anstiegen in der Konzentration von A $\beta$ (x-40) und A $\beta$ (x-42) führt, wodurch diese Zelllinie ein geeignetes System zur Co-Expression der APP-Varianten mit APH darstellt.

Neben der Wildtyp-APP-Form wurde die Schwedische Variante verwendet, die durch eine Punktmutation in der  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle ein besseres Substrat für die Sekretase darstellt und zu einer vermehrten Freisetzung von A $\beta$ -Peptiden führt (Selkoe, 2001). Ebenfalls wurde die am N-Terminus um zwei Aminosäuren verkürzte N3Q Variante benutzt, die durch die zusätzliche Punktmutation von Glutamat zu Glutamin eine verstärkte Bildung von Pyroglutamat-A $\beta$  (pE3-A $\beta$ 40/42) zur Folge hat.

Zur Detektion und Quantifizierung der freigesetzten A $\beta$  Peptide wurde ein ELISA mit spezifischen A $\beta$ -Antikörpern durchgeführt. Der verwendete Primär-Antikörper 4G8 detektiert die Aminosäuren 17-24 und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper 6E10 die Aminosäuren 1-17 der Sequenz des humanen A $\beta$ -Peptids. Da die von Yamin *et al.* 2009 mittels FTICR-MS detektierte Spaltung der A $\beta$ -Peptide an den Positionen 13, 14 und 19 stattfindet, würde man unter Verwendung der beschriebenen Antikörper generell eine geringere nachweisbare A $\beta$ -Menge bei einer Co-Transfektion der APP-Varianten mit der APH erwarten.

Bei der APP-Expression ohne APH zeigt, wie erwartet, die schwedische Mutante die höchste A $\beta$ -Menge, die verkürzte Form mit N-terminalen Glutaminrest weist ebenfalls eine leichte Erhöhung im Vergleich zur WT-Variante auf. Bei der Co-Transfektion der APP-Konstrukte mit APH ist die nachweisbare A $\beta$ -Menge tendenziell vergleichbar mit der Transfektion der APP-Konstrukte ohne APH, generell zeigt sich jedoch sogar eine leichte Erhöhung der A $\beta$ -Menge (Abbildung 3-20).

Eine Reduktion der A $\beta$ -Menge durch die APH konnte in diesem Versuch somit nicht nachgewiesen werden. Damit stehen diese Ergebnisse den Daten von Yamin *et al.* (2009) kontrovers gegenüber. Sie beschrieben die Überexpression von APH in 7PA2-Zellen. Diese stabile CHO Zelllinie exprimiert die APP Variante APP<sub>751</sub>, welche die familiäre Mutation V717F aufweist, die zu einer generellen Erhöhung des A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> Verhältnisses und der damit verbundenen verstärkten Bildung von oligomeren A $\beta$ -Formen im konditionierten Medium führt (Tamoaka *et al.* 1994, Klyubin *et al.* 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ELISA zur Quantifizierung der A $\beta$ -Mengen verwendet, Yamin und Kollegen benutzten Immunopräzipitation unter Verwendung der gleichen A $\beta$ -spezifischen Antikörper (4G8 und 6E10). Die Pellets wurden mittels 10-20%igem Tris-Tricine Gel untersucht und anschließend *Western Blot* Analysen mit 6E10 Antikörper durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass durch die APH-Transfektion der Gehalt an A $\beta$ -Peptiden im konditionierten Medium der 7PA2 Zellen deutlich abnahm.

Ein Einfluss der APH auf die Sekretion von A $\beta$  in der Zellkultur konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es wäre möglich, die Überexpression von APH und A $\beta$  in einer anderen Zelllinie zu untersuchen, ebenfalls müsste die Probenanzahl für eine sichere Statistik erhöht werden. Um eine Positivkontrolle einzuführen, könnte man diesen Versuch zusätzlich mit A $\beta$ -spaltenden Enzymen wie Nephilysin durchführen. Als Negativkontrolle wäre die Verwendung eines APH-Inhibitors während der Co-Transfektion sinnvoll.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine direkte Beeinflussung der A $\beta$ -Konzentration durch die APH im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, ein indirekter Einfluss jedoch nicht auszuschließen ist.

#### **4.4 Vergleichende Untersuchungen von synthetisch und rekombinant hergestellten A $\beta$ -Peptiden: Aggregationsuntersuchungen und Elektronenmikroskopie**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Analyse von rekombinant und synthetisch hergestellten A $\beta$ -Peptiden. Bei der Untersuchung des Aggregationsverhaltens von A $\beta$ <sub>42</sub> mittels Thioflavin-T-Tests zeigten synthetisches und rekombinantes Peptid den charakteristischen sigmoidalen Kurvenverlauf bestehend aus einer *Lag*-Phase, einer Elongationsphase und einer stationären Phase. Es konnte gezeigt werden, dass

rekombinantes A $\beta$ 42 schneller als synthetisches A $\beta$ 42 aggregiert, sichtbar in der stärker ansteigenden Fluoreszenz. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls von Finder *et al.* (2010) beobachtet. Es ist möglich, dass geringe Verunreinigungen, die bei der chemischen Synthese von A $\beta$ -Peptiden nicht verhindert werden können, wie z.B. die Bildung von Racematen, zur verlangsamten Ausbildung der Fibrillenstruktur führen können. Die Morphologie der Fibrillen wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Bei synthetischem und rekombinantem A $\beta$ 42 waren Fibrillenstrukturen sichtbar, jedoch zeigte rekombinantes A $\beta$ 42 eine höhere Anzahl an Fibrillen, sowie eine homogenere Morphologie und weniger Verzweigungen als synthetisches A $\beta$ 42. Generell erschienen die synthetischen A $\beta$ 42 Fibrillen ungeordneter und mit mehreren Bruchstücken. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen von Finder *et al.* (2010) überein. Die Arbeitsgruppe beschrieb für das rekombinante A $\beta$ 42 zudem eine stärkere Neurotoxizität. Diese wurde sowohl bei *in vitro* Untersuchungen an Primärkulturen kortikaler Neuronen der Ratte gezeigt, als auch bei *in vivo* Experimenten an P301L Tau transgenen Mäusen. Das Injizieren von rekombinantem A $\beta$ 42 in die Hirnstrukturen führte verglichen mit synthetischem A $\beta$ 42 zu einer verstärkten Tau-Phosphorylierung und erhöhten Aggregation zu neurofibrillären Bündeln. Die verstärkte Toxizität könnte in diesem Fall auf die gesteigerte Menge uniformer Oligomere zurückzuführen sein. Das rekombinante A $\beta$ 42 kann sich somit als vorteilhafter bei der Medikamentenentwicklung erweisen, beispielsweise beim Überprüfen von Wirkstoffen, die die Polymerisierung inhibieren oder bei Antikörpern, die gegen definierte Epitope von  $\beta$ -Amyloid-Fibrillen gerichtet sind.

Rekombinantes und synthetisches A $\beta$ 40 zeigten bei eingesetzten Konzentrationen von 10 und 20  $\mu$ M in einem Zeitraum von 250 h keine Aggregation und Fibrillenbildung. Möglicherweise wäre in diesem Fall eine längere Inkubationszeit oder höhere Peptidkonzentration von Vorteil gewesen. Schlenzig *et al.* (2012) zeigten die Aggregation und Fibrillenbildung von A $\beta$ 40, und beschrieben eine lange Lag-Phase von 150-200 h. Das Maximum der Fluoreszenz wurde nach 250 Stunden erreicht. Die Konzentration der Peptide von 25  $\mu$ M war in diesem Fall etwas höher.

Die beobachtete stärkere Aggregation von A $\beta$ 42 im Vergleich zu A $\beta$ 40 kann durch die zwei zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus erklärt werden, die eine erhöhte Aggregationsneigung und Neurotoxizität zur Folge haben, weswegen A $\beta$ 42 als die stärker amyloidogene Spezies angesehen wird (Schilling *et al.* 2006, Jarrett *et al.* 1993).

Unter Bedingungen, bei denen A $\beta$ 40 nicht aggregierte, zeigt pE3-A $\beta$ 40 die Bildung von Fibrillen, wobei kein Unterschied zwischen synthetischem und rekombinantem A $\beta$  besteht. Die stärkere Aggregation von pE3-A $\beta$ 40 bestätigt die Literaturdaten. Durch die pE-Modifikation kommt es zur schlechteren Löslichkeit im physiologischen pH Bereich und

verstärkten Hydrophobizität und damit verbundenen zu einer stärkeren Aggregation (Schlenzig *et al.* 2009), welche die Toxizität der Peptide erhöht (Pike *et al.* 1995, He *et al.* 1999, Schilling *et al.* 2006, Russo *et al.* 2002). Die N-terminale Verkürzung führt zu einer verstärkten Fibrillenbildung, die durch den pE-Lactam-Ring zusätzlich erhöht wird (Wulff *et al.* 2015). Es wird ebenfalls vermutet, dass die stärkere Aggregationsneigung der pE-Peptide auf Interaktionen der hydrophoben N-Termini zurückzuführen ist. Es ist nicht auszuschließen, dass diese nicht nur die interfibrillären Interaktionen beeinflussen, sondern auch hydrophobe Interaktionen mit zellulären Proteinen, Membranen oder anderen Oberflächen hervorrufen und damit die Toxizität dieser Peptide bedingt (Schlenzig *et al.* 2009).

Die Aggregation von synthetischem und rekombinantem pE3-A $\beta$ 42 zeigt einen biphasischen Verlauf. Die aus pE3-A $\beta$ 42 gebildeten Fibrillen sind kürzer und treten gebündelter auf als A $\beta$ 42-Fibrillen, was mit den Literaturdaten übereinstimmt (Schlenzig *et al.* 2012, Wulff *et al.* 2015). Es wird vermutet, dass die N-terminale pE-Modifikation zu einer verstärkten Oligomeren-Bildung führt und damit Oligomer-induzierte neurophysiologische Schäden hervorruft (Schlenzig *et al.* 2012). Es wurde gezeigt, dass selbst sub-mikromolare Konzentrationen von A $\beta$ -Oligomeren bereits schädliche Wirkungen auf Gehirnzellen haben, unter anderem die Beeinträchtigung der synaptischen Funktion (Rönicke *et al.* 2010), weswegen das Vorhandensein von A $\beta$ -Oligomeren eher mit der Entwicklung einer Alzheimer Erkrankung in Zusammenhang gebracht wird, als die Gesamtmenge an A $\beta$ -Peptiden (Shankar *et al.* 2008).

