

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

**Interaktion und Bindung zwischen Präsenilin-1 und IP₃-Rezeptor
Typ 1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tim Christian Versteegen
aus Hamburg

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.09.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Aymelt Itzen

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Markus Glatzel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines.....	1
1.2 Neuropathologie der Alzheimer-Demenz.....	2
1.3 Die Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz.....	3
1.4 Kritik an der Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	9
1.5 Die Präsenilin-Hypothese der Alzheimer-Demenz.....	12
1.6 Präseniline und Calcium-Dysregulation in der Alzheimer-Demenz.....	13
1.6.1 Störungen im IP3-Signalweg.....	15
1.6.1.1 Aufbau des IP3-Signalweges.....	15
1.6.1.2 Struktur des IP3-Rezeptors.....	18
1.6.1.3 Regulation des IP3R1.....	20
1.6.1.4 Der IP3-Signalweg und die Alzheimer-Demenz im Speziellen.....	20
1.7 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Materialien.....	25
2.1.1. Chemikalien.....	25
2.1.2. Puffer, Medien und Lösungen.....	27
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.4. Kommerzielle Kits.....	30
2.1.5 Plasmide.....	31
2.1.6 Primer.....	31
2.1.7 Enzyme.....	31
2.1.8 Zellreihen und Bakterienstämme.....	32
2.1.9 Software.....	32
2.1.10 Antikörper.....	32
2.1.11 Geräte.....	34

2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Allgemeine Beschreibungen der molekularbiologischen Methoden.....	35
2.2.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli vom Typ XL10-Gold Ultracompetent Cells (XL10).....	35
2.2.1.2 Transformation von Plasmiden in Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells.....	36
2.2.1.3 Anzucht von Bakterien in Kulturmedien.....	36
2.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA.....	37
2.2.1.5 Photometrische Analyse von DNA.....	37
2.2.1.6 Sequenzierung von DNA.....	38
2.2.1.7 Enzymatischer Restriktionsverdau.....	38
2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	39
2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
2.2.1.11 PCR.....	40
2.2.2 Der Aufbau der molekularbiologischen Experimente im Einzelnen.....	41
2.2.2.1 Klonierung eines Vektors zur Expression von GST-PS1 in Zellen.....	41
2.2.2.2 Klonierung eines Expressionsvektors für GST-CTF.....	48
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	53
2.2.3.1 Kultivierung von Zellen.....	53
2.2.3.2 Zellyse und Proteinextraktion.....	53
2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	54
2.2.3.4 SDS-PAGE.....	54
2.2.3.5 Anfärbung von Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau.....	55
2.2.3.6 Western Blot.....	56
2.2.4 Die Expression von rekombinanten GST-gekoppelten Proteinen.....	57
2.2.4.1 Die Entscheidung für das passende Expressionssystem.....	57
2.2.4.2 Die Expression von Fusionsproteinen in E. coli.....	59
2.2.4.3 Expression und Purifikation von GST-CTF.....	62
2.2.4.4 Analyse und Fraktionierung des rekombinanten GST-CTF durch Größenausschluss-Chromatographie (Size exclusion chromatography).....	63

2.2.4.5	Konzentrierung mittels Vakuumkonzentrator	64
2.2.4.6	Purifikation von rekombinantem GST-PS1	64
2.2.5	Experimente zu Bindung und Interaktion der GST-gekoppelten Proteinen	66
2.2.5.1	Die Methodik zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	66
2.2.5.2	Affinitätschromatographie mittels GST-Tag	67
2.2.5.3	Das Prinzip der Co-Immunopräzipitation	69
2.2.5.4	Bindung zwischen GST-CTF und proteolytisch isoliertem PS1	71
2.2.5.5	Bindung zwischen GST-CTF und humaner Gamma-Sekretase	72
2.2.5.6	Bindung zwischen GST-CTF und Zell-Homogenat aus MEF	73
2.2.5.7	Bindung zwischen GST-CTF und MEF-Homogenat mittels des Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit	74
2.2.6	Co-Immunopräzipitation	75
3.	Ergebnisse	76
3.1	Molekularbiologische Ergebnisse	76
3.1.1	Ergebnisse zur Klonierung von pGEX-6P-1-CTF	76
3.1.2	DNA-Sequenz von GST-CTF	78
3.1.3	Klonierung von pcDNA3.1-GST-PS1	79
3.1.4	DNA-Sequenz von GST-PS1	81
3.2	Gewinnung von rekombinantem Protein	82
3.2.1	Gewinnung von GST-CTF	82
3.2.2	Gewinnung von GST-PS1	86
3.3	Experimente zur Untersuchung von Bindung und Interaktion mit GST-gekoppelten Proteinen	88
3.3.1	Bindung zwischen GST-CTF und proteolytisch isoliertem PS1	88
3.3.2	Bindung zwischen GST-CTF und humaner Gamma-Sekretase	89
3.3.3	Bindung zwischen GST-CTF und Homogenat aus MEF	92
3.3.4	Bindung zwischen GST-CTF und PS1-MEF-Homogenat mittels des Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit	96
3.3.5	Co-Immunopräzipitation	98

4. Diskussion	103
4.1 Ausgangspunkt dieser Arbeit: Direkte Interaktion zwischen PS1 und IP3R1	103
4.1.1 Herstellung der Fusionsproteine	105
4.1.1.1 GST- IP3R1-CTF	105
4.1.1.2 GST- IP3R1-NTF	106
4.1.1.3 GST-PS1	106
4.1.2 GST-gestützte Bindungsversuche („GST Pull downs“)	107
4.1.3 Co-Immunopräzipitation	109
4.1.4 Gesamtergebnis	109
4.2 Alternative Erklärungsmodelle	110
4.2.1 Überladung des ER mit Calcium	110
4.2.2 Defizite im Store operated Calcium Entry (SOCE)-Mechanismus	111
4.2.3 Amyloid- β und der IP3R1	112
4.2.4 Anderweitige Beeinflussung des IP3-Signalweges	113
4.3 Ausblick	118
5. Zusammenfassung	120
6. Summary	121
7. Abkürzungsverzeichnis	122
8. Literaturverzeichnis	126
9. Danksagung	145
10. Lebenslauf	146
11. Eidesstattliche Versicherung	147

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Alle drei Sekunden erkrankt ein Mensch an Demenz (Welt-Alzheimer-Bericht von 2015). Demenzielle Syndrome werden als kognitive Defizite oder Verluste kognitiver Leistungsfähigkeit definiert, die in der Beeinträchtigung der individuellen Fähigkeit zur unabhängigen Lebensgestaltung münden (Sacuiu SF, 2016). Typischerweise zeichnen sie sich durch einen voranschreitenden Verlust insbesondere des Gedächtnisses, der Fähigkeit zur räumlichen und zeitlichen Orientierung sowie schließlich der Sprach- und Sprechfähigkeit aus. Aufgrund der Häufigkeit demenzieller Syndrome in der Weltbevölkerung, deren stark zunehmender Tendenz sowie des häufig unabwendbaren Verlaufs wurde die Demenz durch die WHO als vorrangige Bedrohung für die öffentlichen Gesundheitssysteme identifiziert (WHO, 2012). In ihrem Welt-Alzheimer-Bericht von 2015 (ADI, 2015) kommen die Autoren zu dem Schluss, dass im Jahre 2015 weltweit 46 Millionen Menschen an einer Demenz leiden, deren Zahl sich bis zum Jahr 2050 auf 131,5 Millionen verdreifachen wird. Abgesehen von dem daraus resultierenden menschlichen Leid sind auch die erheblichen gesamtgesellschaftlichen Kosten zu berücksichtigen, die in Deutschland von 94 Milliarden Euro im Jahr 2016 auf schätzungsweise 195 Milliarden Euro im Jahr 2060 steigen werden (Michalowsky et al., 2019). Aus der großen Vielfalt an Ursachen demenzieller Syndrome sticht die Alzheimer'sche Erkrankung (auch Alzheimer-Demenz; AD für *Alzheimer's disease*) mit einem vermuteten Anteil von bis zu 70% an allen Demenzen heraus (Barker et al., 2002). Bis dato existiert keine wirksame Therapie (Bullain und Doody, 2020), sodass der abhängig von Lebensalter, Gesundheit und kulturellen Einflüssen nach 3 bis 12 Jahren zum Tode führende Verlauf (Kua et al., 2014) nicht abzuwenden ist. Nicht zuletzt zur Entwicklung geeigneter Therapien ist die genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen notwendig, die trotz extensiver Forschungsbemühungen bis heute noch unzureichend geklärt sind. Nach einem kurzen Überblick über die wesentlichen neuropathologischen Eigenschaften der Alzheimer'schen Erkrankungen sowie der aktuellen pathogenetischen Hypothesen soll der Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit dargelegt werden.

1.2 Neuropathologie der Alzheimer-Demenz

Die Alzheimer'sche Erkrankung wurde erstmalig von Alois Alzheimer im Jahre 1907 beschrieben (Alzheimer A, 1907), der bereits die beiden wesentlichen neuropathologischen Befunde dieser Krankheitsentität, nämlich die Amyloid-Plaques sowie neurofibrilläre Tangles (Bündel), korrekt identifizierte (Selkoe DJ, 2001). Die Plaques bestehen dabei aus extrazellulären Ablagerungen von Amyloid- β -Proteinen ($A\beta$), die bereits lange vor Auftreten dementieller Symptome zerebral aufzufinden sind (Thal et al., 2002). Bei den Amyloid-Plaques werden diffuse von kerndichten Plaques unterschieden. Nur letztere sind durch Thioflavin-S oder Kongorot anfärbbar und typischerweise von dystrophischen Neuriten (dann als neuritische Plaques bezeichnet) umgeben (Serrano-Pozo et al., 2011). Weil sich nur die kerndichten bzw. neuritischen Plaques als krankheitsspezifisch herausgestellt haben, gehen nur diese (und NFT) in das neuropathologische Scoring ein (NIA-RI Consensus 1997). Die neurofibrillären Bündel stellen intraneuronale Schädigungen dar, die sich aus hyperphosphoryliertem und fehlgefaltetem Tau-Protein zusammensetzen (Goedert et al., 1992). Zwar zählen sie auch als Diagnosekriterium, gelten aber pathogenetisch eher als sekundäre Krankheitsfolge, da sie im Rahmen einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, bei denen jedoch keinerlei Amyloid-Plaques zu finden sind (Lee V M, 2001). Dies wurde dahingehend gewertet, dass neurofibrilläre Tangles als neuronale zytopathische Reaktion zu begreifen sind, die in der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung nachgeschaltet sind (Selkoe DJ, 2001). Weitere, eher allgemeine (also unspezifische) neuropathologischen Befunde umfassen eine cerebrale Amyloid-Angiopathie (CAA), Hirano-Körperchen, granulovakuoläre Degeneration und eine Hirnatrophie (Serrano-Pozo et al., 2011).

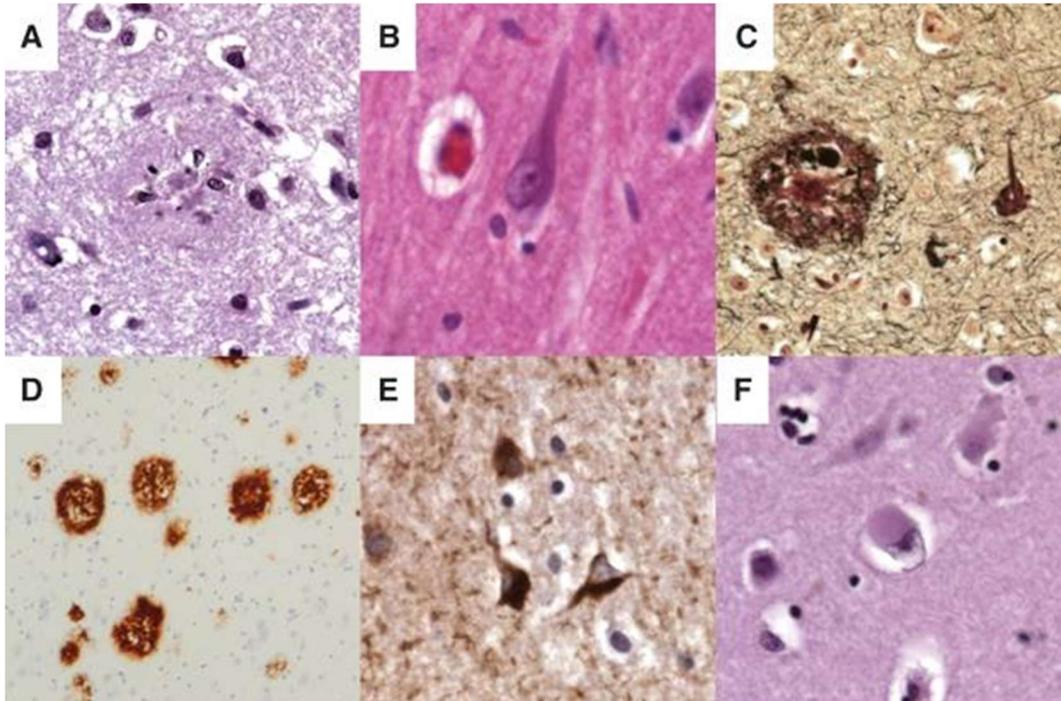


Abbildung 1.1. Zentrale neuropathologische Merkmale der Alzheimer'schen Erkrankung. Plaque in HE-Färbung (A); Tangle in hippocampaler Pyramidenzellen in HE-Färbung (B); sowohl Plaque als auch Tangle in einer Silberfärbung (C); immunhistochemische Färbung gegen Amyloid- β zeigt Plaques (D); immunhistochemische Färbung gegen Tau-Protein zeigt Tangles (E); kortikales Lewy-Körperchen im Frontalkortex (F), deren Bedeutung im Rahmen der Alzheimer'schen Erkrankung umstritten ist.

Abbildung aus Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011), *Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med: (1):a006189.*

1.3 Die Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz

Im Jahr 1985 konnte gezeigt werden, dass die von Alzheimer beschriebenen Plaques im Wesentlichen aus 4-kDA-schweren Amyloid-Proteinen bestehen (Masters et al., 1985; Selkoe et al., 1986). Dieses Amyloid- β ($A\beta$) bezeichnet eine Gruppe amyloidogener Polypeptide von 38 – 42 Aminosäuren Länge. Amyloid- β entsteht aus seinem Vorläuferprotein APP (Amyloid-Precursor-Protein), welches von Sekretasen proteolytisch gespalten wird. Dabei wird das APP von einer Alpha-Sekretase am Aminosäurerest 687 in die Fragmente APP_s-Alpha und ein C-terminales Fragment (C83) gespalten. Dieses wird sodann durch die Gamma-Sekretase weiter in ein kleineres Fragment namens p3 prozessiert (non-amyloidogener Pfad). Alternativ erfolgt die Spaltung durch eine Beta-Sekretase (auch als β -Site APP-cleaving Enzyme (BACE) bezeichnet) am Aminosäurerest 671 von APP, wodurch die Fragmente APP_s-Beta und ein C-terminales Fragment C99

entstehen (Haass und Selkoe, 2007). Das Fragment C99 wiederum wird durch eine Gamma-Sekretase weiter in ein Amyloid- β -Monomer und in ein intrazelluläres C-terminales Fragment namens AICD (APP intracellular domain) gespalten (Selkoe DJ, 2001). Vermutlich kommt es hierbei zu einem mehrschrittigen Prozess mit diversen Zwischenschritten („carboxypeptidase trimming“), an deren Ende die Freisetzung insbesondere von den A β -Spezies A β_{38} , A β_{40} und A β_{42} steht (Wolfe MS, 2019; Haass und Selkoe, 2007). Dieser Pfad ist amyloidogen. Physiologisch gesehen handelt es sich bei der hier beschriebenen APP-Prozessierung um das Beispiel eines als regulierte intramembrane Proteolyse (regulated intramembrane proteolysis; RIP) bezeichneten Signalweges zu handeln (Haass und Selkoe, 2007). Allgemein wird beim RIP zunächst die Ektodomäne eines Membranproteins (hier APP) von einer membranständigen Protease (als Sekretase bezeichnet, hier Alpha-Sekretase bzw. BACE) proteolysiert, wobei daran anschließend der membranständige Rest nochmals durch eine Sekretase (hier Gamma-Sekretase) proteolysiert wird. Hierdurch wird je eine kleines Fragment nach extrazellulär (hier A β) bzw. nach intrazellulär (hier AICD) entlassen, die ihrerseits wiederum Signalwege aktivieren (Brown et al., 2000). Die Produktion von Amyloid- β -Peptiden ist also Nebenprodukt eines allgemeinen zellulären Mechanismus.

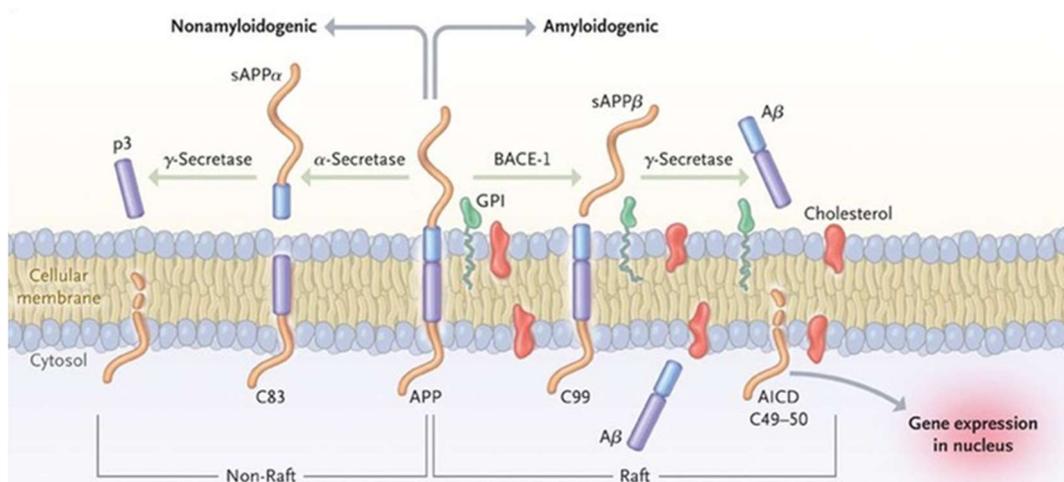


Abbildung 1.2. Prozessierung von APP und Entstehung von A β -Protein. Nach links weg geht der non-amyloidogene Pfad der APP-Prozessierung, nach rechts der amyloidogene.

Abbildung aus Querfurth HW, LaFerla FM (2011), Alzheimer's disease. N Engl J Med: 362(4):329–344.

Die Gamma-Sekretase als zentrales Enzym in der Generierung von Amyloid- β -Spezies ist eingehend untersucht worden (Namensgebung durch Haass und Selkoe, 1993). Da die Gamma-Sekretase ihre Substrate intramembranös spaltet, wird sie zur Familie der sogenannten „intramembraneous cleaving proteases – iCLiPs“ gezählt (Jurisch-Yaksi et al., 2013). Der Gamma-Sekretase-Komplex besteht als Heterotetramer aus vier Untereinheiten, nämlich aus Presenilin 1 (PS1) oder Presenilin 2 (PS2), Nicastrin, APH1 und PEN2 (Kimberly et al., 2003). Katalytisches Zentrum dieses Komplexes ist PS1, eine membranständige Aspartylprotease (Wolfe et al., 1999) von 467 Aminosäuren Länge mit insgesamt 9 Transmembrandomänen, wobei sich zwischen den TMD 6 und 7 eine große hydrophile Schleife befindet. Die katalytischen Aspartatreste liegen bei Asp257 sowie Asp385 (Laudon et al., 2005). PS1 und PS2 werden als ca. 55 kDa schwere und hochgradig homologe Proteine synthetisiert und sodann autokatalytisch (in der Regel zwischen den Aminosäureresten 298 und 299) in ein ca. 35 kDa schweres N-terminales Fragment und in ein ca. 20 kDa schweres C-terminales Fragment gespalten (Fukumori et al., 2010). Die wohl bedeutendste und bestuntersuchtete Rolle hinsichtlich ihrer Funktion nehmen die Präseniline als katalytisches Zentrum der Gamma-Sekretase wahr, sodass sie zur Prozessierung von deren Substraten wie APP (De Strooper et al., 1998) unverzichtbar ist. Darüber hinaus sind über 149 weitere Substrate der Gamma-Sekretase bekannt wie etwa auch Notch (Güner und Lichtenthaler, 2020), die sämtlich Typ-I-Membranproteine darstellen (Wolfe MS, 2019). Abgesehen von seiner Eigenschaft als Protease wurden PS1 diverse Funktionen zugeschrieben, wozu etwa der Proteintransport und die Calcium-Homöostase gehören sollen (De Strooper et al., 2012).

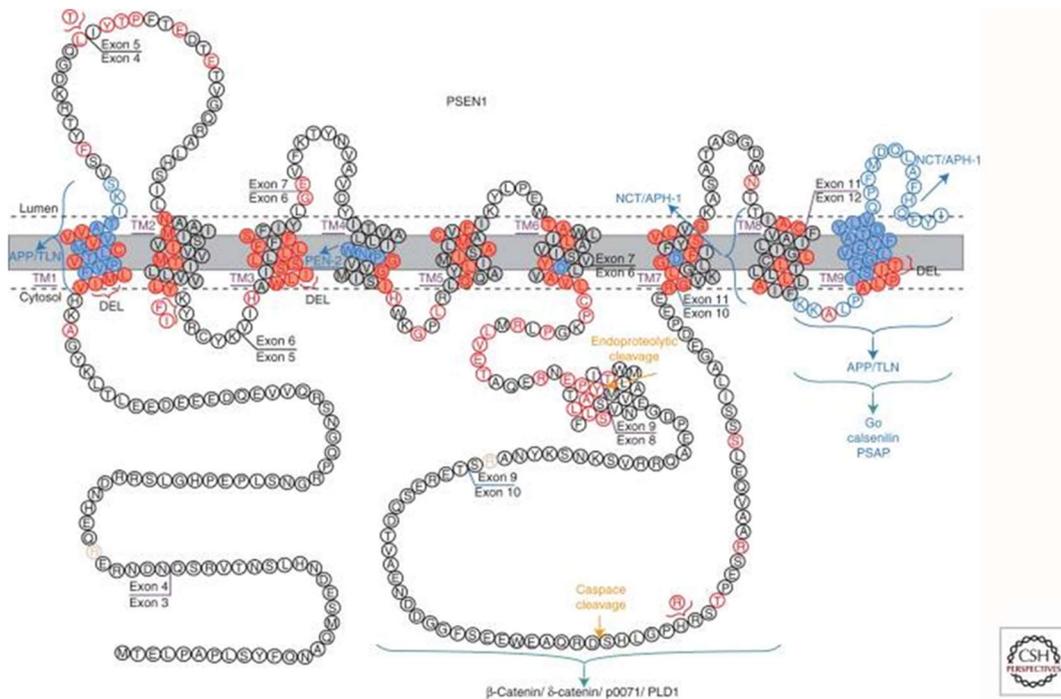


Abbildung 1.2. Struktur und Topologie von PS1 als katalytischen Zentrums der Gamma-Sekretase. Blau entspricht den Aminosäureresten, die an der Interaktion mit APP beteiligt sind. In roter Schrift sind solche Aminosäurereste, für die Mutationen beschrieben wurden. In gelb ist die endoproteolytische Schnittstelle sowie eine Caspase-Schnittstelle angegeben.

Abbildung aus De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS (2012), Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*: 2(1):a006304.

Eine besondere Bedeutung für die Erforschung der Pathogenese haben die Präseniline dadurch erlangt, dass für sie eine Vielzahl von Mutationen beschrieben sind, die zu einer besonders früh auftretenden („early onset“) und aggressiven Form der Alzheimer’schen Erkrankung führen, der sogenannten familiären Alzheimer-Demenz (FAD; Ryan und Rossor, 2010). FAD entsteht durch Mutationen in den Genen für APP (Locus auf Chromosom 21q21) oder den Präsenilin-Genen (PSEN 1 und 2; Loci auf den Chromosomen 14q24 resp. 1q42). Heutzutage sind für PS1 und PS2 über 200 Mutationen und für APP über 30 Mutationen bekannt (Wolfe MS, 2019). Nachdem erstmals klinischen Fälle von familiären Alzheimer-Erkrankungen Mutationen im APP (Goate et al., 1991) sowie in den Präsenilin-Genen (PSEN1: Sherrington et al., 1995; PSEN2: Rogaev et al., 1995) zugeordnet werden konnten, zeigte sich rasch, dass diese dominant vererbten Mutationen mit einem veränderten Amyloid- β -Stoffwechsel einhergingen, namentlich mit der vermehrten Bildung von

A β ₄₂ im Verhältnis zu A β ₄₀ (Suzuki et al., 1994; Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997). Hiermit übereinstimmend wurde in jüngerer Zeit auch eine Mutation im APP-Gen gefunden (APP-Ala673Thr), die mit reduzierter A β -Produktion einhergeht und tatsächlich auch protektiv hinsichtlich der Alzheimer'schen Erkrankung wirkt (Jonsson et al., 2012). Sämtliche dieser Mutationen sind erblich (einzige Ausnahme: PS2-Asn141Ile) und werden autosomal-dominant mit 100%-iger Penetranz weitergegeben mit einer Ausnahme im Falle einer APP-Mutation (Tanzi RE, 2012). Auffällig ist die große Heterogenität der gefundenen Mutationen, was sich sowohl auf die Lage der Mutation in der Aminosäurekette als auch auf den Einfluss auf das A β ₄₂/A β ₄₀-Verhältnis bezieht (Sun et al., 2017). Abseits von Mutationen in den oben genannten Genen, die zwangsläufig zu einer FAD führen, konnten ebenso für die sporadische Alzheimer'sche-Erkrankung (SAD; auch *late-onset Alzheimer's disease*; LOAD) eine Reihe genetischer Risikofaktoren identifiziert werden. Deren bedeutendster liegt in einem Polymorphismus im Gen für das Apolipoprotein E (APOE) und wurde 1993 erstmalig im Zusammenhang mit SAD beschrieben (Saunders et al., 1993). Dabei erhöht die genetische Variante, bei der an den Aminosäureresten 112 und 158 jeweils ein Arginin vorliegt (Allel- ϵ 4) das Risiko für das Auftreten einer SAD um über das zehnfache (Tanz RE, 2012). Mit stetig steigender Zahl neu gefundener SAD-assoziiierter Mutationen wurde schließlich eine Online-Datenbank ins Leben gerufen (Bertram et al., 2007), sodass unter <http://www.alzgene.org/> sämtliche gegenwärtig bekannten Mutationen abgerufen werden können.

Im Zuge dieser Befunde wurden der so veränderte A β -Stoffwechsel als pathogenetisch ursächlich postuliert, was in der erstmalig 1992 formulierten Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Hardys und Higgins, 1992) Ausdruck fand. Dieser zufolge soll es zu einer Veränderung in der Expression der verschiedenen A β -Spezies kommen, die durch ein vermehrtes Anfallen längerer A β -Spezies gekennzeichnet ist. Zentral dabei ist insbesondere eine Steigerung der A β ₄₂-Isoform im Verhältnis zur A β ₄₀-Isoform (Li und Selkoe, 2020). Durch den Umstand, dass längere A β -Spezies (und vermutlich A β ₄₂ ganz besonders), zu einer gesteigerten Aggregation und zur Bildung neuritischer Amyloid-Plaques neigen, die schließlich im Verlauf über neurotoxische Effekte zum Zelltod führen. Auf molekularer Ebene

wird davon ausgegangen, dass A β ₄₂ im Verhältnis zu anderen Amyloid- β -Monomeren in höherem Maße zu Oligomerisierung (insbesondere zur Zusammenlagerung zu Tri- und Tetrameren) neigt (Chen und Glabe, 2006). Biochemisch wird dies damit begründet, dass A β ₄₂ durch die zwei zusätzlichen Aminosäuren Ala41 und Ile42 am C-terminalen Ende, die bei den anderen (regulären) A β -Peptiden fehlen, infolge eines hydrophoben Charakters besonders gut bindet (Jarrett et al., 1993; Li und Selkoe, 2020). Im Ergebnis kommt es also beim vermehrten Anfall von A β ₄₂ zu vermehrter Oligomerisierung und einer damit einhergehenden zerebralen Ablagerung von Amyloid- β . Diese Ablagerung von A β ₄₂ im Gehirn führt zu inflammatorischen Prozessen der umgebenden Mikroglia, zu synaptischen Störungen und zur pathologischen Modifikation von Tau-Protein (Haass und Selkoe, 2007). Dabei ist die spezifische Eigenschaft von A β ₄₂ zur Bildung löslicher Oligomere als wesentlicher pathogenetischer Faktor in den Mittelpunkt gerückt, wohingegen die Eigenschaft diverser Amyloid- β -Spezies zur generellen Akkumulation und Fibrillenbildung keine Rolle spielen soll (Roychaudhuri et al., 2009). Demzufolge wäre auch zu erklären, warum lediglich die Last an löslichem A β inklusive der A β -Oligomere mit klinisch feststellbaren kognitiven Defiziten korreliert, nicht aber die allgemeine Last an postmortal gefundenen Amyloid-Plaques (McLean et al., 1999; Naslund et al., 2000). Ausgehend von den Beobachtungen zu den A β -Oligomeren sind eine Vielzahl verschiedener Erscheinungsformen der Oligomere auf dem Weg hin zu amyloiden Plaques gefunden worden (Benilova et al., 2012). Da sich die Neurotoxizität sowie die Beteiligung an pathologischen Prozesse zwischen den einzelnen A β -Formen unterscheidet, sind nach heutiger Ansicht streng zwischen den verschiedenen Formen zu unterscheiden (Hillen H, 2019): Zum einen fallen A β -Monomere als reguläres Stoffwechselprodukt im Rahmen neuronaler Aktivität an. Zum anderen kommt es im Rahmen der Alzheimer'schen Erkrankung zum Auftreten von löslichen A β -Oligomeren im Sinne eines pathogenetischen Korrelats wie oben beschrieben. Drittens sind zu unterscheiden A β -Fibrillen, die infolge einer Zusammenlagerung aus A β -Monomeren entstehen. Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass Amyloid- β -Oligomere die entscheidenden Auslöser pathophysiologischer Veränderungen darstellen. So wurde etwa gezeigt, dass Amyloid- β -Dimere zu einer

unmittelbaren (also plaqueunabhängigen) Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität in der Lage sind (Shankar et al., 2008).

Verschiedene Isoformen von Amyloid-β			
	A β -Monomere	A β -Oligomere	A β -Fibrillen
Auftreten	Physiologisch	Pathologisch	Unklar
3D-Struktur	Keine stabile 3D-Struktur; in wässriger Lösung Ausbildung einer Sekundärstruktur	Kernstruktur im MRT	Festkörperstruktur im MRT
Bindung an Rezeptoren oder andere Proteine	Nein	Ja	Nein

Tabelle 1.1. Übersicht über die verschiedenen Isoformen von Amyloid- β , modifiziert nach Hillen H, 2019.

Die Annahme, dass toxische Formen des Amyloid- β in Gestalt löslicher Oligomere im Sinne einer weiterentwickelten Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Karran und De Strooper, 2016; Li und Selkoe, 2020) die zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung spielen sollen, hat zur Festlegung von Amyloid- β als Ziel therapeutischer Bemühungen geführt. Dies führte zur Entwicklung einer Reihe von Therapieansätzen, wie etwa der Hemmung der Gamma-Sekretase, der Impfung gegen Amyloid- β oder der Entfernung vom Amyloid- β aus dem Gehirn durch entsprechende Antikörper (Bullain und Doody, 2020).

1.4 Kritik an der Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die vielversprechende Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist in jüngerer Zeit in Zweifel gezogen worden. Sie hatte im Zuge einer immer detaillierten experimentellen Überprüfung diverse Schwachstellen offenbart, die Fragen an ihrer Richtigkeit laut werden ließen (Herrup K, 2015; Morris et al., 2018). Die relevantesten sollen hier einmal dargelegt werden:

1. Das Vorliegen von zerebralen Amyloid- β -Ablagerungen ohne Klinik einer Demenz

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Probanden trotz altersentsprechender kognitiver Leistungsfähigkeit (nicht-dement) zum Teil ausgeprägte zerebrale Amyloid- β -Ablagerungen aufweisen. Entsprechende

Befunde ergaben sich sowohl nuklearmedizinisch gestützt am lebenden Patienten (Pike et al., 2007; Villemagne et al., 2011; Villemagne et al., 2013) als auch durch neuropathologische postmortale Untersuchung von Hirngewebe. So erfüllten 40% nichtdementer Individuen (bei Anlegen strenger Kriterien 20%) die neuropathologischen Anforderungen der Diagnose einer Alzheimer'schen Erkrankung (Price et al., 2009). In Übereinstimmung hierzu wies eine andere Untersuchung nach, dass 14 aus 59 ante-mortem kognitiv unauffälligen Individuen neuropathologisch höhergradige Kriterien der Alzheimer'schen Erkrankung aufwiesen (Davis et al., 1999). Die Spezifität von Amyloid- β -Ablagerungen für die Alzheimer'sche Erkrankung erscheint also fraglich, wäre aber als pathogenetisch-ursächliches Agens zwingend. Hierbei ist nach dem oben gesagten jedoch zu beachten, dass eine pauschale Amyloid- β -Ablagerung als pathophysiologisches Korrelat womöglich nicht existiert. So werden die löslichen A β -Oligomere, die ja am ehesten im pathogenetischen Verdacht stehen, durch das für die meisten nuklearmedizinische Studien eingesetzte Tracermolekül Pittsburgh Compound-B (PiB) wenig bis gar nicht erkannt (Yamin und Teplow, 2017).

2. Das Ausbleiben von Neurodegeneration im Mausmodell

Es sind diverse Modelle entwickelt worden, um die Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung in der Maus nachvollziehen zu können. Zunächst wurde 1996 eine transgene Maus geschaffen, die die humane (sogenannte schwedische) APP-Mutation APP-Lys670Asn-Met671Leu überexprimierte (Hsiao et al., 1996). In diesem Modell konnte eine eindeutige Steigerung der immunologisch sowie pathologisch nachweisbaren zerebralen Amyloid- β -Ablagerungen beobachtet werden (Hsiao et al., 1996). Allerdings stellte sich ein Neuronenuntergang als Ausdruck konkreter Neurotoxizität nicht ein (Izariy et al., 1997a). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Untersuchungen, die ein transgenes Mausmodell, welches die APP-Mutation APP-Val717Phe überexprimierte (Games et al., 1995): Auch hier zeigten sich Amyloid- β -Ablagerungen, dystrophische Neurite und eine ausgeprägte Gliose, aber kein Neuronenuntergang (Izariy et al., 1997b). In einem weiteren Mausmodell, welches auf die Überexpression von A β ₄₂ und A β ₄₀ bei unverändertem APP-Stoffwechsel gerichtet war, zeigt sich, dass A β ₄₂ die maßgeblich aggregierende und sich ablagernde Amyloid-Spezies darstellte (Gowan

et al., 2005). Später stellte sich jedoch heraus, dass die kognitive Leistungsfähigkeit der Mäuse, die A β ₄₂ überexprimierten, trotz entsprechender Amyloid-Ablagerungen und Plaquebildung nicht eingeschränkt war (Kim et al., 2013). Angesichts dieser heterogenen und uneindeutigen Befunde wird kritisiert, dass das Herbeiführen einer Alzheimer-ähnlichen Demenz im (Nage-) Tiermodell nicht möglich ist und sich die entsprechenden Befunde deshalb nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen lassen (Herrup K, 2015).

3. Keine Besserung einer Demenz durch Anti-Amyloid- β -Therapien

Abgeleitet von den vielversprechenden Ergebnissen aus den Untersuchungen an Mäusen (Janus et al., 2000; Dodart et al., 2002) wurde die klinische Erprobung verschiedener Wirkstoffe zur Reduktion von Amyloid- β -Ablagerungen am Menschen eingeleitet. Die allermeisten dieser Wirkstoffe stellten sich jedoch als wirkungslos, wenn nicht gar kontraproduktiv heraus (Morris et al., 2018, Bullain und Doody, 2020). Ein entsprechender Rückschluss auf pathogenetische Kausalitäten durch wirksame Therapien vermuteter Auslöser ist also nicht zulässig.

4. Zweifelhafte Natur von Amyloid- β

Wie oben dargelegt, unterliegt die Entstehung von Amyloid- β und den wiederum daraus womöglich resultierenden Plaques einem komplexen Stoffwechselweg. Insbesondere die Annahme, dass es mit A β ₄₂ eine toxische, krankheitsverursachende Amyloid-Spezies gibt, wohingegen andere Amyloid-Spezies physiologisch (A β ₄₀) oder unspezifisch sind (A β ₃₇, A β ₃₈, A β ₄₃), könnte zu kurz greifen. Inzwischen werden eher qualitative als quantitative Veränderungen hinsichtlich der A β -Formen angenommen, die pathogen wirken (Benilova et al., 2012). Eine physiologische Funktion für bestimmte A β -Spezies könnte sich aus ihrer antimikrobiellen Wirkung erklären (Brothers et al., 2018).

Dabei sind auch methodisch-analytische Schwierigkeiten (etwa bei SDS-PAGE und Größenaufschluss-Chromatographie) aufgetreten, die eine eindeutige und objektivierbare Einordnung von Amyloid- β -Spezies erschweren (Karran und De Strooper, 2016). Ebenso scheint das biochemische Verhalten einzelner A β -Spezies sich erheblich danach zu unterscheiden, ob die Peptide synthetisch hergestellt

wurden, aus Zellkulturen stammen oder aus menschlichen Hirnen bzw. Liquor gewonnen wurden (Li und Selkoe, 2020). Dadurch wird eine Abgrenzung der in vivo zustande kommenden Aggregationsprozesse von lediglich unter Laborbedingungen auftretenden Phänomenen stark erschwert.

1.5 Die Präsenilin-Hypothese der Alzheimer-Demenz

Infolge der beschriebenen Schwächen der Amyloid-Hypothese wurde ein alternatives Erklärungsmodell in die Welt gerufen, die Präsenilin-Hypothese (Shen und Kelleher, 2007). Nach ihr lassen sich Gedächtnisverlust und Neurodegeneration weniger auf Amyloid- β zurückführen, sondern vielmehr auf einen Funktionsverlust der Präseniline hinsichtlich ihrer übrigen Aufgaben in der Nervenzelle abseits der Gamma-Sekretase-Funktion. Die Funktionen der Präseniline über die APP-Prozessierung hinaus sind vielseitig (De Strooper et al., 2012) und ein Verlust dieser Funktionen geht mit Synapsenverlust und Neurodegeneration einher (Zhang et al., 2013).