Um die generelle Verwendbarkeit der rekombinanten Peptide in biologischen Testsystemen zu gewährleisten, wurde das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte A $\beta$ 42 zusätzlich im BrdU Zell-Proliferationsassay in primären kortikalen Neuronen eingesetzt. Dabei wies oligomerisiertes rekombinantes A $\beta$ 42 die gleiche Wirkung wie synthetisches A $\beta$ 42 auf (Abbildung 3-24). Die Replikation genomischer DNA post-mitotischer Neuronen wurde induziert und der ektopischen Wiedereintritt der Neuronen in den Zellzyklus hervorgerufen. Somit konnte verdeutlicht werden, dass das rekombinant hergestellte A $\beta$  die Qualität und Reinheit zur Verwendung in biologischen Assays erfüllt.

#### **4.5 Untersuchung des Einflusses der pE-Modifikation auf die fibrilläre Peptidkonformation von A $\beta$ mittels NMR-Spektroskopie**

NMR-Strukturuntersuchungen zählen zu den wichtigsten Technologien um Struktur und Dynamik biologischer Moleküle auf atomarer Ebene zu untersuchen. Besonders Pyroglutamat-modifizierte A $\beta$ -Isoformen stehen im Fokus der aktuellen Alzheimer Forschung, da sie die Hauptform der N-terminal verkürzten A $\beta$ -Peptide bilden und eine zentrale Rolle im Auslösen der Neurodegeneration und tödlicher neurologischer Schäden

spielen (Wirths *et al.* 2009, Perez-Garmendia *et al.* 2013). Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der pE-A $\beta$ -Formation, -Aggregation und -Struktur kann tiefere Einblicke in die Unterschiede zu unmodifizierten A $\beta$ -Isoformen, sowie die Rolle von Pyroglutamat-modifiziertem A $\beta$  in der Alzheimer Krankheit geben. Mit Hilfe von NMR Strukturanalysen können weitere Kenntnisse über die pE-A $\beta$  Pathogenität erlangt werden, sowie Untersuchungen von Ligandeninteraktionen für Medikamentenentwicklung durchgeführt werden. Es wird vermutet, dass die Zyklisierung zu strukturellen Veränderungen des N-terminalen Bereichs der Peptide führen, welche die Neigung zur Aggregationskeimbildung verstärkt (Wulff *et al.* 2015). Die Qualität und die Quantität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Pyroglutamat-modifizierten <sup>15</sup>N-markierten A $\beta$ -Peptide ermöglichte die Untersuchung mittels NMR Spektroskopie. Bisherige Untersuchungen an der supramolekularen Struktur von A $\beta$ -Aggregaten mittels NMR Analysen mit H/D-Austausch zeigten einen strukturell ungeordneten und für Lösungsmittel zugänglichen N-Terminus der Vollängen-A $\beta$ -Peptide (Balbach *et al.* 2002, Kheterpal *et al.* 2001, Petkova *et al.* 2002). Es wird vermutet, dass durch die Einführung des Pyroglutamatrests dieser ungeordnete Zustand des N-Terminus noch verstärkt wird.

Der Vergleich der Peptide pE3-A $\beta$ 40 und A $\beta$ 40 zeigte eine übereinstimmende fibrilläre Peptidkonformation. Die pE3-A $\beta$ 40 Fibrillen weisen die gleichen vor einem Austausch geschützten Bereiche wie A $\beta$ 40 auf (Garvey *et al.* 2016), die somit Bestandteile der  $\beta$ -Faltblattstrukturen darstellen. Diese Bereiche beinhalten die Positionen 17-25 und 31, 32, 35 und 36. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass der N-terminale Bereich von pE3-A $\beta$ 40 nicht vor einem Austausch geschützt ist, und somit eine ungeordnetere Struktur aufweist. In bisherigen NMR-Untersuchungen wurde den ersten beiden Aminosäuren unmodifizierter A $\beta$ -Peptide eine geordnetere Struktur zugewiesen, die dem N-Terminus eine gewisse Stabilität verleiht (Scheidt *et al.* 2011, 2012). Es wird vermutet, dass die zwei zusätzlichen N-terminalen Reste der unmodifizierten A $\beta$ -Peptide eine Rolle bei der Stabilisierung der Peptide spielen und die Fibrillen vor mechanischem Stress und Fragmentierung schützen. Die hier gezeigte ungeordnetere Struktur des N-Terminus von pE-A $\beta$ 40 bietet zudem eine Erklärung dafür, warum diese Peptide im Vergleich zu unmodifizierten A $\beta$ -Peptiden eher kleinere Aggregate mit teils toxischer Wirkung bilden und die Fibrillen unstrukturierter erscheinen (Schlenzig *et al.* 2012, Wulff *et al.* 2015).

## 5. Zusammenfassung

Die Bildung amyloider Plaques aus akkumulierten A $\beta$ -Peptiden stellt ein wichtiges Merkmal der Alzheimer Demenz dar. Die vorliegende Arbeit untersucht die Fragestellung, inwiefern die Protease APH an der Homöostase der A $\beta$ -Peptide beteiligt ist und somit ein mögliches Target zur Behandlung der Alzheimer Erkrankung darstellt. Um diese Untersuchungen durchzuführen, wurde die Protease APH zunächst rekombinant hergestellt. Die Expression in *E.coli* erzielte die besten Ergebnisse. Durch die Etablierung der Reinigung war anschließend die biochemische Charakterisierung des Enzyms möglich. In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden A $\beta$ -Peptide, die möglicherweise APH-Substrate darstellen, rekombinant hergestellt. Die Expression erfolgte mit dem Fusionspartner (NANP)<sub>19</sub> im *E.coli* Expressionssystem. Es wurden homogene Peptide in hohem Maßstab erzeugt. Zudem konnte die Herstellung N-terminal verkürzter Peptide mit Pyroglutamatrest etabliert werden, die eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Demenz spielen. Die Anwendbarkeit der rekombinanten Peptide in biologischen Testsystemen wurde mittels BrdU Assay unter Verwendung von rekombinantem A $\beta$ 42 nachgewiesen.

Die publizierte *in vitro* Spaltung durch die APH konnte nicht bestätigt werden. Bei einer Überexpression der APH mit APP im Zellkultursystem konnte ebenfalls keine Reduktion der A $\beta$ -Menge durch die APH nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich mittels qPCR Analysen eine signifikant verringerte APH Menge im Temporallappen von Alzheimer Patienten gegenüber den Kontrollprobanden, was einen indirekten Einfluss der APH auf A $\beta$  vermuten lassen könnte. Es ist nicht auszuschließen, dass die *in vivo* und *in vitro* Daten in diesem Fall nicht übereinstimmen.

Des Weiteren wurden vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Aggregation rekombinanter und synthetischer Peptide durchgeführt. Der Thioflavin-T-Test zeigte eine raschere Aggregation des rekombinanten A $\beta$ 42 verglichen mit synthetisch generiertem A $\beta$ 42. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten zudem eine geordnetere Struktur der rekombinanten Fibrillen mit weniger Verzweigungen. Die erhöhte Menge uniformer Oligomere könnte die in der Literatur beschriebene stärkere Toxizität des rekombinanten A $\beta$ 42 erklären. Um abschließend NMR-Analysen zur Untersuchung des Einflusses des pE-Restes auf die Konformation von A $\beta$ -Fibrillen durchzuführen, erfolgte die rekombinante Expression und anschließende Reinigung von <sup>15</sup>N-markiertem pE3-A $\beta$ 40. Im Vergleich zu A $\beta$ 40 war die generelle fibrilläre Peptidkonformation unverändert. Der N-Terminus von pE3-A $\beta$ 40 zeigte eine ungeordnetere Struktur als bei A $\beta$ 40, was eine Erklärung dafür bietet, warum pE-modifizierte Peptide eher kleine und teilweise toxische Aggregate bilden und die Fibrillen unstrukturierter erscheinen.

## 6. Literatur

- Acerio G, Manoutcharian K, Vasilevko V, Munguia ME, Govezensky T, Coronas G, Luz-Madriral A, Cribbs DH, Gevorkian G (2009) Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified Abeta-specific antibodies produced in rabbits. *J Neuroimmunol.* 213: 39-46.
- Arendt T, Brückner MK, Mosch B, Lösche A (2010) Selective cell death of hyperpliod neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 177: 15-20.
- Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK (2011) Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide interacting domain (A $\beta$ ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene.* 488: 13-22.
- Balbach JJ, Petkova AT, Oyster NA, Antzutkin ON, Gordon DJ, Meredith SC, Tycko R (2002) Supramolecular structure in full-length Alzheimer's beta-amyloid fibrils: evidence for a parallel beta-sheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J.* 83: 1205-16.
- Bartlam M, Wang G, Yang H, Gao R, Zhao X, Xie G, Cao S, Feng Y, Rao Z (2004) Crystal structure of an acylpeptide hydrolase/esterase from *Aeropyrum pernix* K1. *Structure.* 12: 1481-8.
- Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM (2006) Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med.* 12: 856-61.
- Bayer TA, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G (1999) It all sticks together-the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 4: 524-8.
- Bayer TA, Wirths O (2008) Alzheimer-Demenz: Molekulare Pathologie, Tiermodelle und Therapiestrategien. *Der Nervenarzt* 79: 117-128.
- Bayer TA, Wirths O (2009): Die modifizierte Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz *Neuroforum* 3/2009: 76-84.
- Bayer TA, Wirths O (2010) Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2: 1-10.
- Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 10: 94-100.
- Bernstein HG1, Lendeckel U, Bukowska A, Ansorge S, Ernst T, Stauch R, Trübner K, Steiner J, Dobrowolny H, Bogerts B (2007) Regional and cellular distribution patterns of insulin-degrading enzyme in the adult human brain and pituitary. *J Chem Neuroanat.* 35: 216-24.
- Bitan G, Fradinger EA, Spring SM, Teplow DB (2005) Neurotoxic protein oligomers--what you see is not always what you get. *Amyloid.* 12: 88-95.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H (2010) Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 6: 131-44.
- Blennow K, Mattsson N, Schöll M, Hansson O, Zetterberg H (2015) Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 36: 297-309.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82: 239-59.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Cabrita LD, Gilis D, Robertson AL, Dehouck Y, Rooman M, Bottomley SP (2007) Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Sci.* 16: 2360–2367.
- Carlesimo GA, Oscar-Berman M (1992) Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychol Rev.* 3: 119-169.
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol.* 165: 1289-1300.
- Ceglia I, Reitz C, Gresack J, Ahn JH, Bustos V, Bleck M, Zhang X, Martin G, Simon SM, Nairn AC, Greengard P, Kim Y (2015) APP intracellular domain-WAVE1 pathway reduces amyloid- $\beta$  production. *Nat Med.* 21: 1054-9.
- Chang WP, Koelsch G, Wong S, Downs D, Da H, Weerasena V, Gordon B, Devasamudram T, Bilcer G, Ghosh AK, Tang J (2004) In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J Neurochem.* 89: 1409-16.
- Clara RO, Soares TS, Torquato RJ, Lima CA, Watanabe RO, Barros NM, Carmona AK, Masuda A, Vaz IS Jr, Tanaka AS (2011) Boophilus microplus cathepsin L-like (BmCL1) cysteine protease: specificity study using a peptide phage display library. *Vet Parasitol.* 181: 291-300.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-3.
- Cynis H, Schilling S, Bodnár M, Hoffmann T, Heiser U, Saido TC, and Demuth HU (2006) Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1764: 1618-25.
- Cynis H, Scheel E, Saido TC, Schilling S, Demuth HU (2008) Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* 47: 7405-13.
- Döbeli H, Draeger N, Huber G, Jakob P, Schmidt D, Seilheimer B, Stüber D, Wipf B, Zulauf M (1995) A biotechnological method provides access to aggregation competent monomeric Alzheimer's 1-42 residue amyloid peptide. *Biotechnology (NY)* 13: 988-93.
- Eckhoff J, Dohmen RJ (2015) In Vitro Studies Reveal a Sequential Mode of Chain Processing by the Yeast SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier)-specific Protease Ulp2. *J Biol Chem.* 290: 12268-81.
- Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet.* 6: 2087-9
- Eckman EA, Reed DK, Eckman CB (2001) Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 276: 24540-8.

- Esler WP, Wolfe MS (2001) A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293: 1449-54
- Fabian H, Szendrei GI, Mantsch HH, Greenberg BD, Otvös L Jr (1994) Synthetic post-translationally modified human A $\beta$  peptide exhibits a markedly increased tendency to form beta-pleated sheets in vitro. *Eur J Biochem FEBS* 221: 959–964.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278: 1349-56.
- Fein JA, Sokolow S, Miller CA, Vinters HV, Yang F, Cole GM, Gyls KH (2008) Co-localization of amyloid beta and tau pathology in Alzheimer's disease synaptosomes. *Am J Pathol.* 172: 1683-92.
- Finder VH, Glockshuber R (2007) Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis.* 4: 13-27
- Finder VH, Vodopivec I, Nitsch RM, Glockshuber R (2010) The recombinant amyloid-beta peptide Abeta1-42 aggregates faster and is more neurotoxic than synthetic Abeta 1-42. *J Mol Biol.* 396: 9-18
- Fischer WH, Spiess J (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3628-32.
- Fonseca MI, Head E, Velazquez P, Cotman CW, Tenner AJ (1999) The presence of isoaspartic acid in  $\beta$ -amyloid plaques indicates plaque age. *Exp Neurol.* 157: 277–288.
- Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF (2010) Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease." *BMC Med.* 8: 89.
- Fujino T, Tada T, Hosaka T, Beppu M, Kikugawa K (2000a) Presence of oxidized protein hydrolase in human cell lines, rat tissues, and human/rat plasma. *J Biochem.* 127: 307-13
- Fujino T, Watanabe K, Beppu M, Kikugawa K, Yasuda H (2000b) Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase. *Biochim Biophys Acta.* 1478: 102-12.
- Fukuda H, Shimizu T, Nakajima M, Mori H, Shirasawa T (1999) Synthesis, aggregation, and neurotoxicity of the Alzheimer's A $\beta$  1-42 amyloid peptide and its isoaspartyl isomers. *Bioorg Med Chem Lett.* 9: 953–956.
- Gade W, Brown JL (1981) Purification, characterization and possible function of alpha-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver. *Biochim Biophys Acta.* 662: 86-93.
- Garvey M, Baumann M, Wulff M, Kumar ST, Markx D, Morgado I, Knüpfer U, Horn U, Mawrin C, Fändrich M, Balbach J (2016) Molecular architecture of A $\beta$  fibrils grown in cerebrospinal fluid solution and in a cell culture model of A $\beta$  plaque formation. *Amyloid.* 23: 76-85.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 23: 175-82.
- Gordon J, Amini S, and White MK (2013) General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol.* 1078: 1–8.

- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol.* 156: 15-20.
- Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T (2013) Neprilysin and A $\beta$  Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease." *Front Aging Neurosci.* 5: 98.
- Güntert A, Dobeli H and Bohrmann B (2006) High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143: 461-475.
- Guzmán F, Barberis S & Illanes A (2007) Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *EJ Biotechnology.* 10: 279-314.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann NY Acad Sci.* 695: 109-16.
- Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 383-8.
- Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M (1998) Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci.* 1: 355-358.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297: 353-6.
- Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, Prada CM, Shoji M, Younkin SG (2000) Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 276: 422-7.
- Hawkes CA, Jayakody N, Johnston DA, Bechmann I, Carare RO (2014) Failure of perivascular drainage of  $\beta$ -amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Brain Pathol.* 24: 396-403.
- He W, Barrow CJ (1999) The Abeta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry.* 38: 10871–10877
- Hepler RW, Grimm KM, Nahas DD, Breese R, Dodson EC, Acton P, Keller PM, Yeager M, Wang H, Shughrue P, Kinney G, Joyce JG (2006) Solution state characterization of amyloid beta-derived diffusible ligands. *Biochemistry.* 45: 15157-67.
- Hersh LB, Rodgers DW (2008) Neprilysin and amyloid beta peptide degradation. *Curr Alzheimer Res.* 5: 225-31.
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 2892-7.
- Hopkins R, Esposito D, and Gillette W (2010) Widening the bottleneck: increasing success in protein expression and purification. *J Struct Biol.* 172: 14–20.
- Horn U, Strittmatter W, Kriebler A, Knüpfer U, Kujau M, Wenderoth R, Müller K, Matzku S, Plückthun A, Riesenberger D (1996) High volumetric yields of functional dimeric mini-antibodies in

- Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl Microbial Biotechnol.* 46: 524-532.
- Hortschansky P, Schroeckh V, Christopheit T, Zandomenighi G, Fändrich M (2005) The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci.* 14: 1753-9.
- Hosoda R, Saido TC, Otvos Jr L, Arai T, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ and Iwatsubo T (1998) Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 1089-1095.
- Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H (2001) Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (Abeta), retards Abeta aggregation, deposition, fibril formation and inhibits cytotoxicity." *J Biol Chem.* 276: 47863-8.
- Huang C, Lin H, Yang X (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39: 383–399.
- Illenberger S, Zheng-Fischhöfer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell.* 9: 1495-512.
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 1739: 198-210.
- Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T (2005) Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng.* 99: 437-47.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition" *Nat Med.* 6: 143-50.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 32: 4693-7.
- Jelicic M, Bonebakker AE, Bonke B (1995) Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review. *Int Psychogeriatr.* 7: 385-392.
- Johnson GD, Jiang W (2005) Characterization of cathepsin L secreted by Sf21 insect cells. *Arch Biochem Biophys.* 444: 7-14.
- Jones WM, Manning JM (1985) Acylpeptide hydrolase activity from erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 126: 933-40.
- Jones WM, Manning LR, Manning JM (1986) Enzymic cleavage of the blocked amino terminal residues of peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 139: 244-50.
- Jones WM, Scalon A, Bossa F, Popowicz AM, Schneewind O, and Manning JM (1991) Genetic relationship between acylpeptide hydrolase and acylase, two hydrolytic enzymes with similar binding but different catalytic specificities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 2194–2198.

- Kapust RB, Tözsér J, Copeland TD, Waugh DS (2002) The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 949-55.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 10: 698-712.
- Kawooya JK, Emmons TL, Gonzalez-DeWhitt PA, Camp MC, D'Andrea SC (2003) Electrophoretic mobility of Alzheimer's amyloid-beta peptides in urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 323: 103-13.
- Kheterpal I, Williams A, Murphy C, Bledsoe B, Wetzel R (2001) Structural features of the Abeta amyloid fibril elucidated by limited proteolysis. *Biochemistry.* 40: 11757-67.
- Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med.* 11: 556-61.
- Kobayashi K, Lin LW, Yeadon JE, Klickstein LB, Smith JA (1989) Cloning and sequence analysis of a rat liver cDNA encoding acyl-peptide hydrolase. *J Biol Chem.* 264: 8892-9.
- Kumar-Singh S, De Jonghe C, Cruts M, Kleinert R, Wang R, Mercken M, De Strooper B, Vanderstichele H, Lofgren A, Vanderhoeven I, Backhovens H, Vanmechelen E, Kroisel PM, Van Broeckhoven C (2000) Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated Abeta(42) in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2589-2598.
- Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods.* 10: 203-9.
- Lee EK, Hwang JH, Shin DY, Kim DI, Yoo YJ (2005) Production of recombinant amyloid-beta peptide 42 as an ubiquitin extension. *Protein Expr Purif.* 40: 183-9.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 24: 1121-59.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D (2002) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 293: 1487-1491.
- Li SJ, Hochstrasser M (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature.* 398: 246-51.
- Linn RT, Wolf PA, Bachman DL, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, Kaplan EF, D'Agostino RB (1995) The 'preclinical phase' of probable Alzheimer's disease. A 13-year prospective study of the Framingham cohort. *Arch Neurol.* 52: 485-490.
- Lucast LJ, Batey RT, Doudna JA (2001) Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. *Biotechniques* 30: 544-550.
- Macao B, Hoyer W, Sandberg A, Brorsson AC, Dobson CM, Härd T (2008) Recombinant amyloid beta-peptide production by coexpression with an affibody ligand. *BMC Biotechnol.* 30: 8:82.
- Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics.* 5: 75-86.

- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 330: 1774.
- Marks N, Lo ES, Stern F, Danho W (1983) Observations on N alpha-deacetylation of model amino acids and peptides: distribution and purification of a specific N-acyl amino acid releasing enzyme in rat brain. *J Neurochem*. 41: 201-8.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 46: 860-866.
- Mehta PD, Pirttila T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP (2001) Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett*. 304: 102-6.
- Mitta M, Asada K, Uchimura Y, Kimizuka F, Kato I, Sakiyama F, Tsunasawa S (1998) The primary structure of porcine liver acylamino acid-releasing enzyme deduced from cDNA sequences. *J Biochem*. 106: 548-51.
- Mitta M, Ohnogi H, Mizutani S, Sakiyama F, Kato I, Tsunasawa S (1996) The nucleotide sequence of human acylamino acid-releasing enzyme. *DNA Res*. 3: 31-5.
- Mossessova E, Lima CD (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell*. (5): 865-76.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51: 263-73.
- Müller S, Hoegge C, Pyrowolakis G, Jentsch S (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 202-10.
- Nagata-Uchiyama M, Yaguchi M, Hirano Y, Ueda T (2007) Expression and purification of uniformly (15)N-labeled amyloid beta peptide 1-40 in Escherichia coli. *Protein Pept Lett*. 14: 788-92.
- Nalivaeva NN, Beckett C, Belyaev ND, Turner AJ (2012) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem*. 120 Suppl 1: 167-85.
- Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengård JH, Salomaa V, Boerwinkle E, Sing CF (2000) Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res*. 10: 1532-45.
- Pearson HA and Peers C (2006) Physiological roles for amyloid  $\beta$  peptides. *J Physiol*. 575: 5–10.
- Perez-Garmendia R, Gevorkian G (2013) Pyroglutamate-Modified Amyloid Beta Peptides: Emerging Targets for Alzheimer's Disease Immunotherapy. *Curr Neuropharmacol*. 11: 491-8.
- Perrier J, Durand A, Giardina T, Puigserver A (2005) Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase. *Biochimie*. 87: 673-85.
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 16742-7.
- Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW (1995) Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem*. 270: 23895-8.
- Polgár L (2002) The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci*. 59: 349-62.

- Preston SD, Steart PV, Wilkinson A, Nicoll JA, Weller RO (2003) Capillary and arterial cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: defining the perivascular route for the elimination of amyloid beta from the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 29: 106-17.
- Puck TT, Cieciora SJ, Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med.* 108: 945-56.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 362: 329-44.
- Raphel V, Giardina T, Guevel L, Perrier J, Dupuis L, Guo XJ, Puigserver A (1999) Cloning, sequencing and further characterization of acylpeptide hydrolase from porcine intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta.* 1432: 371-81.
- Radhakrishna G, Wold F (1989) Purification and characterization of an N-acylaminoacyl-peptide hydrolase from rabbit muscle. *J Biol Chem.* 264: 11076-81.
- Richards PG, Johnson MK, Ray DE (2000) Identification of acylpeptide hydrolase as a sensitive site for reaction with organophosphorus compounds and a potential target for cognitive enhancing drugs. *Mol Pharmacol.* 58: 577-83.
- Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG (2011) Early neuronal dysfunction by amyloid  $\beta$  oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging.* 32: 2219-28.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zürcher-Neely HA, Henrikson RL, Ball MJ (1993) Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 268: 3072-83.
- Rosenblum JS, Kozarich JW (2003) Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 7: 496-504.
- Rowe CC, Ackerman U, Browne W, Mulligan R, Pike KL, O'Keefe G, Tochon-Danguy H, Chan G, Berlangieri SU, Jones G, Dickinson-Rowe KL, Kung HP, Zhang W, Kung MP, Skovronsky D, Dyrks T, Holl G, Krause S, Friebe M, Lehman L, Lindemann S, Dinkelborg LM, Masters CL, Villemagne VL (2008) Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol.* 7: 129-35.
- Russo C, Violani E, Salis S, Venezia V, Dolcini V, Damonte G, Benatti U, D'Arrigo C, Patrone E, Carlo P, und Schettini G (2002) Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides AbetaN3(pE) strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem.* 82: 1480-1489.
- Saido TC, Leissring MA (2012) Proteolytic degradation of amyloid  $\beta$ -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 a006379.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Abeta N3(pE), in senile plaques. *Neuron.* 14: 457-66.
- Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T, Kawashima S (1996) Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci Lett.* 215: 173-6.
- Saido TC (1998) Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol. Aging* 19: 69-75.

- Saitoh H, Pu RT, Dasso M (1997) SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci.* 22: 374-6.
- Scaloni A, Jones WM, Barra D, Pospischil M, Sassa S, Popowicz A, Manning LR, Schneewind O, Manning JM (1992a) Acylpeptide hydrolase: inhibitors and some active site residues of the human enzyme. *J Biol Chem.* 267: 3811-8.
- Scaloni A, Jones W, Pospischil M, Sassa S, Schneewind O, Popowicz AM, Bossa F, Graziano SL, Manning JM (1992b) Deficiency of acylpeptide hydrolase in small-cell lung carcinoma cell lines. *J Lab Clin Med.* 120: 546-52.
- Scaloni A, Barra D, Jones WM, Manning JM (1994) Human acylpeptide hydrolase. Studies on its thiol groups and mechanism of action. *J Biol Chem.* 269: 15076-84.
- Scaloni A, Ingallinella P, Andolfo A, Jones W, Marino G, Manning JM (1999) Structural investigations on human erythrocyte acylpeptide hydrolase by mass spectrometric procedures. *J Protein Chem.* 3: 349-60.
- Scheidt HA, Morgado I, Rothemund S, Huster D, Fändrich M (2011) Solid-state NMR spectroscopic investigation of A $\beta$  protofibrils: implication of a  $\beta$ -sheet remodeling upon maturation into terminal amyloid fibrils. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50: 2837-40.
- Scheidt HA, Morgado I, Rothemund S, Huster D (2012) Dynamics of Amyloid  $\beta$  Fibrils Revealed by Solid-state NMR. *J Biol Chem.* 287: 2017–2021.
- Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, und Demuth HU (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* 563: 191-196.
- Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E and Bohm G (2006) On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45: 12393–12399.
- Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M, Jagla W, Schlenzig D, Lindner C, Rudolph T, Reuter G, Cynis H, Montag D, Demuth HU, Rossner S (2008) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med.* 14: 1106-11.
- Schlenzig D, Manhart S, Cinar Y, Kleinschmidt M, Hause G, Willbold D, Funke SA, Schilling S, Demuth HU (2009) Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides." *Biochemistry.* 48: 7072-8.
- Schlenzig D, Röncke R, Cynis H, Ludwig HH, Scheel E, Reymann K, Saido T, Hause G, Schilling S, and Demuth HU (2012) N-Terminal pyroglutamate formation of A $\beta$ 38 and A $\beta$ 40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem.* 121: 774-84.
- Schönberger OL, Tschesche H (1981) N-Acetylalanine aminopeptidase, a new enzyme from human erythrocytes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 362: 865-73.
- Schöneich C (2005) Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1703: 111-9.
- Seifert F, Schulz K, Koch B, Manhart S, Demuth HU, Schilling S (2009) Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry.* 48: 11831-3.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease: Genes, Proteins and Therapy. *Physiol Rev.* 81: 741-766.
- Selkoe DJ (2001) Clearing the brain's amyloid cobwebs." *Neuron.* 32: 177-80.

- Selkoe DJ (2004) Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* 6: 1054 – 1061.
- Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009) Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid-beta-peptide. *J Neurochem.* 109: 248–256.
- Seward ME, Swanson E, Norambuena A, Reimann A, Cochran JN, Li R, Roberson ED, Bloom GS (2013) Amyloid- $\beta$  signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 126: 1278-86.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 14: 837-42.
- Sharma KK, Ortwerth BJ (1993) Bovine lens acylpeptide hydrolase. Purification and characterization of a tetrameric enzyme resistant to urea denaturation and proteolytic inactivation. *Eur J Biochem.* 216: 631-7.
- Sharpe S, Yau WM, Tycko R (2005) Expression and purification of a recombinant peptide from the Alzheimer's beta-amyloid protein for solid-state NMR. *Protein Expr Purif.* 42: 200-10.
- Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 16: 869-71.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 106: 1489-99.
- Shimizu K, Fujino T, Ando K, Hayakawa M, Yasuda H, Kikugawa K (2003) Overexpression of oxidized protein hydrolase protects COS-7 cells from oxidative stress-induced inhibition of cell growth and survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 304: 766-71.
- Shimizu K, Kiuchi Y, Ando K, Hayakawa M, Kikugawa K (2004) Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 324: 140-6.
- Smith GE, Summers MD, and Fraser MJ (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol.* 3: 2156–2165.
- Sokolik CW, Liang TC, Wold F (1994) Studies on the specificity of acetylaminoacyl-peptide hydrolase. *Protein Sci.* 3: 126-31.
- Song ES, Juliano MA, Juliano L, Hersh LB (2003) Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin) a potential target for drug development. *J Biol Chem.* 278: 49789-94.
- Song ES, Hersh LB (2005) Insulysin: an allosteric enzyme as a target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 25: 201-6.
- Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 115: 113-28.
- Soto C, Castaño EM, Kumar RA, Beavis RC, Frangione B (1995) Fibrillogenesis of synthetic amyloid-beta peptides is dependent on their initial secondary structure. *Neurosci Lett.* 200: 105-8.