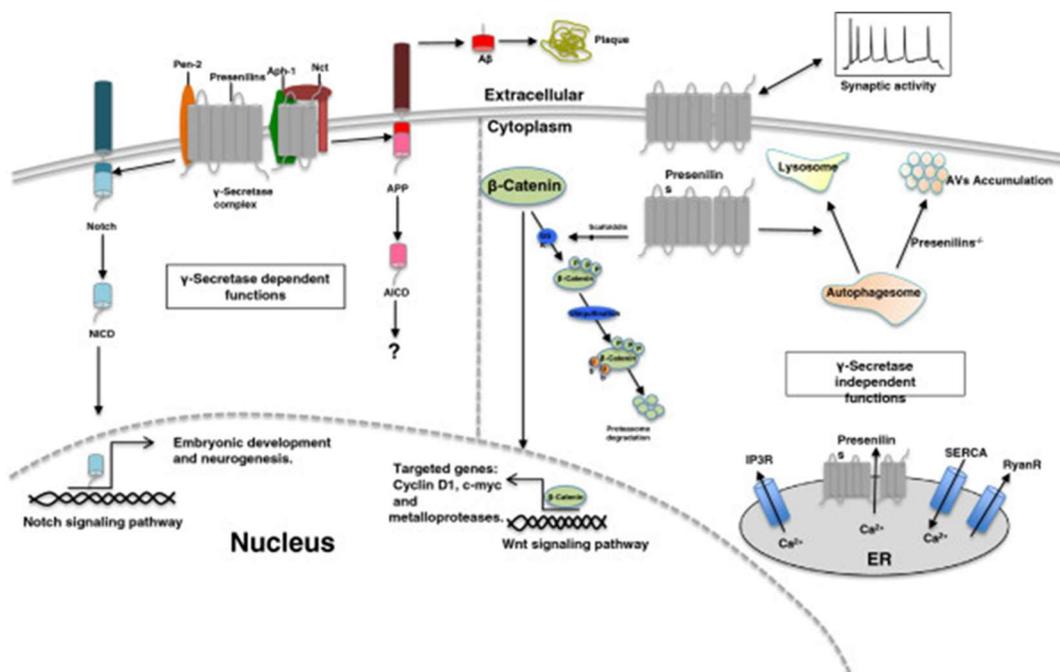


Abbildung 1.4. Darstellung der verschiedenen Gamma-Sekretase-unabhängigen Funktionen der Präseniline. Diese sind unter anderem in Lysosomen, Autophagosomen und im ER in Stoffwechselwege eingebunden.

Abbildung aus Zhang S, Zhang M, Cai F, Song W (2013), Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Transl Neurodegener*: 2(1):15.

1.6 Präseniline und Calcium-Dysregulation in der Alzheimer-Demenz

Ein besonderer Zusammenhang scheint zwischen den Präsenilinen und der neuronalen Calcium-Homöostase zu bestehen. Calcium spielt als Sekundärsignal eine wesentliche Rolle in diversen Signalwegen von Neuronen. Das Aufrechterhalten der intrazellulären Homöostase ist dabei ein hochkomplexer Prozess, der durch transmembranöse Calciumkanäle (NMDA-Rezeptoren, spannungsgesteuerte Kanäle ((VGCC)), transient receptor potential channels (TPCR)) sowie durch intrazelluläre Calciumlager (ER, Mitochondrien) gesteuert wird (Berridge MJ, 1998). Während Veränderungen im neuronalen Calcium-Stoffwechsel im Rahmen physiologischen Alterns beobachtet werden können (Mattson und Magnus, 2006), kommt es im Falle der Alzheimer-Demenz zu einer nachhaltigen Störung der neuronalen Calcium-Homöostase, die schon früh identifiziert und mit der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht wurde (Khachaturian ZS, 1987). Dass eine gestörte Calcium-Homöostase der klassischen Alzheimer-Pathologie zeitlich vorangeht, hat zur Aufstellung der „Calcium-Hypothese“ geführt, nach der diese Dysregulation ein krankheitsauslösendes Merkmal sein soll (Stutzmann GE, 2007). Evidenz für eine solche Vermutung speist sich insbesondere aus der Vielzahl von Studien, die eine Störung der Calcium-Homöostase mit Mutationen in Präsenilinen in Verbindung bringen konnten. So wurde gezeigt, dass humane Fibroblasten, die PS1-Mutationen tragen, im Falle einer Aktivierung des IP3-Signalweges (durch Bradykinin) einen stark erhöhten Calciumausfluss aus dem ER im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten aufweisen (Ito et al., 1994). Ebenso verstärkte eine PS1-Mutation (PS1-Leu286Val) in PC12-Zellen die Calcium-Antwort des ER auf bestimmte Agonisten (Bradykinin und Carbachol); ein Effekt, der durch einen Antagonisten am ER (Dantrolen) sowie am VGCC (Nifedipin) aufgehoben werden konnte (Guo et al., 1996). Hippocampale Neurone aus Knock-in-Mäusen, die die Mutation PS1-Met146Val trugen, zeigten eine signifikant stärkeren intrazellulären Calciumanstieg infolge einer Glutamatrezeptoraktivierung im Vergleich zum PS1-WT (Guo et al., 1999). Entsprechende Ergebnisse erzielte eine Untersuchung durch Stimulation des Calciuminfluxes mittels dem Oberflächenrezeptoragonisten Bradykinin (Leissring et al., 2000). Auch in Synaptosomen gewonnen aus transgenen Mäusen (Überexpression von PS1-M146L oder PS1-Met146Val) ließ sich durch Applikation

von Kaliumchlorid (KCl) eine deutliche Steigerung des Calciuminflux sowie ein länger dauerndes Plateau generieren (Begley et al., 1999). Diese Eigenschaft fand sich auch in *Xenopus*-Oozyten: cRNA-Injektionen der Mutation PS1-Met146Val führten im Vergleich zum PS1-WT und Wasserinjektion zu einem stärkeren IP₃-medierten Calciuminflux (Leissring et al., 1999a). Dieselbe Gruppe konnte für die Mutationen PS2-Asn141Ile und PS2-Met239Val analoge Ergebnisse nachweisen (Leissring et al., 1999b). Weiterhin zeigte sich an PC12-Zellen sowie hippocampalen Neuronen von Knock-In-Mäusen, die die PS1-Met146Val- bzw. die PS1-Leu286Val-Mutation trugen, dass PS1-Mutationen zu einer gesteigerten Expression von Ryanodin-Rezeptoren sowie zu einer gesteigerten Calciumantwort (durch Agonismus mittels Caffein) führen (Chan et al., 2000). Es spricht also einiges dafür, dass Präseniline, die sich auch in räumlicher Nähe zum ER (Annaert et al., 1999) befinden, womöglich dessen Calcium-Signaltransduktion beeinflussen und so in die neuronale Calcium-Homöostase eingreifen. Sogar in der *Drosophila*-Fliege lassen sich durch Reduktion von Präsenilin-Leveln Lern- und Gedächtnisstörungen herbeiführen, die interessanterweise durch genetische Reduktion von unter anderem IP₃R wieder ausgeglichen werden konnten (McBride et al., 2010).

Diese Störung der zellulären Calcium-Homöostase in Gestalt gesteigerter zytosolischer Calciumspiegel scheint die Amyloid- β -Produktion nachteilig zu beeinflussen: Dies wurde etwa gezeigt durch die experimentelle Herbeiführung gesteigerter intrazellulärer Calciumspiegel durch das Calcium-Ionophors (Porenbildendes Molekül; hier A23187) in HEK-293-Zellen (Querfurth und Selkoe, 1994). Entsprechende Versuche in primären kortikalen Neuronen gewonnen aus Ratten bestätigten eine gesteigerte A β ₄₂-Produktion infolge gesteigerter Calciumeinströme, wobei die Amyloid- β -Akkumulation zum Zelltod führte (Pierrot et al., 2004). Weitere Evidenz für einen Einfluss einer Calcium-Dysregulation auf Amyloid- β -Pathologien ergeben sich aus der Koinzidenz erhöhter intrazellulärer Calcium-Ruhelevel und neuropathologisch nachweisbarer Plaques in der 3xTg-Alzheimer-Maus (Lopez et al., 2008) bzw. Amyloid-Ablagerungen im lebenden Tiermodell (Kuchibhotla et al., 2008). Auf struktureller Ebene ist darüber hinaus der erhebliche Einfluss einer gestörten Calciumregulation hinsichtlich Aufbaus und Funktion von Synapsen gut bekannt (Bezprozvanny und Mattson, 2008).

1.6.1 Störungen im IP₃-Signalweg

Eine besonders wichtige Rolle in der Regulation des ER-Calciums spielen die Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptoren (IP₃R) und die mit ihnen verbundenen Signalwege. Störungen im IP₃-Signalweg sind ein typischer Befund bei neurodegenerativen Erkrankungen, da sie nicht nur bei der Alzheimer-Demenz, sondern auch bei der Huntington'schen Erkrankung, der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und spinocerebellären Ataxien (SCA) nachgewiesen werden konnten (Egorova und Bezprovanny, 2018).

1.6.1.1 Aufbau des IP₃-Signalweges

Der IP₃-Signalweg ist in eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse eingebunden, die sich zwischen den verschiedenen Organen stark unterscheiden (Berridge MJ, 2016). Grundsätzlich Beginn des Signalweges ist die Aktivierung zellulärer Oberflächenrezeptoren in Gestalt G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Protein-Tyrosin-Kinase-assoziierte Rezeptoren (PTKR) durch externe Stimuli. Die Kopplung an die Rezeptoren führt jeweils zur Aktivierung einer Phospholipase C (PLC). Diese spaltet Phospho-Inositol-Diphosphat (PIP₂) zu IP₃ und Diacyl-Glycerin (DAG). DAG aktiviert sodann die Proteinkinase C (PKC), wohingegen IP₃ zu seinem Rezeptor IP₃R in der Membran des ER diffundiert und diesen bindet. Bindet simultan Calcium an den IP₃R, so kommt es im Wege dieser Kostimulation zu einer Konformationsänderung des IP₃R und damit zu einem Calciumausstrom aus dem ER (Berridge MJ, 2016). Der Abbau von IP₃, um die calciumfreisetzende Wirkung zu beenden, wird durch IP₃-3-Kinasen und durch Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatasen herbeigeführt. Durch wiederholte Dephosphorylierungen entsteht schließlich Inositol-Monophosphat (IP₁), welches so dann durch die Inositolmonophosphatase (IMPase) in einen Phosphatrest und in freies Inositol gespalten wird. Letzteres ist Substrat zur Neugewinnung frischer Inositolphosphate (Berridge MJ, 2016).

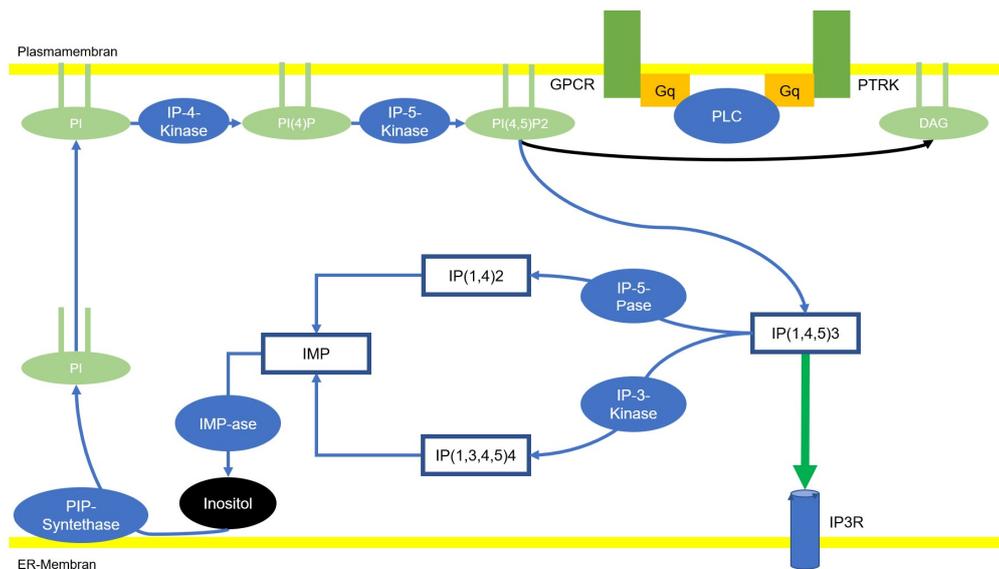


Abbildung 1.5. Übersicht zum Signal- und Stoffwechselweg von IP₃.

In Neuronen (und anderen exzitatorischen Zellen) bedarf es eines primären Calciumsignals, um das für die Kostimulation erforderliche Calcium bereitzustellen. In Nervenzellen erfolgt dieses primäre Calciumsignal über die Aktivierung von L-Typ-Calciumkanälen in der Plasmamembran, die ihrerseits depolarisationsabhängig über Synapsen aus Kletterfasern aktiviert werden. Demgegenüber wird die IP₃-Generierung in Neuronen über metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) aus Parallelfasern vermittelt (Glutamat → metabolischer Glutamatrezeptor → PLC-Aktivierung → IP₃-Genese → Aktivierung des IP₃-Rezeptors gemeinsam mit Calcium). Für einen IP₃R-vermittelten Calciumausstrom aus dem ER in das Zytosol ist also die Aktivierung über zwei unabhängige Stimuli (Calcium über Synapsen der Kletterfaser und Glutamat über Synapsen der Parallelfaser) erforderlich, was einem Koinzidenzprinzip entspricht. Dieser bemerkenswerte Mechanismus ist das molekulare Korrelat einer als Langzeit-Depression („long-term depression“; LTD) bezeichneten Form synaptischer Plastizität (Berridge MJ, 2016). Der zunächst für das Cerebellum beschriebene Effekt der LTD ergibt sich dabei aus den dortigen anatomischen Besonderheiten: Purkinje-Zellen erhalten an exzitatorische Potentialen jeweils den Input von einer einzigen assoziierten Kletterfaser aus der inferioren Olive sowie von einer Vielzahl von Parallelfasern, die den Axonen der Granularzellen entspringen. Wenn die Purkinje-Zelle über diese Afferenzen gleichzeitig und wiederholt stimuliert

wird, so führt dies schließlich zu einer Inhibition der exzitatorischen Aktivität der Purkinje-Zelle (Ito M, 2001). Dieser zunächst für Purkinje-Zellen des Cerebellums entwickelte Mechanismus ist heute allgemein anerkannt als physiologisches Korrelat synaptischer Plastizität und damit auch der Gedächtnisbildung. Über diese Starter-Funktion der Calciumausschüttung in das Zytosol kommt es dann zu einer sekundären Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren (RyR), die ihrerseits als ER-ständige Calciumkanäle die intrazellulären Calciumspiegel weiter erhöhen (Calcium-induzierte Calciumeinstrom (CICR; Berridge MJ, 1998). Dieses Calcium-Signaltransduktion spielt in Neuronen neben der Gedächtnisbildung auch eine Rolle im Axonenwachstum, in Hirnrhythmen und allgemeiner Exzitabilität von Nervenzellen und in der Gentranskription (Berridge MJ, 2016).

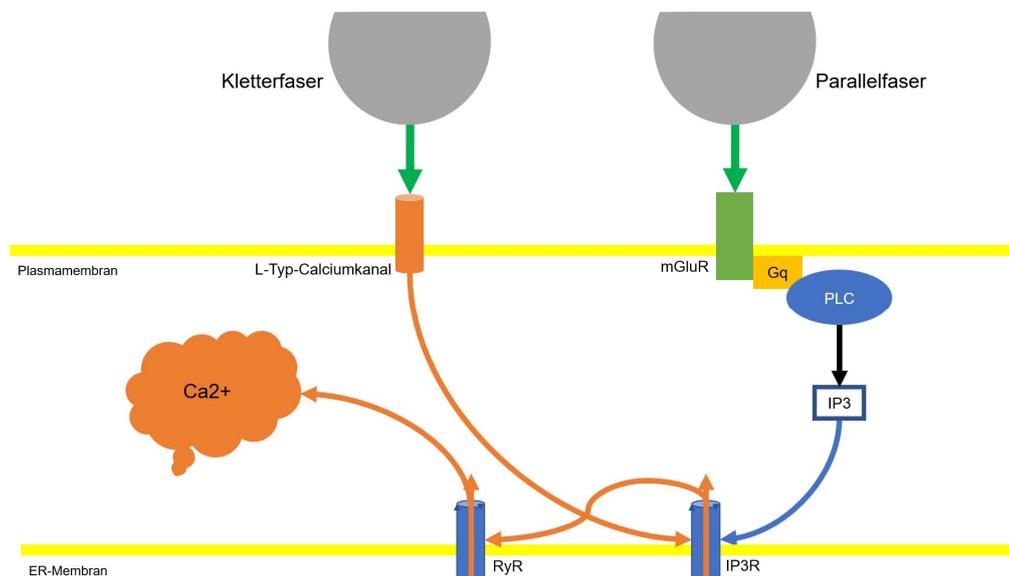


Abbildung 1.6. Übersicht zur Calciumfreisetzung in Neuronen über die Koaktivierung von IP3R durch Calcium und IP3 an der Synapse.

Studien haben die Bedeutung der IP₃R1-Kanäle für synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung eindrucksvoll unterfüttert. Bei experimenteller Ausschaltung (knock-out) des IP₃R1-Gens ist zerebellares LTD nicht möglich (Inoue et al., 1998). Umgekehrt kommt es durch Injektion des IP₃R1-Kanalblockers Xestospongin C (XeC) in den medialen präfrontalen Kortex von Ratten zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses (Brennan et al., 2008). Diese Befunde legen nahe, dass der IP₃-Signalweg von besonderer Bedeutung für die synaptische Plastizität und damit für die Gedächtnisbildung ist (Berridge MJ, 2016).

1.6.1.2 Struktur des IP₃-Rezeptors

Herzstück des IP₃-Signalweges ist der IP₃-Rezeptor: Dies ist ein calciumselektiver Ionenkanal, der vorwiegend im ER exprimiert wird, wobei drei Subtypen unterschieden werden. Im zentralen Nervensystem wird ganz vorwiegend IP₃R Typ 1 (IP₃R1) exprimiert. Für den erstmals 1989 beschriebenen (Mignery et al., 1989) IP₃R1 liegt seit 2015 eine Cryo-EM-Struktur vor (Fan et al., 2015). Der IP₃R1 ist ein homotetrameres Protein, dessen vier Untereinheiten sich jeweils aus 2749 Aminosäuren (Molekulargewicht von 314 kDa) zusammensetzen. Eine einzelne Untereinheit ihrerseits umfasst 10 Domänen und lässt in vier funktionelle Bereiche einteilen (Egorova und Bezprovanny, 2018): N-terminal kommt zunächst eine ligandenbindende Domäne (Reste 1 – 604), in der unter anderem auch das Signalmolekül IP₃ bindet. Daran anschließend folgt eine regulatorische Domäne (Reste 605 – 2272), in der die Aktivität des Kanals etwa durch Bindung von Calcium reguliert wird. Daran anschließend findet sich die porenbildende Region mit sechs Transmembrandomänen (Reste 2273 - 2600). Die C-terminale Region (2601 – 2749) ist im Vergleich zu anderen Rezeptoren (etwa RyR) ungewöhnlich lang und dient womöglich einer intramolekularen Interaktion (Fan et al., 2015). Für IP₃R1 sind diverse Bindungspartner beschrieben, die vermutlich sämtlich einen regulatorischen Einfluss ausüben (Foskett et al., 2007). Eine Übersicht zu Eigenschaften und Bindungspartnern anhand der Primärstruktur ist in Abb. 1.7 zu sehen, eine Cryo-EM-Aufnahme der Quartärstruktur des IP₃R1 ist in Abb. 1.8 dargestellt

1.6.1.3 Regulation des IP₃R1

Der IP₃R1 unterliegt einer komplexen Regulation. Neben den Hauptregulatoren in Gestalt von IP₃ und cytosolischem Calcium sind hieran auch eine Reihe von Proteinen beteiligt. So führt das ausschließlich neuronal exprimierte calcium-binding protein 1 (CaBP 1) durch direkte Bindung mit IP₃R1 zu einer verminderten Sensitivität des Kanals auf IP₃ und damit zu einer Inhibierung des Calciumausstroms (Li et al., 2013). IRBIT (IP₃R1 binding protein released withinositol 1,4,5-trisphosphate) hemmt die IP₃R1-Aktivität, indem dieses Protein mit dem Liganden IP₃ durch eigene Bindung an IP₃R1 um die Bindungsstelle konkurriert (Ando et al., 2014). Eine weitere Gruppe von Modulatoren, die einen wesentlichen Einfluss auf die Apoptose der Zelle haben und diese über eine Calcium-Signaltransduktion regulieren, sind die Mitglieder der Bcl-Familie: So interagieren Bcl-2 (Chen et al., 2004), Bok (Schulman et al., 2013) und Bcl-X_L (Yang et al., 2016). Über eine Bindung des Huntingtin-assoziierten Proteins 1a (HAP1A) an IP₃R1 vermittelt dieses die Komplexbildung von IP₃R1 mit dem Huntingtin-Protein (Htt) und trägt so zur Pathophysiologie der Huntington'schen Erkrankung bei (Tang et al., 2003). Weitere Proteine, die die IP₃R1-Aktivität im Wege einer direkten Interaktion beeinflussen, sind RACK1, die Chromogranine A und B, ERp44, GAPDH sowie Adapterproteine wie Protein 4.1N, Homer1 und Ankyrin (Foskett et al., 2007). Weiterer Mechanismus der Regulation von IP₃R1 ist die Phosphorylierung durch diverse Kinasen wie die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die Proteinkinase C (PKC) und verschiedene Proteintyrosinkinasen (Egorova und Bezprovanny, 2018). Die Quervernetzung des Aminosäurerests Gln2746 mit Lysinresten durch die Transglutaminase 2 (TG2) führt zu einer allosterischen Hinderung von IP₃R1 und damit zu einem verminderten Calciumausstrom (Hamada et al., 2014).

1.6.1.4 Der IP₃-Signalweg und die Alzheimer-Demenz im Speziellen

Die ersten Hinweise, dass Störungen im IP₃-Signalweg eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz spielen könnte, ergaben sich aus dem Befund, dass die Stimulation des IP₃-Signalweges in PS1-Mutation-exprimierenden Zellen zu einem deutlichen Anstieg des Calciumeinstroms führt (Guo et al., 1996,

Guo et al., 1999, Leissring et al., 2000). Fibroblasten, die aus FAD-Patienten gewonnen und kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu Fibroblasten aus Kontrollpatienten eine signifikante stärkere Calciumfreisetzung infolge einer Aktivierung des IP₃-Signalwegs durch die Agonisten Bradykinin (Konz. von 100 pM) und Bombesin (Konz. von 1 μM). Diese Ergebnisse eigneten sich sogar für eine diagnostische Differenzierung von FAD-Patienten und Kontrollen (Hirashima et al., 1996). Neurone gewonnen aus transgenen Mäusen, die die PS1-Met146Val-Mutation anstelle des PS1-WT in sich trugen, wiesen einen um das Dreifache gesteigerten Calciumausstrom nach photochemischer IP₃-Aktivierung gegenüber non-transgenen Mäusen auf (Stutzmann et al., 2004). Infolge dieser Erkenntnisse wurde zunehmend nach einem biochemischen Mechanismus zwischen Präsenilinen und Bestandteilen des IP₃-Signalweges, insbesondere dem IP₃R1, gefahndet. Einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Präsenilinen und dem IP₃R1 legten dabei Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Cheung (Cheung et al., 2008) nahe: Sie maßen die elektrophysiologische Aktivität von IP₃R1 (bzw. dem Analogon in Sf9-Insekten) in Sf9-Zellen, die entweder gar keinen Vektor, PS1-Wildtyp oder die PS1-Met146Leu-Mutation exprimierten (Abb. 1.9).

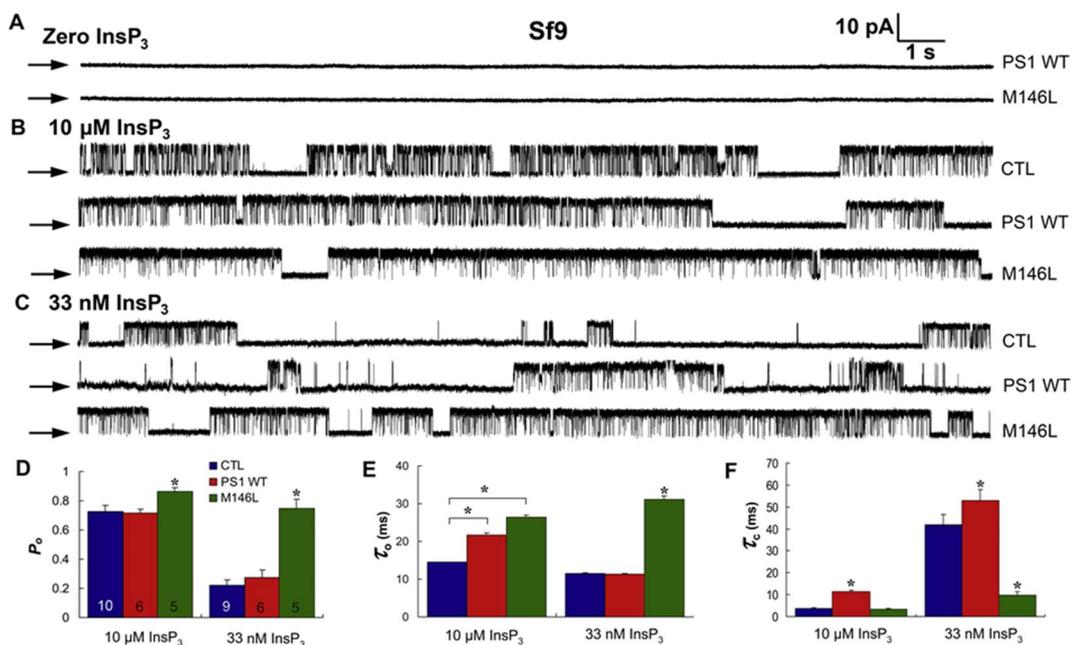


Abbildung 1.9. Elektrophysiologische Eigenschaften von IP₃R1 ohne IP₃ (A), nach Stimulation durch IP₃ in hoher Konzentration (B) bzw. in niedriger Konzentration (C) nach Expression von IP₃R1 allein (blau) bzw. als Koexpression mit PS1-WT (rot) oder PS1-Met146Val (grün) in Sf9-Insektenzellen. In (D) sind die entsprechenden Daten grafisch aufgetragen für die Offenwahrscheinlichkeit (P_o), die mittlere Öffnungsdauer (T_o) sowie die mittlere Schließungsdauer (T_c).

Aus Cheung KH, Shineman D, Müller M, et al. (2008), Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP₃ receptor channel gating. *Neuron*: 58(6): 871–883.

Dabei wurde nach Transfektion der Sf9-Zellen mit den beiden Konstrukten die Nuclei dieser Zellen isoliert, die entsprechend dem ER in ihrer äußeren Membran Präsenilin als Holoprotein und das IP₃R1-Analogon enthalten. Als Parameter für die Aktivität des IP₃R1 wurden die Offenwahrscheinlichkeit, die mittlere Öffnungsdauer und die mittlere Schließungsdauer definiert. Nach Zugabe von IP₃ in sättigender (10 µM) sowie in subsättigender (33 nM) Konzentration waren Offenwahrscheinlichkeit und mittlere Öffnungsdauer im Falle der PS1-Mutation im Vergleich zu Wildtyp und Leervektor stark erhöht. Besonders zeigten sich diese Effekte in der niedrigeren, physiologischen Konzentration von 33 nM IP₃.

Sehr ähnliche Befunde erhoben die Autoren in derselben Studie für ein anderes Zellsystem (DT40-Zellen aus Hühnern). Sie werteten die beobachteten Effekte als Ausdruck einer gesteigerten Sensibilität der IP₃R1 auf ihren Liganden IP₃ in Anwesenheit der Präsenilin-Mutation. Präseniline könnten also einen direkten Modulator der IP₃R1-Aktivität darstellen, wobei PS-Mutationen zu einer Überfunktion dieser Calciumkanäle und so zur gestörten Calcium-Homöostase beitragen. Weitere Experimente dieser Arbeitsgruppe, die weitere PS-Mutationen in auch neuronalen Zellsystemen (Primäre kortikale Neurone aus der 3xTg-Alzheimermaus, humane B-Zell-Lymphoblasten und embryogene Mausfibroblasten) in Hinblick auf die IP₃R1-Aktivität untersuchten, stützten diese Hypothese (Cheung et al., 2010). Bemerkenswerterweise konnte diese Arbeitsgruppe auch zeigen, dass in einem IP₃R-defizientem Zellsystem (DT40-IP₃R-Knock-out-Zellen) die Expression von PS1-Met146Val sowie von APP (in Form des APP_{SWE}) zu einer erheblichen Produktionssteigerung von Aβ₄₂ und Aβ₄₀ führt, was sich auch in einer Erhöhung der Aβ₄₂/ Aβ₄₀-Ratio niederschlägt (Cheung et al., 2008). Neben diesem bedeutenden Zusammenhang zu Merkmalen der allgemeinen Alzheimer-Pathologie konnten günstige Effekte infolge einer Reduktion der IP₃R-Aktivität beschrieben werden. So führte die Überexpression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2, welches als direkter IP₃R-Inhibitor agiert, in 3xTg-Alzheimermäusen zu verminderten Amyloid-Ablagerungen sowie neurofibrillären Tangles (Rohn et al., 2008). Darüber hinaus ließ sich durch entsprechende Kreuzungen von 3xTg-Alzheimermäusen mit IP₃R1-defizienten Mäusen die IP₃R1-Expression um die Hälfte reduzieren, was zu einer Normalisierung der zellulären Calciumhomöostase und bemerkenswerterweise auch zu einer Reduktion der

kognitiven Beeinträchtigungen und Alzheimer-assoziierten Pathologien in diesen Tieren führte (Shilling et al., 2014). In jüngster Zeit konnte in Übereinstimmung mit den Befunden von Shilling gezeigt werden, dass die intracerebroventrikuläre Applikation von Xestospongine C (XeC), einem reversiblen IP₃R1-Antagonisten, einen positiven Einfluss auf kognitive Defizite und Alzheimer-assoziierte Pathologien in APP/PS1-Mäusen hat (Wang et al., 2019). Von besonderer Bedeutung scheint auch der Einfluss einer gestörten IP₃R-Signaltransduktion auf neuronale Mitochondrien und den Energiestoffwechsel der Zelle zu sein, wodurch sich der beobachtete Zelltod im Rahmen der Alzheimer-Demenz erklären lässt. Die Modellierung der beobachteten IP₃R-Überaktivität in PS-Mutationen-exprimierenden Zellen in Bezug auf relevante mitochondriale Stoffwechselprozesse legt nahe, dass diese Überaktivität zur Bildung von oxidativem Stress und einer verminderten ATP-Produktion führt (Rojas-Charry et al., 2020). Die kontinuierliche erhöhten intrazellulären Calciumspiegel überfordern die mitochondrialen Kapazitäten zur Pufferung, was über die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und so zur Induktion proapoptotischer Signale und zur Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies führt (Berridge MJ, 2011).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass zumindest bei den FAD eine unmittelbare Interaktion von PS1-Mutationen mit dem IP₃-Signalweg oder dessen Rezeptor einen zentralen Pathomechanismus darstellen könnten. Wie Präseniline auf molekularer Ebene aber diesen Einfluss nehmen und wodurch PS-Mutationen die beschriebenen Veränderungen herbeiführen, ist bis dato unklar. Aufgrund der zahlreichen Modulatoren von IP₃R1, die den Kanal durch eine direkte Interaktion beeinflussen, erscheint im Falle von Präsenilin eine solche durch eine direkte Bindung von einem oder beiden Präsenilinen denkbar.

1.7 Arbeitshypothese und Fragestellung

Hypothese dieser Arbeit ist, dass zwischen Präsenilin Typ 1 (PS1) und dem IP₃-Rezeptor Typ 1 (IP₃R1) eine Interaktion im Sinne einer direkten biochemischen Bindung besteht. Es ist also zu fragen, ob diese Hypothese durch Evidenz in Gestalt geeigneter Bindungsversuche gestützt werden kann. Die sich anhand des methodischen Vorgehens konkret ergebenden Fragen wurden demnach wie folgt definiert:

1. Binden die mittels eines GST-Tags purifizierte Proteine PS1 und IP₃R1 *in vitro* aneinander?
2. Binden die beiden Proteine im Rahmen einer Co-Immunopräzipitation aneinander?
3. Falls die Proteine aneinanderbinden, lassen sich spezifische, für die Bindung notwendige, Domänen identifizieren?
4. Falls die Proteine binden, wird diese Interaktion durch die Mutation PS1-E280A beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 2.1. Auflistung der eingesetzten Chemikalien unter Angabe des jeweiligen Herstellers. Die im Weiteren verwandte Abkürzung ist hinter dem jeweiligen Reagens angegeben.

0,2 % Triton X 100	ROTH, Karlsruhe
2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris) (hydroxymethyl)methan (BIS-TRIS)	Merck, Darmstadt
10x FastDigest® Puffer	Thermo Fisher Scientific, USA
10x T4 DNA Ligase Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
10x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, USA
10x FastDigest Puffer Green	Thermo Fisher Scientific, USA
6x DNA Loading Dye (6x Stopppuffer)	Thermo Fisher Scientific, USA
Acrylamid	ROTH, Karlsruhe
Agarosepulver	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Beta-Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich, München
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserum Albumin)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Coomassie-Brillant-Blau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
dNTP Mix (10 mM each)	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. R0193)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Thermo Fisher Scientific, USA

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 11965084)
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hefe (Bacto Yeast Extract)	ROTH, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-Thio- β -D-Galaktopyranoside (IPTG, dioxane-free)	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. R0392)
Magermilchpulver Reform Instant	Frema Reform, Lüneburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	ROTH, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Nitrocellulose Membrane, 0.2 μ m	BioRad, München
Nonylphenoethoxylat (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 26616)
Phosphatase Inhibitor (Cocktail Tablets)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Protease Inhibitor (Cocktail Tablets)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Saccharose	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Sodiumdodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Tricine	Sigma-Aldrich, München
Trizma base (TRIS)	Sigma-Aldrich, München
Trizma hydrochloride (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA Solution (TE)	Thermo Fisher Scientific, USA
Trypton	ROTH, Karlsruhe
Tween® 20	ROTH, Karlsruhe
Zeocin™ Selection Reagent (Selektionsantibiotikum)	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.2. Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 2.2. Zusammensetzung der eingesetzten Puffer, Medien und Lösungen.

2xYT-Medium	16 g Trypton 10 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl 5 M NaOH (pH 7,0) Ad 1000 ml mit ddH ₂ O
IP Lysis/Wash Buffer zur Co-Immunopräzipitation von Thermo Fischer Scientific (nach Herstellerangaben)	0,025 M Tris 0,15 M NaCl 0,001 M EDTA 1% NP-40 5% Glycerol ad. 50 ml ad. pH 7.4

Laemmli-Puffer (4x)	3,03 g TRIS (0,25 M) 8 g SDS (%) 10% Beta-Mercaptoethanol (β -ME) 30 ml Glycerol (30%) 400 μ g Bromphenolblau (0,2%) ad. 100 ml mit ddH ₂ O.
Elektrophorese-Laufpuffer (10x)	30,3 g TRIS (0,25 M) 144,1 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1%) ad. 1l mit ddH ₂ O
LB-Agar	Zusammensetzung s. LB-Medium, zusätzlich 12g Agar 100 μ g/ml Ampicillin
LB-Medium	10g Trypton 5g Hefe-Extrakt 10g NaCl ad. 1l mit ddH ₂ O
NZY-Medium	Zusammensetzung wie LB-Medium, zusätzlich 12,5 ml 1 M MgCl ₂ 12,5ml MgSo ₄ 10ml 2M Glucose
Radioimmunoprecipitation assay-Puffer (RIPA-Buffer)	0,6 g TRIS 0,87 g NaCl 1 ml 1% Nonylphenoethoxylat (NP-40) 0,5 g Natriumdesoxycholot (0,5%) 0,1 g SDS (0,1%) ad. 100 ml mit ddH ₂ O ad. pH 8,0 mit HCl

Sandwich-Puffer (10x)	30,3 g TRIS (0,25 M) 144,1 g Glycin (1,92 M) Methanol (10 – 20%) ad. 1l mit ddH2O
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer 50x (TAE-Puffer)	242g TRIS 57,1ml Acetat 100ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad. 1000 ml mit ddH2O
Tris-buffered saline (TBS-Puffer)	6g TRIS 8,8g NaCl ad. 1000 ml mit ddH2O ad. pH 7,6 mit HCl
Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST)	1 ml Tween-20 ad. 1000 ml TBS

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3. Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien.

1,5ml Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
2ml Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
15 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	Greiner bio-one, Essen
14 ml PP-Röhrchen mit Zwei-Positionen- Belüftungsstopfen	Greiner bio-one, Essen
50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	Greiner bio-one, Essen
Amicon® Ultra-4 10K Zentrifugen-Filtereinheiten	Millipore, Schwalbach am Taunus
Kunststoffküvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipette Glas 230mm, steril	ROTH, Karlsruhe

Pinzetten	Biochem, Weilburg
Pipetten Serol 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Eppendorf, Hamburg
Kosmetiktuch 100er Box Samtess Clou Prestige	Wepa, Arnsberg-Müschede
Whatman® Gel Blot Paper 3MM	Sigma-Aldrich, München
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG Nürnbergrecht, (Produkt.-Nr. 83.3911)
Zellschaber	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.4. Kommerzielle Kits

Tabelle 2.4. Eingesetzte kommerzielle Kits und deren Hersteller.

GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 0701)
Immunoprecipitation Kit Dynabeads® Protein G	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 10007D)
NucleoBond® Xtra Midi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 23227)
Pierce Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 26149)
Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 21516)
Pierce® GST Spin Purification Kit, 1 mL	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 16107)
Pierce™ HRV 3C Protease Kit	Thermo Fisher Scientific, USA (Cat.No. 88946)

2.1.5 Plasmide

Tabelle 2.5. Eingesetzte Plasmide und deren Größe, Resistenzen und Herkunft.

Name	Größe (nativ)	Resistenzen
pcDNA3.1 mit Mock, PS1-WT, PS-E280A, PS1-Δ9	5428/5427 bp	Ampicillin; Neomycin
pGEX-6P-1	4984 bp	Ampicillin
pIRES2-IP3R1-EGFP	Ca. 13 500 bp	Kanamycin; Neomycin

2.1.6 Primer

Tabelle 2.6. Eingesetzte Primer und deren Sequenz. Die Primer wurde sämtlich von Sigma-Aldrich, München, bezogen.

Primername	Sequenz
5'pGEX-6P-1	GGC TGT GCA GGT CGT AAA TC
5'GSTnhe1	CCG GCT AGC ATG TCC CCT ATA CTA GGT TA
5'IP3R1-CTF	CCG GAA TTC GTG GGC TAC CTG TTC TTC AA
3'IP3R1-CTF	CCG CTC GAG TTA GGC TGG CTG CTG TGG
3'PS1xhoI	CCG CTC GAG CTA GAT ATA AAA TTG ATG G

2.1.7 Enzyme

Tabelle 2.7. Eingesetzte Restriktionsenzyme und deren jeweilige Schnittsequenz. Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fischer Scientific bezogen.

Name	Schnittsequenz
EcoR I	GAA TTC
Nhe I	GCT AGC
Xho I	CTC GAG

2.1.8 Zellreihen und Bakterienstämme

Tabelle 2.8. Eingesetzte Zellreihen und Bakterienstämme sowie deren Herkunft.

MEF-PS1 ^{-/-} /PS2 ^{-/-}	Bart de Strooper, VIB Leuven, Belgien
NEURO-2A (N2a)	ATCC (interne Modifikation)
Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells – Novagen	Merck KGaA, Darmstadt (Cat.No. 71400)
XL10-Gold Ultracompetent Cells (XL10)	Agilent Technologies, USA

2.1.9 Software

Tabelle 9. Eingesetzte Software und deren Hersteller.

Name	Herkunft
Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Microsoft Excel für Office 365	Microsoft
SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal	SIB Swiss Institute of Bioinformatics

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2.10. Eingesetzte Antikörper, deren Epitope, Spezieszugehörigkeit und Hersteller.

Name	Epitop	Spezies	Hersteller
Bcl-2 (cs2872)	Komplettes bcl-2	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Cyclophilin D (E11AE12BD4)	Nicht angegeben	Maus	Merck Millipore
Cytochrome C (cs4272)	Komplettes Cytochrom C	Kaninchen	Cell Signaling Technology
ERp44 (cs2886)	Komplettes ERp44	Kaninchen	Cell Signaling Technology

GST-Tag (tfsA-5800)	Glutathione S-transferase	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific
Homer1 (ab184955)	Zwischen den Aminosäuren 100 – 250	Kaninchen	abcam
INPP5A	Zwischen den Aminosäuren 288 – 387	Maus	Abnova
ITPKA (sc11206)	N-terminales Ende von ITPKA	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
ITPKA (sc271838)	Zwischen den Aminosäuren 2 – 25	Maus	Santa Cruz Biotechnology
IP3R1 (sc271197)	Aminosäuren 1894-1973 von IP3R1	Maus	Santa Cruz Biotechnology
IP3R-I/II/III (sc377518)	Aminosäuren 2402-2701 von IP3R2	Maus	Santa Cruz Biotechnology
IP3R1-CTF (ABS55)	Zytoplasmatische Domäne von IP3R1	Kaninchen	Merck Millipore
Nicastrin (sc376513)	Zwischen den Aminosäuren 23 – 59	Maus	Santa Cruz Biotechnology
PDI (SPC114)	Komplettes PDI	Kaninchen	StressMarq Biosciences
PS1-FL (ab71181)	PS1-Holoprotein		abcam
PS1-NTF1 (MAB1563)	N-terminales Ende von PS1 (Aminosäuren 21 – 80)	Ratte	Chemicon International
PS1-CTF (cs3622)	C-terminales Ende von PS1 (rund um Aminosäure 293)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
PS1-loop (MAB5232)	Loop (Aminosäuren 276 – 378)	Maus	Chemicon International
PS1-NTF2 (ab15456)	N-terminales Fragment (Aminosäuren 21 – 34)	Maus	abcam
Synthase C (ab181243)	C-terminales Ende (ab Aminosäure 50)	Kaninchen	abcam

2.1.11 Geräte

Table 2.11. Eingesetzte Geräte sowie deren Hersteller.

Blotting-Kammer (Mini Trans-Blot® Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Größenausschluss-Chromatographie-Säule (Superose™ 12 10/300 GL)	GE Healthcare
Säulenzentrifuge (Megafuge 3.0R)	PROFCONTROL GmbH, Potsdam
Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge 5418R	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät zum Zellaufschluss (Branson Digital Sonifier 250 Cell Disruptor)	Branson Ultrasonics Corporation, USA
Vortexer (IKA Vibrofix VF1 Schüttelmaschine)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden
Zentrifuge 5430R (Großzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810R (Durchgangsraum)	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Beschreibungen der molekularbiologischen Methoden

Im Folgenden werden nun zunächst die generellen molekularbiologischen Versuchsanordnungen beschrieben, insoweit sie für die jeweiligen Experimente verallgemeinerbar sind. Dies umfasst etwa den Enzymverdau, die Ligation oder die Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie die Konstruktion spezifischer DNA-Vektoren in Form von Plasmiden (vgl. Feinbaum, 1998). Wenn im Einzelfall von diesen Versuchsanordnungen abgewichen wurde, so ist dies in den betreffenden Abschnitten beschrieben. Die jeweiligen spezifischen Reaktionsansätze und konkreten Durchführungsbedingungen der Experimente sind tabellarisch dargestellt.

2.2.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli vom Typ XL10-Gold Ultracompetent Cells (XL10)

Zur Herstellung der erforderlichen Plasmide war zunächst die Gewinnung ausreichend großer Mengen an DNA notwendig. Hierzu muss das betreffende Plasmid in Bakterien eingebracht werden, sodann werden diese in Kultur vermehrt und schließlich derart aufgeschlüsselt, dass die vervielfältigten Plasmide gewonnen werden können. Der als Transformation bezeichnete Vorgang des Einbringens von Plasmiden in Bakterien (Seidman et al., 2001) kann durch verschiedene Methoden realisiert werden, wobei im vorliegenden Fall das Hitzeschock-Verfahren genutzt wurde. Durch kurzfristiges Erhitzen von E. coli-Bakterien auf 42°C bilden sich Poren in deren Zellwand, wodurch die Plasmid-DNA in das Innere der Zelle gelangt. Wird der Hitzeschock sodann beendet, werden die Plasmide im Weiteren infolge Zellwachstums und -vermehrung vielfach kopiert. Der hierzu verwandte Bakterienstamm hieß XL10-Gold® Ultracompetent Cells, ein E. coli-Stamm des Herstellers STRATAGENE, der infolge von Herstellermodifikationen besonders günstige Eigenschaften zur Plasmidkonservierung bzw. -vermehrung aufwies.

Die Transformation der XL10 erfolgte dabei nach Herstellerangaben: Nach dem kurzzeitigen Auftauen und vorsichtigem Durchmischen der Bakterien auf Eis wurden 50 µl bakterienhaltiger Lösung in eisgekühlte 15 ml Tubes mit

abgerundetem Boden übertragen. Sodann wurden 2 µl Beta-Mercaptoethanol hinzugegeben und das Gemisch für 10 Minuten auf Eis mit gelegentlichem vorsichtigem Durchmischen inkubiert. Dann wurden 5 µl der das Plasmid enthaltenden DNA hinzugefügt und dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation eines Hitzeschocks bei 42°C für 30 Sekunden im Wasserbad. Hiernach wurden die Röhrchen zwei Minuten auf Eis gekühlt. Währenddessen wurden 500 µl des Nährmediums NZY⁺ im Wasserbad erwärmt und sodann in die Röhrchen mit der Zelllösung hinzugegeben. Dann erfolgte eine 60-minütige Inkubation in einem Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C. Sodann wurden 100 µl dieses Mediums auf LB-Agarplatten (mit Selektionsantibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37° inkubiert.

2.2.1.2 Transformation von Plasmiden in Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells

Die Transformation des Vektors pGEX-6P-1-GST-CTF in die Rosetta™ – Zellen diente der Expression des rekombinanten Proteins GST-CTF. Es wurde dabei entsprechend den Angaben des Herstellers (NOVAGEN) verfahren. Nach kurzzeitigem Auftauen und vorsichtigem Durchmischen der Bakterien auf Eis wurde 100 µl der Bakterien in eisgekühlte 1,5 ml Tubes übertragen. Dann wurden 1 µl des unter 2.2.2.2 hergestellten Ligationsansatzes, welcher das synthetisierte Plasmid enthielt, hinzugefügt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation eines Hitzeschocks bei 42°C für 30 Sekunden im Wasserbad. Hiernach wurden die Röhrchen zwei Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 µl des Nährmediums SOC (Raumtemperatur) in die Tubes mit dem Bakterien-Ligationsansatz-Gemisch hinzugegeben. Dann erfolgte eine 60-minütige Inkubation in einem Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C, um hiernach 100 µl dieses Mediums auf LB-Agarplatten (mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin) auszustreichen und über Nacht bei 37° zu inkubieren.

2.2.1.3 Anzüchtung von Bakterien in Kulturmedien

Die wie oben beschrieben transformierten Bakterien wurden nach der Über-Nacht-Inkubation zur Selektion auf antibiotikahaltige Agarplatten ausgestrichen. Die eingesetzten Plasmide enthielten stets ein Resistenzgen bezüglich eines

bestimmten Antibiotikums, um eine Selektion zu ermöglichen. Soweit ein E. coli-Klon das gewünschte Plasmid aufgenommen hatte, zeigte er sich gegenüber dem Selektionsantibiotikum resistent und wirkte kolonienbildend. Hierfür wurde die ausgestrichene Platte für 24 – 72 h inkubiert (bei 37°C oder Raumtemperatur). Anschließend wurden einige Klone aus der Vielzahl entstandener Kolonien auf der Platte mittels eines Bakterienpickers unter sterilen Bedingungen entnommen. Dabei wurde jeweils ein einzelner Klon in 5 ml geeigneten Nährmediums mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum in einem 15-ml-Reaktionsgefäß mit abgerundetem Boden gelöst. Dieser Reaktionsansatz wurde für einige Stunde bei 37°C und 200 Umdrehungen/Minute in einem Schüttelinkubator inkubiert. Hieran schloss sich entweder die Weiterverarbeitung durch eine Mini-DNA-Präparation oder der Bewuchs größerer Mengen des Kulturmediums an. Im zweiten Fall wurde der bakterienhaltige Ansatz im Verhältnis 1:100 in antibiotikumhaltiges Medium überführt, welches in 500 ml-Inkubationsflasche mit maximaler Füllung von einem Drittel über Nacht bei 37° und 200 Umdrehungen/Minute wiederum im Schüttelinkubator inkubiert wurden (Elbing und Brent, 2019). Am Folgetag wurde die so behandelte Bakterienkultur auf 50-ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 4°C und 5 000 g für 10 Minuten in der Zentrifuge 5810R abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde gewogen und je nach Versuchsanordnung direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C zur Konservierung eingefroren.

2.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus dem gewonnenen Bakterienpellet erfolgte mittels des NucleoBond® Xtra Midi-Kits (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben.

2.2.1.5 Photometrische Analyse von DNA

Die durch Präparationen hergestellte Plasmid-DNA und ebenso die im Rahmen von PCR oder Restriktionsverdau gewonnene DNA wurde spektroskopisch oder photometrisch quantifiziert (Desjardins und Conklin, 2011). Hierzu wurden stets 5 µl der gelösten DNA (je nach Versuchsanordnung entweder in doppelt-destilliertem Wasser oder in Elutionspuffer der jeweiligen Kits zur Aufreinigung resp. Präparation) in weiteren 95 µl doppelt-destillierten Wassers verdünnt, kurz gevortext und tischzentrifugiert. Anschließend wurde dieser Ansatz in eine Kürette mit einer

Schichtdicke von 1 cm übertragen und im Biophotometer oder mittels Nanodrop gemessen. Die ermittelten Werte wurden mit Hinblick auf Quantität und Reinheit der gewonnenen DNA analysiert.

2.2.1.6 Sequenzierung von DNA

Zur exakten Analyse der genomischen Sequenz wurden Proben isolierter und gereinigter DNA (entweder in Plasmid-Form oder als PCR-Fragment) an die Microsynth SeqLab, Göttingen, versandt und dort sequenziert.

2.2.1.7 Enzymatischer Restriktionsverdau

Zur Einfügung geeigneter Anheftungsstellen an DNA-Fragmente bzw. zur Linearisierung von Plasmiden erfolgte eine enzymatischer Verdau der DNA mittels Endonukleasen (Bloch und Grossmann, 1995). Zu diesem Zweck wurden Restriktionsenzyme der FastDigest®-Reihe von Thermo Scientific gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Es wurden ddH₂O, 10x-FastDigestpuffer, DNA sowie die entsprechenden FastDigest-Restriktionsenzyme in der genannten Reihenfolge in ein 100- μ l-Mikroreaktionsgefäß gefüllt. Dieses wurde sodann vorsichtig gemischt und kurz tischzentrifugiert. Sodann erfolgte die Inkubation in der PCR-Maschine bei 37°C für 30-60 Minuten, daran anschließend eine Abkühlung auf 4°C.

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung durch die Agarose-Gelelektrophorese diente der Kontrolle der erfolgreichen Plasmid-Isolation oder PCR sowie des korrekten Restriktionsverdaus. Für die grundsätzliche Prinzipien und die Beschreibung des exakten Vorgehens sei auf Voytas, 2000, verwiesen. Zunächst wurde Agarosepulver in TAE-Puffer im Verhältnis 1:100 gelöst, erhitzt und sodann als Gel in eine Elektrophoresekammer mit einer Schichtdicke von 3 – 4 mm gegossen. Mithilfe eines Kammes konnten Taschen in das Gel eingefügt werden, sodass die Proben und ein Marker zur Abschätzung der Laufzeiten der DNA-Fragmente jeweils einzeln aufgetragen werden konnten. Dann erfolgte die Separierung der verschiedenen Fragmente durch Anlegen einer Spannung von 110 V für etwa 90 Minuten. Im Anschluss an die Trennung wurde das Gel für 20 Minuten in ein

Ethidiumbromid-Bad gelegt und sodann unter UV-Licht hinsichtlich der Auftrennung der DNA-Fragmente beurteilt.

Im Falle einer weitergehenden Nutzung der aufgetrennten DNA-Fragmente (etwa zur Ligation) wurde ein leicht veränderter Versuchsbau gewählt. Dabei wurde ein dünneres Gel mit nur 0,6%igem Anteil Agarose hergestellt und die Laufspannung auf 60 V reduziert. Nach der Färbung durch Ethidiumbromid wurden die entsprechenden Fragmente aus dem Gel mithilfe eines Skalpell unter Verzicht auf UV-Durchleuchtung ausgeschnitten und in 1,5 cm-Tubes übernommen.

2.2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Sowohl die Weiternutzung von DNA-Fragmenten in Form von PCR-Produkten als auch in Form von Geleinschlüssen machte die anschließende Reinigung der DNA erforderlich hierbei wurde anhand des GeneJET PCR Purification Kits von Thermo Scientific nach Herstellerangaben vorgegangen. Dabei wurde nach Zugabe eines Volumenbindungspuffers zunächst das Gelstückchen bei 55°C geschmolzen, um die DNA wieder in Lösung zu bringen. Dann erfolgten mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte, um die DNA schließlich in Elutionspuffer zu lösen und so weiterverarbeiten zu können. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte in analoger Weise, wobei im Falle der PCR auf das Aufwärmen der ohnehin gelösten DNA verzichtet werden konnte.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch eine Ligationsreaktion (Lohmann et al., 2011) wurden korrespondierende Stellen von Insert- und Vektor-DNA-Fragment wieder zu einem Plasmid zusammengefügt. Dabei wurden zunächst Vektor-DNA (ca. immer 100ng), Insert-DNA (im fünffachen berechneten Verhältnis) zusammengefügt. Dieses DNA-Gemisch wurde dann für 5 Minuten auf 45° erhitzt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden Ligasepuffer und -enzym (entweder jeweils von ROBOKLON oder Thermo scientific) hinzugegeben. Schließlich wurde der Reaktionsansatz mit ddH₂O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde vorsichtig durchmischt, kurz zentrifugiert und bei 16°C über Nacht in der PCR-Maschine ohne Schütteln inkubiert.

2.2.1.11 PCR

Mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction; PCR), sowie bei Kramer und Coen, 2001, beschrieben, konnten DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Diese Technik wurde vielfach zur Vorbereitung einer Ligation oder zur Überprüfung korrekt eingesetzter DNA-Sequenzen eingesetzt. Die bei - 20°C gelagerten Komponenten (Primer, dNTP) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend kurz gevortext. Dann wurden die Reagenzien in der folgenden Reihenfolge zusammengegeben: Wasser entsprechend eines Reaktionsansatzes von insgesamt 50 µl je PCR-Tube, 10fach konzentrierter PCR-Puffer, dNTP, die jeweiligen Primers und die Template-DNA. Zum Schluss wurde die DNA-Polymerase hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde nun vorsichtig durchmischt, zu je 50 µl auf PCR-Tubes aufgeteilt, noch einmal kurz durchmischt und kurz mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Sodann wurden die befüllten PCR-Tubes in die PCR-Maschine eingesetzt und das entsprechende Protokoll der PCR gestartet.

2.2.2 Der Aufbau der molekularbiologischen Experimente im Einzelnen

2.2.2.1 Klonierung eines Vektors zur Expression von GST-PS1 in Zellen

Um die Bindungsversuche zwischen PS1 und den betreffenden Fragmenten von IP3R1 bewerkstelligen zu können, war zunächst die Schaffung eines geeigneten Expressionskonstruktes erforderlich. Hierzu war ein zweischrittiges Vorgehen notwendig: Im ersten Schritt musste das Zielgen (PS1) an den GST-Tag gekoppelt werden. Zu diesem Zweck wurde das PS1-Gen in das GST-haltige Plasmid pGEX-6P-1 hineinligiert. Anschließend wurde in einem zweiten Schritt das neu gewonnene Produkt aus GST und PS1 wieder aus dem pGEX-6P-1-Plasmid herausgeschnitten, um es in einen für die Expression in eukaryotischen Zellen günstigen Vektor (pcDNA3.1) wieder einzubringen. Dieses Produkt konnte sodann für die Expression in N2a- und MEF-Zellen verwandt werden. Das Plasmid pGEX-6P-1 wurde freundlicherweise von Giovanna Gallicotti gestellt. Ein PS1-haltiges Konstrukt (pcDNA3.1-PS1) wurde freundlicherweise von Diego Sepulveda-Falla gestellt.

Beide Plasmide wurden entsprechend des oben dargelegten Vorgehens in XL10-Gold® Ultracompetent Cells transformiert, in Kultur angezüchtet und schließlich mittels einer Midi-Präparation (NucleoBond® Xtra Midi) gewonnen. Nach photometrischer Bestätigung einer ausreichenden Menge der jeweilig isolierten DNA konnte der Restriktionsverdau erfolgen. Hierzu wurden sowohl pGEX-6P-1 als auch pcDNA3.1-PS1 mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Xho1 verdaut, um das herausgelöste PS1 in die pGEX-6P-1-Vektor einfügen zu können. Der Restriktionsverdau erfolgte dabei durch folgenden Reaktionsansatz:

Table 2.12. Restriction digestion of pGEX-6P-1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	41 µl
Reaktionspuffer	10x FastDigest® Buffer	6 µl
Plasmid (DNA)	pGEX-6P-1 (260 ng/µl)	7 µl (= 1,8 µg)
Restriktionsenzym #1	FastDigest® EcoR1	2 µl
Restriktionsenzym #2	FastDigest® Xho1	2 µl
Alkalische Phosphatase	FastAP® Thermosensitive Alkaline Phosphatase	2 µl
	Gesamt	60 µl

Table 2.13. Restriction digestion of pcDNA3.1-PS1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	47 µl
Reaktionspuffer	10x FastDigest® Buffer	6 µl
Plasmid (DNA)	pcDNA3.1-PS1 (360 ng/µl)	5 µl (= 1,8 µg)
Restriktionsenzym #1	FastDigest® EcoR1	2 µl
Restriktionsenzym #2	FastDigest® Xho1	2 µl
	Gesamt	60 µl

Im Anschluss an diese Restriktionsverdau wurden die gewonnenen Fragmente mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel zurückgewonnen und gereinigt. Nun wurden das für PS1 codierende DNA-Fragment in den Vektor pGEX-6P-1 hineinligiert. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Insert-Vektor-Verhältnis von 5:1 gewählt:

Table 2.14. Ligation of PS1 in pGEX-6P-1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	5 µl
Reaktionspuffer	10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
Vektor	pGEX-6P-1 (12 ng/µl)	8 µl (= 96 ng)
Insert	PS1 (20 ng/µl)	4 µl
Ligaseenzym	T4 DNA Ligase (ROBOKLON)	1 µl
	Gesamt	20 µl

Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurden 2 µl dieses Ansatzes in XL10-Gold Ultracompetent Cells transformiert. Nach der Kultivierung geeigneter Klone und der Herstellung ausreichender DNA-Mengen wurde das korrekte Vorliegen des gewünschten Plasmides (pGEX-6P-1-PS1) mittels PCR überprüft. Hierzu wurden die Primer 5'GSTnhe1 und 3'PS1FLxho im folgenden Reaktionsansatz eingesetzt. So konnte das gemeinsame Vorliegen von GST und PS1 überprüft werden.

Table 2.15. PCR zur Amplifikation von GST-PS1.

Komponente	Reagenz	Menge (Konz.)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	328,5 µl
Reaktionspuffer	10X DreamTaq Buffer	45 µl
Nukleotide	dNTP Mix (10 mM jew.) (Thermo scientific)	15 µl (0,33 mM)
5'Primer	5'GSTnhe1	22,5 µl (0,5 µM)
3'Primer	3'PS1FLxho	22,5 µl (0,5 µM)
Template DNA	pGEX-6P-1-PS1 (190 ng/ µl)	24 µl (= 4,5 µg)
DNA-Polymerase	DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	4,5 µl
	Gesamt	20 µl

Die entsprechende PCR wurde mit folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.16. Reaktionsbedingungen der PCR aus Tabelle 15.

Reaktionsschritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	94°C für 3 Minuten
1. Cycling (10x)	
Denaturierung	94°C für 20 Sekunden
Annealing	Gradient von 70° - 60°C für 30 Sekunden
Extension	72°C für 1 Minute
2. Cycling (25x)	
Denaturierung	94°C für 20 Sekunden
Annealing	Gradient von 70° - 60°C für 30 Sekunden
Extension	72°C für 80 Sekunden
Finale Extension	72°C für 7 Minuten

Im Anschluss an diese PCR erfolgte eine Gelelektrophorese, um die korrekte Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragmentes (GST-PS1) nachzuweisen.

Zur Gewinnung größerer Mengen dieses Fragmentes wurde der neu hergestellte Vektor (pGEX-6P-1-PS1) noch einmal im Rahmen einer weiteren Minipräparation hergestellt und sodann die PCR mit diesem DNA-Template in höherer Konzentration noch einmal durchgeführt mit nachstehenden Bedingungen:

Tabelle 2.17. PCR zur Amplifikation von GST-PS1.

Komponente	Reagenz	Menge (Konz.)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	329 µl
Reaktionspuffer	10X DreamTaq Buffer	45 µl
Nukleotide	dNTP Mix (10 mM jew.) (Thermo scientific)	15 µl (0,33 mM)
5'Primer	5'GSTnhe1	22,5 µl (0,5 µM)
3'Primer	3'PS1FLxho	22,5 µl (0,5 µM)
Template DNA	pGEX-6P-1-PS1 (400 ng/ µl)	12 µl (= 4,5 µg)
DNA-Polymerase	DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	4,5 µl
	Gesamt	450 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde zu je 50 µl auf insgesamt 8 PCR-Tubes aufgeteilt und die PCR mit dem folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.18. Reaktionsbedingungen der PCR aus Tabelle 17.

Reaktionsschritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	94°C für 3 Minuten
1. Cycling (10x)	
Denaturierung	94°C für 20 Sekunden
Annealing	Gradient von 71° - 64°C für 30 Sekunden
Extension	72°C für 1 Minute
2. Cycling (25x)	
Denaturierung	94°C für 20 Sekunden
Annealing	Gradient von 71° - 64°C für 30 Sekunden
Extension	72°C für 80 Sekunden
Finale Extension	72°C für 7 Minuten

Die aus der PCR resultierenden Produkte wurden mithilfe des GeneJET PCR Purification Kits nach Herstellerangaben gereinigt und konzentriert. Hieran wurde eine photometrische Messung von Reinheit und Konzentration angeschlossen.

Um eine ausreichende Kohäsion im Rahmen der durchzuführenden Ligation zu gewährleisten, wurden das gewonnene Fragment GST-PS1 und der Vektor pcDNA3.1 mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Hierzu wurden folgende Reaktionen angesetzt:

Tabelle 2.19. Restriktionsverdau von GST-PS1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	18 µl
Reaktionspuffer	10x FastDigest® Buffer	4 µl
PCR-Produkt	GST-PS1 (150 ng/µl)	14 µl (= 2,1 µg)
Restriktionsenzym #1	FastDigest® NheI	2 µl
Restriktionsenzym #2	FastDigest® XhoI	2 µl
	Gesamt	40 µl

Tabelle 2.20. Restriktionsverdau von pcDNA3.1-PS1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	42 µl
Reaktionspuffer	10x FastDigest® Buffer	6 µl
Plasmid-DNA	pcDNA3.1-PS1 (420 ng/µl)	6 µl (= 2,5 µg)
Restriktionsenzym #1	FastDigest® NheI	2 µl
Restriktionsenzym #2	FastDigest® XhoI	2 µl
Alkalische Phosphatase	FastAP® Thermosensitive Alkaline Phosphatase	2 µl
	Gesamt	60 µl

Im Anschluss an diese Restriktionsverdauung erfolgte die Aufreinigung der GST-PS1-haltigen Reaktion durch das GeneJET PCR Purification Kit, wohingegen der Vektor pcDNA3.1 durch eine Separierung per Gelelektrophorese von dem abzusondernden PS1 isoliert werden musste. Der leere Vektor wurde sodann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels GeneJET PCR Purification Kit gereinigt. Nach der so erfolgten Aufbereitung der Fragmente standen Insert (GST-PS1) und Vektor (pcDNA3.1) für die gewünschte Ligation zur Verfügung, sodass folgende Ligationsreaktion angesetzt wurde:

Tabelle 2.21. Ligation von GST-PS1 in pcDNA3.1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	5,1 µl
Reaktionspuffer	10x T4 DNA Ligase Puffer (ROBOKLON)	1 µl
Vektor	pcDNA3.1 (30 ng/µl)	1 µl (= 30 ng)
Insert	GST-PS1 (25 ng/µl)	2,4 µl (= 60 ng)
Ligaseenzym	T4 DNA Ligase (ROBOKLON)	0,5 µl
	Gesamt	10 µl

Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurden 5 µl des Ligationsansatzes in XL10-Gold Ultracompetent Cells transformiert. Diese wurden in Kultur angezüchtet und die entstandene Plasmid-DNA präpariert. Die so gewonnene DNA wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese und durch Sequenzierung durch die Microsynth Seqlab, Göttingen, analysiert. Die hierzu genutzten Primer waren 5'GSTnhe1 und preGST-pGEX6P1. Nachdem sich eine korrekte Insertion und eine fehlerfreie genetische Sequenz herausgestellt hatte, konnte der so modifizierte Vektor (pcDNA3.1-GST-PS1) für die Transfektion in Zellen und damit zur Proteinexpression eingesetzt werden.

2.2.2.2 Klonierung eines Expressionsvektors für GST-CTF

Die Herstellung eines geeigneten Expressionsvektors begann mit der freundlichen Überlassung des das Zielgen (IP3R1) enthaltenden Plasmids (pIRES2-IP3R1-EGFP) durch Kevin Foscett. Dieses Plasmid wurde entsprechend des oben dargelegten Vorgehens in XL10-Gold® Ultracompetent Cells transformiert und kultiviert, wobei Kanamycin als Selektionsantibiotikum verwandt wurde. Im Anschluss hieran wurde durch eine DNA-Präparation mittels des NucleoBond® Xtra Midi-Kits (Machery-Nagel) ausreichende Mengen an Plasmid-DNA gewonnen. Das für eine spätere Expression gewünscht C-terminale Fragment (CTF) wurde sodann per PCR aus der Plasmid-DNA isoliert, amplifiziert sowie mit Restriktionsstellen (EcoRI am 5'-terminalen Ende und XhoI am 3'-terminalen Ende) versehen. Diese Reaktionszusammensetzung lautete wie folgt:

Tabelle 2.22. PCR zur Amplifikation des C-terminalen Endes (CTF) von IP3R1 sowie zur Einfügung geeigneter Restriktionsstellen.

Komponente	Reagenz	Menge (Konz.)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	181,2 µl
Reaktionspuffer	10X DreamTaq Buffer	25 µl
Nukleotide	dNTP Mix (10 mM jew.) (Thermo scientific)	8,33 µl (0,33 mM)
5'Primer	5'NT	12,5 µl (0,5 µM)
3'Primer	3'FL	12,5 µl (0,5 µM)
Template DNA	pIRES-IP3R1-EGFP (310 ng/ µl)	8 µl (= 2,4 µg)
DNA-Polymerase	DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	2,5 µl
	Gesamt	250 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde zu je 50 µl auf insgesamt 4 PCR-Tubes aufgeteilt und die PCR mit den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.23. Reaktionsbedingungen der PCR aus Tabelle 22.

Reaktionsschritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	94°C für 3 Minuten
1. Cycling (10x)	
Denaturierung	94°C für 20 Sekunden
Annealing	Gradient von 69,2°C für 30 Sekunden
Extension	72°C für 1 Minute
2. Cycling (25x)	
Denaturierung	94°C für 20 Sekunden
Annealing	Gradient von 69,2°C für 30 Sekunden
Extension	72°C für 80 Sekunden
Finale Extension	72°C für 7 Minuten

Die aus der PCR resultierenden Produkte wurden mithilfe des GeneJET PCR Purification Kits von Thermo Fischer Scientific nach Herstellerangaben gereinigt und konzentriert. Hieran wurde eine photometrische Messung von Reinheit und Konzentration angeschlossen.

Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau des neu gewonnenen PCR-Produktes, um die für die Insertion notwendigen überlappenden Enden („sticky ends“) zu generieren. Die Reaktionszusammensetzung hierzu lautete wie folgt:

Tabelle 2.24. Restriktionsverdau des PCR-Produktes CTF (C-terminales Ende von IP3R1).

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	24 µl
Reaktionspuffer	10x FastDigest® Buffer	6 µl
PCR-Produkt	CTF (80 ng/µl)	24 µl (= 1,9 µg)
Restriktionsenzym #1	FastDigest® EcoRI	3 µl
Restriktionsenzym #2	FastDigest® XhoI	3 µl
	Gesamt	60 µl

Neben der Herstellung und Modifizierung des C-terminalen Fragments von IP3R1 als Insert musste auch das Expressionsplasmid pGEX-6P-1 in ausreichender Menge und Form vorliegen. Hierzu wurde dieser Vektor in großer Menge durch eine DNA-Präparation mithilfe des QIAGEN Mini-Prep Kits zur Plasmid-Isolierung gemäß der Herstellerangaben gewonnen.

Anschließend wurde das Plasmid enzymatisch verdaut, um die überlappenden Enden für die Ligation auch hier zu gewinnen:

Tabelle 2.25. Restriktionsverdau von pGEX-6P-1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	36 µl
Reaktionspuffer	10x FastDigest® Buffer	6 µl
Plasmid-DNA	pGEX-6P-1 (200 ng/µl)	12 µl (= 2,4 µg)
Restriktionsenzym #1	FastDigest® EcoRI	2 µl
Restriktionsenzym #2	FastDigest® XhoI	2 µl
Alkalische Phosphatase	FastAP® Thermosensitive Alkaline Phosphatase	2 µl
	Gesamt	60 µl

Im Anschluss an den Restriktionsverdau erfolgte die Aufreinigung durch das GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Fischer Scientific. Die so vorbereiteten DNA-Fragmente pGEX-6P-1 und CTF konnten nun miteinander ligiert werden, wobei das Verhältnis Insert zu Vektor 3:1 betrug.

Tabelle 2.26. Ligation von CTF in pGEX-6P-1.

Komponente	Reagenz	Menge (in µg)
Lösungsmittel	ddH ₂ O	4 µl
Reaktionspuffer	10x T4 DNA Ligase Puffer (ROBOKLON)	10 µl
Vektor	pGEX-6P-1 (50 ng/µl)	2 µl (= 100 ng)
Insert	CTF (30 ng/µl)	3 µl (= 90 ng)
Ligaseenzym	T4 DNA Ligase (ROBOKLON)	1 µl
	Gesamt	20 µl

Die Ligationsreaktion wurde nach dem unter 2.2.1.9 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes in XL10-Gold® Ultracompetent Cells transformiert. Diese wurden in LB-Medium angezüchtet und die entstandene Plasmid-DNA präpariert. Die so gewonnene DNA wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese und der Sequenzierung durch die Microsynth Seqlab, Göttingen, analysiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die eingesetzten eukaryotischen Zelllinien (MEF- und N2a-Zellen) wurden in einem Nährmedium aus DMEM mit 10% FBS in Kulturflaschen angezchtet. Einer Kontamination der Zellkultur wurde mittels der Zugabe des Selektionsantibiotikums Zeocin® in einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml Medium vorgebeugt. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C und Begasung mit 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Brutschrank. Jeden zweiten Tag wurde die Zellkultur unter dem Mikroskop beurteilt. Sobald sich eine Konfluenz eingestellt hatte, wurden die Zellen aufgeteilt. Hierzu wurde zunächst das alte Medium aus den Kulturflaschen mittels einer Glaspipette und einer Saugpumpe entfernt. Sodann wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen (dreimal) und anschließend mit 2ml Trypsin für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 6 ml des Standardmediums (DMEM mit 10%-igem Anteil FBS) zugegeben und die Zellen in ein 15-ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das zellhaltige Pellet in neuem Medium resuspendiert. Diese Lösung wurde sodann in eine frische Zellkulturflasche gegeben und sodann wurden die Zellen wiederum inkubiert.

2.2.3.2 Zellyse und Proteinextraktion

Um das in den Zellen entstandene Protein zu gewinnen, mussten diese in geeigneter Weise lysiert werden. Hierzu wurde zunächst vorsichtig das Medium unter einer Abzugshaube abgesaugt. Dann wurden die Zellen zweimalig mit eisgekühltem PBS gewaschen und das PBS jeweils immer abgesaugt. Nach den Waschungen wurde ein drittes Mal PBS (diesmal nur 1 ml) auf die Platte gegeben und die Zellen dann mittels eines Zellschabers von der Platte geschabt. Die zellhaltige PBS-Lösung wurde als nächstes in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 1 000 g für 5 Minuten und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und verworfen und 10 ml RIPA-Puffer zum Pellet sowie ein Proteaseinhibitor-Mix hinzugegeben. Diese Lösung wurde für 30 Minuten inkubiert und von Zeit zu Zeit gevortext, um so einen Aufschluss sämtlicher Zellen sicherzustellen. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 13 000 g und 4°C für

15 Minuten. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, welches anschließend eingefroren wurde.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der gewonnenen Proben wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit eingesetzt. Dieses baut auf dem Versuch von Bradford zur Quantifizierung von Protein auf (Simonian und Smith, 2006). Nach Kalibrierung einer Standardtestreihe wurde die Testreagenz in der notwendigen Menge durch Zusammengeben der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben bereitgestellt. Dann wurde diese jeweils im Verhältnis 1:10 zu den Proteinproben gegeben, wobei ebenso eine Nullprobe vorbereitet wurde (ddH₂O mit Testreagenz im Verhältnis 1:10; Blankwert). Die Proben wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und anschließend die Absorption photometrisch mit dem Spectrophotometer Typ Ultrospec 3000 erfasst. Hieraus ließ sich dann über die Testreihe sowie über den Blankwert die Proteinkonzentration bestimmen.

2.2.3.4 SDS-PAGE

Gemäß dem von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickelten Verfahren erfolgte die größenabhängige Auftrennung von Proteinfractionen mittels eines Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE). Als Elektrophoresekammer wurde dabei die Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell von Bio-Rad sowie als Power supplier der PowerPac™ Basic Power Supply (auch Bio-Rad) eingesetzt. Trenngel sowie Laufgel wurden entsprechend der nachstehenden Tabelle angesetzt und in die Kammer gegossen, wobei die Zusammensetzung des Laufgels in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins variiert wurde.

Tabelle 2.27. Zusammensetzung der hergestellten Gele für das SDS-PAGE.

Reagens	Trenngel	Laufgel	
		10%	12%
ddH ₂ O	5,6 ml	15,8 ml	13,2 ml
Polyacrylamid (30%)	1,67 ml	13,33 ml	16,00 ml
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	2,52 ml	10,00 ml	10,00 ml
SDS 10%	100 µl	400 µl	400 µl
APS 10%	100 µl	400 µl	400 µl
TEMED	10 µl	40 µl	40 µl

Die Probenvorbereitung begann mit dem Auftauen der jeweiligen Proben auf Eis, der anschließenden Zugabe des Laemmli-Puffers (s.o.; Verhältnis Probe:Puffer 4:1), dem kurzen Durchmischen mithilfe des Vortexers und dem Denaturieren der Proben in einer PCR-Maschine durch Aufkochen auf 95°C für 5 Minuten. Dann wurden die Proben so vorbereitet in die jeweiligen Kammern des Gels gegeben, in eine Kammer wurde ein Größenmarker gegeben und die Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer (1x) aufgefüllt. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit dem Netzteil verbunden und die Elektrophorese gestartet. Die Separierungsphase erfolgte dabei regelhaft mit einer Spannung von 60 V, in der Laufphase wurden zwischen 80 und 140 V bis zum Ende des Durchlaufs eingesetzt. Anschließend wurde das Gel entweder mittels Coomassie angefärbt und analysiert oder auf eine Membran geblottet.

2.2.3.5 Anfärbung von Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau

Insbesondere um die Güte und Vollständigkeit von rekombinant hergestelltem Protein einordnen zu können, wurden die wie oben beschrieben hergestellten Gele mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Entsprechend dieser Methode lassen sich SDS-PAGE-Gele schnell und sensitiv anfärben (Bradford, 1976).

2.2.3.6 Western Blot

Zur spezifischen Detektion bestimmter Proteine mittels Antikörper wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Hierzu wurde das Gel an ein Stück Nitrocellulosemembran entsprechender Größe gelegt. Auf beiden Außenseiten von Gel und Membran wurden dann jeweils ein Filterpapier und Schwamm angelegt. Dieses „Sandwich“ konnte dann in die Haltevorrichtungen des Mini Trans-Blot® Cell-Systems von Bio-Rad eingespannt werden. Die äußere Kammer dieses Systems wurde mit Sandwich-Puffer sowie einem Kühlpack aufgefüllt, das Netzteil angeschlossen und eine Stromstärke von 300 – 400 mA oder 100 V für 60 – 90 Minuten angelegt. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers wurde im Anschluss eine Färbung mit 0,1%-igem Ponceau S (gelöst in 5%-iger Essigsäure) vorgenommen. Nach Auswaschen der Ponceau S-Färbung wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Milch (5% Milchpulver gelöst in TBS) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren (Mahmood et Yang, 2012). Hiernach wurden die ebenso in Milch (5% Milchpulver gelöst in TBST) entsprechend der von dem jeweiligen Hersteller empfohlenen Verdünnung gelösten Primärantikörper zugegeben. Es schloss sich eine Inkubation über Nacht auf einem Schüttler unter gekühlten Bedingungen (4°C) an. Anderntags wurde der Primärantikörper entfernt, die Membran dreimalig mit TBST gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (gerichtet gegen den Primärantikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Sodann konnte der Sekundärantikörper entfernt und die Membran wiederum dreimal mit TBST gewaschen werden. Schließlich konnte der Western Blot durch die Zugabe chemilumineszierender Substanzen (SuperSignal West Chemiluminescent Substrates von Thermo Fischer Scientific) und unter Einsatz eines entsprechenden Detektionsgerätes (ChemiDoc XRS+ System von Bio-Rad) entwickelt werden. Die qualitative wie quantitative Auswertung erfolgte durch die Software „Quantity One“ (auch Bio-Rad).

2.2.4 Die Expression von rekombinanten GST-gekoppelten Proteinen

2.2.4.1 Die Entscheidung für das passende Expressionssystem

Um ein GST-Tag-gestütztes Pulldown-Experiment durchführen zu können, ist die erfolgreiche Purifikation von entsprechendem Protein und eine Gewinnung ausreichend großer Mengen erforderlich. Die zentrale Herausforderung ist dabei die Isolierung des Zielproteins in biologisch aktiver Form (Wingfield PT, 2015). Eine etablierte Alternative, die insbesondere zur Expression von Fusionsproteinen weit verbreitet ist, ist der Einsatz eines *Escherichia coli* (*E. coli*) -Bakterienstammes. Vorteile einer Expression in *E. coli* sind die einfache Handhabbarkeit und die Geschwindigkeit, mit der auch große Proteinmengen produziert werden können (Gray und Subraminan, 2000). Soweit jedoch posttranslationale Modifikationen (insbesondere Glykosylierung; Ausbildung von Disulfid-Brücken) für die Proteinexpression erheblich sind, das Zielprotein eine gewisse Größe überschreitet (> 50 kDa) oder multiple Membrandomänen aufweist, ist eine erfolgreiche Expression in *E. coli* unwahrscheinlich (Gray und Subraminan, 2000).