- Sumitomo M, Shen R, Nanus DM (2005) Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta*. 1751: 52-9.
- Szeltner Z, Kiss AL, Domokos K, Harmat V, Naray-Szabo G, Polgar L (2009) Characterization of a novel acylaminoacyl peptidase with hexameric structure and endopeptidase activity. *Biochim Biophys Acta*. 1794: 1204-10.
- Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, Usami M, Sahara N, Suzuki N, Nukina N, Mizusawa H, Shoji S, Kanazawa I APP7 (1994) 17 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A $\beta$  1-42/43 and A $\beta$  1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*. 269: 32721-4.
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72: 211-22.
- Tickler AK, Barrow CJ, Wade JD (2001) Improved preparation of amyloid-beta peptides using DBU as Nalpha-Fmoc deprotection reagent. *J Pept Sci*. 7: 488-94.
- Tsunasawa S, Narita K, Ogata K (1975) Purification and properties of acylamino acid-releasing enzyme from rat liver. *J Biochem*. 77: 89-102.
- Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE, Estus S (2000) The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci*. 20: 3937-46.
- Van Nostrand WE, Porter M (1999) Plasmin cleavage of the amyloid beta-protein: alteration of secondary structure and stimulation of tissue plasminogen activator activity. *Biochemistry*. 38: 11570-6.
- Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA (2001) Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A $\beta$ (1-42) and A $\beta$ (25-35). *J Am Chem Soc*. 123: 5625-31.
- Varvel NH, Bhaskar K, Patil AR, Pimplikar SW, Herrup K, Lamb BT (2008) A $\beta$  oligomers induce neuronal cell cycle events in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 28: 10786-93.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 22: 735-41.
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*. 13: 213-7.
- Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci*. 20: 1657-65.
- Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE (1998) Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 153: 725-33.

- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO (2008) Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease." *Brain Pathol.* 18: 253-66.
- Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML, Wood HA (1992) Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog.* 8: 391-6.
- Wilcock GK (2003) Memantine for the treatment of dementia. *Lancet Neurol.* 2: 503-5.
- Wiltfang J, Esselmann H, Cupers P, Neumann M, Kretzschmar H, Beyermann M, Schleuder D, Jahn H, Rütger E, Kornhuber J, Annaert W, De Strooper B, Saftig P (2001) Elevation of beta-amyloid peptide 2–42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J Biol Chem.* 276: 42645–42657.
- Wirh's O, Multhaup G, Bayer TA (2004) A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *J Neurochem.* 91: 513-20. Review
- Wirh's O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth HU and Bayer TA (2009) Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3–42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol.* 118: 487–496.
- Witheiler J, Wilson DB (1972) The purification and characterization of a novel peptidase from sheep red cells. *J Biol Chem.* 247: 2217-21.
- Wolfe MS (2007) When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 8: 136–140.
- Wolfe MS (2008) Gamma-secretase: structure, function, and modulation for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.* 8: 2-8.
- Wu G, Miller RA, Connolly B, Marcus J, Renger J, Savage MJ (2014) Pyroglutamate-modified amyloid- $\beta$  protein demonstrates similar properties in an Alzheimer's disease familial mutant knock-in mouse and Alzheimer's disease brain. *Neurodegener Dis.* 14: 53-66.
- Wulff M, Baumann M, Thümmeler A, Yadav JK, Heinrich L, Knüpfer U, Schlenzig D, Schierhorn A, Rahfeld JU, Horn U, Balbach J, Demuth HU, Fändrich M (2016) Enhanced Fibril Fragmentation of N-Terminally Truncated and Pyroglutamyl-Modified A $\beta$  Peptides. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55: 5081-4.
- Yamin R, Malgeri EG, Sloane JA, McGraw WT, Abraham CR (1999) Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 is necessary for Alzheimer's amyloid-beta peptide degradation. *J Biol Chem.* 274: 18777-84.
- Yamin R, Bagchi S, Hildebrandt R, Scaloni A, Widom RL, Abraham CR (2007) Acyl peptide hydrolase, a serine proteinase isolated from conditioned medium of neuroblastoma cells, degrades the amyloid-beta peptide. *J Neurochem.* 100: 458-67.
- Yamin R, Zhao C, O'Connor PB, McKee AC, Abraham CR (2009) Acyl peptide hydrolase degrades monomeric and oligomeric amyloid-beta peptide. *Mol Neurodegener.* 4: 33.
- Zagorski MG, Yang J, Shao H, Ma K, Zeng H, Hong A (1999) Methodological and chemical factors affecting amyloid beta peptide amyloidogenicity. *Methods Enzymol.* 309: 189-204.

- Zannis VI, Kardassis D, Zannis EE (1993) Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv Hum Genet.* 21: 145-319.
- Zarándi M, Soós K, Fülöp L, Bozsó Z, Datki Z, Tóth GK, Penke B (2007) Synthesis of Abeta[1-42] and its derivatives with improved efficiency. *J Pept Sci.* 13: 94-9.
- Zhang L, Yu H, Song C, Lin X, Chen B, Tan C, Cao G, Wang Z (2009) Expression, purification, and characterization of recombinant human beta-amyloid42 peptide in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 64: 55-62.

## 7. Anhang

### Chemikalien

Produkt	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Acetonitril („gradient grade“)	VWR, Darmstadt
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Heidelberg
Agarose	AGS GmbH, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DMF (Dimethylformamid)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Ducheve, Haarlem, Niederlande
dNTP	Promega, Mannheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HFIP (1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-2-propanol)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Heidelberg
HEPES	Merck, Darmstadt
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
KOH	Roth, Karlsruhe
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Pepton	Difco, Heidelberg
Roti®-Load 1 (4x)	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	VWR, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

## Materialien

Produkt	Hersteller
Amicon Zentrifugal-Filtrationseinheit (10kDa)	Merck Millipore, Darmstadt
(EBA) (Streamline 25 column, Amersham) (Volumen expandiert: 245 ml, volumen gepackt: 100 ml)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Butylsepharose Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Nunc Platten Maxi Sorb	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Mikrotiterplatte (MicroWell™ 96-well-Platte schwarz, Nunc™)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dialyseschlauch (0,0025-0,005 Microns)	Roth, Karlsruhe
HPLC Säule C18 (Luna)	Phenomenex, Aschaffenburg
HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HisSpinTrap-Säulchen GE Healthcare	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Ni-NTA Superflow Säulenmaterial	Quiagen, Hilden
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe
Sephadex G25 (Amersham, „Hi Prep 26/10 Desalting Column“)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Superdex 200 HR 10/30	Pharmacia, Erlangen
6-well-Platte, 96-well Platte, unbeschichtet	Greiner
T-Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
10-20% Tricin-Gradienten-Gele	NOVEX (Life Technologies), Darmstadt

## Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta Purifier	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Allegra TM21	Beckmann Coulter, Krefeld
Avanti J-20 (Zentrifuge)	Beckmann Coulter, Krefeld
JA 25.50 (Rotor mit fixiertem Winkel) Für 50 ml Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter, Krefeld
JLA-8.1000 (Rotor mit fixiertem Winkel für 1 L Zentrifugenbecher)	Beckmann Coulter, Krefeld
JS-4.3 (Schwingrotor für 50 ml Zentrifugenröhrchen oder 10 ml Falconröhrchen)	Beckmann Coulter, Krefeld
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
BioDoc-It™ Imaging System UVP	Upland (USA)
CASY@Cell Counter (Model DT)	Innovatis AG, Reutlingen
DNA-Gelelektrophorese GEB1A-UVT	Hybaid AGS, Heidelberg
French Pressure Cell Press	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Offenburg
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Osterode
HPLC L4000	Merck Hitachi, Darmstadt
Infors HAT multitron bei 90-100 rpm	Infors, Einsbach
Inkubationsschrank B6 FUNCTION line	Heraeus, Hanau
Laser-Scanning-Mikroskops (LSM)	Carl Zeiss Jena
MALDI Voyager DE Pro Applied Biosystems	Life Technologies, Darmstadt

MasterCycler	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop ND-2000	Peqlab, Erlangen
PCR-Cycler	Bio-Rad München
pH-Meter inoLab Serie 720	WTW, Weilheim
Power Pac 200, 300	Bio-Rad, München
Reinstwasser-Anlage PURELab Plus	Seral, Ransbach
Cycler Rotor-Gene™ 3000	Qiagen, Venlo, Niederlande
Schüttelinkubator KS15/TH-15;SM-30/TH-30	Bühler, Tübingen
SDS-PAGE Laufkammer + Zubehör für SDS Gele	Bio-Rad, München
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Bio-Rad, München
Sterilwerkbank Biowizard Kojair	Vilppula, Finnland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TECAN Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer	Männedorf, Schweiz
Transmissionselektronenmikroskop EM900	Zeiss, Jena
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Bochemia, USA

### Kits

Produkt	Hersteller
CloneJet™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Pierce, Illinois, USA
JETquick DNA Clean-up Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Super Signal West Pico/Femto Chemiluminescent Kit	Thermo Scientific, Pierce, Illinois, USA
PCR product purification Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Silver Stain Kit	Thermo Scientific, Pierce, Illinois, USA

### Enzyme und dafür benötigte Lösungen

Produkt	Hersteller
GoTaq® Polymerase	Promega, Mannheim
Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
Ligationspuffer	Fermentas, St. Leon-Roth
Nukleotidmix	Promega, Mannheim
Oligo(dT)-Primer	Promega, Mannheim
Pfu DNA-Polymerase und Puffer	Promega, Mannheim
Rekombinante hQC	Probiodrug AG
Rekombinante mQC	Probiodrug AG
Restriktionsenzyme und Puffer	NEB, Schwalbach
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Life Technologies, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
T4-DNA-Ligase-Puffer	Fermentas, St. Leon-Roth