Vor dem Hintergrund, dass jede Untereinheit des IP₃R1 mit über 300 kDa sehr groß ist und darüber hinaus sechs Transmembrandomänen hat, war *E. coli* hierfür nicht das geeignete Expressionssystem. Eine Analyse der einzelnen Proteinabschnitte hatte jedoch gezeigt, dass die Interaktions- und Bindungspartner insbesondere am N- und C-terminalen Ende des Proteins zu finden waren (Foskett et al., 2007). Daher sollte die Problematik einer Expression des Gesamtproteins dadurch umgangen werden, dass das N-terminalen und C-terminale Ende selektiv aus dem IP₃R1-Gen der Ratte herauskloniert wurden. Nach Einbringung dieser Abschnitte in einen pGEX-6P-1-Vektor stünden dann eine geeignete cDNA zur Expression eines GST-N-terminalen Fragmentes (GST-NTF) sowie eines GST-C-terminalen Fragmentes (GST-CTF) zur Verfügung. Für PS1 hingegen kam ein solches Vorgehen nicht infrage, da das Protein in seiner Gesamtheit vorwiegend aus Transmembrandomänen besteht (neun Stück) und hier eine wahrscheinliche Interaktionsstelle nicht aus der Proteinstruktur gefolgert werden konnte. Aus diesem Grund fiel der Entschluss PS1 nach Klonierung des GST-Tags in einem entsprechenden Vektor (pcDNA5.1) in Säugerzellen zu exprimieren. Das eine

Expression des GST-Fusions-Systems grundsätzlich auch in eukaryotischen Systemen möglich ist, ist bekannt (Tsai YR und Reed RR, 1997). Die entsprechende Expression erfolgte sodann wie unten beschrieben.

Nachstehend ist die Aminosäuresequenz von GST-CTF angegeben, sie enthält 527 Aminosäurereste bei einem rechnerischem Molekulargewicht von 60,8 kDa. Blau eingefärbt ist die Sequenz des GST-Tags (beginnend mit Met1), gelb hinterlegt die Restriktionsstelle für die HRV-Protease (beginnend mit Leu221) und orange eingefärbt die Expressionssequenz von rIP3R1-CTF (beginnend mit Val235). Val235 entspricht Val2450 bezogen auf die Gesamtsequenz von rIP3R1-CTF.

GST-CTF:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNL
PYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRAYS
KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMD
PMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPKSDL
EVLFGGPLGSPEFVGYLFFKDDFILEVDRLPNETAGPETGESLANDFLYSDVCRV
ETGENCTSPAPKEELLPVEETEQDKEHTCETLLMCIVTVLSHGLRSGGGVGDVL
RKPSKEEPLFAARVIYDLLFFFMVIIIVLNLIFGVIIDTFADLRSEKQKKEEILKTTCFI
CGLERDKFDNKTVTFEHIIKEEHNMWHYLCFIVLVKVKDSTEYTGPE SYVAEMIR
ERNLDWFPRMRAMSLVSSDSEGEQNELRNLQEKLESTMKLVTNLSGQLSELKD
QMTEQRKQKQRIGLLGHPPHMNVNPQQPA.

Hiernach ist die Aminosäuresequenz für GST-PS1 angegeben, sie enthält 697 Aminosäurereste bei einem rechnerischem Molekulargewicht von 79,4 kDa. Blau eingefärbt ist die Sequenz des GST-Tags (beginnend mit Met1), gelb hinterlegt die Restriktionsstelle für die HRV-Protease (beginnend mit Leu221) und orange eingefärbt die Expressionssequenz von PS1 (beginnend mit Met235).

GST-PS1:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNL
PYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRAYS
KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMD
PMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPKSDL
EVLFGGPLGSPEFMTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSENTNDRERQEHNDRRSL
GHPEPLSNGRPQGNSRQVVEQDEEDEELTKYGAKHVIMLFVPVTLICMVVVVA
TIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVMTILLVVLYKY
RCYKVIHAWLISSLLLLFFFSFIYLVGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVGMISIH
WKGPLRLQQAYLIMISALMALVFIKYLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRM
LVETAQERNETLFPALIYSSTMVWLVNMAEGDPEAQRVSKNSKYNAESTERES
QDTVAENDDGGFSEEWEAQRDShLgPhRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEER
GVKLGLGDFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILIGLCLLLLLAIFKKALPAL
PISITFGLVFYFATDYLVPFMDQLAFHQFYI

2.2.4.2 Die Expression von Fusionsproteinen in E. coli

Ob die GST-gebundenen Fragmente erfolgreich in E. coli exprimiert werden, ist von einer Vielzahl unbekannter Variablen abhängig und muss empirisch optimiert werden. Zunächst ist insoweit ein geeigneter Bakterienstamm erforderlich. Um auch eukaryotische (heterologe) Proteine herstellen zu können, muss der Bakterienwirt über die tRNAs für solche Aminosäuren verfügen, die für gewöhnlich in Bakterien nicht vorkommen (sogenannten seltenen Codons). Bei den in der vorliegenden Arbeit genutzten Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells wurde dies durch den Hersteller so gelöst, dass ein Vektors (pRARE) mit den entsprechenden tRNA-Sequenzen in die Bakterien eingebracht wurde. Der BL21-E. coli-Stamm zeichnet sich durch seinen T7-Promoter, sein lac-Repressor-Gen und die Induzierbarkeit der

Proteinexpression durch IPTG aus (Bernard und Payton, 1995). Die kontrollierte Expression des Fusionsproteins wird dabei durch die Supprimierbarkeit des Promoters sichergestellt. Der in diesem System verwendete lac-Promoter kann durch Expression und Bindung eines lac-Repressor-Proteins (ein lac-Repressor codierendes Gen ($lacI^q$) befindet sich auf dem Vektor) inhibiert werden. So wird die Initiation der Expression des Fusionsproteins gehemmt. Durch Zugabe von Isopropyl-Thio- β -D-Galaktopyranoside (IPTG) wird der lac-Repressor an dieses gebunden und der Promoter initiiert, nun ungebunden, die Translation (LaVallie ER, 1995).

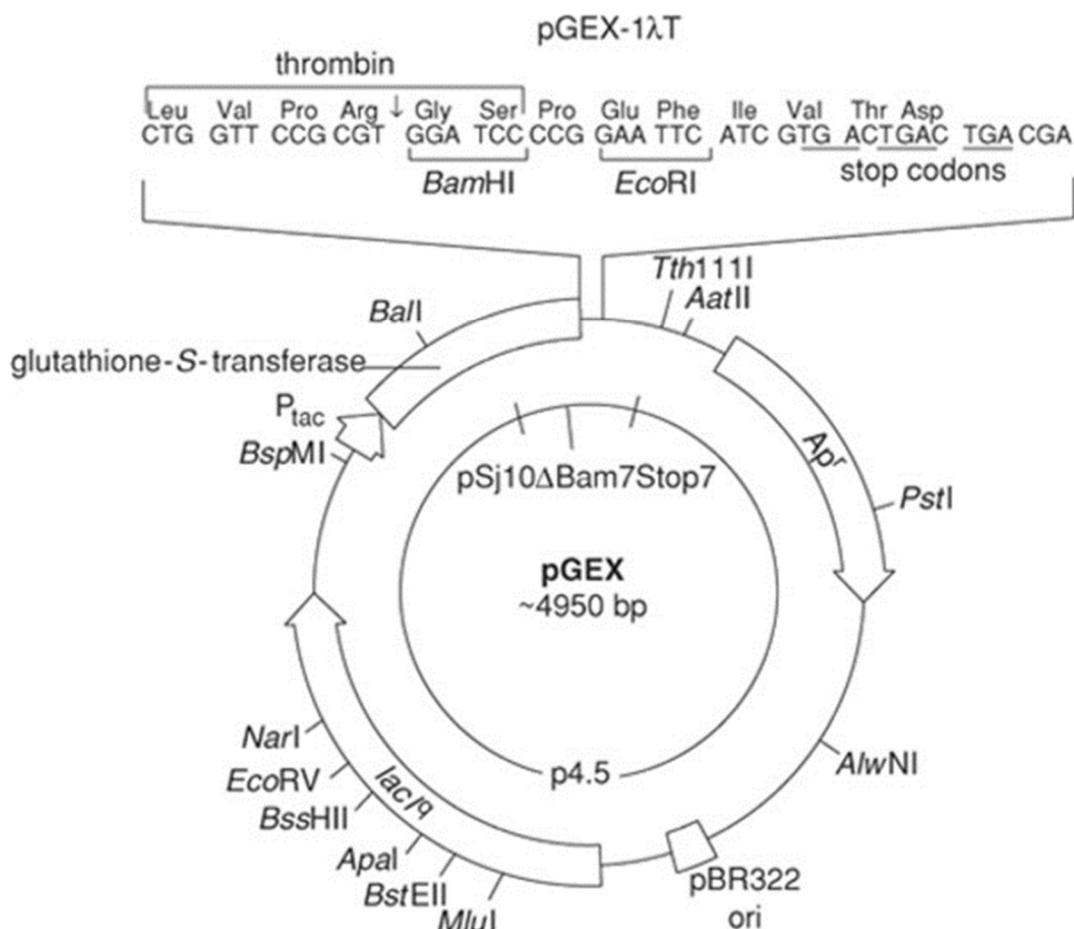


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung eines pGEX-Vektors zur Expression eines GST-haltigen Fusionproteins. Links oben in der Vektorkarte findet sich die GST-codierende Sequenz mit dem davor geschalteten Tac-Promoter. Danach kommt die multiple Klonierungsseite, die ebenfalls die Proteasenschnittstelle enthält. Weiterhin finden sich auf dem Vektor eine Resistenzgen gegen Ampicillin (Ap'), der Replikationsursprung (ori) sowie ein Gen für den lac-Repressor ($lacI^q$), der den Promoter bis zur Induktion mit IPTG unterdrückt.

Abbildung aus Harper S, Speicher DW (2008), Expression and Purification of GST Fusion Proteins. Current Protocols in Protein Science: 52: 6.6.1-6.6.26.

Nach erfolgreicher Transformation der Expressionsvektoren in *E. coli* kann mit der Gewinnung rekombinanten Proteins begonnen werden. Hierbei wird zunächst mit einer geringen Menge an Bakterienkultur (ca. 5 ml) gearbeitet, um den generellen Expressionserfolg zu überprüfen und die optimalen Expressionsbedingungen durch Austestung der verschiedenen Parameter zu ermitteln. Der Workflow dieses Expressionsprozesses ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Nach Erreichen einer gewissen Dichte (gemessen als OD₆₀₀) der inkubierten Bakterienkultur wird die Proteinexpression durch IPTG induziert. Nach abgeschlossener Induktion und Abzentrifugation des überschüssigen Kulturmediums erfolgt der Zellaufschluss, wobei hierbei verschiedene Vorgehensweisen möglich sind. Hieran anschließend erfolgt eine neuerliche Zentrifugation, um ausschließlich gelöstes Protein zu erhalten. Dieses gelöste Protein kann dann gegebenenfalls noch einmal ultrafiltriert werden, um degradierte Proteinfragmente aus der Probe auszuschließen. Das verbliebene Protein kann schließlich weiter purifiziert werden wie oben beschrieben.

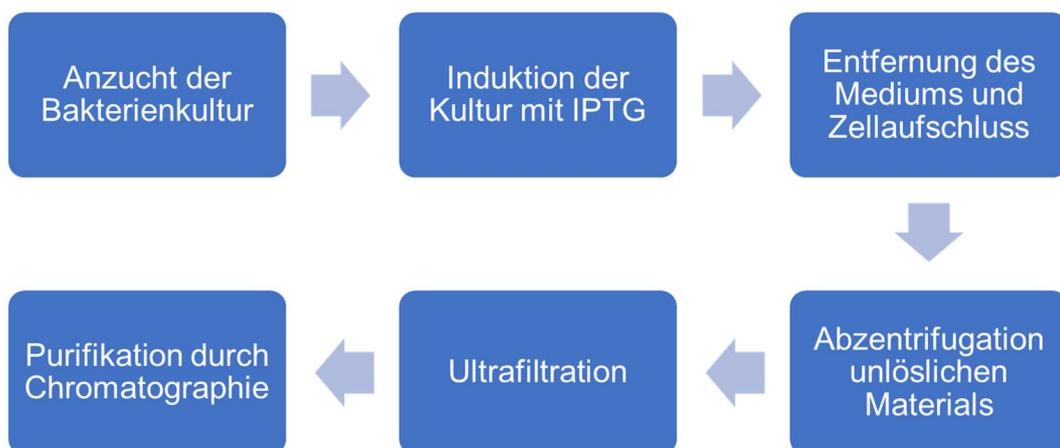


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung des Expressionsprozesses der Fusionsproteine in *E. coli*.

Die weiteren kritischen Variablen dieses Prozesses sind dabei insbesondere die Dichte der Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Induktion, die Bedingungen während der Induktion (Dauer und Temperatur) und das Vorgehen im Rahmen des Zellaufschlusses. Sämtliche dieser Variablen sind dabei für das einzelne Fusionsprotein empirisch zu ermitteln.

2.2.4.3 Expression und Purifikation von GST-CTF

Zunächst erfolgte die Transformation des Expressionsvektor pGEX-6P-1-CTF in Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells (Novagen) nach dem oben beschriebenen Vorgehen. Die so transformierten Bakterien wurden auf eine Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° inkubiert. Sodann wurde ein Klon entnommen, in 5 ml LB-Medium eingebracht und für einige Stunden bei 37° inkubiert. Im Anschluss wurden eine geeignete Menge Plasmid-DNA wie oben beschrieben hergestellt, die sodann mittels PCR, Sequenzierung und Agarosegelelektrophorese auf ihre Korrektheit hin überprüft wurde. Anschließend wurden 200 µl dieser Bakterienkultur in 200 ml Ampicillin-haltiges 2xYT-Medium gegeben und zunächst bei 30° für 2 Stunden und später bei 37°C für weitere 4 Stunden im Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert. Als eine photometrisch bestimmte OD₆₀₀ von 1,0 erreicht war, erfolgte die Induktion mit IPTG in einer finalen Konzentration von 1,0 mM. Nach Abschluss der weiteren Inkubation über Nacht bei 20°C und 250 rpm wurde der Reaktionsansatz bei 5 000 g und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert und das überbleibende Pellet gewogen (4,2 g). Dieses wurde anschließend bei -20°C für eine Nacht eingefroren.

Anderntags erfolgte die Lyse mittels Ultraschalles. Hierzu wurde das Pellet in Lysepuffer (10 ml PBS, 50 µl von 1 M DTT und 500 µl Triton-X (20%ig)) in einem 50ml- PP-Tube resuspendiert. Nach etwas vorsichtigem Durchmischen wurden die Bakterienzellen mittels Ultraschalles aufgeschlossen. Dabei wurden jeweils zehn fünfsekündige Pulse bei einer Amplitude von 50% appliziert. Zwischen den Pulsen wurde der Lyseansatz strikt für jeweils 30 Sekunden eisgekühlt, um eine Überhitzung zu vermeiden. Um das nun in dem Lysepuffer gelöste Protein isolieren zu können, wurde der Zelldebris bei 10 000 g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert.

Hieran schloss sich die Purifikation des Zielproteins mittels des Pierce® GST Spin Purification Kit (1 mL) von Thermo Fisher Scientific an. Gemäß der Herstellerangaben wurde ein Elutionspuffer vorbereitet und eine Säule equilibriert. Es wurden entsprechend des Fassungsvermögens der Säule 4 ml des Lysates geladen und für etwa 30 Minuten bei 4°C und leichter Durchmischung inkubiert, um eine optimale Bindung des Zielproteins GST-CTF an das Harz der Säule zu

ermöglichen. Anschließend wurde die Säule in ein 15 ml Tube mit konischem Boden gestellt und in einer Großraumzentrifuge abzentrifugiert (700 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur). Das Zentrifugat wurde zur weiteren Analyse aufgefangen. Danach wurde die Säule mit 2,6 ml Waschpuffer (dem zweifachen des Harzvolumens der Säule) gewaschen, das Harz sorgfältig durch Invertieren aufgelockert und wiederum abzentrifugiert. Der so beschriebene Waschschrift wurde dreimal durchgeführt und die Zentrifugate jeweils aufgefangen und verwahrt. Im Anschluss wurde 1 ml des frisch vorbereiteten Elutionspuffers, der das zur Lösung erforderliche reduzierte Glutathion enthielt, auf die Säule aufgetragen und das Harz der Säule dann sorgfältig durch Invertieren aufgelockert. Anschließend wurde die Säule wie bei den Waschsritten abzentrifugiert und das Zentrifugat aufgefangen. Auch dieser Schritt wurde dreimalig durchgeführt. Die so gewonnenen jeweiligen Fraktionen wurden separat bei -20°C eingefroren und später per SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Um eine ausreichende Menge an Protein zu gewinnen, wurde der hier beschriebene Versuch noch drei weitere Male durchgeführt.

2.2.4.4 Analyse und Fraktionierung des rekombinanten GST-CTF durch Größenausschluss-Chromatographie (Size exclusion chromatography)

Im Anschluss an die Expression und Purifikation von GST-CTF nach dem in 2.2.4.3 beschriebenen Vorgehen wurde eine Größenausschluss-Chromatographie (auch Gel-Filtration genannt) durchgeführt. Dies hatte zum einen den Zweck, die Reinheit bzw. Homogenität der Probe mit dem Fusionsprotein GST-CTF zu untersuchen, und zum anderen gezielt die Fraktionen zu gewinnen, die mutmaßlich das gewünschte Fusionsprotein enthielten. Im Rahmen der Größenausschluss-Chromatographie wird die gelöste Probe auf eine Chromatographie-Säule geladen. Polymermoleküle in der Säule führen eine Auftrennung der Bestandteile der Probe herbei, wobei größere Moleküle schneller durch das Polymernetz gelangen (Hagel, 1998). Unter permanenter Injektion eines Puffers (hier PBS) kann so eine Größenauftrennung der Probe erfolgen. Die Probenbestandteile werden zudem spektroskopisch analysiert, wobei im vorliegenden Fall die Absorption bei 220 nm, 254 nm und 280 nm untersucht wurde. Dabei ist insbesondere die Absorption bei 280 nm, in geringerem Ausmaß auch die anderen genannten Wellenlängen der Indikator für

das Vorhandensein von Protein (Simonian und Smith, 2006). Für die Größenausschluss-Chromatographie wurde die Säule Superose™ 12 10/300 GL von GE Healthcare gemäß der Herstellerangaben eingesetzt. Der dabei eingesetzte Elutionspuffer war Dulbecco's PBS. Dabei ließ sich das Eluat der Säule in Abhängigkeit von der Durchlaufgeschwindigkeit in einzelne Fraktionen aufteilen. Mittels photometrischer Analyse des gesamten Durchsatzes der Säule konnte die Fraktionen identifiziert werden, die im Wesentlichen das Zielprotein enthielten (Peak). Die Fraktionen, die mutmaßlich das gewünschte Protein enthielten, wurden im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie aufbewahrt bzw. weiterverwandt, wohingegen die restlichen Fraktionen verworfen wurden.

2.2.4.5 Konzentrierung mittels Vakuumkonzentrator

Um im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erzielen, wurden die verschiedenen wie unter 2.2.4.3 beschrieben gewonnenen Fraktionen mithilfe eines Vakuumkonzentrators (Concentrator 5301) weiter konzentriert. Hierbei wird über ein Vakuum das Verdampfen von Wasser aus einer flüssigen Probe herbeigeführt, sodass die in dieser Probe gelösten Teilchen (wie in diesem Fall Proteine) schließlich höher konzentriert übrigbleiben. Die so behandelten Proben verloren etwa zwei Drittel ihres Ausgangsvolumens und wurden zur Nutzung in den weiteren Experimenten in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen zusammengefasst.

2.2.4.6 Purifikation von rekombinantem GST-PS1

Es erfolgte die Transfektion von MEF-Zellen mit pcDNA3.1-GST-PS1 sowie deren Kultivierung und Ernte samt Aufschlüsselung. Nach Überlassung des Proteinlysates wurde die erfolgreiche Expression des Fusionsproteins mithilfe eines Western Blots nachgewiesen. Hieran schloss sich die Purifikation mittels des Pierce® GST Spin Purification Kit (1 mL) von Thermo Fisher Scientific an. Im Anschluss an diese Isolierung wurde sodann die enzymatische Abtrennung des GST-Tags vom PS1-Protein veranlasst. Dieses Experiment wurde unter Zuhilfenahme des Pierce™ HRC 3C Protease Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Dabei wurden Teile der Eluate aus der vorangegangenen Purifikation im Puffer aus dem Reaktionskit gelöst und sodann auf der harzhaltigen Säule inkubiert (ca. 5 h bei

Raumtemperatur). Anschließend wurde die Säule dreimalig gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Dann wurde die in 2 ml Reaktionspuffer gelöste Protease (in einer Menge von 55 µl; entsprechend 110 Units) hinzugegeben, gut durchmischt und die Säule wiederum über Nacht (für ca. 17 h bei 4 ° und unter Über-Kopf-Rotation) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule zentrifugiert und der unmittelbare Durchfluss aufgefangen, in dem nun das von dem GST-Tag proteolytisch abgelöste PS1 zu erwarten war. Hieran schlossen sich noch dreimalige Waschungen mit Elutionspuffer (Glutathion gelöst in Reaktionspuffer) an, um das am Harz verbleibende GST-Protein sowie womöglich unproteolysiertes GST-PS1 herauszulösen. Einige repräsentative Fraktionen wurde sodann in einem Western Blot miteinander verglichen, um den Erfolg des Experiments beurteilen zu können. Ebenso wurde ein mit Coomassie gefärbtes Gel zur Beurteilung der Isolierung des rekombinanten Proteins angefertigt.

2.2.5 Experimente zu Bindung und Interaktion der GST-gekoppelten Proteinen

2.2.5.1 Die Methodik zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer hypothetischen Bindung zwischen Präsenilin Typ 1 (PS1) und dem IP₃-Rezeptor Typ 1 (IP₃R1). In einem generellen Verständnis stellt eine solche Bindung zwischen zwei Proteinen eine Protein-Protein-Interaktion (PPI) dar. Als PPI werden spezifische (also nicht-zufällige und generische) physikochemische Kontakte zwischen Proteinen auf molekularer Ebene verstanden (De Las Rivas und Fontanillo, 2010). Weiterhin lassen sich die PPI anhand ihrer Eigenschaft weiter unterteilen in: Direkt oder indirekt (mediert über weitere Proteine), homo- oder hetero-oligomerisch, obligat oder nicht-obligat, dauerhaft oder transient und domänen- oder peptidabhängig (Peng et al., 2017). Die Stärke (oder Affinität) der zugrundeliegenden Bindung wird dabei regelhaft über die Dissoziationskonstante K_d angegeben (Brent R, 1998). Diese ist wie folgt definiert:

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

Dabei entsprechen [A] und [B] den bindenden Proteinen und [AB] der gebundenen Form dieser Proteine. Die Konzentration dieser Proteine bzw. des Komplexes sind wie auch die K_d selbst in mol/l angegeben. K_d -Werte für biologische Bindungen bewegen sich zwischen 10^{-14} M (Streptavidin-Biotin-Bindung) und 10^{-2} M (Bindung zwischen Phagenrepressor und der E. coli RNA-Polymerase). Zur Untersuchung solcher PPI sind eine Vielzahl verschiedenster Methoden entwickelt worden, die sich dabei nach Rao (Rao et al., 2014) grob in drei Kategorien einteilen:

1. In vitro: Untersuchungen außerhalb des lebenden Organismus
2. In vivo: Untersuchungen am lebenden Organismus, hierbei ist das sogenannte Hefe-zwei-Hybrid-System (Yeast Two-Hybrid System; Y2H) als Prototyp zu nennen
3. In silico: Computergestützte Untersuchungen, die entweder auf Datenbanken experimentell nachgewiesener PPI zurückgreifen oder auf Grund struktureller Erkenntnisse (Aminosäuresequenz, 3D-Struktur) PPI vorhersagen

Weiterhin lassen sich PPI-Experimente in Hochdurchsatz-Verfahren zur schnellen Untersuchung vieler PPI (Proteom-Scanning) von kleinen Experimenten spezifisch zu testender PPI („low throughput“) unterscheiden. Der Vorteil von letzteren ist, dass sie weniger zur Erzeugung falsch-positiver Ergebnisse (bis zu 50%) neigen und sich allgemein aus ihnen höherwertige Daten ergeben (Peng et al., 2017). Da vorliegend nur eine einzige PPI von Interesse war, wurde auf etablierte Verfahren kleindimensionierter Nachweismethoden zurückgegriffen. Dies waren die Affinitätschromatographie einerseits und die Co-Immunopräzipitation andererseits. Beide Verfahren sind gängige Methoden zur Bestimmung von PPI und zeichnen sich durch eine gute Verlässlichkeit und Handhabbarkeit aus (Berggard et al., 2007). Erstere wurde dabei mittels eines GST-Tags als „Pull-down-Experiment“ durchgeführt, letztere nach Testung und Auswahl geeigneter Antikörper. Im Folgenden wird nun zunächst das Prinzip der Purifikations-Affinitätschromatographie (GST-Tag) dargelegt, daran anschließend wird die Affinitätschromatographie mittels Immunopräzipitation erläutert. Schließlich werden die Versuchsanordnungen im Einzelnen dargelegt.

2.2.5.2 Affinitätschromatographie mittels GST-Tag

Die Affinitätschromatographie bezeichnet eine Technik durch welche biologische Proben anhand einer selektiven und reversiblen Bindung an ein bestimmtes Medium separiert und purifiziert werden können. Hierzu werden insbesondere sogenannte „Tags“ eingesetzt. Dabei handelt es sich um Aminosäuresequenzen, die zusätzlich zu der regulären Proteinsequenz exprimiert werden und später die Bindung an das Affinitätsmedium vermitteln (Kimple et al., 2013). So können rekombinant hergestellte Proteine gezielt purifiziert werden. Der in der vorliegenden Arbeit gewählte GST-Tag wird zusätzlich zu dem herzustellenden Protein als Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* codierende Gensequenz N-terminal in den Expressionsvektor eingefügt, um ein entsprechendes Fusionsprotein zu erhalten. GST weist eine sehr starke Affinität zu seinem Substrat Glutathion (Tripeptid aus GluCysGly) von $K_d = 0,6 \text{ nM}$ auf (Kimple et al., 2013). Durch Immobilisierung von Glutathion in Sepharose (quervernetzter Agarose als stationäre Phase der Chromatographie) bindet GST mitsamt dem angehängten Protein an der Sepharose, sodass die übrigen Proteine hinfert

gewaschen werden können. Die Glutathion-GST-Bindung kann anschließend durch Zugabe von reduziertem Glutathion eluiert werden (Abb. 2.3).

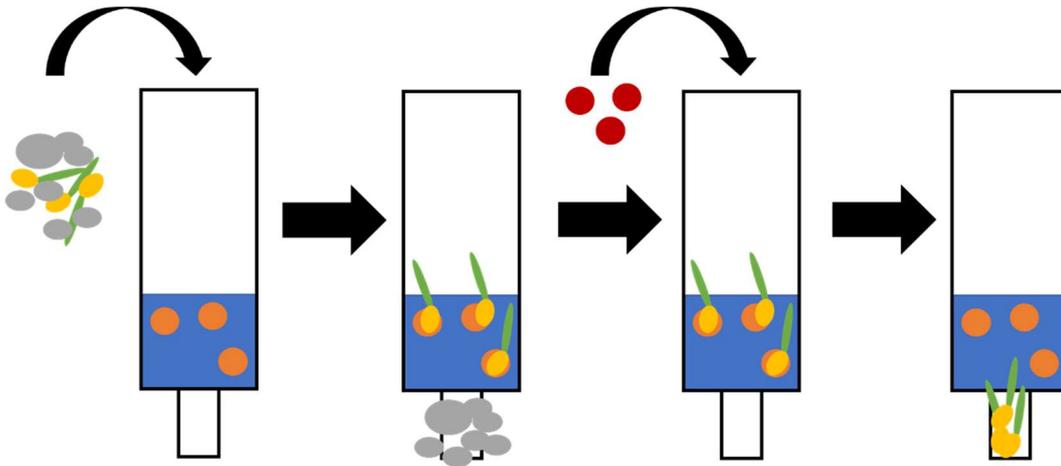


Abbildung 2.3. GST-Tag-Purifikation. Zugabe des Homogenates (1), welches das Fusionsprotein (Grün: Zielprotein; Gelb: GST) und unspezifische Proteine (grau) enthält). In der Säule befindet sich an Sepharose (blau) gebundenes Glutathion (orange). Inkubation und Bindung des GST an das Glutathion, anschließende Zentrifugation zum Ausscheiden der unspezifischen Proteine (2). Zugabe des reduzierten Glutathions (rot) und Lösen des GST von der Sepharose (3). Zentrifugation zur Elution des Fusionsproteins.

Zudem ist in den Expressionsvektoren eine Schnittstelle für Proteasen eingefügt, sodass das gewünschte Protein enzymatisch von der GST gelöst werden kann. Weiterhin sind insbesondere Pull-down-Experimente durch den GST-Tag möglich: Das Tag-haltige Protein („bait“) bindet an der Sepharose, dem dann ein weiteres Protein („prey“) zugegeben wird. Nach Inkubation erfolgt die Waschung der Sepharose. Anschließend wird das GST-haltige Protein mittels Glutathion eluiert oder die Verbindung zwischen GST und dem „bait-protein“ proteolytisch gespalten. So kann eine Bindung zwischen den Proteinen festgestellt werden (Smith DB, 2000).

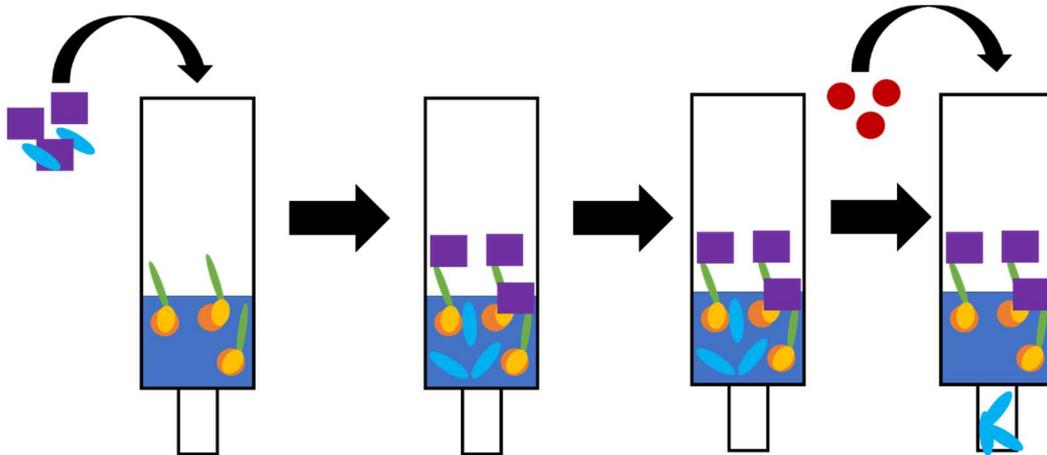


Abbildung 2.4. Schematische Darstellung eines Pull-down-Experiments mithilfe der GST-Sepharose-Bindung. Das Fusionsprotein (gelb-grün) bindet über die GST (gelb) an das immobilisierte Glutathion (orange). Nach Zugabe eines Proteingemisches bindet ein weiteres Protein (prey) an das gekoppelte Protein (bait). Nicht-bindendes Protein (blau) kann ausgewaschen und der Proteinkomplex durch Zugabe von reduziertem Glutathion (rot) abgelöst werden.

2.2.5.3 Das Prinzip der Co-Immunopräzipitation

Eine weitere Form der Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion als Pull-down-Experiment ist die Co-Immunopräzipitation (Elion EA, 2007). Anders als im Falle des GST-Tags wird hierbei die spezifische Bindung eines Antikörpers an sein Epitop ausgenutzt, um eine möglich Co-Bindung dieses Proteins an ein anderes aufzuspüren. Ein Ausfällen des entstehenden Proteinkomplexes wird dabei klassisch durch eine Bindung des Antikörpers an einem Festkörper (etwa Sepharose-Kügelchen) vermittelt. Eine solche Bindung wird über die starke Affinität des F_C-Rezeptors von IgG-Antikörpern für Protein A oder Protein G aus Staphylokokken bzw. Streptokokken erzielt (Bonifacino et al., 1999).

Nach Bindung des Antikörpers an die Matrix wird dieser Komplex gemeinsam mit dem lysierten Zellhomogenat inkubiert. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Zubereitung des Zellhomogenats, da eine zu aggressive Zellyse etwaige Protein-Interaktionen oder Protein-Komplexe ansonsten artifiziell zerstören könnte (Elion EA, 2007; Bonifacino et al., 1999). Aus diesem Grund werden zur Zellyse vorrangig nicht-ionische Detergenzien verwendet (bspw. Triton X-100 oder NP-40), da diesen gegenüber ionisches Detergenzien (wie etwa das anionische SDS) schonender sind. Nach der Inkubation wird der Probenansatz mehrfach gewaschen,

um ungebundenes Protein zu entfernen. Der verbleibende Bead-Antikörper-Protein-Komplex wird sodann durch einen Elutionspuffer oder auch nur durch Zugabe des SDS-Probenpuffers aufgelöst und kann im SDS-PAGE analysiert werden (Elion EA, 2007).

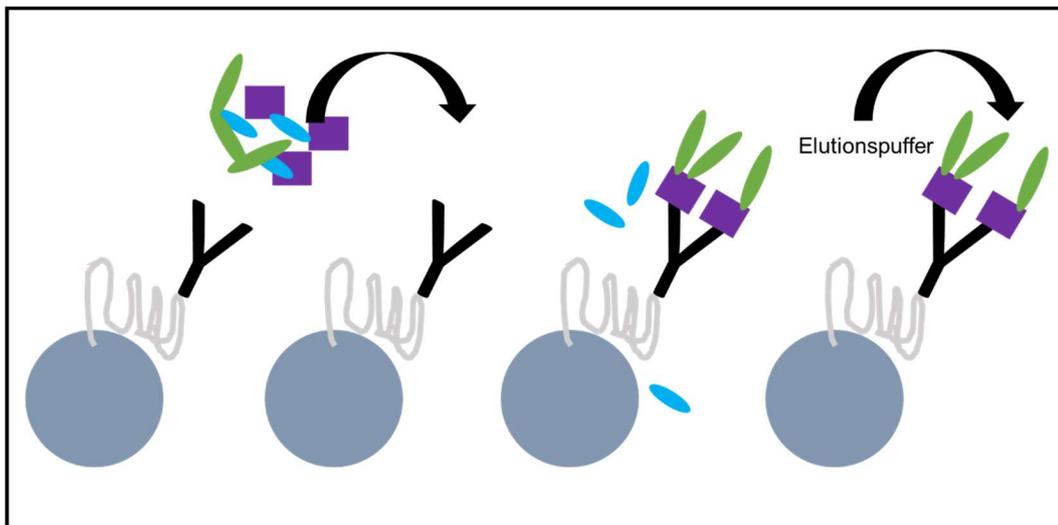


Abbildung 2.5. Schematische Darstellung der Co-Immunopräzipitation. Zunächst wird der Antikörper (schwarz) über Protein A/G (hellgrau) an den Bead (dunkelgrau) gebunden. Dann wird das Zellhomogenat hinzugegeben. Der Antikörper bindet sein Antigen (lila), welches wiederum seinen Interaktionspartner (grün) bindet. Unspezifische Proteine binden hingegen nicht (blau). Durch Abzentrifugieren sedimentiert das Bead, sodass ungebundenes Protein ausgewaschen werden kann. Durch Zugabe von Elutionspuffer wird schließlich der präzipitierte Immunkomplex von den Beads gelöst.

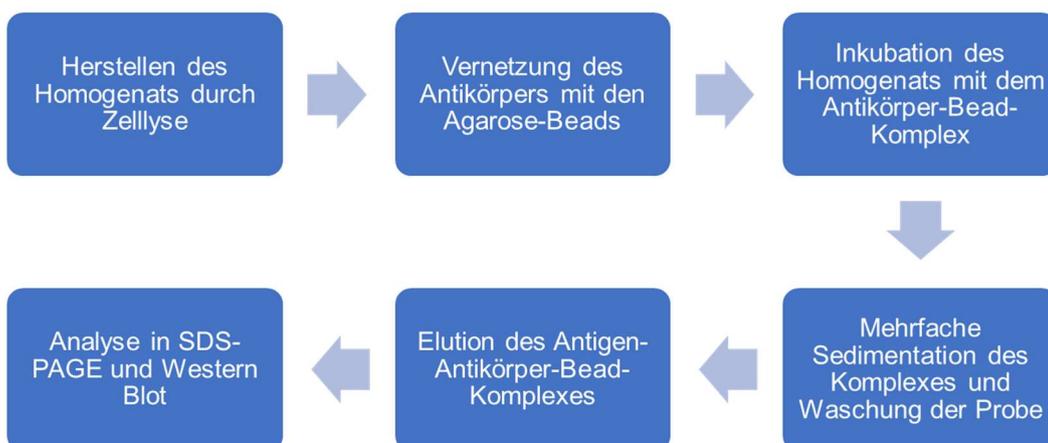


Abbildung 2.6. Workflow einer Co-Immunopräzipitation mit Agarose-Beads.

2.2.5.4 Bindung zwischen GST-CTF und proteolytisch isoliertem PS1

Für den Bindungsversuch wurden GST-CTF und GST-PS1 wie oben beschrieben hergestellt. Das GST-CTF war dabei im Anschluss an die Purifikation vakuumkonzentriert und sodann Größenausschluss-chromatographiert worden. Eine proteolytische Abtrennung des GST-Tags war im Falle des GST-CTF unterblieben, um im Falle einer Bindung zwischen CTF und PS1 einen Verhalt des PS1 in der Säule zu ermöglichen und die Bindung so nachweisen zu können. Das PS1 war entsprechend Abschnitt 2.2.4.6 hergestellt worden, danach war noch einmal eine Säulenpurifikation erfolgt, um möglichst sämtliches PS1, das noch an den GST-Tag gebunden war (GST-PS1), auszuschließen. Nach Beschickung der Säule mit dem proteolytisch verdauten PS1 (PS1cleav) wurden diese für 60 Minuten bei 4°C inkubiert und sodann abzentrifugiert (700 g, 4°C). Der aufgefangene Durchfluss wurde sodann im Bindungsexperiment eingesetzt. Für das Bindungsexperiment wurden zunächst folgende Versuchsansätze etabliert:

Tabelle 2.28. Zusammensetzung der Versuchsproben PS1cleav und GST-CTF.

Negativkontrolle	Experiment
Proteolysiertes PS1 (2 ml)	Proteolysiertes PS1 (2 ml)
Spinpurifikation-Waschpuffer (1,5 ml)	GST-CTF gelöst in Elutionspuffer (1,5 ml)

Diese Reaktionen wurden für 20 Stunden bei 4°C mittels Kopf-über-Kopf-Rotation inkubiert. Hieran anschließend wurden die Proben auf jeweils verschiedene Spinsäulen gegeben entsprechend der Fraktionen aufgetrennt (zunächst vier Waschschrirte und danach drei Elutionsschrirte mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer). Die so gewonnenen Proben wurde dann zur Steigerung der Proteinkonzentration und damit einhergehend besserer Beurteilbarkeit im Western Blot vakuumkonzentriert, bis sich eine Menge von etwa 1,0 ml bei sämtlichen Proben ergab. Sodann erfolgte die weitere Analyse mittels eines Western Blots.

2.2.5.5 Bindung zwischen GST-CTF und humaner Gamma-Sekretase (h- γ -Sec)

Als nächstes wurde eine mögliche Bindung zwischen CTF und dem Gamma-Sekretase-Komplex untersucht. Hierzu wurde eine Probe humaner Gamma-Sekretase (hG-Sec) freundlicherweise von Bart DeStrooper überlassen. Hierbei war der vollständige Gamma-Sekretase-Komplex (also mit sämtlichen Komponenten) in seinem nativen Vorkommen aus der Zellmembran gelöst worden. Als Bindungspartner wurde wiederum GST-CTF gemäß dem in Abschnitt 2.2.4.3 beschriebenen Verfahren hergestellt, chromatographiert und sodann vakuumkonzentriert. Die zu untersuchenden Bindungspartner wurden in der folgenden Menge und Konzentration zusammengegeben:

Tabelle 2.29. Zusammensetzung der Versuchsproben hG-Sec und GST-CTF.

Negativkontrolle	Experiment
hG-Sec (60 μ g gelöst in 200 μ l PBS)	hG-Sec (60 μ g gelöst in 200 μ l)
Spinpurifikation-Reaktionspuffer (150 μ l)	GST-CTF gelöst in PBS (80 μ g gelöst in 150 μ l)

Die so zusammengesetzten Proben wurden sodann bei 4°C per Kopf-über-Kopf-Rotation über Nacht (ca 16 h) inkubiert. Anderntags wurden die Proben jeweils mit Pierce HRV 3C Reaction Buffer aus dem Pierce™ HRC 3C Protease Kit von Thermo Fisher Scientific auf ein Gesamtvolumen von 2 ml gebracht, gut durchmischt und sodann auf äquilibrierte Pierce Glutathion Spinsäulen geladen. Diese wurden für 120 Minuten bei 4°C per Kopf-über-Kopf-Rotation inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation (700 g für 2 Minuten) zur Entfernung ungebundenen Proteins und anschließend 3 Waschschrte mit je 2 ml Waschpuffer und neuerlicher Zentrifugation. Hiernach wurden die Spinsäulen mit jeweils 2 μ l Pierce™ HRC 3C Protease gelöst in 2 ml Pierce HRV 3C Reaction Buffer beladen und über Nacht bei 4°C per Kopf-über-Kopf-Rotation inkubiert. Am Folgetag wurden die Spinsäulen bei 700 g abzentrifugiert und verbleibendes GST-CTF per Zugabe von Glutathionhaltigem Elutionspuffer von den Säulen gelöst. Dieser Elutionsschritt wurde dreifach durchgeführt. Sämtliche in diesem Versuch gewonnenen Fraktionen wurden aufbewahrt und später per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.5.6 Bindung zwischen GST-CTF und Zell-Homogenat aus MEF

Weiterhin wurde die Bindung zwischen GST-CTF und dem Homogenat aus PS1-überexprimierenden MEF-Zellen untersucht. Die Transfektion, Pflege und Zellaufschluss wurden von Diego Sepulveda-Falla übernommen. GST-CTF wurde gemäß dem in Abschnitt 2.2.4.3 beschriebenen Verfahren hergestellt und dann mittels Pierce® GST Spin Purification Kit (1 mL) von Thermo Fisher Scientific purifiziert. Im Anschluss an die Purifikation wurden die gewonnenen Eluate (vier Proben zu jeweils 1,3 ml) mittels Zentrifugation bei 3500 g durch 10-kDa-Filter von Amicon® auf ein Endgesamtvolumen von 0,65 ml konzentriert. Anschließend wurden das so konzentrierte GST-CTF gemeinsam mit dem aus den MEF-Zellen stammenden Homogenat (PS1-haltig) in der folgenden Zusammensetzung für 48 Stunden bei 4°C in Kopf-über-Rotation inkubiert.

Table 2.30. Zusammensetzung der Versuchsproben Zellhomogenat und GST-CTF.

Experiment (a)	Nur GST-CTF (b)	Nur Zellhomogenat (c)
GST-CTF (1000 µg gelöst in 200 µl Elutionspuffer)	GST-CTF (1000 µg gelöst in 200 µl Elutionspuffer)	---
Zellhomogenat aus MEF (1000 µg gelöst in 300 µl PBS)	---	Zellhomogenat aus MEF (1000 µg gelöst in 300 µl PBS)

Im Anschluss an die Inkubation wurden alle Proben mit Pierce HRV 3C Reaction Buffer auf ein Volumen von 3 ml gebracht. Die so verdünnten Proben wurden dann auf Pierce Glutathion Spinsäulen geladen, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 700 g und Raumtemperatur für 2 Minuten abzentrifugiert, wobei der Durchfluss aufgefangen und verwahrt wurde. Dann wurden die Säulen zweimal mit je 2 ml Waschpuffer gewaschen. Auch diese wurde mit 700 g bei Raumtemperatur für 2 Min zentrifugiert und das Zentrifugat verwahrt. Im Anschluss wurde die Pierce™ HRC 3C Protease hinzugefügt, wobei 5 µl des Enzyms in 2 ml Pierce HRV 3C Reaction Buffer gelöst wurden. Nun konnten die Spinsäulen über Nacht bei 4°C mit einer Kopf-über-Rotation inkubiert werden, um die Proteolyse erfolgen zu lassen. Am Folgetag wurden die Spinsäulen mit 700 g

bei Raumtemperatur für 2 Min abzentrifugiert und das Zentrat aufgefangen. Um bei einem möglicherweise insuffizienten Schnitt dennoch eine Aussage über das Bindungsverhalten der Interaktionspartner treffen zu können, wurde noch eine Elution mittels Glutathion durchgeführt (so wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben). Die so gewonnenen Eluate wurden zur Konzentrierung noch einmal mittels 10-kDa-Filter von Amicon® auf ein Endgesamtvolumen von ca. 0,5 ml gebracht. Die in diesem Experiment gewonnenen Fraktionen bzw. Zentraten wurden schließlich per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.5.7 Bindung zwischen GST-CTF und MEF-Homogenat mittels des Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit

Schließlich wurde eine mögliche Bindung des GST-CTF an PS1 (oder andere Bestandteile der Gamma-Sekretase) mithilfe des Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit von Thermo Fisher Scientific untersucht. Das Prinzip der darin enthaltenen Versuchsanordnung ist wiederum dem eines „Pull-down-assays“ zuzuordnen. Dabei wird eine Säule mit agarosehaltigem Harz vorbereitet, um sodann ein GST-gekoppeltes Protein („bait“) hinzuzugeben in der Erwartung, dass dieses an das Harz binde. Anschließend kann ein Proteinlysate, das das gesuchte Protein („prey“) enthält, hinzugefügt werden. Wenn sodann nach entsprechender Inkubationsdauer die Säule (wiederholt) gewaschen wird, so wird ungebundenes Protein entfernt, wohingegen das bait-Protein (welches seinerseits wiederum über das GST an das Harz gebunden ist) in der Säule verbleibt. Über die abschließende Zugabe von glutathionhaltigem Puffer wird die Bindung zwischen Harz und GST gelöst, sodass auch das GST-Fusions-Protein (mit etwaigen Bindungspartnern) in einem separaten Schritt aus der Säule gewaschen werden kann. Im vorliegenden Experiment wurden drei Säulen vorbereitet: Eine wurde mit purifiziertem und aufgereinigtem GST-CTF (bait) und Zelllysate (prey) inkubiert, die zweite nur mit GST-CTF und die dritte nur mit Zelllysate.

Tabelle 2.31. Probenanordnung für den Bindungsversuch nach 2.2.5.7

Experiment (Säule Nr. 1)	Bait ctrl (Säule Nr. 2)	Prey ctrl (Säule Nr. 3)
GST-CTF (800 µl)	GST-CTF (800 µl)	Pull-Down Lysis-Buffer aus dem Kit (800 µl)
Zellhomogenat aus MEF (150 µg gelöst in 700 µl)	Wash Solution aus dem Kit (700 µl)	Zellhomogenat aus MEF (150 µg gelöst in 700 µl)

Die erste Inkubation erfolgte bei 4°C für ca. 14h bei Kopf-über-Kopf-Rotation, dann erfolgten mehrere Waschschriffe und sodann die zweite Inkubation mit dem Zelllysate („prey“). Diese dauerte wiederum bei 4°C ca. 22h bei Kopf-über-Kopf-Rotation. Hiernach wurden die Säulen abzentrifugiert, der Durchfluss aufgefangen und die Säulen mehrfach gewaschen. Zur Elution wurden abschließend jeweils dreimal 750 µl Elutionspuffer zugegeben, die Säulen kurz inkubiert und dann abzentrifugiert. Die so gewonnenen Proben wurden im Weiteren per Western Blot ausgewertet.

2.2.6 Co-Immunopräzipitation

Zur Ergänzung und methodischen Diversifizierung der Experimente wurde mit der Co-Immunopräzipitation eine weitere Form der Pull-down-Assays eingesetzt (Elion EA, 2007). Hierbei wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben (genutzt wurde das das Pierce Co-Immunoprecipitation ((Co-IP)) Kit von Thermo Fisher Scientific) verfahren. Vorzug dieses Systems ist die kovalente Bindung des Antikörpers an das Harz der Säule, wodurch ein späteres Ablösen des Antikörpers im Rahmen der Elution vermieden werden kann. Nach Immobilisierung des Antikörpers an dem Harz der Säule erfolgte die Zugabe des Zelllysates. Die Lyse der Zellkultur erfolgte dabei mit eiskaltem IP-Lysis/Wash Buffer aus dem Kit des Herstellers (mit dem Detergens NP-40 in 1%-iger Konzentration). Im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand abpipettiert und mehrfach gewaschen, um ungebundenes Protein abzuscheiden. Schließlich wurde durch Zugabe des Elutionspuffer und kurzzeitiger Inkubation die bestehende Antikörper-Antigen-Bindung aufgebrochen und die einzelnen Fraktionen konnten mittels SDS-PAGE und Wester Blot analysiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische Ergebnisse

3.1.1 Ergebnisse zur Klonierung von pGEX-6P-1-IP3R1-CTF

Die Herstellung des Expressionsvektors für pGEX-6P-1-IP3R1-CTF erfolgte wie in 2.2.1.2.2 beschrieben. Eine schematische Darstellung der Klonierungsschritte findet sich in Abbildung 3.1. Neben der Herstellung ausreichender Mengen des von J.K. Foskett überlassenen Vektor pIRES-IP3R1-EGFP (Abb. 3.2, A) erforderte die Herstellung des Expressionsplasmids die Vervielfältigung des C-terminalen Fragmentes unter Einfügung von Restriktionsschnittstellen (Abb. 3.2, B), den enzymatischen Verdau des Vektors pGEX-6P-1 (Abb. 3.2, C) sowie die Ligation von Vektor und Fragment. Schließlich wurde die erfolgreiche Insertion mittels PCR kontrolliert (Abb. 3.2, D).

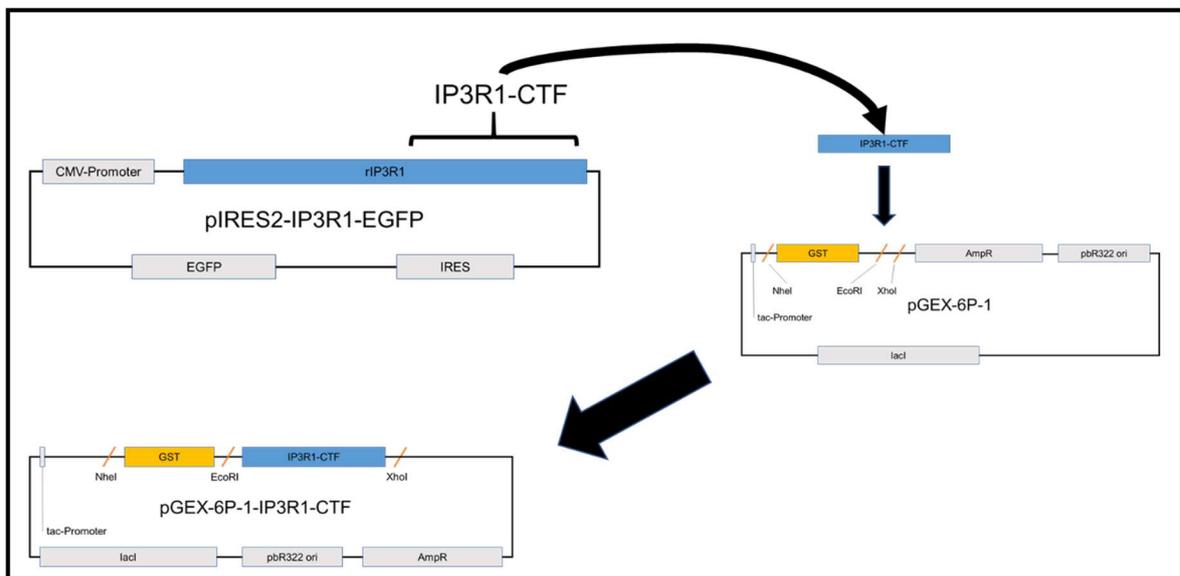


Abb. 3.1. Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors pGEX-6P-1-IP3R1-CTF durch Insertion von Restriktionsschnittstellen in CTF-PCR-Produkt (links oben) und nachfolgender Einfügung des Fragments in den pGEX-6P-1-Vektor (Mitte) zum Gesamtkonstrukt (unten).

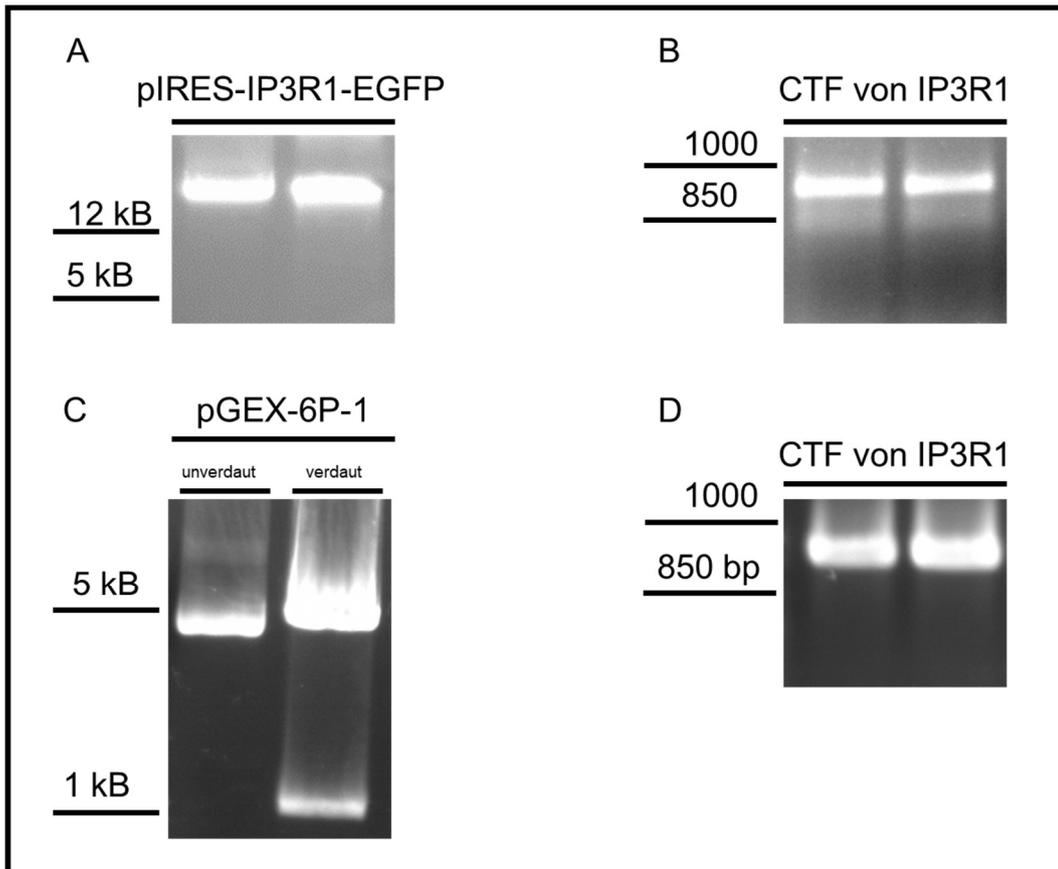


Abbildung 3.2. A: Der überlassene Vektor pIRES-IP3R1-EGFP, sowie er freundlicherweise überlassen wurde, nach Vervielfältigung durch eine Midi-Präparation. Die beobachtete Größe entspricht der schätzungsweise berechneten Größe von 16.500 bp. B: PCR-Produkt des C-terminalen Endes von IP3R1. Die Größe des Fragmentes entspricht etwa der berechneten Größe von 882 Basenpaaren. C: Verdautes sowie unverdautes pGEX-6P-1 auf einem Agarosegel. Die Größe des leeren Vektors entspricht knapp 5.000 bp. Erkennbar ist, dass der linearisierte Vektor etwas langsamer läuft als der nichtlinearisierte (linke Spur). Das Fragment bei 1 kB in der rechten Spur entspricht vermutlich bei dem Verdau ausgeschnittenem Neuroserpin. D: PCR des C-terminalen Fragmentes nach Ligation in pGEX-6P-1 zur Bestätigung der korrekten Insertion. Die abgebildete Bande entspricht der erwartungsgemäßen Größe.

3.1.2 DNA-Sequenz von GST-CTF

Im nachfolgenden ist die DNA-Sequenz von GST-CTF angegeben, sowie sie von der Microsynth Seqlab, Göttingen, übermittelt wurde. Dies entspricht 1.548 Basenpaaren bzw. 528 Triplets. Grün hervorgehoben ist der Startcodon des GST, türkis die Erkennungssequenz der Protease, gelb das erste Codon von IP3R1-CTF und rot das Endcodon des Fusionsproteins.

ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA CCC
ACT CGA CTT CTT TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG
TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TTG
GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA
TTA ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC
ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA
GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT
AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA
ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT
GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT
GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA TTA
GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC
TTG AAA TCC AGC AAG TAT ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC TGG CAA
GCC ACG TTT GGT GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TCG GAT **CTG GAA**
GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC **GTG** GGC TAC
CTG TTC TTC AAG GAT GAC TTT ATC TTG GAA GTA GAC AGG TTG CCC AAT
GAG ACA GCT GGT CCA GAA ACT GGT GAG AGT TTG GCC AAC GAT TTC
CTG TAC TCT GAT GTG TGC CGG GTA GAG ACG GGG GAG AAC TGC ACC
TCT CCG GCA CCC AAA GAA GAG CTG CTC CCT GTG GAA GAA ACG GAA
CAG GAT AAG GAG CAC ACG TGT GAG ACA CTG CTC ATG TGC ATC GTC
ACC GTT CTG AGT CAC GGG CTG CGG AGT GGG GGC GGA GTA GGA GAT
GTG CTC AGG AAG CCA TCC AAA GAG GAG CCT CTG TTT GCT GCA AGG
GTG ATC TAT GAC CTC CTC TTC TTC TTC ATG GTC ATC ATC ATT GTC CTG
AAC CTC ATT TTT GGG GTC ATC ATC GAC ACC TTT GCT GAC CTG AGG AGT
GAG AAG CAG AAG AAG GAA GAG ATC TTA AAA ACC ACG TGC TTC ATT TGT
GGC TTG GAA AGG GAC AAG TTT GAC AAT AAG ACC GTC ACC TTT GAA

GAG CAC ATT AAG GAA GAA CAC AAC ATG TGG CAC TAT CTG TGC TTC ATC
 GTG CTG GTG AAA GTG AAG GAC TCC ACC GAG TAC ACC GGG CCC GAG
 AGC TAC GTG GCA GAG ATG ATC AGG GAA AGA AAC CTT GAT TGG TTC
 CCC AGG ATG AGA GCC ATG TCC CTG GTC AGC AGT GAC TCT GAA GGG
 GAA CAG AAC GAG CTG AGG AAC CTG CAG GAG AAG CTG GAG TCC ACC
 ATG AAG CTG GTC ACC AAT CTT TCT GGC CAG CTG TCA GAA CTA AAG GAC
 CAG ATG ACA GAA CAA AGG AAG CAG AAA CAA AGA ATT GGC CTT CTA
 GGA CAT CCT CCT CAC ATG AAT GTC AAC CCA CAG CAG CCA GCC TAA

3.1.3 Klonierung von pcDNA3.1-GST-PS1

Die Herstellung des Vektors pcDNA3.1-GST-PS1 erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Eine schematische Darstellung des Prozesses findet sich in Abb. 3.3.



Abb 3.3. Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors pcDNA3.1-GST-PS1-WT.

Zunächst wurde hierzu PS1 aus dem Vektor pcDNA3.1 (Abb. 3.4., A) herausgeschnitten und in den Vektor pGEX-6P-1 hineinligiert (Abb. 3.4, B). Das GST-PS1-Fragment wurde sodann im gesamten mittels PCR unter Einfügung von Restriktionsstellen vervielfältigt (Abb. 3.5) und wiederum in pcDNA3.1 hineinligiert. Abschließend wurde das korrekte Vorliegen der Sequenz mittels PCR und Sequenzierung ermittelt (Abb. 3.5, B).

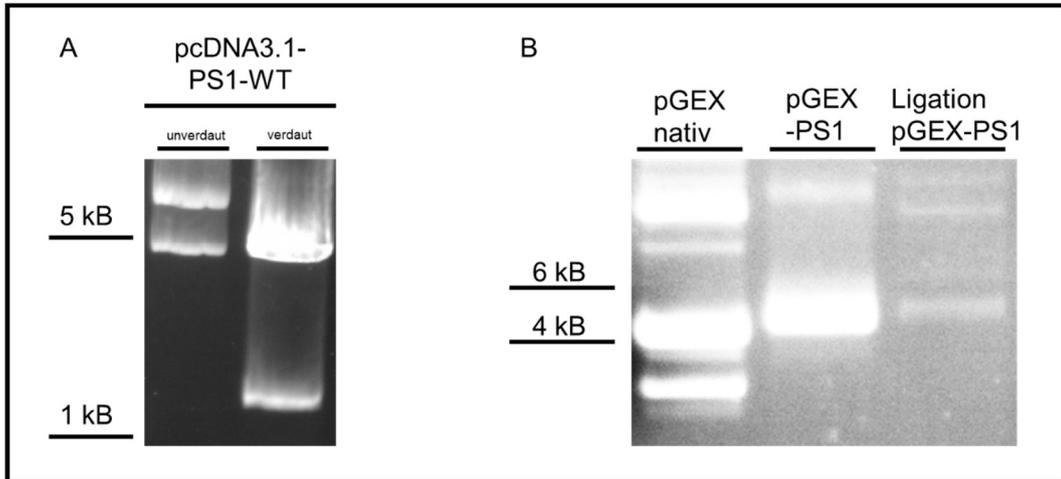


Abbildung 3.4. A: Verdautes sowie unverdautes pcDNA3.1-PS1 auf einem Agarosegel. Die Größe des leeren Vektors entspricht knapp 5.300 bp. Die verschiedenen Formen des unzerschnittenen Vektors links (coiled, supercoiled, twisted) führen zu verschiedenen Laufgeschwindigkeiten. Das Fragment etwas über 1 kb in der rechten Spur entspricht dem ausgeschnitten PS1 (ca. 1.400 bp).

B: In der linken Spur ist pGEX-6P-1 unkloniert zu sehen. In der mittleren Spur ist pGEX-PS1 im Anschluss an die Gewinnung aus einer Mini-Präparation nach Transformation in *E.coli* zu sehen. In der rechten Spur ist der für die Transformation genutzte Ligationsansatz zu sehen. Aufgrund der nur sehr geringen DNA-Menge in der Ligation fällt die Bande entsprechend schwach aus. Die weiteren Banden in den allen Spuren sind durch die verschiedenen Lauftypen der Vektoren zu erklären.

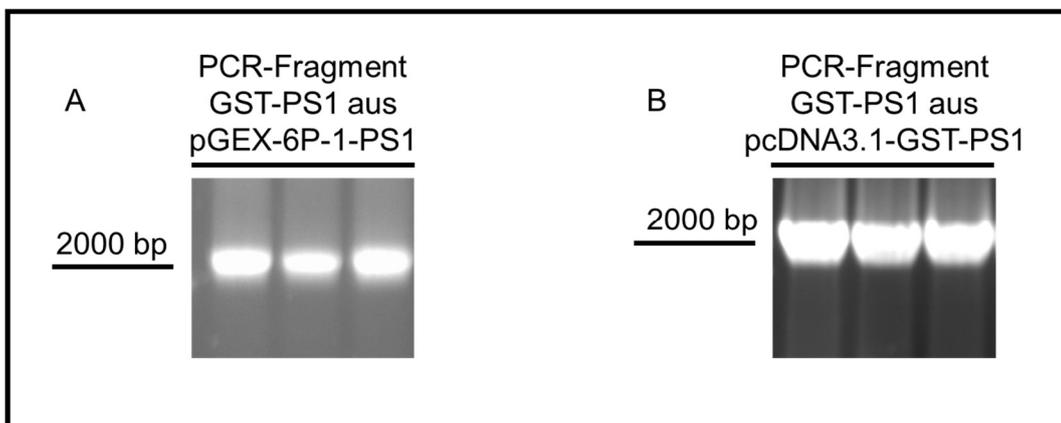


Abbildung 3.5. A: PCR-Fragment GST-PS1 aus dem neu gewonnenen Vektor pGEX-6P-1-PS1. Die Größe entspricht mit 2.000 Basenpaaren auch der Erwartung (GST mit 668 Basenpaaren sowie PS1 mit 1.392 Basenpaaren).

B: PCR-Fragment GST-PS1 aus dem Vektor pcDNA3.1-GST-PS1. Die Größe des PCR-Produktes entspricht der berechneten Größe (knapp 2.000 Basenpaare)

3.1.4 DNA-Sequenz von GST-PS1

Im nachfolgenden ist die DNA-Sequenz von GST-PS1 angegeben, sowie sie von der Microsynth Seqlab, Göttingen, übermittelt wurde. Dies entspricht 2.094 Basenpaaren bzw. 698 Triplets. Grün hervorgehoben ist der Startcodon des GST, türkis die Erkennungssequenz der Protease, gelb das erste Codon von PS1 und rot das Endcodon des Fusionsproteins.

ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA CCC
ACT CGA CTT CTT TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG
TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TTG
GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA
TTA ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC
ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA
GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT
AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA
ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT
GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT
GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA TTA
GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC
TTG AAA TCC AGC AAG TAT ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC TGG CAA
GCC ACG TTT GGT GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TCG GAT **CTG GAA**
GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC **ATG** ACA GAG
TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA CAG ATG TCT GAG GAC
AAC CAC CTG AGC AAT ACT AAT GAC AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC
AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT GAG CCA TTA TCT AAT GGA
CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG GAG CAA GAT GAG GAA
GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC AAG CAT GTG ATC
ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG GTG GTC GTG GCT
ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT GGG CAG CTA ATC
TAT ACC CCA TTC ACA GAA GAT ACC GAG ACT GTG GGC CAG AGA GCC
CTG CAC TCA ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC ATT GTT GTC
ATG ACT ATC CTC CTG GTG GTT CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT AAG GTC
ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG TTG CTG TTC TTT TTT

TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC GTT GCT GTG
GAC TAC ATT ACT GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTT GGT GTG GTG GGA
ATG ATT TCC ATT CAC TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG CAG GCA
TAT CTC ATT ATG ATT AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC AAG TAC
CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA GTA TAT
GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA GGT CCA CTT CGT ATG CTG GTT
GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT TTT CCA GCT CTC ATT TAC
TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC CCG
GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT AAT GCA GAA AGC
ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG AAT GAT GAT GGC
GGG TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG
CCT CAT CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT
TCC AGC AGT ATC CTC GCT GGT GAA GAC CCA GAG GAA AGG GGA GTA
AAA CTT GGA TTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAA
GCC TCA GCA ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGT
TTC GTA GCC ATA TTA ATT GGT TTG TGC CTT ACA TTA TTA CTC CTT GCC
ATT TTC AAG AAA GCA TTG CCA GCT CTT CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG
CTT GTT TTC TAC TTT GCC ACA GAT TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC
CAA TTA GCA TTC CAT CAA TTT TAT ATC TAG

3.2 Gewinnung von rekombinantem Protein

3.2.1 Gewinnung von GST-CTF

Die Herstellung des für die weiteren Versuche benötigten GST-CTF wurde zunächst hinsichtlich der gewonnenen Menge an Fusionsprotein optimiert. Hierzu wurde die Expression in Rosetta durchgeführt, die Zellen lysiert und sodann in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE verglichen (Abb. 3.6), wobei die Expression von GST-CTF in XL-10 Gold als Negativkontrolle diente. Hierbei zeigte sich im Falle der XL-10 Gold-Bakterien kein wesentliches Signal, wohingegen eine deutliche Proteinakkumulation in den mit Zelllysat aus Rosetta-Bakterien beladenen Bahnen gefunden wurde. Dies ist vor dem Hintergrund, dass es den XL-10-Gold-Bakterien für die Expression von humanen Proteinen erforderlichen Codons („rare codons“)

fehlt, gut erklärbar. Demgegenüber zeigte sich für Zellysate aus Rosetta ein deutliches Signal in Höhe der Größe von GST (26 kDa), was eine taugliche Proteinexpression durch den Modellorganismus nahelegt.

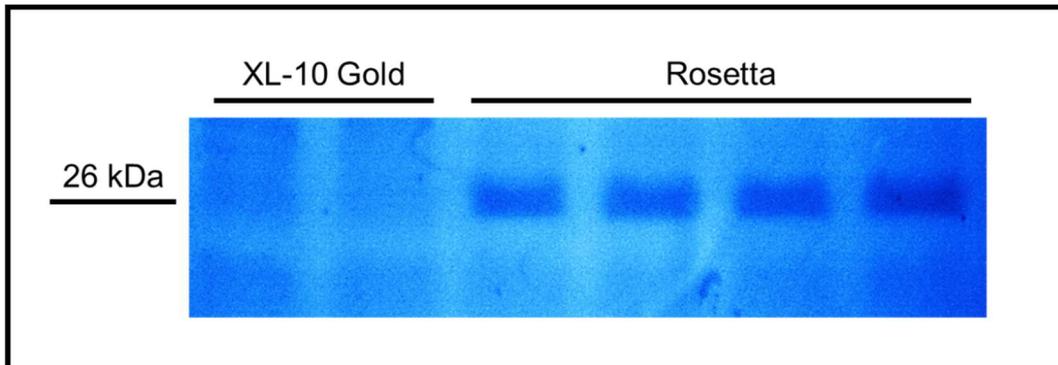


Abbildung 3.6. Coomassie-gefärbte SDS-PAGE. Im linken Bild ist der Vergleich zwischen Zellysate aus XL-10-Gold-Bakterien (linken beiden Bahnen) und Rosetta (die rechten vier Bahnen) dargestellt. Beiden wurden mit dem pGEX-6P1-CTF transformiert und kultiviert. Im rechten Bild ist Zellysate aus transformierten und kultivierten Rosetta nach IPTG-Induktion zu sehen. Die Pfeile markieren die einzelnen abgrenzbaren Banden, die rekombinantes Protein entsprechen könnten.

Im Anschluss an die Proteinexpression und Zellyse erfolgte die Purifikation mittels einer GST-Spinsäule wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben. Das so purifizierte Protein wurde anschließend in einem Western Blot analysiert, wobei standardmäßig der Antikörper IP3R1-CTF von Merck Millipore (# ABS55) eingesetzt wurde, der sich ausschließlich gegen die zytoplasmatische Domäne von IP3R1 richtet und so das C-terminale Fragment zu detektieren vermochte. Im Rahmen des Western Blots ließen sich die einzelnen Schritte der Purifikation vergleichen (Abb. 3.7). Da die einzelnen analysierten Fraktionen in der Regel immer in derselben Reihenfolge ins Gel eingebracht wurden, sollen sie hier einmal kurz erläutert werden: Ganz links findet sich das unzentrifugierte Zellysate direkt nach erfolgtem Zellaufschluss („totale lysat“ ((TL)) oder im Falle der Zellkultur auch Homogenat), danach kommt der Überstand („supernatant“; SN) einer Probe unmittelbar nach Zentrifugation. Nach Bindung an das Harz der Säule und Zentrifugation wird der Durchfluss („flow-through“; FT) gewonnen, nämlich der Probenanteil, der ungebunden und ohne Waschung von der Säule wieder abzentrifugiert werden konnte. Daran schlossen sich mehrere Waschschrte (ca. 3 – 6) an, die in dieser Reihenfolge auf das Gel geladen wurden (W1 bis Wx). Schließlich wurden ganz rechts die Ergebnisse der Elution aufgetragen, die durch die Glutathion-Zugabe abgelösten Proteine (Glutathioneluat; GE). Die zu erwartende Bande betrug dabei 60,8 kDa, was mithilfe

des *Protein Molecular Weight Calculator* von science gateway errechnet wurde. Regelmäßig zeigte sich neben der erwünschten Bande bei 60 kDa eine weitere Bande bei ca. 50 kDa, welche als Zeichen einer entsprechenden Degradation oder partiellen Proteolyse von GST-CTF gewertet wurde. Auch zeigte sich teilweise eine deutliche Überschreitung der Bindungskapazität der Säule, da erhebliche Mengen des Fusionproteins ungebunden direkt oder in den Waschschrritten wieder ausgeschieden wurden.

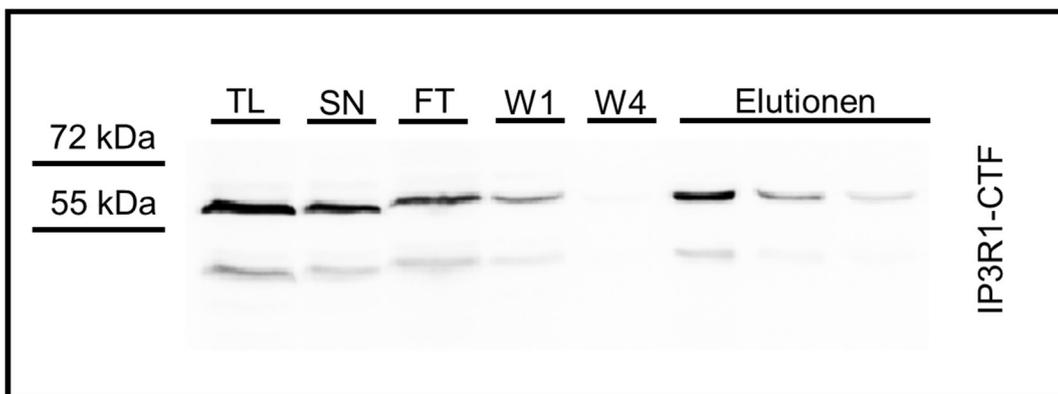


Abbildung 3.7. Western Blot unter Einsatz des Antikörpers IP3R1-CTF. Von links nach rechts befinden sich in den einzelnen Bahnen: Zelllysät vor Zentrifugation (TL, Nr. 1), Überstand nach Zentrifugation (SN, Nr. 2), Durchfluss nach Beladung der Säule (FT), Durchfluss nach Waschung der Säule (Waschschritte 1 und 4; Nr. 3 und 4) und Durchfluss nach Elution der Säule mit Glutathionhaltigem Puffer (Elutionsschritte 1-4, Nr. 5 bis 8).

Zur näheren Beurteilung der Reinheit bzw. Homogenität der gewonnenen Proben erfolgte eine Größenaufschluss-Chromatographie wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben. Für die Beurteilung der in Abbildung 3.8 gezeigten chromatographischen bzw. spektroskopischen Verläufe sind die rosa, blaue und rote Kurve zu beachten: Der Verlauf der jeweiligen Kurven zeigt dabei die relative Quantität der jeweiligen Absorptionsmaxima (die rote Kurve zeigt dabei die Absorptionsmaxima bei 220 nm, die rosa Kurve die bei 254 nm und die blaue Kurve die bei 280 nm). Da die rosa und die blaue Kurve die Absorptionen der Wellenlängen repräsentieren, die für Aminosäuren (also Proteine) spezifisch sind, geben diese Kurven Aufschluss über die Proteinverteilung in der eingebrachten Probe. Ein Anstieg dieser Kurven lässt sich nur im Bereich der Fraktionen C1 bis zur Fraktion C13 beobachten, was näherungsweise dem Größenbereich zwischen 75 und 40 kDa entspricht.

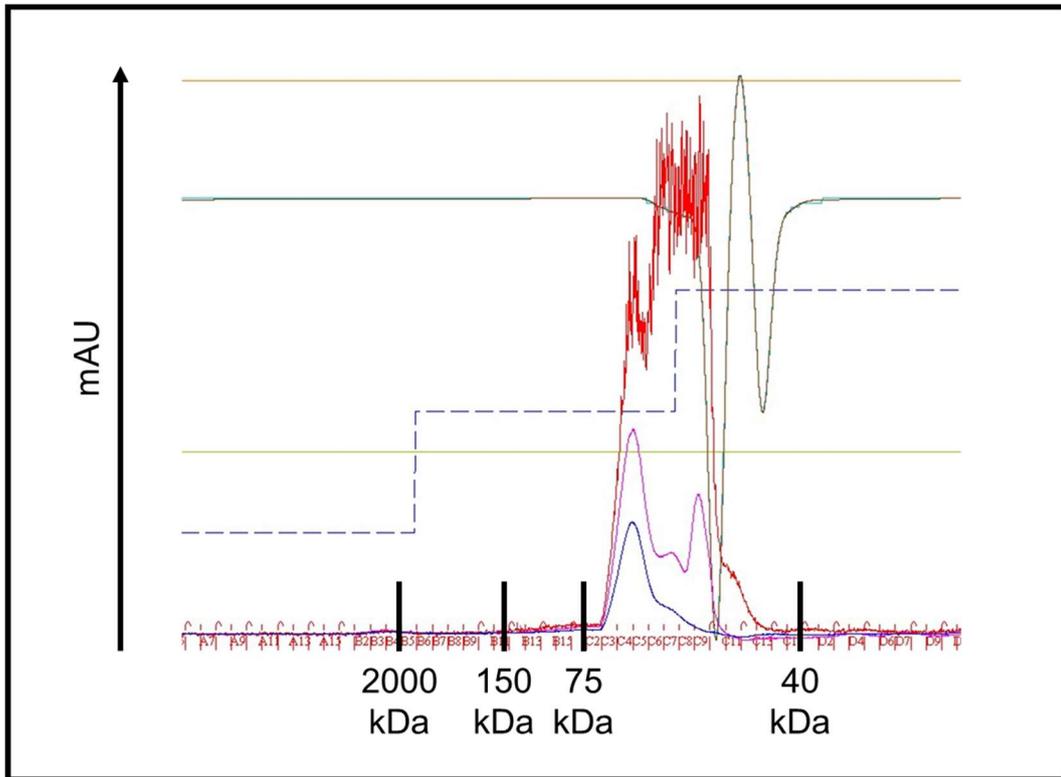


Abbildung 3.8. Auswertungskurve einer Größenausschlusschromatographie einer GST-CTF-Probe. Die Intensität der Lichtreaktion ist auf der Ordinate in milli-arbitrary units (mAU) angegeben. Die rote Kurve entspricht der Absorption bei 220 nm, die rosa Kurve der bei 254 nm und die blaue Kurve der bei 280 nm. Die Nummerierungen A7 bis D9 entsprechen den jeweiligen Fraktionen, die von der Chromatographiesäule ausgegeben wurden. Zur Orientierung wurden einige Größenordnungen des Chromatographieverlaufes hervorgehoben.