### Molekulargewichtsmarker

Produkt	Hersteller
PAGE-Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
PAGE-Ruler Plus unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Multicolor Low Range Protein Ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth

### Substrate und Inhibitoren

Produkt	Hersteller
Ac-Ala-AMC (1M = 288,31 g/l)	Bachem, Torrence (USA)
Complete <sup>®</sup> Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
Pefabloc <sup>®</sup> SC (AEBSF)	Roche Applied Science, Indianapolis, USA

### Software/Programme

Produkt	Hersteller
Grafit, Version 5.0.4 für Windows	Erithacus Software Ltd., Horley, GB
GraphPadPrism 6.0	GraphPad, USA
Kaleidagraph	
MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis	Nashville, USA
Origin 7.0	Northampton, USA
Adobe Photoshop	
ExPASy Translate Tool	<a href="http://www.expasy.ch/tools/dna.html">http://www.expasy.ch/tools/dna.html</a>
ClustalW	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html">http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html</a>
ExPASy ProtParam Tool	<a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>

### Medien und Zusätze für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
Accutase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium)	Life Technologies, Darmstadt
D-MEM:F12	Life Technologies, Darmstadt
FBS	Life Technologies, Darmstadt
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
G418	Life Technologies, Darmstadt
Gentamycin	Life Technologies, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
Lipofectamin 2000	Life Technologies, Darmstadt
SFM-900	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
Cellfectin	Life Technologies, Darmstadt
Grace's Medium	Life Technologies, Darmstadt

## Häufig verwendete Puffer und Lösungen

### Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Färbelösung (Coomassie-Färbung):	50 % Methanol 10 % Essigsäure 0,025 % Serva blue W
Entfärbelösung (Coomassie-Färbung):	10 % Essigsäure
Probenpuffer (reduzierende SDS-Page):	Roti®-Load 1 (4x) von BioRad
Probenpuffer (nicht-reduzierende SDS-Page):	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 5 % (w/v) SDS 50 % Glycerol 0,005 % Bromphenolblau
SDS-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 0,1% (w/v) SDS

### Puffer und Lösungen für den ELISA:

ELISA-Blocker (ThermoScientific, PIERCE)

TBS-Tween-20

Stopp-Lösung: 1,2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Substrat SURE BLUE (KPL, Gaithersburg, Maryland 20878 USA)

## Antikörper

### Primärantikörper

Produkt	Hersteller	Typ	Konzentration	Verdünnung	Anwendung
Anti-GST	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Kaninchen	1 mg/ml	1:500	WB
Anti-APH (C-Terminus) (human, murin, Ratte)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	Polyklonal, Ziege	200 µg/ml	1:200	WB
Anti-Sumo3 (human)	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Kaninchen	5 mg/ml	1:500	WB
Anti-Smt3 ( <i>S.cerevisiae</i> )	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Kaninchen	1 mg/ml	1:1000	WB
Anti-Amyloid β (Aβ) <sub>x-40</sub> (AS 34-40) (human, murin)	Upstate via Merck, Darmstadt	Maus-Aszites		1:1000	WB
Anti-Flag-tag	Cell Signaling, Boston, USA	Polyklonal, Kaninchen		1:1000 1:100	WB IF
Anti-His-tag	Abcam, Cambridge, UK	Monoklonal, Maus		1:1000	WB
Anti-Amyloid β (17-24) (4G8) (human)	Chemicon International	Monoklonal, Maus	1 mg/ml	1:1000 1:500	WB, ELISA

### Sekundärantikörper

Produkt	Hersteller	Typ/Ursprung	Konzentration	Verdünnung	Anwendung
Anti-Maus-IgG-(H&L)-AP	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Ziege	1 mg/ml	1:10.000	WB
Anti-Maus-IgG-HRP	Dianova, Hamburg	Polyklonal, Ziege		1:10.000	WB
Anti-Ziege IgG-(H&L)-AP	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Esel	1 mg/ml	1:10.000	WB
Anti-Human-IgG-(H&L)-AP	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Kaninchen	1 mg/ml	1:10.000	WB
Anti-Kaninchen-IgG-(H&L)-AP	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonal, Ziege	1 mg/ml	1:10.000	WB
Rhodamine Red™-X	Life Technologies, Darmstadt	Polyklonal, Ziege	2 mg/ml	1:100	IF
Anti-Amyloid-β (1-17) 6E10 - HRP	BioLegend, San Diego, USA	Monoklonal, Maus	1 mg/ml	1:2000	ELISA

## Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert. Die Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung dargestellt (RV = reverse, FW = Forward)

Verwendungszweck	Ausgangsplasmid	Zielvektor	PCR Bedingungen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'-3'
Klonierung APH zur Expression in <i>E.coli</i>	APH in pOTB	pET28a+	Pfu Polymerase, Produktgröße: 2220 bp Annealing Temp.: 65 °C Elongationszeit: 5 min	APH-pET-FW  APH-pET-RV	CGCCATATGGAACGTCAGGTGCTGCTGAGCGAGCCC <i>NdeI</i> -Schnittstelle und Start-Codon  CCGCTCGAGTCAGCTGCCCAAGTGTGTGCGTAGCCAG <i>XhoI</i> -Schnittstelle und Stopp-Codon
Klonierung APH zur Expression in CHO/COS7--Zellen,  sowie im Baculovirus-System:	APH in pOTB	pcDNA3.1  pFastBac™1	Pfu Polymerase, Produktgröße 2255 bp Annealing Temp.: 65°C Elongationszeit: 5 min	APH-1-FW  APH-2-RV	GTGGAATTCATGCATCATCATCATCATGAACGTCAGG TGCTGCTGAGCGA <i>EcoRI</i> -Schnittstelle, Start-Codon und <i>His-tag</i>  CGAGCGGCCGCTCACTTGTCTGTCGTCGTCCTTATAGTCG CTGCCCAAGTGTGTGCGTAGCCAG <i>NotI</i> -Schnittstelle, Stopp-Codon und <i>Flag-tag</i>
Primer zur Überprüfung der Klonierung in DH10Bac Zellen (Bacmid)			Taq Polymerase, Annealing Temp.: 55°C Elongationszeit abhängig von der Gengröße	M13 FW  M13-RV	GTTTTCCCAGTCACGAC  CAGGAAACAGCTATGAC
Klonierung von SUMO-Q3-Aβ40 in pET41a(+) (mit GST-tag) zur Expression in <i>E.coli</i>	Q3-Aβ40 in pET-SUMO	pET41a(+)	Pfu-Polymerase, Produktgröße: 490 bp Annealing Temp.: 65°C Elongationszeit: 1 min	pET41-FW  pET41-RV	CGGGGATCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAC <i>BamHI</i> -Schnittstelle und Start-Codon  CTCGCCTGCAGTTAGACAACACCGCCCACCATGAGTC <i>PstI</i> -Schnittstelle und Stopp-Codon
Klonierung scULP1	DNA kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen	pET28a+ (Zwischenklonierung in Vektor pJET)	Pfu Polymerase, Produktgröße: 681 bp, Annealing Temp.: 60°C, Elongationszeit: 1 min	Ulp1-NdeI FW  Ulp1-XhoI RV	ACGTATCATATGCTTGTTCCTGAATTAAATG <i>NdeI</i> -Schnittstelle und Start-Codon  ATCTCGAGATATTTTAAAGCGTCGG <i>XhoI</i> Schnittstelle
Klonierung (NANP) <sub>19</sub> -Aβ42 zur Expression in <i>E.coli</i>	(NANP) <sub>19</sub> -Aβ42 in pMK-RQ (Life Technologies)	pET28a+	Pfu Polymerase, Produktgröße: 437 bp Annealing Temp.: 65°C Elongationszeit: 1 min	NANP-Abeta-FW  NANP-1-42-RV	GATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATC <i>NcoI</i> Schnittstelle und Start-Codon  GAATTCGGATCCTTATGCGATAACAACAC <i>BamHI</i> -Schnittstelle und Stopp-Codon

Klonierung (NANP) <sub>19</sub> -Aβ40 Zur Expression in <i>E.coli</i>	(NANP) <sub>19</sub> -Aβ42 in pET28a	pET28a+	Mutagenese nach Angaben des Herstellers	Muta x-40 FW  Muta x-40 RV	TGGTTGGTGGTGTGTTGTTAAGGATCCGAATC Stopp-Codon  GAATTCGGATCCTTAAACAACACCACCAACCA Stopp-Codon
Klonierung (NANP) <sub>19</sub> -Q3-Aβ42 zur Expression in <i>E.coli</i>	(NANP) <sub>19</sub> -Aβ42 in pET28a(+)	pET28a+	Mutagenese nach Angaben des Herstellers	Muta 3Gln-42 FW  Muta 3Gln-42 RV	GAAAATCTGTATTTTCAGCAGTTTCGCCATGATAGCGGT  ACCGCTATCATGGCGAAACTGCTGAAAATACAGATTTTC
Klonierung (NANP) <sub>19</sub> -Q3-Aβ40 zur Expression in <i>E.coli</i>	(NANP) <sub>19</sub> -Q3-Aβ42 in pET28a(+)	pET28a+	Mutagenese nach Angaben des Herstellers	Muta x-40 FW  Muta x-40 RV	Siehe oben
Klonierung TEV-Protease zur Expression in <i>E.coli</i>	TEV-Protease in pEX-A (Eurofins MWG operon)	pET28a+	Pfu Polymerase, Produktgröße: 782 bp Annealing Temp.: 65°C Elongationszeit: 2 min	TEV-FW  TEV-RV	GATATACCATGGGTCATCATCATCATC <u>NcoI</u> Schnittstelle und Start-Codon  GAATTCGGATCCTTACTTGTCTCGTCGTCGTC <u>BamHI</u> -Schnittstelle und Stopp-Codon