Demzufolge befinden sich überwiegend Proteine in dieser Größe in der purifizierten Probe. Dabei lassen sich sowohl der Gipfel („Peak“) der Kurve für 254 nm (rosa) wie auch der Gipfel der Kurve für 280 nm (blau) in gute Übereinstimmung mit der errechneten und im Western Blot beobachteten Größe des Fusionsproteins GST-CTF (nämlich ca. 60 kDa) bringen. Bemerkenswerterweise zeigt sich auch zumindest im Verlauf der rosa Kurve ein zweiter Peak bei etwas geringerer Molekülmasse, der der zweiten Bande bei ca. 50 kDa im Western Blot entsprechen könnte. Die rote Kurve (Absorption bei 220 nm) entspricht am ehesten einem „Hintergrundrauschen“ verursacht durch Bestandteile der Puffersubstanz (Salze, Phosphate, Zucker), die spektroskopisch mit den Proteinen dieser Größenordnung interagieren. Im Ergebnis ist die Reinheit der Probe als zufriedenstellend anzusehen, insbesondere schien eine selektive Absonderung des GST-CTF-

Fusionsproteins möglich. Die Fraktionen C2 bis C6 dieser Größenaufschluss-Chromatographie wurden in den folgenden Bindungsversuchen eingesetzt.

3.2.2 Gewinnung von GST-PS1

Die Herstellung von GST-PS1 erfolgte in MEF-Zellen. Dabei wurde zunächst die erfolgreiche Expression des Fusionsproteins mittels Western Blot überprüft (Abb. 3.9). Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper, die Präsenilin jeweils in verschiedener Größe detektieren, verwendet.

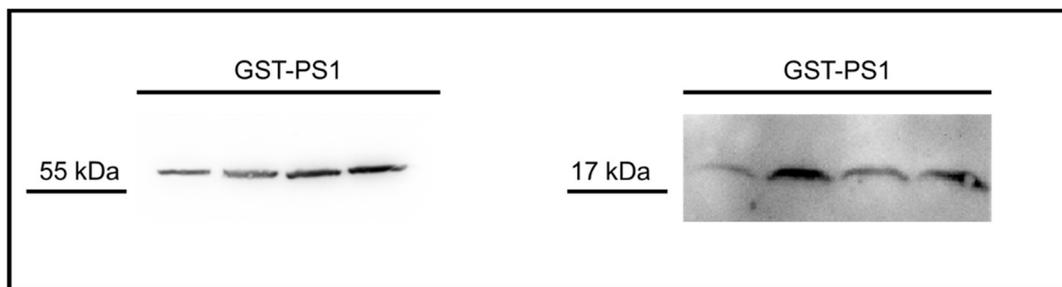


Abbildung 3.9. Western Blot mit einem Primärantikörper gegen PS1 (links PS1-FL, rechts PS1-loop). In sämtlichen Bahnen ist Lysat einer mit pcDNA3.1-GST-PS1 transfizierten Zellkultur zu finden.

Es zeigten sich mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen PS1 (PS1-FL und PS1-loop) eine Immunreaktivität in den PS-defizienten MEF-Zellen (Abb. 3.9).

Das hergestellte GST-PS1 wurde anschließend wie in Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben zum einen mithilfe der GST-Spinsäule purifiziert, um so in einem weiteren Schritt zur proteolytischen Abspaltung des GST zu gelangen, um isoliertes PS1 zu gewinnen. Zur Überprüfung des Erfolges einer GST-gestützten Purifikation erfolgte die Anfertigung eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE (Abb. 3.10) sowie ein Western Blot zur Detektion von PS1 (Abb. 3.11). Dabei zeigten sich spezifische Signale jeweils in den Elutionsschritten, also im Rahmen der Glutathion-haltigen Aussonderung von in der Säule gebundenem Protein.

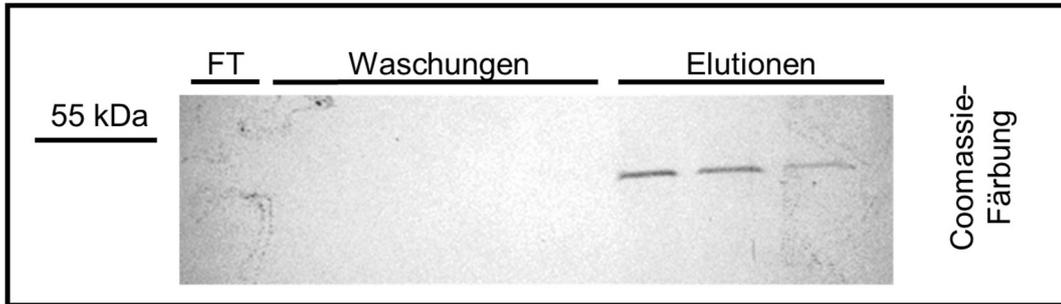


Abbildung 3.10. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE mit den einzelnen Schritten der GST-Spinsäulenpurifizierung. Durchfluss nach Beladung der Säule (FT), Durchfluss nach Waschung der Säule (Waschungen) und Durchfluss nach Elution der Säule mit Glutathion-haltigem Puffer (Elutionsschritte 1-3).

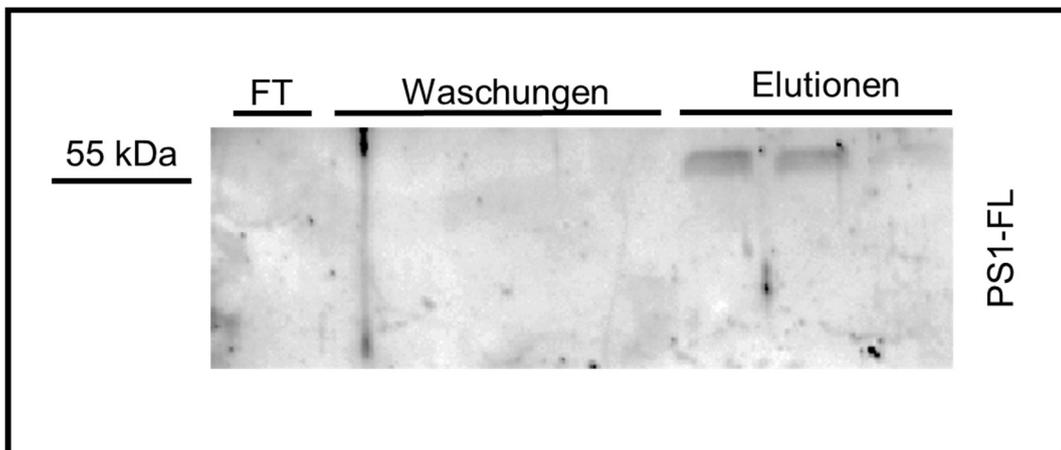


Abbildung 3.11. Western Blot der einzelnen Schritte der GST-Spinsäulenpurifizierung und Proteolyse mit einem Primärantikörper gegen PS1-FL. Durchfluss nach Beladung der Säule (FT), Durchfluss nach Waschung der Säule (Waschungen) und Durchfluss nach Elution der Säule mit Glutathion-haltigem Puffer (Elutionsschritte 1-3).

3.3 Experimente zur Untersuchung von Bindung und Interaktion mit GST-gekoppelten Proteinen

3.3.1 Bindung zwischen GST-CTF und proteolytisch isoliertem PS1

Der Bindungsversuch zwischen purifizierten GST-CTF und purifiziertem und proteolytisch gespaltenen GST-PS1 wurde wie in Abschnitt 2.2.5.4 beschrieben durchgeführt. Nach der gezielten Isolierung von GST-PS1 wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt sollte die proteolytische Aufspaltung von GST und PS1 wie beschrieben erfolgen. Ein solcher suffizienter und zufriedenstellender Verdau des GST-PS1 gelang mit dem erwähnten System bedauerlicherweise nicht. Auch nach verschiedentlichen Modifikationen des Versuchsaufbaus gelang kein signifikanter und aussagekräftiger Nachweis von isoliertem proteolytisch gespaltenen PS1 (Daten nicht gezeigt) im SDS-PAGE resp. Western Blot.

Da sich insoweit infolge einer stark eingeschränkten Beurteilbarkeit und bei fragwürdiger Aussagekraft des Spaltungsprodukts eine zielführende Fortsetzung des Experiments mit proteolytisch isoliertem PS1 erübrigte, wurden die weiteren Experimente auf die weiteren Bindungsmodalitäten fokussiert. Auf einen weiteren Einsatz der Protease bzw. auf eine enzymatische Spaltung der gewonnenen Fusionsproteine wurde verzichtet.

3.3.2 Bindung zwischen GST-CTF und humaner Gamma-Sekretase (hu- γ -Sec)

Eine andere denkbare Form der Interaktion zwischen PS1 und IP₃R1 könnte darin bestehen, dass der Calciumkanal zwar nicht direkt an PS1 bindet, sondern an den gesamten Gamma-Sekretase-Komplex bzw. an eine andere Untereinheit des Komplexes (Nicastrin, PEN2, aph-1). Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde auch ein Bindungsversuch zwischen dem Gamma-Sekretase-Komplex und rekombinatem GST-CTF durchgeführt. Zum Aufbau des Bindungsversuchs kann auf Abschnitt 2.2.5.5 verwiesen werden. Ebenso wie im Bindungsversuch mit isoliertem PS1 wurde hierbei eine Negativkontrolle (ausschließlich Gamma-Sekretase-Komplex ohne GST-CTF) mit einer Probe, die auch den fraglichen Interaktionspartner GST-CTF enthielt, verglichen. Sodann wurden die einzelnen Schritte des Purifikationsprozesses in mehreren Western Blots miteinander verglichen. Es folgten der spontane Durchfluss des ungebundenen Probenmaterials (FT), dann das auswaschbare (W1-W3) und schließlich das durch Glutathion ablösbare Probenmaterial (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Zur Beurteilung des Anhaftens von Gamma-Sekretase und/oder GST-CTF wurde der Antikörper gerichtet gegen PS1 in voller Länge (abcam ab71181; PS1-FL) verwendet.

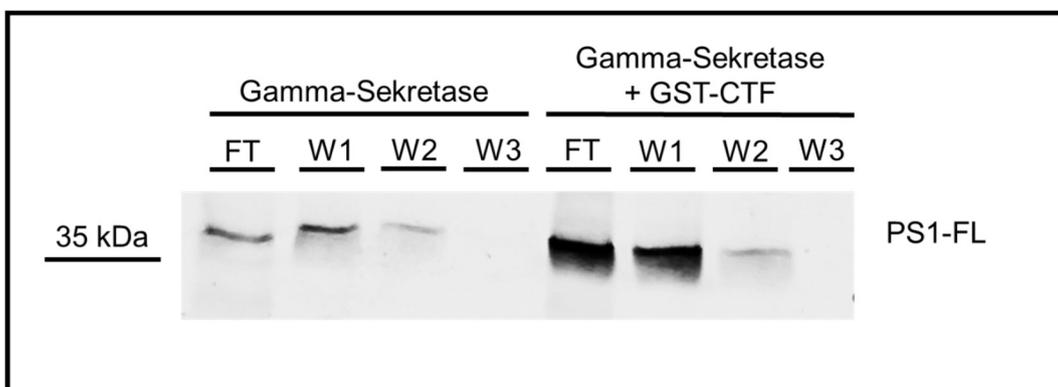


Abbildung 3.12. Western Blot des Bindungsversuchs mit den einzelnen Schritten des nach Abschnitt 2.2.5.5 durchgeführten Experiments. Der Primärantikörper richtet sich gegen PS1-FL. Im linken Bereich sind die Bahnen der Probe, die nur Gamma-Sekretase enthielt zu sehen (Nr. 1 bis 4). Rechts daneben befinden sich die Bahnen, die sowohl Gamma-Sekretase als auch GST-CTF enthielten (Nr. 5 bis 8). FT („flow-through“): Durchfluss der ungebundenen Probe; W1, W2, W3 (Nr. 2 -4; Nr. 6-8)).

Vorliegend zeigte sich der abzentrifugierte Ausfluss nach den Waschschrritten in beiden Proben für PS1 gleichermaßen leer. Es zeigte sich in den ersten Waschungen noch erhebliche Mengen PS1-haltigen Materials, wohingegen sich in der finalen Waschung (W3) überhaupt keine spezifische Bande mehr identifizieren lässt. Dies gilt für die Negativkontrolle sowie für die Versuchsprobe in gleichem Maße. Schließlich wurden noch die Elutionen des Versuchs auf ihren Gehalt an PS1 hin untersucht.

Die Elutionen des Versuchs wurden mit einem Antikörper gegen das PS1 (abcam71181) untersucht (Abb. 3.13). In den Unterabbildungen A und B sind jeweils links wiederum die Gamma-Sekretase ohne GST-CTF (Bahnen Nr. 1 bis 3), rechts die Mischung aus Gamma-Sekretase und GST-CTF aufgetragen (Bahnen Nr. 4 bis 6).

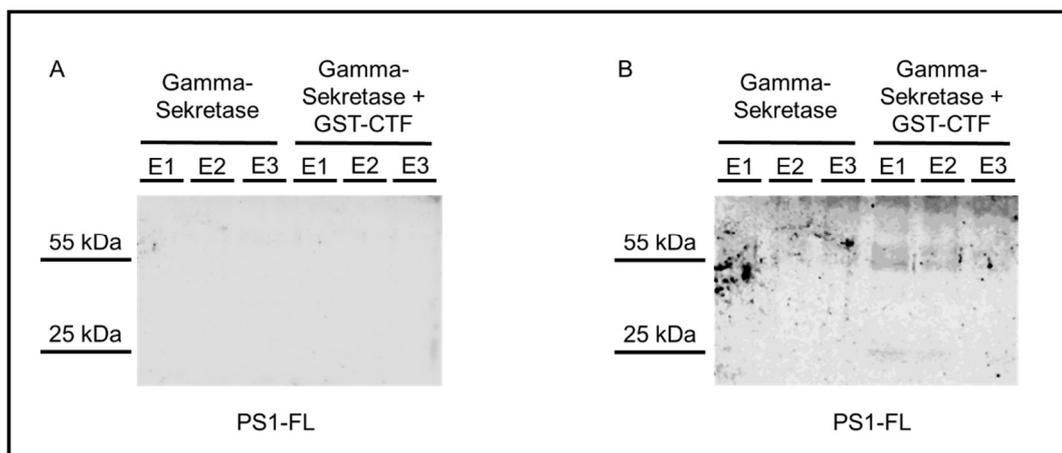


Abbildung 3.13. Western Blot des Bindungsversuchs mit den einzelnen Elutionsschritten (jeweils E1 bis E3) des nach Abschnitt 2.2.5.5 durchgeführten Experiments. Der Primärantikörper richtet sich gegen PS1-FL (abcam ab71181). In A ist die unbearbeitete Originalaufnahme zu sehen, rechts eine erheblich kontrastverstärkte und grafisch optimierte Version des gleichen Blots zu sehen. Im linken Teil sind jeweils die Bahnen der Probe, die nur Gamma-Sekretase enthielt, zu sehen. Rechts daneben befinden sich die Bahnen, die sowohl Gamma-Sekretase als auch GST-CTF enthielten.

Vorliegend zeigt sich in der Höhe von ca. 55 kDa sowohl für die Kontrolle (nur Gamma-Sekretase) als auch für das Experiment (Gamma-Sekretase + GST-CTF) in der ursprünglichen Aufnahme das Fehlen jeglicher Signale. Allenfalls in der durch starke Kontrastierung nachjustierten Aufnahme (B, Abb. 3.13.) lassen sich bei 55 kDa fragliche Signale identifizieren, wobei ein Unterschied zwischen Kontrolle und Experiment nicht ersichtlich ist. In der Höhe von ca. 25 kDa zeigt sich ein sehr

diskretes Signal für das Experiment (Gamma-Sekretase + GST-CTF), dass sich in der Kontrolle (kein GST-CTF) nicht finden lässt. Diese äußerst diskreten Banden sind infolge ihrer geringen Intensität als Ausdruck einer unspezifischen Bindung zwischen den beteiligten Proteinen zu werten und muss als nicht signifikant eingeordnet werden. Ein überzeugender Hinweis auf eine direkte Interaktion konnte aus dem vorliegenden Experiment nicht abgeleitet werden.

3.3.3 Bindung zwischen GST-CTF und PS1-haltigem Homogenat aus MEF

Der Bindungsversuch zwischen purifiziertem GST-CTF und Homogenaten aus PS1-überexprimierenden MEF-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.6 beschrieben. Die verschiedenen Proben bzw. Versuchsschritte wurden später in insgesamt vier Western Blots zusammengefasst und analysiert. Dabei wurden in den linken Bahnen in zwei der vier Western Blots jeweils die gemeinsam inkubierte Probe (GST-CTF + MEF-Homogenat), nur GST-CTF und nur MEF-Homogenat aufgetragen. In den anderen beiden Western Blots wurden nur die Ausgangsproben (also GST-CTF und MEF-Homogenat). In allen vier Western Blots schlossen sich daran die Waschungen (abgebildet ist jeweils die finale Waschung (FW)) aus den drei Versuchskombinationen (GST-CTF + MEF-Homogenat, nur GST-CTF, nur MEF-Homogenat) an. Schließlich wurden in den letzten drei Bahnen der vier Western Blots die Glutathion-Elutionen der jeweils drei Versuchskombinationen (GST-CTF + MEF-Homogenat, nur GST-CTF, nur MEF-Homogenat) aufgetragen. Jede Membran wurde mit jeweils einem Antikörper (Anti-IP3R1-CTF, Anti-GST, Anti-PS1 und Anti-ERp44) inkubiert.

In Abb. 3.14 ist der mit Anti-IP3R1-CTF (ABS55) untersuchte Western Blot dargestellt. Es zeigt sich, dass sich in den inkubierten Proben erhebliche Mengen GST-CTF (Größe von ca. 60 kDa) befinden, die in der ausschließlich MEF-Homogenat enthaltenden Kontrolle (Bahn Nr. 3) nahezu fehlt. Das dennoch vorhandene Signal wurde als IP3R1-Fragment infolge von Proteindegradation gewertet. In den mittleren drei Bahnen findet sich für keine der Proben ein Signal. Dies ist für die GST-CTF-haltigen Proben (Bahnen Nr. 4 und 5) am ehesten durch ein Ausbleiben der proteolytischen Aktivität der eingesetzten HRV-3C-Protease zu erklären.

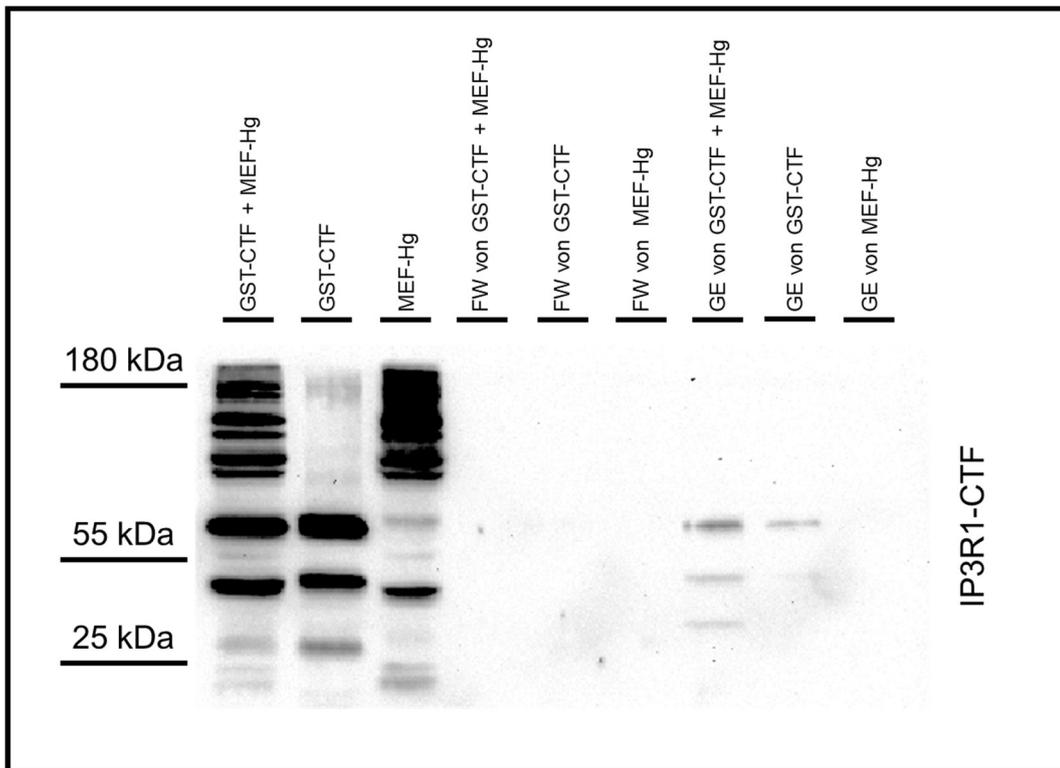


Abbildung 3.14. Western Blot des Bindungsversuchs zwischen GST-CTF und MEF-Homogenat mit einem Antikörper gegen IP3R1-CTF (ABS55). In den ersten drei Bahnen finden sich jeweils die verschiedenen Zusammensetzungen der Proben nach Inkubation; in den mittleren drei Bahnen die Ausflüsse aus der Säule nach Auswaschung unspezifischer Bindung; in den letzten drei Bahnen befinden sich die Glutathion-Elutionen der jeweiligen Proben.

In den durch die Reduktion durchgeführte Elutionen findet sich für die GST-haltigen Proben ein zwar diskretes, aber spezifisches Signal, das auf die Ablösung von intaktem GST-CTF hinweist. Ein solches Signal fehlt für das MEF-Homogenat völlig (letzte Bahn Nr. 9 ganz rechts), sodass eine eigenständige Bindung von c-terminalen IP3R1-Bestandteilen an die Säulenmatrix ausgeschlossen werden konnte.

In dem mit Anti-PS1-Antikörper behandeltem Western Blot (Abb. 3.15) zeigte sich antikörperspezifische Signale nur in den Bahnen Nr. 1 (GST-CTF + MEF-Homogenat) und Nr. 3 (nur MEF-Homogenat). Dies legt nahe, dass PS1 nur in den Ausgangsproben, die im Versuch eingesetzt wurden, zu finden war und ansonsten fehlte. Aus den Signalen des Western Blots ergeben sich keine Hinweise auf eine Bindung von PS1 an IP3R1-CTF oder an das Harz oder andere Bestandteile der Säule selbst.

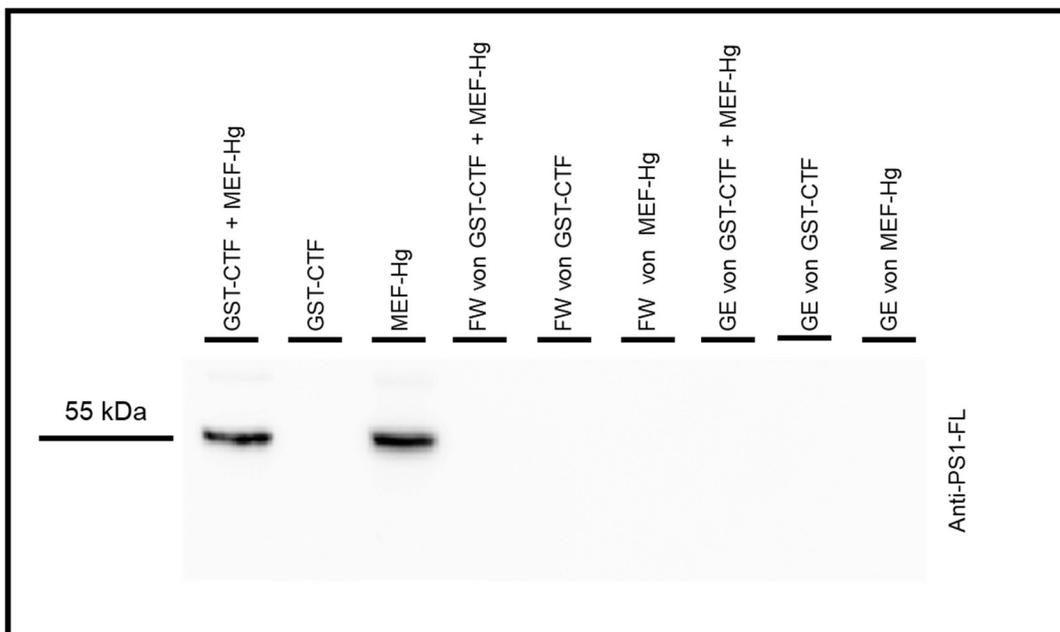


Abbildung 3.15. Western Blot des Bindungsversuchs zwischen GST-CTF und MEF-Homogenat mit einem Antikörper gegen PS1 (abcam ab71181). In den ersten drei Bahnen finden sich jeweils die verschiedenen Probenzusammensetzungen nach Inkubation; in den mittleren drei Bahnen die Ausflüsse aus der Säule nach finaler Waschung; in den letzten drei Bahnen befinden sich die Glutathion-Elutionen der jeweiligen Proben.

Eine Testung im Western Blot mit einem Antikörper gegen ERp44 war schließlich noch als Positivkontrolle durchgeführt worden (Abb. 3.16). ERp44 ist bereits als Bindungspartner des c-terminalen Bereichs von IP3R1 beschrieben worden (Higo et al., 2004) und wurde deshalb zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit des rekombinant hergestellten IP3R1-CTF herangezogen. Im vorliegenden Experiment zeigte sich jedoch weder im Durchfluss nach Proteolyse noch im Ausfluss der Säule nach Elution mit Glutathion ein Signal für ERp44, sodass sich für eine Bindung zwischen ERp44 und dem rekombinanten Protein GST-CTF keine Anhaltspunkte ergaben.

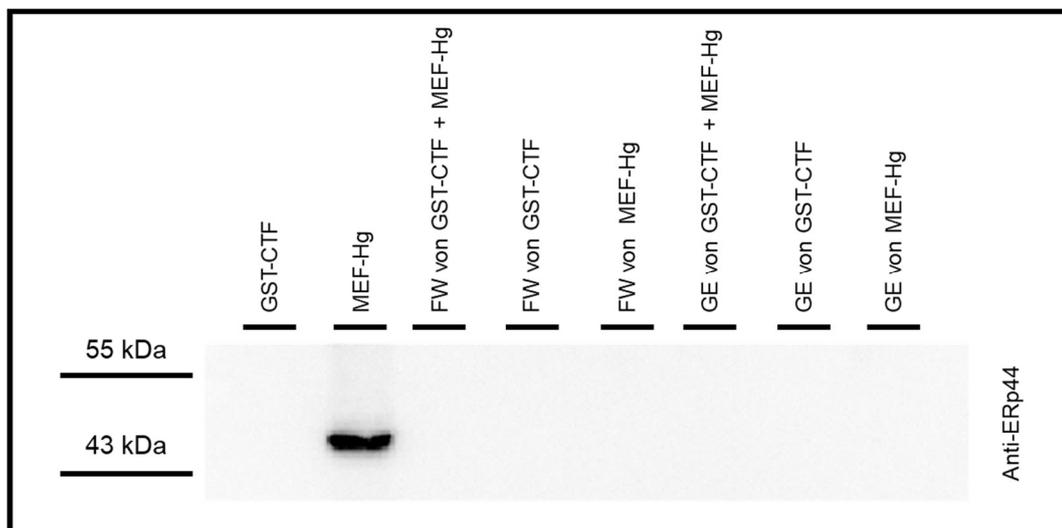


Abbildung 3.16. Western Blot des Bindungsversuchs zwischen GST-CTF und MEF-Homogenat mit einem Antikörper gegen ERp44. In den ersten beiden Bahnen finden sich jeweils GST-CTF und MEF-Homogenat nach Inkubation; in den mittleren drei Bahnen die Ausflüsse aus der Säule nach finaler Waschung; in den letzten drei Bahnen befinden sich die Glutathion-Elutionen der jeweiligen Proben.

3.3.4 Bindung zwischen GST-CTF und PS1-MEF-Homogenat mittels des Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit

Details zur Durchführung des Experiments zur Bindung zwischen dem rekombinanten GST-CTF und PS1-haltigem Zelllysate aus MEF finden sich in Abschnitt 2.2.5.7. Ziel dieses Versuchs war es, eine mögliche Interaktion zwischen dem c-terminalen Abschnitt von IP3R1 und PS1 nochmals durch eine weitere in-vitro-Methode zu untersuchen. Um ein falsch-positives Ergebnis auszuschließen, sollten zunächst Positivkontrollen etabliert werden, wozu wie schon oben insbesondere in der Literatur vorbeschriebene und charakterisierte Interaktionspartner in Betracht kamen. Nach Durchführung wurden deshalb also zunächst das Vorhandensein von IP3R1-CTF selbst sowie den Interaktionspartnern Bcl-2 und Cytochrom-c analysiert (Abb. 3.17).

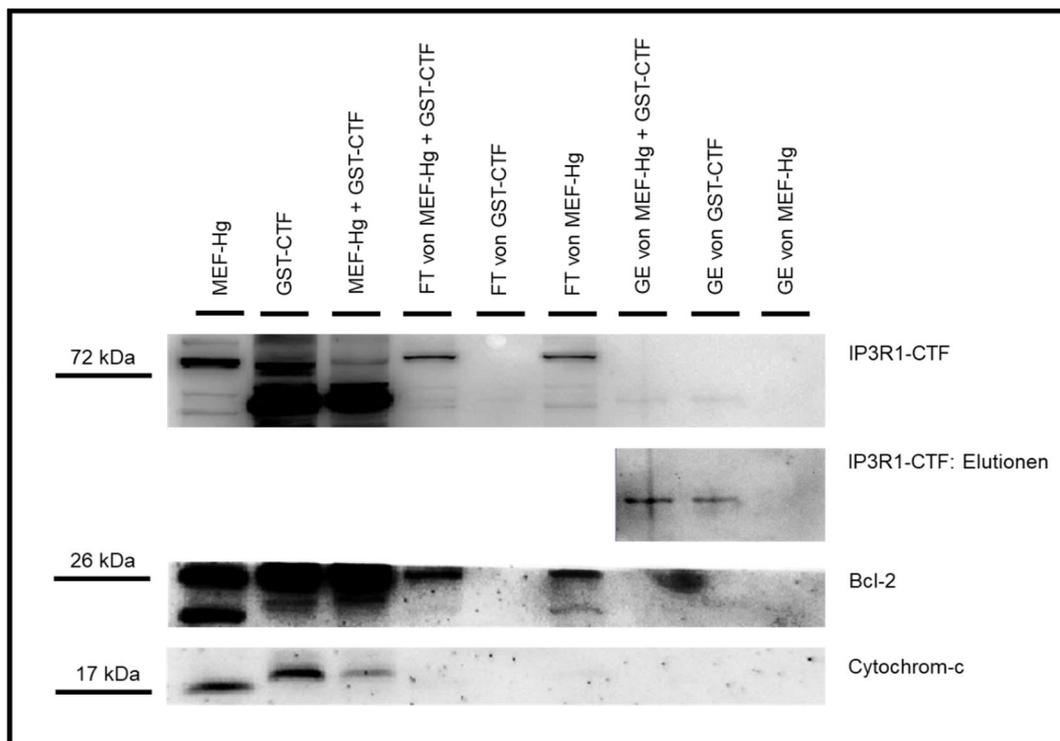


Abbildung 3.17. Western Blot des Bindungsversuchs zwischen GST-CTF und MEF-Homogenat mit dem GST-Pierce-Interaktions-Kits. In den ersten drei Bahnen finden sich jeweils GST-CTF, MEF-Homogenat und die Mischung aus beiden als Versuchsansatz. In den Bahnen Nr. 4 – 6 findet sich der Ausfluss der jeweiligen Proben nach Inkubation; in den Bahnen Nr. 7 – 9 finden sich die Ausflüsse nach Glutathion-Elutionen der jeweiligen Proben. Oben erfolgte die Antikörperprobenung mit IP3R1-CTF-Antikörper (ABS55), in der Mitte mit Bcl-2-Antikörper (cell signaling cs2872) und unten mit Cytochrom-c-Antikörper (cell signaling cs4272). Für IP3R1 wurden die Elutionsfraktionen noch einmal gesondert herausgestellt, um diese sehr feinen Banden des Blots besser darzustellen.

Dabei wurden die Proben wie folgt miteinander verglichen: Nur das totale MEF-Homogenat (MEF-Hg, Bahn Nr. 1), nur das Fusionsprotein GST-CTF (GST-CTF, Bahn 2), der Versuchsansatz als Kombination aus dem zellulären Homogenat und dem GST-CTF (MEF-Hg + GST-CTF, Bahn Nr. 3) sowie die jeweiligen Kombinationen in Hinblick auf den Durchfluss nach Bindungsinubation (Bahnen Nr. 4 – 6) und auf den Durchfluss (Bahnen Nr. 7 – 9) nach Elution.

Im Western Blot (Abb. 3.17) zeigten sich Signale für die untersuchten Proteine in den Ausgangsproben sowie in den Durchflüssen nach Inkubation zumindest in MEF-Hg-haltigen Proben (Bahnen Nr. 4 und 6). In den Glutathion-Elutionen zeigte sich lediglich für IP3R ein Antikörper-Signal (Bahnen Nr. 7 und 8). Für die vorbeschriebenen Interaktionspartner (Bcl-2 und Cytochtom-c) zeigten sich keine sicher identifizierbaren Banden, die eine direkte Bindung vermuten ließen. Dementsprechend wurde in Ermangelung einer adäquaten Positivkontrolle auf eine Testung mit einem PS1-Antikörper verzichtet, da ein entsprechender Nachweis im Grunde keine Aussagekraft gehabt hätte.

3.3.5 Co-Immunopräzipitation

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation dargelegt. Die Versuchsbeschreibungen finden sich in Abschnitt 2.2.6. Mittels dieser Technik konnte ein weiterer alternativer Ansatz zur Testung einer möglichen Bindung zwischen dem IP3R1 und PS1 untersucht werden, der nicht durch die Fragmentierung des IP3R1 limitiert war. Zunächst wurden dabei Antikörper ermittelt, die sich zur Co-Immunopräzipitation eigneten. Dies wurde mittels Western Blot überprüft. Hierzu wurden stets das eingesetzte Zellhomogenat (Bahn Nr. 1), der Durchfluss („Flow-Through“; FT) nach Inkubation der jeweiligen Proteinmischung (Bahn Nr. 2), der abschließende Waschschrift (Bahn Nr. 3) sowie die Elution der Proteine vom Antikörper (Bahn Nr. 4). Entsprechende Experimente wurden für Antikörper gegen PS1 (MAB1563; cs3622; ab15456), IP3R1 und Nicastrin durchgeführt. Zudem wurden jeweils auch Proteine zur Positivkontrolle untersucht. Die Western Blots der für die Co-Immunopräzipitation gegen die PS1-Antikörper finden sich in Abb. 3.18 (Bait-Antikörper ist der PS1-NTF-Antikörper MAB1563) und Abb. 3.19 (Bait-Antikörper ist der PS1-CTF-Antikörper cs3622).

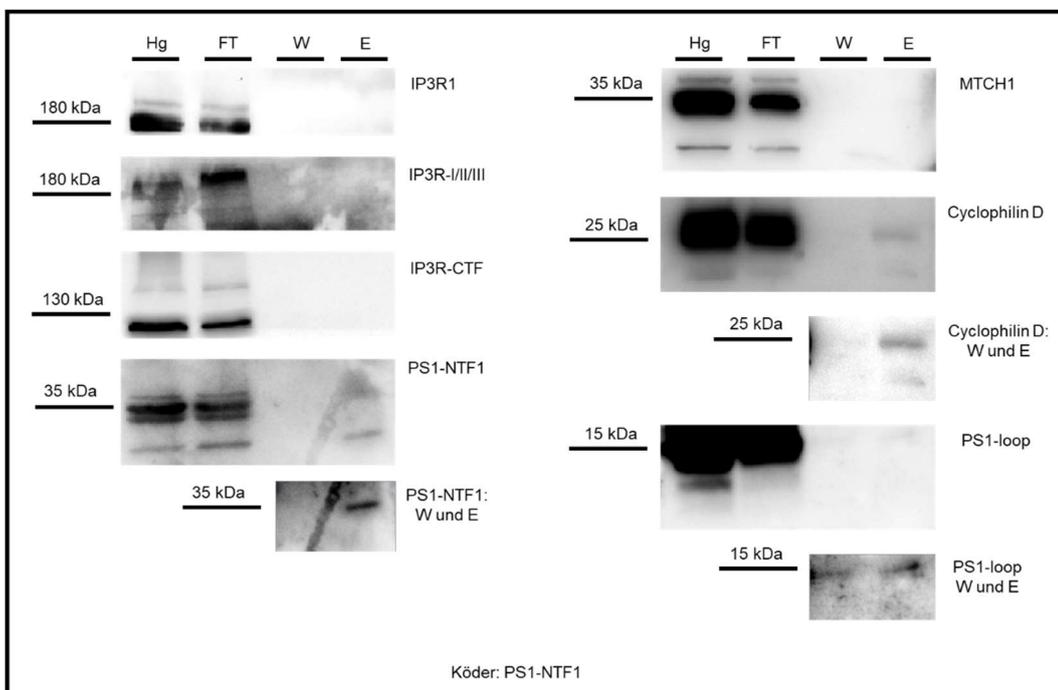


Abbildung 3.18. Western Blot der Co-Immunopräzipitationen mit dem PS1-Antikörper MAB1563 als Köder („bait“). Nebeneinander sind Homogenat (Hg), Überstand nach Protein-Protein-Inkubation (FT), letzte Waschung der Co-Immunopräzipitation (W) und Elution der gebundenen Proteine (E) aufgetragen.

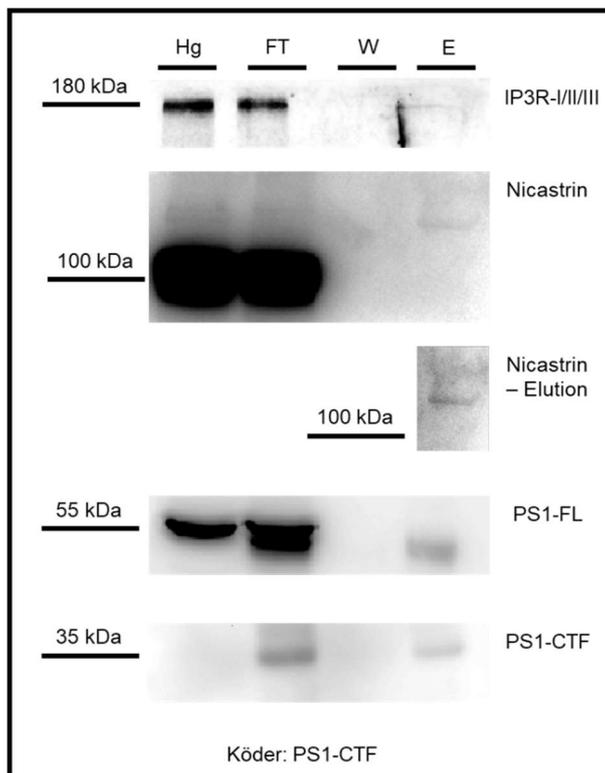


Abbildung 3.19. Western Blot der Co-Immunopräzipitationen mit dem PS1-Antikörper PS1-CTF (cs3622) als Köder („bait“). Nebeneinander sind Homogenat (Hg), Überstand nach Protein-Protein-Inkubation (FT), letzte Wäsche der Co-Immunopräzipitation (W) und Elution der gebundenen Proteine (E) aufgetragen. Zur Detektion wurden folgende Antikörper eingesetzt: Anti-IP3R-I-II-III; Nicastrin; Anti-PS1-FL; Anti-PS1-NTF1; Anti-PS1-CT. Zur besseren Sichtbarkeit wurde die Elutionsbande für Nicastrin noch einmal mit verstärktem Kontrast dargestellt.

Mit MAB1563 als Köder-Antikörper („bait“) zeigte sich eine schwache Bindung von PS1 selbst (Immunopräzipitation): Sowohl für den PS1-Antikörper (MAB5232) gegen die „Loop“-Region von PS1 als auch für den Antikörper gegen das N-terminale Fragment von PS1 (MAB 1563) fand sich ein proteinspezifisches Signal. Für den dritten zur Detektion von PS1 eingesetzten Antikörper, nämlich PS1-FL zeigte sich kein Signal. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass PS1-FL lediglich PS1 in voller Länge, also vor der Proteolyse in die beiden Fragmente, detektiert. Weiterhin ließ sich ein Signal für Cyclophilin D nachweisen. Auch für den Antikörper gegen Nicastrin wäre ein Signal zu erwarten gewesen, was jedoch nicht zu beobachten waren. Als Bestandteil der Gamma-Sekretase ist für Nicastrin eine direkte Interaktion mit PS1 zweifelsfrei nachgewiesen (De Strooper et al., 2012). Für die beiden eingesetzten Antikörper gegen IP3R1 (sc377518 und sc271197) ist ebenso kein Signal in der Elution zu finden. Somit ergibt sich aus diesem Experiment kein Hinweis auf eine Co-Immunopräzipitation von IP3R1 durch PS1.

Neben MAB1563 wurde ein weiterer Antikörper als Köder eingesetzt und untersucht: cs3622 (Abb. 3.19), der sich gegen das C-terminale Ende von PS1 richtet. Demzufolge war eine Immunopräzipitation durch PS1 nachzuweisen, die

durch denselben Antikörper gelang (unterstes Panel in Abb. 3.19). Demgegenüber war für den N-terminalen PS1-Antikörper (MAB1563) kein Signal nachzuweisen, was sich über die ausschließliche Bindung des C-terminalen Fragments von PS1 als Köderprotein erklären lässt. Der Antikörper gegen das PS1 in voller Länge (ab71181) war, wie auch im Falle von MAB1563 ohne spezifische Bande. Zwar ließ sich im Western Blot ein Signal in der Höhe entdecken, es ist jedoch davon auszugehen, dass dieses der leichten Kette des eingesetzten Köder-Antikörpers entspricht, da es in der Ausgangsprobe (Homogenat; Hg) fehlt, dafür aber in der Probe nach Inkubation von Antikörper und Protein ebenfalls nachzuweisen ist (Durchfluss; FT). Nicastrin wiederum war in diesem Fall nachzuweisen und konnte so als Positivkontrolle gewertet werden. Für den erprobten IP3R1-Antikörper (sc377518) war auch hier kein spezifisches Signal aufzufinden.

Die Untersuchung der Co-Immunopräzipitation wurde auch mit Köder-Antikörpern gegen Nicastrin (Abb. 3.20) und IP3R (Abb. 3.21) durchgeführt.

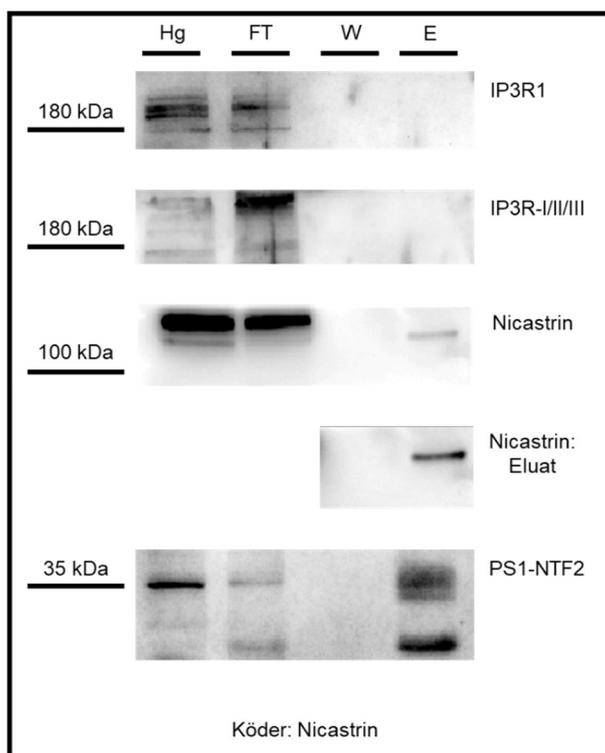


Abbildung 3.20. Western Blot der Co-Immunopräzipitationen mit dem Nicastrin-Antikörper sc377513 als Köder („bait“). Nebeneinander sind Homogenat (Hg), Überstand nach Protein-Protein-Inkubation (FT), letzte Waschung der Co-Immunopräzipitation (W) und Elution der gebundenen Proteine (E) aufgetragen.

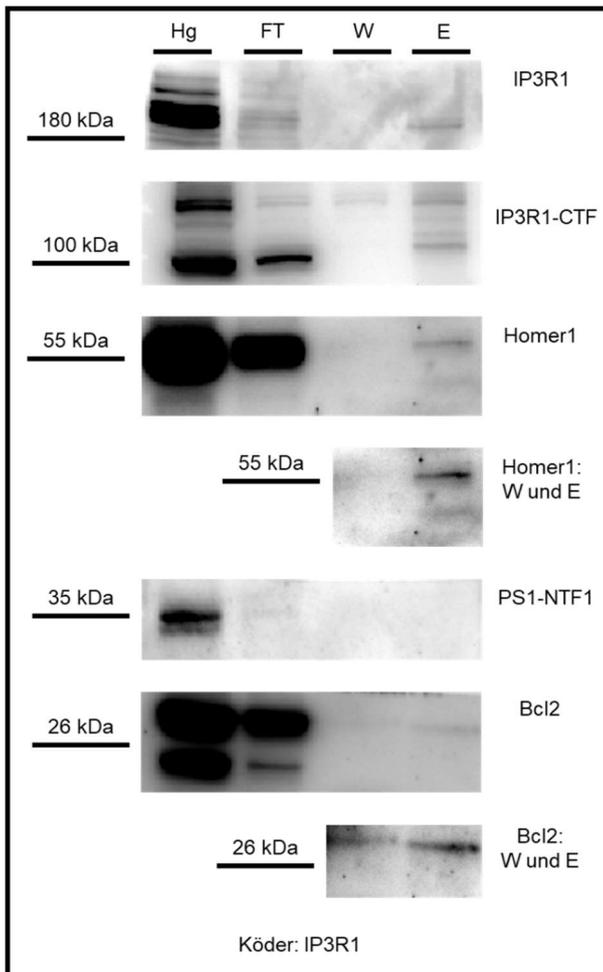


Abbildung 3.21. Western Blot der Co-Immunopräzipitationen mit dem IP3R1-Antikörper sc271197 als Köder („bait“). Nebeneinander sind Homogenat (Hg), Überstand nach Protein-Protein-Inkubation (FT), letzte Waschung der Co-Immunopräzipitation (W) und Elution der gebundenen Proteine (E) aufgetragen. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Wasch- sowie Elutionsbande für Homer1 und bcl-2 noch einmal mit verstärktem Kontrast dargestellt.

In letzterem Fall wurde als Antikörper sc271197 eingesetzt, der sich gegen die zytoplasmatische Domäne von humanem IP3R1 zwischen den Aminosäuren 1894 und 1973 richtet. Im Falle von Nicastrin als eingesetztem Köder-Antikörper (Abb. 3.20) zeigte sich eine Immunpräzipitation von Nicastrin sowie eine Co-Immunopräzipitation von PS1-NTF (ab15456). Ein anderer Anti-PS1-NTF-Antikörper (MAB1563) wies jedoch kein der Größe entsprechendes Signal auf. Jedenfalls für die Co-Immunopräzipitation von IP3R1 fand sich für die entsprechenden Antikörper (sc377518, sc271197) kein Hinweis. Für IP3R1 als Köder-Antikörper (Abb. 3.19) gelang eine Immunpräzipitation (Nachweis durch die Antikörper sc271997 und ABS55) sowie eine Co-Immunopräzipitation in der Literatur beschriebener Bindungspartner: Bcl2 (Rong et al., 2009) und Homer1 (Fagni et al., 2002). ERp44 ist zwar auch als direkter Bindungspartner vorbeschrieben (Higo et al., 2005), was jedoch hier nicht detektiert wurde (nicht gezeigt). Ein Nachweis von PS1 (MAB1563) als Co-Immunopräzipitat gelang auch

hier nicht. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder PS1 den IP3R1 noch IP3R1 das PS1 in den hier durchgeführten Versuchen co-immunopräzipitiert.

gebildet. Cheung et al. stützten ihre Annahme einer direkten biochemischen Interaktion zwischen IP₃R1 und Präsenilinen auf eine von der Gruppe durchgeführte Immunopräzipitation, die eine erfolgreiche Präzipitation von IP₃R1 mit PS1 und PS2 zeigen konnte (Abb. 4.2).

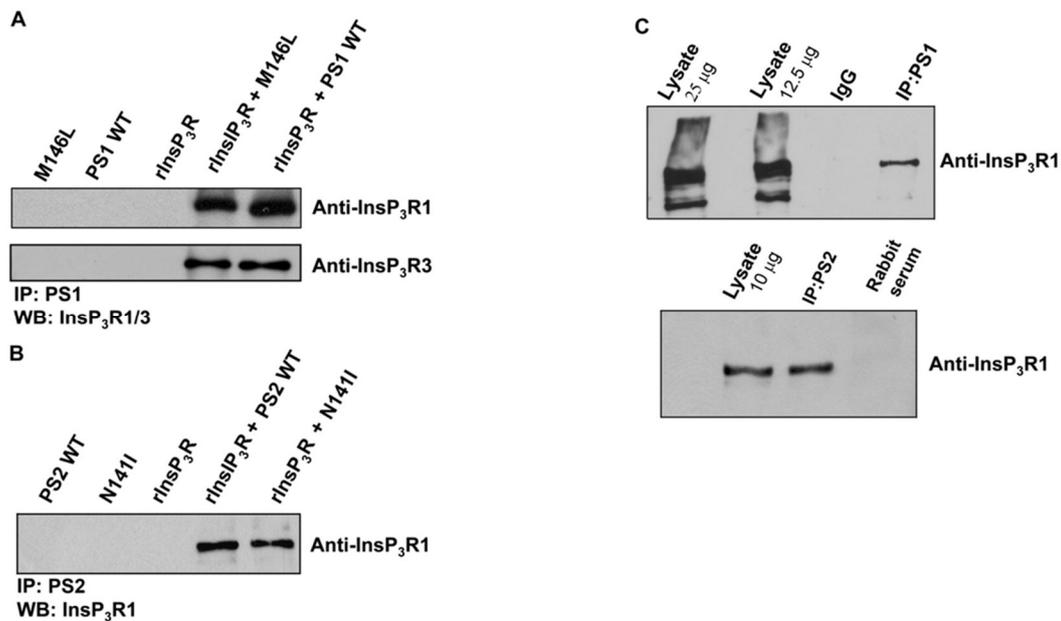


Abbildung 4.2. Western Blots der Immunopräzipitationen von Cheung et al., 2008. In (A) sind die Immunopräzipitate aus Sf9-Zellen zu sehen, die IP₃R mit PS1-Met146Val bzw. PS1-WT koexprimieren. Als IP-Antikörper wurde ein PS1-Antikörper genutzt, als Detektionsantikörper solche gegen IP₃R1 und IP₃R3. In (B) ist der identische Western Blot für PS2-WT und PS2-Asn141Ile gezeigt. Im dritten Panel (C) ist die Immunopräzipitation aus Hirnlysate aus primären kortikalen Neuronen aus Mausembryonen.

Abbildung aus Cheung KH, Shineman D, Müller M, et al. (2008), Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP₃ receptor channel gating. *Neuron*: 58(6): 871–883.

Die in Abb. 4.2. dargestellten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen mit Insektenzellen (Sf9), die womöglich eine (intensivierte) Interaktion zwischen den Zielproteinen zulassen. Auch mag der Aufbau des Experiments eine entscheidende Rolle spielen, nämlich dahingehend, dass die mildere Formen des Zellaufschlusses das Fortbestehen eines IP₃R1-PS1-Komplexes ermöglichen, wobei die Interaktion über vermittelnde Bindungsproteine (also indirekt) zustande käme. Hierbei wäre insbesondere an die drei weiteren Partnern (Nicastrin, Aph-1 und PEN-2) des PS1 im Gamma-Sekretase-Komplex zu denken. Da der genaue Versuchsaufbau sich der Publikation von Cheung et al. nicht entnehmen lässt und auch die zur Immunopräzipitation bzw. zur Detektion eingesetzten Antikörper nicht angegeben

sind, war eine direkte Reproduktion der Ergebnisse nicht möglich. In den hier beschriebenen abweichenden Zellmodellen und Versuchsaufbauten ließ sich die von Cheung et al. gezeigte Interaktion nicht reproduzieren.

4.1.1 Herstellung der Fusionsproteine

Wie bereits in der Einführung zur Methodik angedeutet, schien eine vollständige GST-gekoppelte Expression von IP₃R1 in E. coli und damit eine gezielte Purifikation des vollständigen Rezeptors unmöglich. Dementsprechend erfolgten die Identifizierung und selektive Klonierung der endständigen Anteile, die für die Interaktion mit hoher Wahrscheinlichkeit notwendig waren. Dabei muss kritisch berücksichtigt werden, dass eine Bindung von PS1 nichtsdestotrotz in den ausgelassenen Regionen von IP₃R1 stattfinden könnte und so im Rahmen der GST-Pulldown-Versuche übersehen werden könnte. Um dieses Risiko zu minimieren und um die Versuche der GST-Bindungsexperimente methodisch weiter abzusichern, wurden ergänzend Co-Immunopräzipitationen aus Zelllysaten mit den jeweils vollständigen und unveränderten Proteinen durchgeführt.

4.1.1.1 GST- IP₃R1-CTF

Die Expression des C-terminalen Fragmentes von IP₃R1 gekoppelt an GST in E. coli gelang. Eine entsprechende Analyse in SDS-PAGE und Western Blot zeigte die Existenz zweier spezifischer Banden, von der jeweils die obere der zu erwartenden Größe von ca. 60 kDa entsprach. Ob es sich bei der jeweils kleineren Bande (ca. 45 kDa) um ein Degradationsprodukt infolge von Proteolyse handelt oder um eine alternative Auslegung des ORF ist nicht zu beurteilen. Obwohl beide Banden Antigenität gegen den zur Detektion eingesetzten Antikörper aufwiesen (ABS 55 von Merck Millipore, gerichtet gegen das zytosolische Fragment von IP₃R1), ließ sich nur das größere CTF durch die GST-Spin-Purifikation isolieren. Eine zufriedenstellende Expression und Purifikation wurden auch durch die Größenaufschluss-Chromatographie bestätigt.

4.1.1.2 GST- IP₃R1-NTF

Die Klonierung eines N-terminalen Fragmentes aus IP₃R1 innerhalb des angesetzten Projektzeitraums gelang nicht. Damit erübrigte sich auch die Expression eines rekombinanten Fusionsproteins. Die Ursache für diesen Misserfolg lässt sich nicht sicher beurteilen, es stellte sich jedenfalls heraus, dass eine Vielzahl von Primern ausprobiert worden, die alle nicht das gewünschte Ergebnis erzielen konnten. Vor dem Hintergrund, dass sich auch im N-terminalen IP₃R1 viele Interaktionspartner befinden (Homer, CaBP, IRBIT, Na⁺/K⁺-ATPase, vgl. Foskett et al., 2007) wog die Unmöglichkeit auch das NTF zu analysieren schwer.

4.1.1.3 GST-PS1

Die Klonierung von GST-PS1 gelang, wie die PCR-Kontrollen und Sequenzieren zeigten. Die Expression des neu generierten Vektors (pcDNA3.1-GST-PS1) in PS-defizienten MEF (PS1^{-/-}/PS2^{-/-}) führte zur Expression von PS1, wie durch Western Blot bestätigt werden konnte (Abb. 3.9). Unklar ist dabei jedoch, warum der Western Blot die deutlichste Bande bei etwa 55 kDa aufwies, da sich eine rechnerische Größe des Fusionsproteins von ca. 80 kDa ergibt. Bemerkenswerterweise scheint auch die autokatalytische Aktivität von PS1 (Proteolyse in ein N-terminales und in ein C-terminales Fragment) trotz des GST-Tags uneingeschränkt, da das für MAB5232 (Antikörper gegen die hydrophile Schleife von PS1 zwischen TMD 6 und 7) typische Signal im C-terminalen Ende liegt (Abb. 3.9 rechts). Hierbei ist die Größe von ca. 17 kDa erwartbar gewesen, da der N-terminal gelegene GST-Tag an der Größe des C-terminalen PS1-Fragmentes nichts ändert. So könnte gemutmaßt werden, dass sich die deutliche Bande für PS1-FL bei „nur“ 55 kDa (Abb. 3.9 links) dadurch erklärt, dass sich dieses Protein aus GST und dem angeschlossenen N-terminalen Ende von PS1 zusammensetzt (GST mit 26 kDa und PS1-NT mit 35 kDa = 60 kDa). Dagegen spricht jedoch, dass PS1-FL deutlich stärker das PS1-Holoprotein detektiert als dessen Fragmente (vergleiche Herstellerangaben). Im Ergebnis jedenfalls kann wohl von einer suffizienten Herstellung von GST-PS1 ausgegangen werden.

4.1.2 GST-gestützte Bindungsversuche („GST Pull downs“)

Die GST-gestützten Experimente zur Protein-Protein-Interaktion waren zum einen mithilfe der auch zur Purifikation verwendeten Säulen als auch durch das entsprechende Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt worden. Während sich GST-CTF als Köderprotein auch im bereits purifizierten Zustand eignete, ergaben sich Schwierigkeiten hinsichtlich der enzymatischen Restriktion zwischen GST und dem Fragment. Ein zufriedenstellender Verdau konnte jedenfalls nicht erzielt werden, allenfalls zeigte sich eine geringfügige proteolytische Aktivität. Dies kann auf viele Ursachen zurückzuführen sein, etwa auf die Inaktivität der Protease infolge suboptimaler Umgebungsbedingungen (pH, Pufferung mit Kationen, Temperatur, Inkubationszeit) oder auf eine sterische Hinderung durch Dimerisierung der GST-Proteine (Harper und Speicher, 2008). All diese Faktoren hätten, da es sich um ein neuartiges Fusionsprotein handelt, auf empirischen Wege durch Veränderung der genannten Variablen optimiert werden müssen (vgl. Herstellerangaben), was den zeitlichen Rahmen der vorgelegten Arbeit gesprengt hätte. Aus diesen Gründen wurde auf weitere Experimente zur enzymatischen Abtrennung von IP₃R1 und PS1 verzichtet und stattdessen GST-CTF als Köderprotein verwandt. Somit konnte immerhin noch eine „semi-purifizierte“ Interaktionsanalyse erfolgen.

Weiterhin stellte sich der Nachweis von Positivkontrollen im Falle von GST-CTF als schwierig heraus. Dabei wurden unter den in Betracht kommenden Interaktionspartnern ERp44, bcl-2 und Cytochrom-C (CytC) untersucht. Eine Bindung zwischen ERp44 und IP₃R1 ließ sich in den durchgeführten Experimenten nicht nachweisen. Dies könnte auf die spezifischen Eigenschaften dieser Interaktion zurückzuführen sein: Die durch Higo (Higo et al., 2005) charakterisierte Bindung zwischen IP₃R1 und ERp44 fand sich nur unter aziden Bedingungen (pH 5,2) wohingegen der Pull-down bei neutralem pH (pH 7,2) durchgeführt wurde.

Im Falle der Bindung von CytC mit IP₃R1 war gleichfalls keine Bindung nachzuweisen. Diese von Boehning et al., 2003 beschriebene Interaktion ist eng mit der Aktivierung von apoptotischen Signalwegen im Kontext von IP₃R1 assoziiert.

Auch bei Bcl-2 gelang kein Nachweis der berichteten Interaktion mit Bcl-2. Diese wurde ausgehend von dem Artikel von Foskett (Foskett et al., 2007) vermutet und in entsprechender Absicht als Positivkontrolle getestet. Die berichtete Interaktion von Bcl-2 und IP₃R1 im C-terminalen Bereich hat sich jedoch später als unzutreffend herausgestellt, vielmehr bindet Bcl-2 den IP₃R1 im mittleren Abschnitt des Proteins in einer Domäne innerhalb der Aminosäuren 932 bis 1581 (Rong et al., 2008). Lediglich das vorliegend nicht getestete Bcl-X_L bindet wohl tatsächlich im C-terminalen Bereich von IP₃R1 (White et al., 2004). Somit könnte das Ausbleiben des Interaktionsnachweises von Bcl-2 mit IP₃R1 sich aus diesem Unterschied erklären.

Weiterhin kommt es für eine valide Beurteilung von Protein-Protein-Interaktion stets auch auf die Ionenstärke und andere Eigenschaften der Lyse sowie der Waschschriffe an, sodass eine zu stringente Probenverarbeitung womöglich transiente oder schwache Bindungen nicht detektiert. Um eine taugliche Positivkontrolle für IP₃R1-CTF zu etablieren, hätten in einem weiteren Schritt mildere Lysepuffer (etwa Einsatz eines anderen Detergens wie CHAPS-1% oder NP-40 anstelle des Triton wie beschrieben in Rong et al., 2008).

Schließlich kommt auch der kritischen Auswahl zu wählender Positivkontrollen der Protein-Protein-Interaktion eine besondere Bedeutung zu, da sich nicht in allen Fällen eine systemübergreifende Reproduzierbarkeit einer berichteten Interaktion herbeiführen lässt, wie sich etwa an den oben besprochenen Beispielen für ERp44 und Bcl-2 zeigen lässt.

4.1.3 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation förderte weder eine Bindung durch einen PS1-Bait-Antikörper noch durch IP₃R1-Bait-Antikörper zutage. Dabei ist anzumerken, dass die hierfür verwendeten PS1-Antikörper sich in gewissem Umfang als ungeeignet herausstellten: Während bei PS1-ab15456 weder die Präzipitation des Köder-Proteins noch von Nicastrin als Positivkontrolle gelang (Daten nicht gezeigt), ließ sich mit PS1-CTF (cs3622) immerhin Nicastrin als Interaktionspartner und die Autopräzipitation von PS1 nachweisen (Abb. 3.19). Der dritte getestete PS1-Antikörper MAB1563 immunopräzipitierte PS1, jedoch kein Nicastrin (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde auch Cyclophilin-D (CypD) präzipitiiert, wobei eine Interaktion zwischen Cyclophilin-D und PS1 soweit ersichtlich noch nicht vorbeschrieben ist. Auch Nicastrin präzipitierte kein IP₃R1, wohl aber PS1 (Abb. 3.20). Die Co-Immunopräzipitation mit dem IP₃R1-Antikörper sc271197 konnte jedoch sowohl den Rezeptor selbst wie auch Positivkontrollen (Bcl-2, HOMER1) präzipitieren (Abb. 3.21). Dass sich keine direkte Interaktion mit ERp44 fand, ist womöglich auf die nicht-acidophilen Bedingungen des Versuchs zurückzuführen (siehe oben). Das hier in PBS gelöste Zellhomogenat wies einen entsprechenden neutralen pH auf, was womöglich die Bindung während der Inkubationsphase hinderte und so die Abweichung zu dem von Cheung et al. (vgl. 4.1 mit Abb. 4.2) gezeigten Ergebnissen erklärte. Über eine systematische Austestung und Vergleichung verschiedener Lyse- und Bindungspuffer sowie einer Variation der eingesetzten Detergenzien könnte hierbei in weiteren Experimenten womöglich die tatsächliche Bindungsaffinität näher charakterisiert werden.

4.1.4 Gesamtergebnis

Trotz gewisser vorangehend dargelegter methodischer Defizite fand sich in keinem der vorgenommenen Experimente ein überzeugender Hinweis auf eine direkte biochemische Interaktion zwischen PS1 und IP₃R1. Dies gilt sowohl für nativ exprimiertes PS1 in MEF und N2a-Zellen, für GST-PS1 aus MEF-Zellen und für Untersuchungen mit dem vollständigen Gamma-Sekretase-Komplex. Zumindest bei den Versuchen zur Co-Immunopräzipitation konnte eine Bindung von PS1 und IP₃R1 zu geläufigen Interaktionspartnern nachgewiesen und so Positivkontrollen etabliert werden. Dementsprechend konnte eine direkte Interaktion der

untersuchten Proteine nicht nachgewiesen werden, sodass sich weitere Untersuchungen wie eine punktgenaue Mutagenese zur Identifikation der für eine Bindung unabdingbaren Aminosäurereste oder eine Strukturanalyse durch Röntgenkristallographie erübrigten. Die formulierte Hypothese ist somit im Ergebnis zu verneinen.

4.2 Alternative Erklärungsmodelle

Wenn aber nicht durch eine direkte PS- IP₃R1-Interaktion, wie ließen sich dann die PS-assoziierten erhöhten Calciumspiegel und insbesondere auch die gesteigerte IP₃R1-Aktivität erklären? Hierzu wurde eine Reihe von Modellen entwickelt.

4.2.1 Überladung des ER mit Calcium

Erstmals 2000 (Leissring et al., 2000) wurde vorgeschlagen, dass pathologisch überfüllte ER-Calciumspeicher Ursache verstärkten Calciumausstroms und der damit einhergehenden Dysregulation seien. Tu et al., 2006 (Tu et al., 2006) konnten zeigen, dass Präseniline als Calcium-Leckage-Kanäle mit niedriger Leitfähigkeit in der ER-Membran fungieren. Als solche sorgen sie in quasi-antagonistischer Weise zur SERCA-Pumpe für einen kontinuierlichen und geringfügigen Ausstrom von Calcium aus dem ER ins Zytoplasma. In PS-defizienten embryogenen Fibroblasten der Maus (DKO-MEF) zeigte sich ein um das 1,8-fach vergrößerter Pool an ionomycin-sensiblen Calcium. Kunstmembranen, die in ER-Microsomen aus Sf9-Zellen eingebracht wurden, zeigten sich nur bei Expression von Präsenilinen stromleitend für divalente Kationen (Ba²⁺ und Cs²⁺). Bemerkenswerterweise zeigte sich für zwei PS1-Mutationen (PS1-Met146Val und PS2-Asn151Ile) deutliche eingeschränkte Ströme über die Kunstmembran, wohingegen andere Mutationen (PS1-Asp257Ala und PS1-Δ-Exon9) regelrechte bzw. sogar gesteigerte Ströme zeigten. Daraus wurde gefolgert, dass bestimmte Präsenilin-Mutationen womöglich mit einem Loss-of-function einhergehen, wodurch die Calcium-Leckage aus dem ER abgeschwächt wird (Tu et al., 2006). Durch Untersuchung weiterer PS1-Mutationen konnte die Arbeitsgruppe für sieben weitere PS1-Mutationen sowie für eine PS2-Mutation ebenfalls eine abgeschwächte Calcium-Leckage aus dem ER nachweisen (Nelson et al., 2007). Das Modell, dass Präseniline als ER-Calcium-

Leckage-Kanäle fungieren konnte jedoch in unabhängigen Experimenten nicht repliziert werden (Shilling et al., 2012).

4.2.2 Defizite im Store operated Calcium Entry (SOCE)-Mechanismus

Das ER als maßgeblicher Calcium-Speicher der Zelle ermöglicht den bedarfsangepassten und raschen Einstrom von Calcium in den Intrazellularraum. Um dies zu gewährleisten, bedarf es der kontinuierlichen Wiederauffüllung des ERs, um das abgegebene Calcium auszugleichen. Der entsprechende Mechanismus lautet „store operated calcium entry“ (SOCE) oder früher auch „capacitative calcium entry“ (CCE) und wurde 1986 (Putney JW, 1986) erstmalig beschrieben. Dabei führt der rezeptor- oder ligandenabhängige Influx von Calcium aus dem ER in den Intrazellularraum zu einem kontinuierlichen Calciumeinstrom von extrazellulär über die Plasmamembran, der letztlich der Wiederauffüllung des ER-Calcium-Speichers dient (Prakriya und Lewis, 2015). Dabei kommt es bei abfallendem Calciumspiegel im ER zu einer Konformationsänderung mehrerer Proteine, die schließlich in einer Vernetzung der ER-Membran mit plasmamembranständigen Calciumkanälen mündet. Ein abgeschwächter SOCE im Zusammenhang mit einer Präsenilin-Mutation wurde erstmals beschrieben, als sich ein abgeschwächtes Plateau in der intrazellulären Calciumkonzentration bei PS1-Met146Val-Knock-in-Mausfibroblasten zeigte, was auf einen verminderten reaktiven Calcium-Einstrom hindeutete (Leissring et al., 2000). Diese Präsenilin-assoziierte Fehlfunktion scheint der A β ₄₂-Akkumulation voranzugehen (Yoo et al., 2000). Die zentralen Proteine dieses Mechanismus, nämlich die als Calciumsensoren fungierenden Proteine STIM1 und 2 sowie der Calcium-Influx-vermittelnde Kanal Orai1 sind essenziell für die Ausbildung von dendritischen Spines, die ihrerseits wichtiger struktureller Bestandteil der Synapse und der Bildung neuronaler Kreisläufe sind (Secondo et al., 2018). PS-Mutationen, die mit FAD assoziiert sind, führen zu einer verminderten Expression von STIM2 in B-Lymphozyten (Bojarski et al., 2009), in PS1-Met146Val-Knock-in-Mäusen (Sun et al., 2014) sowie in APP-Knock-in-Mäusen (Zhang et al., 2015). Dies wiederum resultiert in einem Verlust dendritischer Spines und Synapsen (Sun et al., 2014; Zhang et al., 2015). Dabei scheine auch Rescue-Effekte möglich: So führte eine Überaktivierung des SOCE-Mechanismus durch Überexpression von dessen Bestandteilen STIM1 und Orai1 und dem damit assoziierten

Calciumstrom in das ER zu einer deutlich verminderten Amyloid- β -Synthese (Zeiger et al., 2013). Andere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass es sich bei STIM1 um ein Substrat der Gamma-Sekretase handelt, sodass die Expression einer Präsenilin-Mutation (PS1-Met146Leu) zu einer gesteigerten Gamma-Sekretase-Aktivität und so zu einer gesteigerten Prozessierung von STIM1 kommt (Tong et al., 2016).

4.2.3 Amyloid- β und der IP₃R1

Auch im Zusammenhang von Amyloid- β und einer Überaktivität sind in jüngerer Zeit diverse neue Erkenntnisse zusammengetragen worden. Aufbauend auf diesen hat die Arbeitsgruppe um Calvo-Rodriguez (Calvo-Rodriguez et al., 2020) ein Amyloid- β -Exazerbationsmodell entwickelt, wonach zunächst eine neuronale Calcium-Dysregulation als allgemeine Folge auf das Altern zurückgeführt werden kann. So zeigen gealterte Neurone in Zellkultur eine verminderte Leistungsfähigkeit des SOCE-Mechanismus, gesteigerte ER-Calciumspiegel und einen verstärkten Transfer von Calcium vom ER in die Mitochondrien, wie eine andere Arbeit dieser Gruppe ergab (Calvo-Rodriguez et al., 2016).

Zugabe löslichen A β_{42} führte nun in älteren hippocampalen Neuronen der Ratte zu einer Verstärkung all dieser Effekte, was sich auch in einer deutlichen Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen niederschlug. Die A β_{42} -Exposition führte bei jungen Neuronen interessanterweise nicht zu diesen Effekten (Calvo-Rodriguez et al., 2019). Die Arbeitsgruppe sieht hierbei eine infolge von Alterungsprozessen gesteigerte Vulnerabilität und einer damit verbundenen Anfälligkeit für Amyloid- β -assoziierte Neurotoxizität als Pathomechanismus der Alzheimer-Demenz. Während junge Neurone anfallendes toxisches Amyloid- β „vertragen“, löst dies in älteren Neuronen infolge geschwächter Kompensationsmechanismen eine Überforderung der zellulären Calciumhomöostase und schließlich den Zelltod aus (Calvo-Rodriguez et al., 2020).

Doch wie führen Amyloid- β -Spezies auf molekularer Ebene zu der IP₃R1-Überaktivität und anderen Aspekten der beobachteten Calcium-Dysregulation? Eine Möglichkeit wären eine rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität: Die

altersabhängige verstärkte Expression von exzitatorischen Oberflächenrezeptoren wie NMDA-Rezeptoren und Glutamatrezeptoren führt zu einer überschießenden Calciumaktivierung durch entsprechende Agonisten und exzitatorische Metabolite (Calvo-Rodriguez et al., 2020). Auch könnte sich die Neurotoxizität bestimmter Amyloid-Spezies biophysikalisch erklären lassen: So verfügt A β ₄₂ C-terminal über die zusätzlichen Aminosäuren Alanin₄₁ und Isoleucin₄₂, was mit einer höheren Hydrophobität einhergeht. So könnten lösliche A β -Oligomere mit ihren hydrophoben C-termini direkt mit der Lipidmembran interagieren und so Einfluss auf exzitatorische Zelloberflächenrezeptoren (mGlu-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren) nehmen, womöglich auch über eine direkte Bindung an einen dieser Rezeptoren (Li et al., 2020).

4.2.4 Anderweitige Beeinflussung des IP₃-Signalweges

Während in älteren Neuronen der Ratte eine Überexpression der IP₃R-Isoformen (am stärksten IP₃R1) auffiel (Calvo-Rodriguez et al., 2019), könnten in Modellen der FAD, die ja zur Erkrankung bei Jüngeren führt, eine Steigerung der IP₃R1-Aktivität möglicherweise auch aus Präsenilin-assoziierten Veränderungen des dem Rezeptor vorgeschalteten Signalwegs zu erklären sein. Denkbar ist dabei insbesondere, dass die beteiligten Phosphatmetabolite oder deren Enzyme in Produktion, Modifikation oder Recycling betroffen sind. So könnten Veränderungen im komplexen Stoffwechsel der Inositol-Phosphat-Metabolite und deren Kreisläufe Präsenilin-abhängig in Mitleidenschaft gezogen werden und schließlich zu einer pathologischen IP₃R-Aktivität führen.

So zeigte sich in ergänzend in dieser Arbeit vorgenommenen Experimenten die signifikante Verminderung der IP₃-Kinase Typ A (ITPKA) in N2a-Zellen, die die PS1-E280A-Mutation exprimierten, verglichen mit solchen Zellen, die den PS1-Wildtyp exprimierten (Abb. 4.3). Die IP₃-Kinase Typ A phosphoryliert IP₃ zu IP₄, wobei diese Metabolisierung das Ende der Calcium-mobilisierenden Wirkung von IP₃ zur Folge hat (Berridge MJ, 2016). Ein Pathomechanismus könnte darin liegen, dass eine reduzierte Expression von ITPKA in Gegenwart von PS1-Mutationen zu einer verminderten Umwandlung von IP₃ in IP₄ führt, was in einer höheren und dauerhafteren IP₃-abhängigen IP₃R1-Aktivität resultiert. Dies wiederum würde das

Bild des vermehrten ER-Calcium-Ausstroms erklären. Unklar bleibt nach diesem Modell, wie genau PS1 einen Einfluss auf die Expression von ITPKA nimmt.

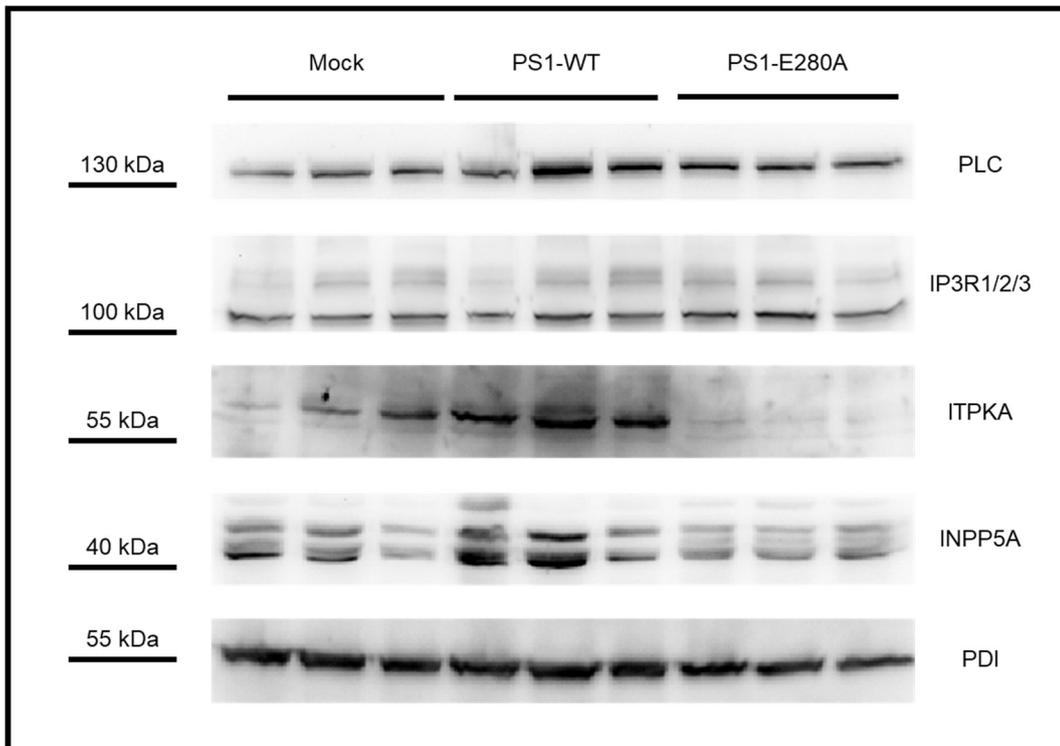


Abb. 4.3. Western Blot mit Zelllysaten aus N2a-Zellen, die entweder einen Leervektor (Mock), einen Vektor mit PS1-WT oder einen Vektor mit der cDNA für PS1-E280A exprimierten. Es wurden die Expressionsstärken verschiedener am Inositolphosphat-Stoffwechsel beteiligter Proteine untersucht (PLC, IP3R1, ITPKA, INPP5A). PDI dient als Expressionskontrolle.

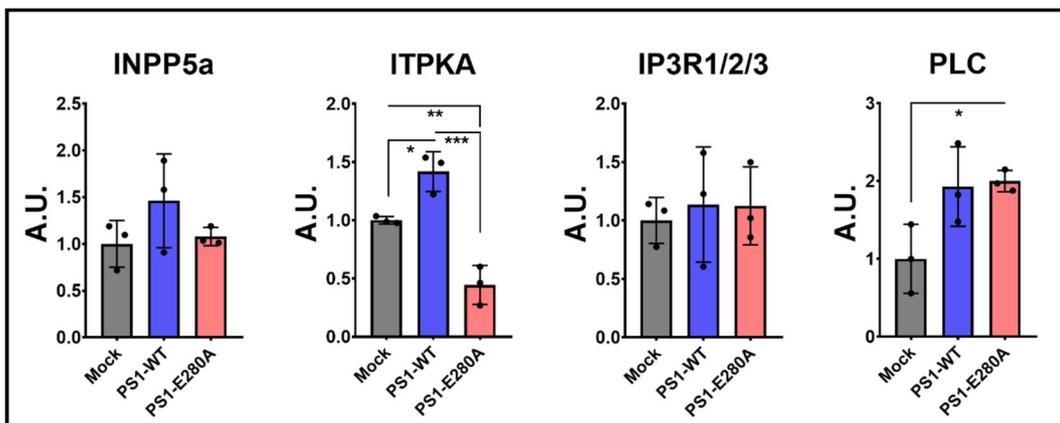


Abb. 4.4. Statistische Auswertung der Intensität der Fluoreszenzsignale aus Western Blot in Abb. 4.3. Western Blot für die vier untersuchten Proteine (INPP5a, ITPKA, IP3R1/2/3 und PLC). Signifikanzniveaus: * = $0,01 \leq p < 0,05$; ** = $0,001 \leq p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (Statistische Auswertung freundlicherweise durch Dr. Diego Sepulveda-Falla.)