## Messdaten

### Bestimmung kinetischer Parameter der APH

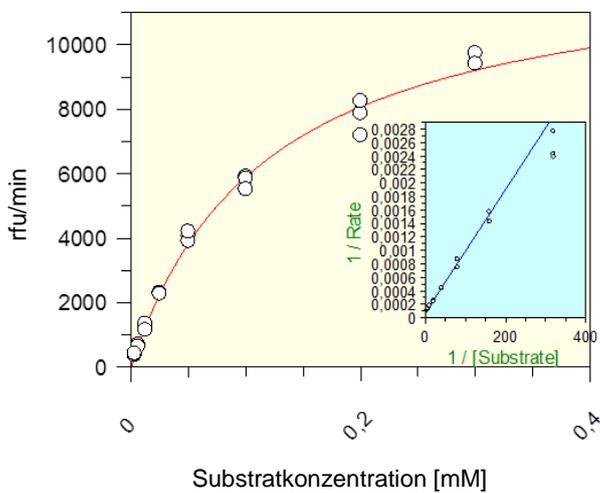
Ansatzvolumen 270  $\mu\text{l}$  (96-well Mikrotiterplatte)

50  $\mu\text{l}$  Substrat

20  $\mu\text{l}$  Enzym

200  $\mu\text{l}$  Puffer (50 mM Tris, pH 7,4)

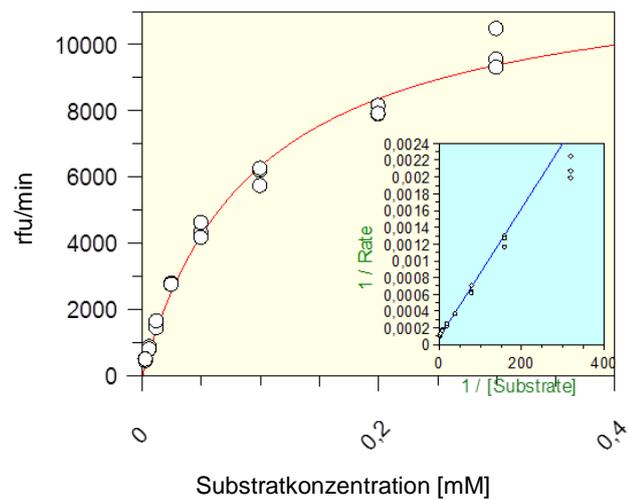
Charakterisierung rekombinanter  
APH aus *E.coli*



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	12801,5123	433,7260
Km	0,1170	0,0088

APH (21.09.11) aus *E.coli*  
 Proteinkonz. = 0,01 mg/ml  
 Substrat: Ac-Ala-AMC  
 Km = 0,117 mM

Charakterisierung gekaufter  
APH (Takara)



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	12377,3031	394,6714
Km	0,0958	0,0075

APH (erworben von Takara)  
 (gelöst in Tris-Puffer, Lagerung -20°C)  
 Proteinkonz. = 0,08 mg/ml  
 Substrat: Ac-Ala-AMC  
 Km = 0,0958 mM

## Nukleotid-Sequenzen der verwendeten rekombinanten Proteine und Peptide

### A $\beta$ 42:

GATGCAGAATTTCCGCCATGATAGCGGTTATGAAGTTCATCATCAGAACTGGTGTTTTTTGCCGAAGA  
TGTGGGTAGCAATAAAGGTGCAATTATTGGTCTGATGGTTGGTGGTGTGTTATCGCA

### SUMO-A $\beta$ 40:

**AT**GGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGCTAGCATGTC  
GGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCA  
ATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGG  
CTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTAT  
TAGAATTCAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACA  
GAGAACAGATTGGTGGTGTGATGCAGAATTCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTG  
GTGTTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGT  
**CTAA**

### (NANP)<sub>19</sub>-A $\beta$ 42:

**AT**GGGCAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCAATGCAAATCCGAATGCCAATCCTAATGCGAA  
CCCGAACGCGAATCCAAACGCAAACCCAAATGCTAACCCCTAACGCCAACCCGAATGCTAATCCGAATG  
CAAATCCAAACGCTAATCCTAACGCAAATCCGAACGCGAACCCCTAATGCCAATCCAAACGCGAATCCG  
AATGCCAACCCGAACGCTAACCCCTAATGCGAACCCCTAATGCAAACCCAAATGCCAATCCGCGTAGCGA  
AAATCTGTATTTTCAGGATGCAGAATTTCCGCCATGATAGCGGTTATGAAGTTCATCATCAGAACTGG  
TGTTTTTTGCCGAAGATGTGGGTAGCAATAAAGGTGCAATTATTGGTCTGATGGTTGGTGGTGTGTT  
ATCGCATAA

### scULP1 (in pET28a+):

**AT**GGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT**ATG**CTTGT  
TCCTGAATTAATGAAAAAGACGATGACCAAGTACAAAAAGCTTTGGCATCTAGAGAAAATACTCAGT  
TAATGAATAGAGATAATATAGAGATAACAGTACGTGATTTTAAGACCTTGGCACCACGAAGATGGCTA  
AATGACACTATCATTGAGTTTTTTATGAAATACATTGAAAAATCTACCCCTAATACAGTGGCGTTTAA  
TTCATTTTTCTATAACCAATTTATCAGAAAGGGTTATCAAGGCGTCCGGAGGTGGATGAAGAGAAAGA  
AGACACAAATTGATAAACTTGATAAAATCTTTACACCAATAAATTTGAACCAATCCCCTGGGCGTTG  
GGCATAATTGATTTAAAAAGAAAATATAGGTTACGTAGATTCAATTATCGAATGGTCCAAATGCTAT  
GAGTTTCGCTATACTGACTGACTTGCAAAAATATGTTATGGAGGAAAGTAAGCATAACAATAGGAGAAG  
ACTTTGATTTGATTCATTTAGATTGTCCGCAGCAACCAATGGCTACGACTGTGGAATATATGTTTGT  
ATGAATACTCTCTATGGAAGTGCAGATGCGCCATTGGATTTTGATTATAAAGATGCGATTAGGATGAG  
AAGATTTATTGCCATTTGATTTTAACCGACGCTTTAAAATATCTCGAGCACCACCACCACCACC**CT**  
**GA**

### APH (in pET28a+):

**AT**GGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT**ATG**GAAACG  
TCAGGTGCTGCTGAGCGAGCCCGAGGAGGCGGCGGCTCTGTATCGGGCCTTAGCCGCCAGCCCGCGC  
TGAGCGCCCGCTGCCTGGGCCCGGAGGTCAACACGCAGTACGGCGGCAATACCCGACGGTGCACACT  
GAGTGGACCCAGAGGGACCTGGAACGCATGGAGAACATTCGATTCTGCCGCAATACCTGGTGTTC  
TGACGGGGACTCAGTGGTGTGTCAGGACCTGCAGGCAACAGTGTGGAGACCCGGGGGAACTGCTGA  
GCAGAGAGTCTCCTCAGGCACCATGAAAGCTGTGCTGCGCAAGGCTGGAGGCACGGGCCCCTGGGGAA  
GAGAAGCAGTTCCTGGAGGTCTGGGAGAAGAACCAGGAGCTCAAGAGCTTCAACCTGTCAGCGCTGGA  
GAAACATGGGCCTGTTTATGAGGATGACTGCTTTGGCTGCCTGTCTGGTTCGCACTCGGAGACACACT  
TGTTGTATGTGGCAGAGAAGAAGCGCCCCAAGGCCGAGTCTTCTTTTCAGACCAAAGCCTTGGACGTC  
AGTGCCAGCGATGATGAGATAGCCAGGCTGAAGAAGCCAGACCAAGCCATCAAGGGGATCAGTTTGT  
GTTTTATGAAGACTGGGGAGAAAACATGGTTTCCAAAAGCATCCCTGTGCTCTGCGTGTGGATGTCG  
AGAGTGGCAACATCTCTGTGCTTGAGGGGGTCCCTGAGAATGTGTCCCCTGGACAGGCATTTTGGGCC  
CCTGGAGATGCTGGTGTGGTGTGTTGTGGGCTGGTGGCATGAGCCCTTCCGTTGGGCATCCGCTTTTG

CACCAATCGCAGGTCAGCCCTGTATTACGTGGACCTCATCGGGGGGAAGTGTGAGCTCCTCTCGGATG  
 ACTCCCTGGCTGTCTCTTCTCCCCGGCTGAGCCCAGACCAATGTCGCATTGTCTACCTGCAGTACCCA  
 TCTCTGATCCCCATCACCAATGCAGCCAGCTGTGCCTGTATGACTGGTATAACCAAGGTTACCTCAGT  
 GGTGGTAGATGTTGTGCCTCGGCAGCTGGGAGAGAACTTCTCTGGGATCTACTGCAGCCTTCTGCCTT  
 TGGGATGCTGGTCAGCTGACAGCCAGAGAGTGGTCTTTGACTCGGCTCAGCGCAGCCGGCAGGACCTG  
 TTTGCTGTGGACACCCAAGTGGGCACTGTGACCTCCCTCACAGCTGGAGGGTCAGGTGGGAGCTGGAA  
 GTTGCTCACAAATTGACCAGGACCTCATGGTGGCACAGTTTTCCACACCCAGCCTACCTCCAACCCTGA  
 AAGTTGGGTTCTGCCTTCTGCAGGGAAGGAGCAGTCAGTGTTGTGGGTGTCCCTGGAGGAGGCCGAG  
 CCCATTCCCGACATCCACTGGGGCATCCGGGTGCTACAGCCACCCCCAGAGCAAGAGAATGTGCAGTA  
 TGCTGGCCTTGACTTTGAAGCAATCCTGCTGCAGCCTGGCAGCCCTCCAGATAAGACCCAAGTGCCCA  
 TGGTGGTCATGCCCCACGGGGGGCCCCATTTCATCCTTTGTCACTGCCTGGATGCTGTTCCAGCCATG  
 CTTTGCAAGATGGGCTTTGCGGTACTACTAGTGAAGTATCGTGGCTCCACGGGCTTTGGCCAGGACAG  
 CATCCTCTCCCTCCCAGGCAATGTGGGCCACCAGGATGTGAAGGATGTCCAGTTTGCAGTGGAAACAGG  
 TGCTCCAGGAGGAACACTTTGATGCAAGCCATGTGGCCCTTATGGGTGGTTCCCATGGTGGCTTCATT  
 TCCTGCCACTTGATTGGTCAGTACCCAGAGACCTACAGGGCCTGCGTGGCCCCGGAACCCCGTGATCAA  
 CATCGCCTCCATGTTGGGCTCCACTGACATCCCTGACTGGTGCCTGGTGGAGGCTGGCTTTCCCTTCA  
 GCAGTGAAGTGCCTGCCAGACCTCAGCGTGTGGGCTGAGATGCTGGACAAATCGCCATCAGATACATC  
 CCTCAGGTGAAGACACCACTGTTACTGATGTTGGGCCAGGAGGACCGGCGTGTGCCCTTCAAGCAGGG  
 CATGGAGTATTACCGTGCCCTCAAGACCCGGAATGTGCCTGTTCCGGCTCCTGCTCTATCCCAAAGCA  
 CCCACGCATATCAGAGGTGGAGGTGGAGTCAGACAGCTTCATGAATGCTGTGCTCTGGCTACGCACA  
 CACTTGGGCAGCTGA

### APH (pcDNA 3.1, pFastBac):

**ATGCATCATCATCATCATGAACGTCAGGTGCTGCTGAGCGAGCCCGAGGAGGCGGCGGCTCTGTA**  
 TCGGGGCTTAGCCGCCAGCCCGCGCTGAGCGCCGCTGCCTGGGCCCGGAGGTCACCACGCAGTACG  
 GCGGCCAATACCGGACGGTGCACACTGAGTGGACCCAGAGGGACCTGGAACGCATGGAGAACATTCGA  
 TTCTGCCGCCAATACCTGGTGTTCATGACGGGGACTCAGTGGTGTTCAGGACCTGCAGGCAACAG  
 TGTGGAGACCCGGGGGAACTGCTGAGCAGAGAGTCTCCTTCAGGCACCATGAAAGCTGTGCTGCGCA  
 AGGCTGGAGGCACGGGCCCTGGGGAAGAGAAGCAGTTCCTGGAGGTCTGGGAGAAGAACCAGGAGCTC  
 AAGAGCTTCAACCTGTCAGCGCTGGAGAAACATGGGCTGTTTATGAGGATGACTGCTTTGGCTGCCT  
 GTCCTGGTGCCTCGGAGACACACTGTTGTATGTGGCAGAGAAGAAGCGCCCCAAGGCCGAGTCCCT  
 TCTTTCAGACCAAAGCCTTGGACGTGAGTGCAGCGATGATGAGATAGCCAGGCTGAAGAAGCCAGAC  
 CAAGCCATCAAGGGGATCAGTTTGTGTTTATGAAGACTGGGGAGAAAACATGGTTTCCAAAAGCAT  
 CCCTGTGCTCTGCGTGTGGATGTCGAGAGTGGCAACATCTCTGTGCTTGAGGGGGTCCCTGAGAATG  
 TGTCCCCTGGACAGGCATTTTGGGCCCTGGAGATGCTGGTGTGGTGTTCAGGGGCTGGTGGCATGAG  
 CCCTTCCGGTTGGGCATCCGCTTTTGCACCAATCGCAGGTCAGCCCTGTATTACGTGGACCTCATCGG  
 GGGAAAGTGTGAGCTCCTCTCGGATGACTCCCTGGCTGTCTTCTCCCCGGCTGAGCCCAGACCAAT  
 GTCGCATTGTCTACCTGCAGTACCCATCTCTGATCCCCATCACCAATGCAGCCAGCTGTGCCTGTAT  
 GACTGGTATAACCAAGGTTACCTCAGTGGTGGTAGATGTTGTGCCTCGGCAGCTGGGAGAGAAGTCTC  
 TGGGATCTACTGCAGCCTTCTGCCTTTGGGATGCTGGTCAGCTGACAGCCAGAGAGTGGTCTTTGACT  
 CGGCTCAGCGCAGCCGGCAGGACCTGTTTGTGTTGGACACCCAAGTGGGCACTGTGACCTCCCTCACA  
 GCTGGAGGGTCAAGTGGGAGCTGGAAGTTGCTCACAAATTGACCAGGACCTCATGGTGGCACAGTTTTT  
 CACACCCAGCCTACCTCCAACCCTGAAAGTTGGGTTCTGCCTTCTGCAGGGAAGGAGCAGTCAGTGT  
 TGTGGGTGTCCCTGGAGGAGGCCGAGCCATTCCCGACATCCACTGGGGCATCCGGGTGCTACAGCCA  
 CCCCCAGAGCAAGAGAATGTGCAGTATGCTGGCCTTACTTTGAAGCAATCCTGCTGCAGCCTGGCAG  
 CCCTCCAGATAAGACCCAAGTGGCCATGGTGGTCATGCCCCACGGGGGGCCCCATTTCATCCTTTGTCA  
 CTGCCTGGATGCTGTTCCAGCCATGCTTTGCAAGATGGGCTTTGCGGTACTACTAGTGAAGTATCGT  
 GGCTCCACGGGCTTTGGCCAGGACAGCATCCTCTCCCTCCCAGGCAATGTGGGCCACCAGGATGTGAA  
 GGATGTCCAGTTTGCAGTGGAAACAGGTGCTCCAGGAGGAACACTTTGATGCAAGCCATGTGGCCCTTA  
 TGGGTGGTTCCCATGGTGGCTTCATTTCCCTGCCACTTGATTGGTCAAGTACCCAGAGACCTACAGGGCC  
 TGCGTGGCCCCGGAACCCCGTATCAACATCGCCTCCATGTTGGGCTCCACTGACATCCCTGACTGGTG  
 CGTGGTGGAGGCTGGCTTTCCCTTTCAGCAGTGAAGTGCCTGCCAGACCTCAGCGTGTGGGCTGAGATGC  
 TGGACAAATCGCCATCAGATAACATCCCTCAGGTGAAGACACCACTGTTACTGATGTTGGGCCAGGAG  
 GACCGGCGTGTGCCCTTCAAGCAGGGCATGGAGTATTACCGTGCCTCAAGACCCGGAATGTGCCTGT  
 TCGGCTCCTGCTCTATCCCAAAGCACCCACGCATTATCAGAGGTGGAGGTGGAGTCAGACAGCTTCA  
 TGAATGCTGTGCTCTGGCTACGCACACACTTGGGCAGCACTATAAGGACGACGACGACAAGTGA

**TEV-Protease:**

**ATGGGTCATCATCATCATCATCATCATGGAGAAAGCTTGTTTAAGGGGCCGCGTGATTACAACCCGAT**  
ATCGAGCACCATTTGTCATTTGACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGAT  
TTGGTCCCTTCATCATTACAAACAAGCACTTGTTTAGAAGAAATAATGGAACACTGGTCGTCCAATCA  
CTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTTGCAACAACACCTCATTGATGGGAGGGACAT  
GATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTTCCACCATTTCTCAAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAA  
GGGAAGAGCGCATATGTCTTGTGACAACCAACTTCCAAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTGTGACAG  
ACTAGTTGCACATTCCTTCAGGCGATGGCATATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAAGGATGGGCA  
GTGTGGCAGTCCATTAGTATCAACTAGAGATGGGTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCGAATTTCA  
CCAACACAAACAATTATTTTACAAGCGTGCCGAAAACTTCATGGAATTGTTGACAAATCAGGAGGCG  
CAGCAGTGGGTTAGTGGTTGGCGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGGCCATAAAGTTTTTCAT  
GGTGAACCTGAAGAGCCTTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAATGACTATAAGGACG  
ACGACGACAAGTAA

## Wissenschaftliche Publikationen

Wulff M, Baumann M, **Thümmler A**, Yadav JK, Heinrich L, Knüpfer U, Schlenzig D, Schierhorn A, Rahfeld JU, Horn U, Balbach J, Demuth HU, Fändrich M (2016) Enhanced Fibril Fragmentation of N-Terminally Truncated and Pyroglutamylyl-Modified A $\beta$  Peptides. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55: 5081-4.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. H.-U. Demuth für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in der Probiodrug AG in Halle anzufertigen, sowie die wissenschaftliche Betreuung und stete Bereitschaft zur Diskussion.

Bei Prof. G. Reuter bedanke ich mich für die Betreuung dieser Dissertationsarbeit seitens der Universität Halle-Wittenberg.

Weiterhin danke ich Dr. Jens Rahfeld für die wissenschaftliche Unterstützung. Seine Motivation und die vielen konstruktiven Vorschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Fändrich und Prof. Balbach danke ich für die Zusammenarbeit hinsichtlich der NMR Strukturuntersuchungen.

Ein besonderer Dank gilt Michael Wermann für die vielen gemeinsam durchgeführten Proteinreinigungen, teils sehr nervenaufreibende Stunden vor der Äkta, sowie die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung und Motivation.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Jens Rahfeld und Dr. Anett Stephan für das Lesen und die kritische Bewertung des Manuskripts.

Dr. Astrid Kehlen und Katja Menge danke ich für die Unterstützung in der Zellkultur und Dr. Gerd Hause für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Bei Dr. Dagmar Schlenzig bedanke ich mich für die Mithilfe bei der Durchführung der Th-T Assays und der Aß-Zellkulturuntersuchungen und bei Anja Reimann für die Durchführung des BrdU Assays. Dr. Raik Wolf und Christina Schnittka danke ich für die Zusammenarbeit bei HPLC- und MALDI-TOF-MS Analysen.

Ich danke außerdem den Mitarbeitern der Probiodrug AG, besonders meinen Kollegen Dr. Kathrin Gnoth, Dr. Anett Stephan, Nadine Jänckel, Katja Menge, Anke Piechotta für die angenehme und immer lustige Arbeitsatmosphäre und dass sie stets ein offenes Ohr für kleine und große Probleme hatten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Ruben Großer, meiner Tochter Svenja und bei meinen Eltern für deren zuverlässige Unterstützung im Alltag bedanken.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Einrichtung vorgelegt oder veröffentlicht.

Halle/Saale, \_\_\_\_\_