Weiterhin bindet PS1 an die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K; Baki et al., 2004), was die nachfolgenden Stoffwechselwege beeinflusst, insbesondere den PI-3-K – Akt/Proteinkinase B – GSK-3 – Signalweg, der an einer Vielzahl regulatorischer Funktion in der Zelle beteiligt ist. Dieser Mechanismus hat vor allem deshalb Beachtung erlangt, weil er über die GSK-3 und deren Phosphorylierung des Tau-Proteins mit der Alzheimer-Pathologie und neuronalem Zelltod assoziiert ist (Takashima A, 2006) und außerdem in FAD-assoziierten PS-Mutationen supprimiert zu sein scheint (Baki et al., 2008).

Es sollte dabei aber nicht übersehen werden, dass die PI-3-Kinase davon abgesehen die Phosphorylierung von PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ katalysieren (Dickson und Hille, 2019). Hierdurch wird auch der IP₃-Signalweg beeinflusst. Dementsprechend ist etwa die basale Aktivität der Phospholipase-C als Enzym zur IP₃-Generierung in PS1-ΔE9-Mutationen tragenden SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen gesteigert (Cedazo-Minguez et al., 2002). Auch zeigten sich die PIP₂-Level in PS-Mutationen (PS1-ΔE9; PS1-Leu286Val; PS2-Asn141Ile) exprimierenden HEK293-Zellen vermindert (Landman et al., 2006). Interessanterweise zeigte diese Arbeit auch, dass die Steigerung der PIP₂-Level durch Hemmung der PLC (durch Edelfosine) zu einer verminderten Aβ₄₂-Produktion führte, wohingegen die Stimulation der PLC (durch m-3mFBS) zu einer Reduktion von PIP₂ und zu dies zu einer Steigerung der Aβ₄₂-Expression führte. Es könnte also argumentiert werden, dass der loss-of-function in PS1 in Bezug auf die PI-3-Kinase über einen Mangel an PI(3,4,5)P₃ auch zu einer verminderten Produktion PI(4,5)P₂ führt, da letzteres via Dephosphorylierung aus ersterem gebildet wird (Dickson und Hille, 2019). Tatsächlich ist die Expression von PTEN (Phosphatase, die PI(3,4,5)P₃ zu PI(4,5)P₂ dephosphoryliert) in Zellen, in denen kein PS exprimiert wird, deutlich vermindert, was mit einer loss-of-function-Situation zu vereinbaren wäre (Zhang et al., 2008). Die verminderten PI(4,5)P₂-Level könnten dann wiederum zu einer reflektorischen Aktivitätssteigerung der PLC führen, was schließlich in der gesteigerten IP₃-Genese resultieren könnte.

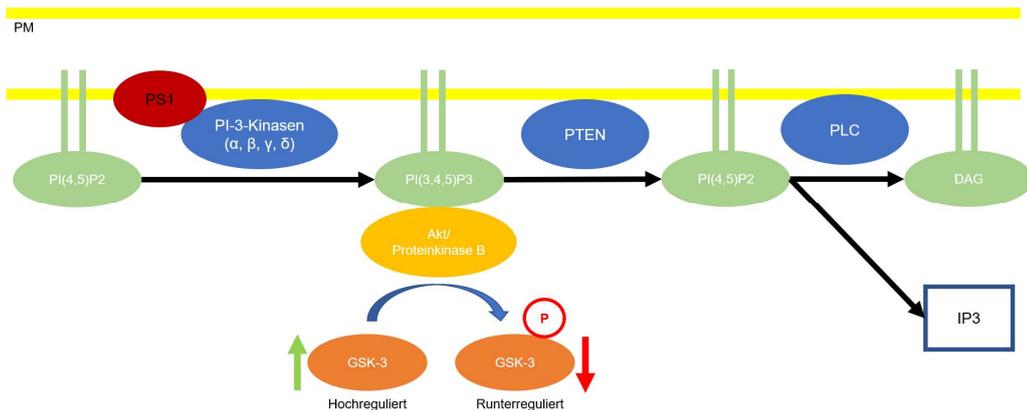


Abbildung 4.5. Übersicht über die PI-3-Kinase-Aktivitäten: Einfluss auf den Akt/Protein-kinase B – GSK3-Signalweg einerseits und auf den Phosphoinositol-Stoffwechsel andererseits.

Eine besonders wichtige Rolle in diesem Zusammenhang könnte die Gamma-Sekretase-Aktivität der Präseniline spielen: Es wurde von Yan et al. (Yan et al., 2017) gezeigt, dass eine bestimmte Aminosäuresequenz des C99-Fragments, die bei sämtlichen Substraten der Gamma-Sekretase konserviert ist, an der inneren Schicht der Plasmamembran an PIP₂ bindet (polybasische Region Lys53 bis Lys55 von C99).

Die Autoren gehen davon aus, dass diese Interaktion Voraussetzung für die korrekte Zusammenlagerung des katalytischen Zentrums der Gamma-Sekretase und dessen Fragment C99 ist. Eine Störung dieser Interaktion (zum Beispiel durch Reduktion der PIP₂-Level) könnte zum „Verfehlen“ des Substrates führen, die in einer Spaltung von C99 zwischen Leu49 und Thr48 statt zwischen Val50 und Leu49 resultiert. Damit wird der Aβ₄₂-Pfad beschriftet (Aβ₄₈ → Aβ₄₅ → Aβ₄₂), was die gesteigerte Produktion dieser toxischen Aβ-Spezies zur Folge hat.

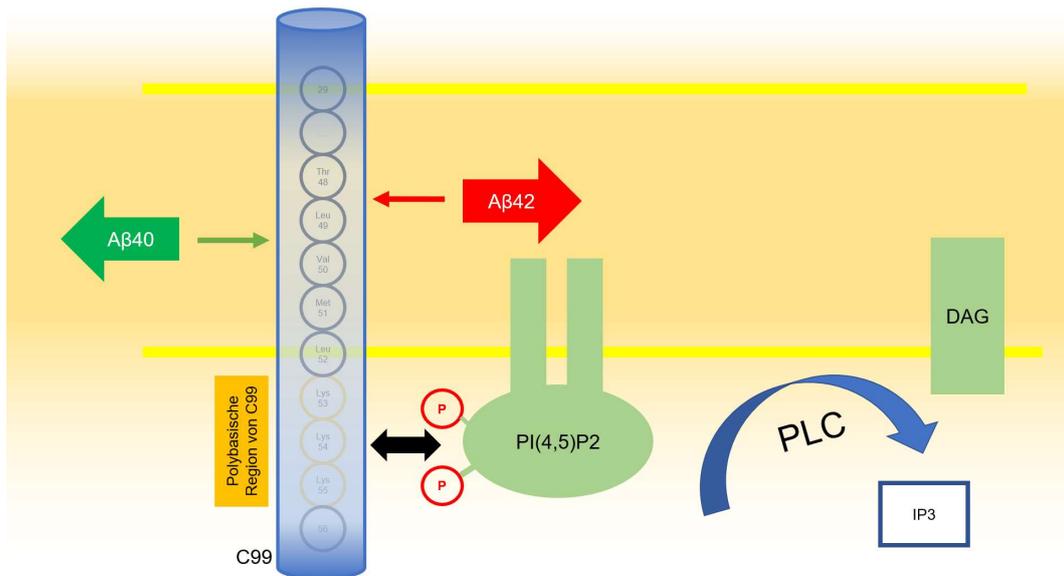


Abbildung 4.6. Darstellung der beschriebenen Interaktion zwischen PIP₂ und dem C99-Fragment aus APP. Durch unterschiedliche Schnittstellen wird entweder die Produktion von Aβ₄₀ oder Aβ₄₂ gefördert. Die polybasische Region ist orange hinterlegt.

Präsenilinen käme so eine Doppelfunktion in der Alzheimer-Genese zu: Zum einen tragen sie (auf noch ungeklärtem Wege) zu einer Störung im Inositol-Phosphat-Stoffwechsel bei, was mit einer gestörten Calcium-Homöostase einerseits und einer Minderung der PIP₂-Expression andererseits einherginge. Zum anderen kommt es aber durch die Störung der PIP₂-Expression zu einer eingeschränkten PIP₂-C99-Interaktion. Dies wiederum hat eine Beeinträchtigung der Gamma-Sekretase zur Folge, dahingehend das Präsenilin das C99-Fragment vermehrt fehlerhaft prozessiert. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Aβ₄₂-Synthese, welche schließlich in einer umfassenden amyloidogenen Neurotoxizität mündet.

4.3 Ausblick

Insgesamt scheint die Calcium-Dysregulation einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung der Alzheimer-Demenz zu nehmen, wobei vermutlich diverse verschiedene Mechanismen einen Beitrag leisten. Weiterer Klärung bedarf auch die Frage, ob und wie sich insbesondere die Modelle einer Amyloid- β -vermittelten Exzitotoxizität in das Bild der FAD einfügen. Auch erscheint unklar, welcher der beschriebenen Effekte im Ergebnis physiologisch, kompensatorisch oder pathologisch ist. Ebenso ist der Zusammenhang zwischen Präsenilinen und dem hochkomplexen und äußerst fein regulierten Inositolphosphat-Stoffwechsel (Dickson und Hille, 2019) nicht ausreichend verstanden. Hier wäre eine eingehende Analyse und Charakterisierung der am Stoffwechsel beteiligten Proteine (Kinasen und Phosphatasen) sowie der einzelnen Phosphoinositol-Metabolite in Gegenwart verschiedener PS-Mutationen und im Vergleich zum Wildtyp zweifelsfrei wertvoll. Darüber hinaus erscheint es kaum zufällig, dass Präseniline den Inositolphosphat-Stoffwechsel sowohl innerhalb ihrer amyloidogenen Eigenschaft als auch unabhängig von dieser zu beeinflussen scheinen. Ein Vorschlag für denkbare Zusammenhänge auf Grundlage der hier diskutierten Arbeiten zeigt Abb. 4.6.

Auch wenn die vorliegende Arbeit keine Evidenz für eine direkte Interaktion zwischen Präsenilinen und IP₃R1 und damit für ein entsprechendes ätiologisches Modell nachweisen konnte, so gibt es doch Hinweise im Tiermodell, dass eine Hemmung des IP₃-Singalwegs eine Linderung der Präsenilin-assoziierten FAD-Pathologie bewirken kann (Shilling et al., 2014; Wang et al., 2019). Ein Antagonismus am IP₃R1 könnte deshalb einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellen, um auf der Ebene der dysregulierten Calcium-Homöostase in den pathogenetischen Prozess einzugreifen.

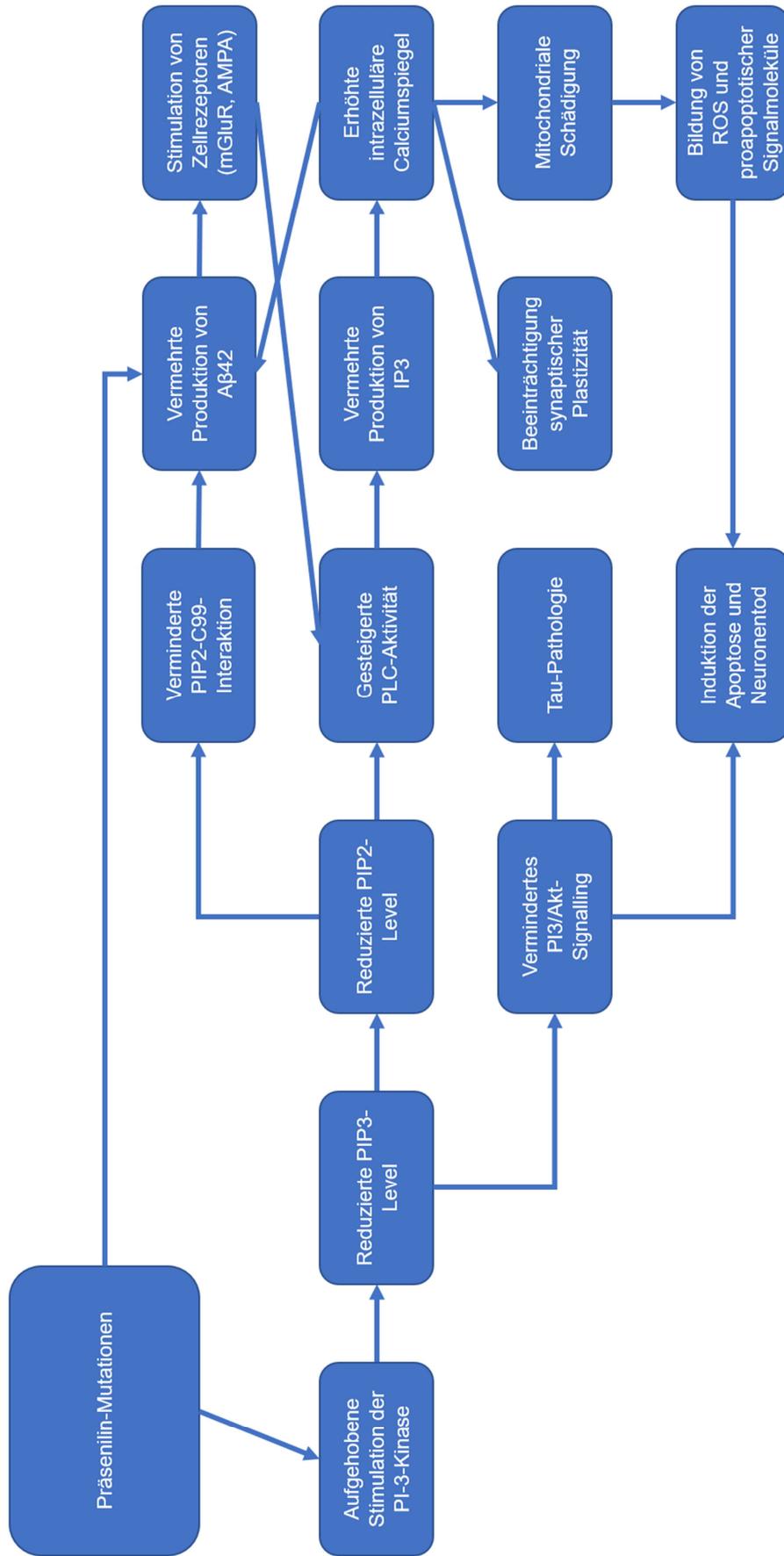


Abb. 4.6. Vorschlag für denkbare pathophysiologische Zusammenhänge im Rahmen FAD-assoziierte PS-Mutationen, die Störungen im Phosphoinositol-Stoffwechsel, Calcium-Dysregulation und Aβ42-Akkumulation miteinander vereinbaren.

5. Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste Ursache für Demenz und Neurodegeneration. Neben der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit tritt die familiäre Form (FAD) bei jüngeren Patienten auf und wird oft durch Mutationen in Präsenilinen (PS1 und PS2) hervorgerufen. Zusätzlich zu ihrer Rolle als katalytische Untereinheit der Gamma-Sekretase bei der Produktion von Amyloid- β (A β) wurden mehrere unabhängige zelluläre Funktionen für Präseniline beschrieben, wozu auch die Regulation der intrazellulären Calcium-Signaltransduktion gehört. Dieses ist im Rahmen der Alzheimer-Demenz schon früh gestört, wobei der zugrundeliegende Mechanismus unverstanden ist. Vorgehende Untersuchungen legen nahe, dass zwischen PS1 und dem IP3-Rezeptor Typ 1 (IP3R1), einem Kalziumkanal im ER, eine Interaktion besteht, sodass es bei Vorliegen von Präsenilin-Mutationen zu einer Steigerung der IP3R1-Kanalaktivität kommt. Obwohl eine direkte Interaktion durch Bindung zwischen PS1 und IP3R1 vermutet wurde, ist, soweit ersichtlich, keine detaillierte biochemische Charakterisierung dieser Interaktion durchgeführt worden. Um Interaktion und Bindung beider Proteine zu untersuchen, wurde deren cDNA mit GST (Glutathion-S-Transferase) gekoppelt und in Expressionsvektoren eingefügt. Bei IP3R1 erfolgte eine Beschränkung auf den N- und C-terminalen Teil, da diese Abschnitte die meisten bereits vorbeschriebenen Proteinbindungsstellen enthalten. Da die erfolgreiche Expression des GST-markierten N-terminalen Fragments von IP3R1 fehlschlug, beschränkten sich die weiteren Experimente auf GST-CTF und GST-PS1. Hierzu erfolgte die Purifikation durch eine GST-gestützte Affinitätschromatographie. Wachstumsbedingungen, Zellaufschluss und Proteinfreisetzung (Ultraschallbehandlung, chemische Lyse) wurden optimiert, um Ausbeute und Qualität des rekombinanten Proteins zu steigern. Purifizierte rekombinante Proteine wurden als Köder in Bindungsassays unter Verwendung von purifiziertem Protein, isolierter Gamma-Sekretase und Homogenaten aus Zellkultur als prey verwendet, um eine mögliche Protein-Protein-aufzuspüren. Darüber hinaus wurde eine systematische Co-Immunpräzipitation mit Zellkultur-Homogenaten durchgeführt. Im Ergebnis fanden sich in keinen der durchgeführten Experimente Hinweise auf eine direkte Bindung zwischen PS1 und IP3R1. Somit ist die IP3R1-assoziierte und PS1-vermittelte Calciumdysregulation im Rahmen der FAD nicht auf eine direkte Interaktion dieser Proteine zurückzuführen.

6. Summary

Alzheimer's disease is the most common cause of dementia and neurodegeneration. The familial form (familial Alzheimer's disease - FAD) occurs in younger patients and is most often evoked by mutations in presenilins (PS1 and PS2). In addition to their role as a catalytic subunit of gamma-secretase in the production of amyloid- β (A β), several cellular functions for presenilins have been described. Among these, presenilins are involved in the regulation of intracellular calcium signaling. Aberrant calcium signaling is an early and important feature of Alzheimer's disease. However, the mechanism underlying mutated presenilins leading to calcium dysregulation is unclear. Findings suggest some form of interaction between PS1 and IP3 receptor type 1 (IP3R1), a calcium channel in the ER. Presence of presenilin mutants lead to a functional gain in IP3R1 channel activity. Although a direct interaction between PS1 and IP3R1 was suspected, a detailed biochemical characterization of this interaction was not conducted. To investigate the interaction and binding of both proteins, we GST-tagged their cDNA and inserted it into expression vectors. Given the size of each of the four IP3R1-subunits forming the complex of the receptor (320 kDa), it is hardly possible to express the entire protein. Therefore, we focused on the N- and C-terminal part of IP3R1, since these parts contain most of the binding sites for proteins that are known to interact directly with this receptor. Because the expression of the GST-tagged N-terminal fragment of IP3R1 failed, further experiments were conducted with only GST-CTF and GST-PS1. Protein purification was carried out by affinity chromatography against GST (glutathione S-transferase). Growing conditions, cell-disruption and release methods (sonication, chemical lysis) were optimized to increase the yield and quality of recombinant protein. Purified recombinant proteins were used as bait in binding assays using purified protein, purified functional gamma-secretase and cell culture protein homogenates as prey binders in order to detect a protein-to-protein interaction between IP3R1-CTF and PS1. Furthermore, a systematic co-immunoprecipitation with lysates from cell cultures was performed to avoid missing the direct binding due to the lack of NTF-expression in the GST-pulldowns. In conclusion, none of the conducted experiments provided evidence for a direct binding between PS1 and IP3R1. Thus, IP3R1-associated and PS1-mediated calcium dysregulation in FAD does not result from direct interaction.

7. Abkürzungsverzeichnis

3xTg-Alzheimer-Maus	Mausmodell, in welches die humanen Transgene für PS1-Met146Val, APP-Lys595Asn-Met596Leu und Tau-Pro301Leu
A β	Amyloid- β
AD	Alzheimer's disease (Alzheimer'sche Erkrankung; Alzheimer-Demenz)
ADI	Alzheimer's Disease International
AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APH1	Anterior pharynx-defective 1
APOE	Gen für Apolipoprotein 4
APP	Amyloid precursor protein
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β -Site APP-cleaving Enzyme, auch Beta-Sekretase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
C83	C-terminales Fragment nach Spaltung von APP durch die Alpha-Sekretase
C99	C-terminales Fragment nach Spaltung von APP durch die Beta-Sekretase
CAA	Cerebrale Amyloidangiopathie
cDNA	Complementary DNA; Komplementär-DNA
CE	Cleavage Eluat; Eluat, welches sich nach Applikation der HRV 3C Protease von der Säule gelöst hat
CICR	Calcium induced calcium release; Calcium-induzierter Calciueinstrom
cRNA	Complementary RNA; Komplementär-RNA
Cryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
CTF	C-terminales Fragment
CyPD	Cyclophilin-D
CytC	Cytochrom C
DAG	Diacyl-Glycerin

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT40-Zellen	B-Zelllinie aus Hühnern
E. coli	Escherischia coli
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERp 44	Endoplasmic reticulum resident protein 44
FAD	Familial Alzheimer's disease; familiäre Alzheimer-Erkrankung
FT	Flow-through; Durchfluss nach Inkubation auf der Säule
GE	Glutathioneluat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase Typ 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GST-CTF	GST-gekoppeltes C-terminales Fragment von rIP ₃ R1
GST-NTF	GST-gekoppeltes N-terminales Fragment von rIP ₃ R1
HEK293-Zellen	" <i>Human Embryonic Kidney</i> "-Zellen
HG; Hg	Homogenat; vollständiges Homogenat einer Zellkultur
HRV 3C Protease	Human rhinovirus 3C protease
IMP	Inositolmonophosphat
IMP-ase	Inositolmonophosphatase
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
ITPKA	IP ₃ -Kinase Typ A
IP ₃ R1; IP ₃ R2; IP ₃ R3	Inositol-Triphosphat-Rezeptor Typ 1, 2 oder 3
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galaktopyranoside
KCl	Kaliumchlorid
LTD	Long-term depression
MEF	mouse embryo fibroblast
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MTCH-1	Mitochondrial carrier homolog 1
N2a	Neuro2a (murine Neuroblastoma-Zelllinie)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Nonidet P40 (nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate
NTF	N-terminales Fragment

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	Open reading frame; offener Leserahmen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEN2	Presenilin enhancer 2
PI	Phosphoinositol
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PI(4,5)P ₂	Phosphoinositol-(4,5)-Diphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PS1; PS2	Präsenilin Typ 1; Präsenilin Typ 2
PS1cleav	PS1 nach Proteolyse mit der HRV 3 C Protease
PS1-Δ-Exon9	PS1-Mutation, bei der das Exon Nr. 9 vollständig deletiert ist
PSEN 1; PSEN 2	Gene für PS1 und PS2
PTEN	Phosphatase, die PI(3,4,5)P ₃ zu PI(4,5)P ₂ dephosphoryliert
PTKR	Protein-Tyrosin-Kinase-assoziiertes Rezeptor
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SAD	Sporadic Alzheimer's disease; sporadische Alzheimer-Erkrankung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Sf9-Zellen	Immortalisierte Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SOCE	Store operated calcium entry
STIM	Stromal interaction molecule
TL	Total lysat; vollständiges Zell- oder Bakterienlysat
TMD	Transmembrandomäne
TPCR	Transient receptor potential channels
tRNA	Transfer-RNA
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization

WT	Wildtyp
XeC	Xestospongin C
XL10	E. coli vom Typ XL10-Gold Ultracompetent Cells

8. Literaturverzeichnis

Alzheimer A (1907), Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Zentralbl. Nervenhe. Psych. 18, 177-179.

Ando H, Kawaai K, Mikoshiba K (2014), IRBIT: a regulator of ion channels and ion transporters. *Biochim Biophys Acta*: 1843(10): 2195–2204.

Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, et al. (1999), Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol*: 147(2):277–294.

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. (2012), ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res* 40(W1): W597-W603.

Baki L, Shioi J, Wen P, et al. (2004), PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J*: 23(13):2586–2596.

Baki L, Neve RL, Shao Z, Shioi J, Georgakopoulos A, Robakis NK (2008), Wild-type but not FAD mutant presenilin-1 prevents neuronal degeneration by promoting phosphatidylinositol 3-kinase neuroprotective signaling. *J Neurosci*: 28(2): 483–490.

Barker WW, Luis CA, Kashuba A, et al. (2002), Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 16(4): 203–212.

Begley JG, Duan W, Chan S, Duff K, Mattson MP (1999), Altered calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in cortical synaptic compartments of presenilin-1 mutant mice. *J Neurochem*: 72(3):1030–1039.

Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012), The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*: 15(3):349–357.

Berggård T, Linse S, James P (2007), Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*: 7(16):2833–2842.

Berridge MJ (1998), Neuronal calcium signaling. *Neuron*: 21(1): 13–26.

Berridge MJ (2011), Calcium signalling and Alzheimer's disease. *Neurochem Res*: 36(7):1149–1156.

Berridge MJ (2016), The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev*: 96(4): 1261–1296.

Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007), "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." *Nat Genet* 39(1): 17-23.

Bezprozvanny I, Mattson MP (2008), Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*: 31(9):454–463.

Bloch K D, Grossmann B (1995), Digestion of DNA with Restriction Endonucleases. *Curr Prot in Mol Biol* 31: 3.1.1-3.1.21.

Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH (2003), Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis [published correction appears in *Nat Cell Biol*. 2004 Jan;6(1):77]. *Nat Cell Biol*: 5(12):1051–1061.

Bonifacino JS, Dell'Angelica ES and Springer TA (1999), Immunoprecipitation. *Current Protocols in Protein Science*: 18: 9.8.1-9.8.28.

Bojarski L, Pomorski P, Szybinska A, et al. (2009), Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*: 1793(6):1050–1057.

Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, et al. (1996), Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀ ratio in vitro and in vivo. *Neuron*: 17(5):1005–1013.

Bradford (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7(72): 248-254.

Brennan AR, Dolinsky B, Vu MA, Stanley M, Yeckel MF, Arnsten AF (2008), Blockade of IP₃-mediated SK channel signaling in the rat medial prefrontal cortex improves spatial working memory. *Learn Mem*: 15(3): 93–96.

Brent, R (1998), Analysis of Protein-Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science*: 14: 19.1.1-19.1.4.

Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR (2018), The Physiological Roles of Amyloid-β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*: 10:118.

Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000), Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*: 100(4): 391–398.

Bullain S, Doody R (2020), What works and what doesn't work in Alzheimer's disease? From interventions on risk factors to anti-amyloid trials [published online ahead of print, 2020 Apr 11]. *J Neurochem*: 10.1111/jnc.15023.

Calvo-Rodríguez M, García-Durillo M, Villalobos C, Núñez L (2016), In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca²⁺ cross talk and loss of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in rat hippocampal neurons. *Biochim Biophys Acta*: 1863(11):2637–2649.

Calvo-Rodríguez M, Hernando-Perez E, Nuñez L, Villalobos C (2019), Amyloid β Oligomers Increase ER-Mitochondria Ca²⁺ Cross Talk in Young Hippocampal Neurons and Exacerbate Aging-Induced Intracellular Ca²⁺ Remodeling. *Front Cell Neurosci*: 13:22.

Calvo-Rodríguez M, Hernando-Pérez E, López-Vázquez S, Núñez J, Villalobos C, Núñez L (2020), Remodeling of Intracellular Ca²⁺ Homeostasis in Rat Hippocampal Neurons Aged In Vitro. *Int J Mol Sci*: 21(4):1549.

Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, Mattson MP (2000), Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem*: 275(24):18195–18200.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, et al. (1991), Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*: 353(6347):844–846.

Chen R, Valencia I, Zhong F, et al. (2004), Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*: 166(2):193–203.

Chen YR, Glabe CG (2006), Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem*: 281(34):24414–24422.

Cheung KH, Shineman D, Müller M, et al. (2008), Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron*: 58(6): 871–883.

Cheung KH, Mei L, Mak DO, et al. (2010), Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Sci Signal*: 3(114): ra22.

Citron M, Westaway D, Xia W, et al. (1997), Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*: 3(1):67–72.

Davis DG, Schmitt FA, Wekstein DR, Markesbery WR (1999), Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects. *J Neuropathol Exp Neurol*: 58(4):376–388.

De Las Rivas J, Fontanillo C (2010), Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol*: 6(6):e1000807.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. (1999), A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*: 398(6727):518–522.

De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS (2012), Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*: 2(1):a006304.

De Strooper B, Saffig P, Craessaerts K, et al. (1998), Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*: 391(6665):387–390.

Desjardins R, Conklin D S (2011), Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Curr Prot in Mol Biol*, 93: A.3J.1-A.3J.16.

Dickson EJ, Hille B (2019), Understanding phosphoinositides: rare, dynamic, and essential membrane phospholipids. *Biochem J*: 476(1):1–23.

Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, et al. (2002), Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*: 5(5): 452–457.

Egorova PA, Bezprozvanny IB (2018), Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. *FEBS J*: 285(19): 3547–3565.

Elbing, K L, Brent, R. (2019), Growth of *E. coli* in liquid medium. *Curr Prot in Mol Biol*, 125, e81.

Elion EA (2007), Detection of Protein-Protein Interactions by Coprecipitation. *Current Protocols in Protein Science*: 49: 19.4.1-19.4.10.

Fagni L, Worley PF, Ango F (2002), Homer as both a scaffold and transduction molecule. *Sci STKE*. 2002 (137):re8.

Fan G, Baker ML, Wang Z, et al. (2015), Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. *Nature*: 527(7578): 336–341.

Feinbaum R (1998), Introduction to Plasmid Biology. *Curr Prot in Mol Biol* 41(1): 1.5.1 1.5.17.

Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO (2007), Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev*: 87(2): 593–658.

Fukumori A, Fluhrer R, Steiner H, Haass C (2010), Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *J Neurosci*: 30(23): 7853–7862.

Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*: 373(6514):523–527.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. (1991), Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*: 349(6311):704–706.

Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992), Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8(1):159–168.

Gray D, Subramanian S (2000), Choice of Cellular Protein Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, 20: 5.16.1-5.16.34.

Green KN, LaFerla FM (2008), Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron*: 59(2):190–194.

Guo Q, Fu W, Sopher BL, et al. (1999), Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med*: 5(1):101–106.

Guo Q, Furukawa K, Sopher BL, et al. (1996), Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport*: 8(1):379–383.

Güner G, Lichtenthaler SF (2020), The substrate repertoire of γ -secretase/presenilin. *Semin Cell Dev Biol*: 105:27-42.

Haass C, Selkoe DJ (1993), Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*: 75(6):1039–1042.

Hagel L (1998), Gel-filtration chromatography. *Curr Prot in Mol Biol* 44: 10.9.1-10.9.2.

Hamada K, Terauchi A, Nakamura K, et al. (2014), Aberrant calcium signaling by transglutaminase-mediated posttranslational modification of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 111(38):E3966–E3975.

Harper S, Speicher DW (2008), Expression and Purification of GST Fusion Proteins. *Current Protocols in Protein Science*: 52: 6.6.1-6.6.26.

Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K (2004), Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 120(1): 85–98.

Hillen H (2019), The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*: 13:1154.

Hirashima N, Etcheberrigaray R, Bergamaschi S, et al. (1996), Calcium responses in human fibroblasts: a diagnostic molecular profile for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*: 17(4): 549–555.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. (1996), Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*: 274(5284):99–102.

Inoue T, Kato K, Kohda K, Mikoshiba K (1998), Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*: 18(14): 5366–5373.

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT (1997a). APPSw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol*: 56(9):965–973.

Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, et al. (1997b) A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci*: 17(18):7053–7059.

Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, et al. (1994), Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 91(2):534–538.

Ito M (2001), Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev*: 81(3): 1143–1195.

Janus C, Pearson J, McLaurin J, et al. (2000), A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*: 408(6815): 979–982.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993), The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci*.: 695:144–148.

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, et al. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*: 488(7409):96–99.

Jurisch-Yaksi N, Sannerud R, Annaert W (2013), A fast growing spectrum of biological functions of γ -secretase in development and disease. *Biochim Biophys Acta*: 1828(12):2815–2827.

Karran E, De Strooper B (2016), The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem*: 139 Suppl 2:237–252.

Khachaturian ZS. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain (1987), *Neurobiol Aging*: 8(4):345–346.

Kim J, Chakrabarty P, Hanna A, et al. (2013), Normal cognition in transgenic BRI2-A β mice. *Mol Neurodegener*: 8:15.

Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003), Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 100(11):6382–6387.

Kimble ME, Brill AL, Pasker RL (2013), Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*: 73:9.9.1–9.9.23.

Kramer M F, Coen D M (2001), Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Curr Prot in Mol Biol* 56: 15.1.1-15.1.14.

Kua EH, Ho E, Tan HH, Tsoi C, Thng C, Mahendran R (2014), The natural history of dementia. *Psychogeriatrics* 14(3):196–201.

Laemmli (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

LaFerla FM (2002), Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*: 3(11): 862–872.

Landman N, Jeong SY, Shin SY, et al. (2006), Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 103(51):19524–19529.

Laudon H, Hansson EM, Melén K, et al. (2005), A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem*: 280(42):35352–35360.

LaVallie ER (1995), Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*: 00: 5.1.1-5.1.8.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001); Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 24:1121–1159.

Leissring MA, Paul BA, Parker I, Cotman CW, LaFerla FM (1999a), Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus oocytes*. *J Neurochem*: 72(3): 1061–1068.

Leissring MA, Parker I, LaFerla FM (1999b), Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *J Biol Chem*: 274(46):32535–32538.

Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM (2000), Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol*: 149(4): 793–798.

Li C, Enomoto M, Rossi AM, et al. (2013), CaBP1, a neuronal Ca²⁺ sensor protein, inhibits inositol trisphosphate receptors by clamping intersubunit interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 110(21): 8507–8512.

Li S, Selkoe DJ (2020), A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble A β oligomers from Alzheimer's brain [published online ahead of print, 2020 Mar 17]. *J Neurochem*: 10.1111/jnc.15007.

Lohman G, Tabor S, Nichols N (2011), DNA Ligases. *Curr Prot in Mol Biol* 94: 3.14.1-3.14.7.

Lopez JR, Lyckman A, Oddo S, Laferla FM, Querfurth HW, Shtifman A (2008), Increased intraneuronal resting [Ca²⁺] in adult Alzheimer's disease mice. *J Neurochem*: 105(1):262–271.

Mahmood T, Yang P (2012), Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci* 4(9): 429–434.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985), Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(12):4245–4249.

Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability (2006), *Nat Rev Neurosci*: 7(4): 278–294.

McBride SM, Choi CH, Schoenfeld BP, et al. (2010), Pharmacological and genetic reversal of age-dependent cognitive deficits attributable to decreased presenilin function. *J Neurosci*: 30(28):9510–9522.

McGowan E, Pickford F, Kim J, et al. (2005), Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*: 47(2):191–199.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, et al. (1999), Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*: 46(6):860–866.

Michalowsky B, Kaczynski A, Hoffmann W (2019), Ökonomische und gesellschaftliche Herausforderungen der Demenz in Deutschland – Eine Metaanalyse [The economic and social burden of dementia diseases in Germany- A meta-analysis]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*: 62(8):981–992.

Morris GP, Clark IA, Vissel B. (2018) Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*: 136(5): 663–689.

Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, et al. (2000), Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*: 283(12):1571–1577.

Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, de Strooper B, Bezprozvanny I (2007), Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *J Clin Invest*: 117(5):1230–1239.

Peng X, Wang J, Peng W, Wu FX, Pan Y (2017), Protein-protein interactions: detection, reliability assessment and applications. *Brief Bioinform*: 18(5):798–819.

Pierrot N, Ghisdal P, Caumont AS, Octave JN (2004), Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J Neurochem*: 88(5):1140–1150.

Pike KE, Savage G, Villemagne VL, et al. (2007), Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain*: 130(Pt 11):2837–2844.

Prakriya M, Lewis RS (2015), Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*: 95(4): 1383–1436.

Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, et al. (2009), Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*: 30(7):1026–1036.

Prince MJ, Wimo A, Guerchet MM, Ali G-C, Wu Y-T, Prina AM (2015), Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia: An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*. London: Alzheimer's Disease International.

Rojas-Charry L, Calero-Martinez S, Morganti C, Morciano G, Park K, Hagel C, Marciniak SJ, Glatzel M, Pinton P, Sepulveda-Falla D (2020), Susceptibility to cellular stress in PS1 mutant N2a cells is associated with mitochondrial defects and altered calcium homeostasis. *Sci Rep*: 10(1):6455.

Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi MM, Teplow DB (2009), Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 284(8):4749–4753.

Querfurth HW, Selkoe DJ (1994), Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry*: 33(15): 4550–4561.

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, et al. (1995), Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*: 376(6543):775–778.

Rohn TT, Vyas V, Hernandez-Estrada T, Nichol KE, Christie LA, Head E (2008), Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. *J Neurosci*: 28(12):3051–3059.

Rong YP, Aromolaran AS, Bultynck G, Zhong F, Li X, McColl K, Matsuyama S, Herlitze S, Roderick HL, Bootman MD, Mignery GA, Parys JB, De Smedt H, Distelhorst CW (2008). Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol Cell*. 31(2):255-65.

Rong YP, Bultynck G, Aromolaran AS, et al. (2009), The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(34): 14397–14402.

Ryan NS, Rossor MN (2010), Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med*: 4(1):99–112.

Sacuiu SF (2016), Dementias. *Handb Clin Neurol*: 38: 123–151.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. (1993), Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*: 43(8):1467–1472.

Secondo A, Bagetta G, Amantea D. (2018), On the Role of Store-Operated Calcium Entry in Acute and Chronic Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*: 11:87.

Selkoe DJ, Abraham CR, Podlisny MB, Duffy LK (1986), Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 46(6):1820–1834.

Selkoe DJ (2001), Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 81(2): 741–766.

Seidman, C, Struhl, K, Sheen, J and Jessen, T. (1997), Introduction of Plasmid DNA into Cells. *Curr Prot in Mol Biol* 37(1): 1.8.1-1.8.10.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011), Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*: (1):a006189.

Schulman JJ, Wright FA, Kaufmann T, Wojcikiewicz RJ (2013), The Bcl-2 protein family member Bok binds to the coupling domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and protects them from proteolytic cleavage. *J Biol Chem*: 288(35): 25340–25349.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, et al. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*: 14(8):837–842.

Shen J, Kelleher RJ 3rd (2007), The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 104(2):403–409.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. (1995), Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*: 375(6534):754–760.

Shilling D, Mak DO, Kang DE, Foskett JK (2012), Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca²⁺ leak channels. *J Biol Chem*: 287(14):10933–10944.

Shilling D, Müller M, Takano H, et al. (2014), Suppression of InsP3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling alleviates mutant presenilin-linked familial Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci*: 34(20):6910–6923.

Simonian M H, Smith J A (2006), Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration. *Curr Prot in Mol Biol* 76: 10.1.1-10.1A.9.

Smith DB (2000), Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods Enzymol*: 326:254–270.

Stutzmann GE, Caccamo A, LaFerla FM, Parker I (2004), Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J Neurosci*: 24(2): 508–513.

Stutzmann GE (2007), The pathogenesis of Alzheimers disease is it a lifelong "calciumopathy"? *Neuroscientist*: 13(5):546–559.

Sun S, Zhang H, Liu J, et al. (2014), Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron*: 82(1):79–93.

Sun L, Zhou R, Yang G, Shi Y (2017), Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 114(4): E476–E485.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. (1994), An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*: 264(5163):1336–1340.

Takashima A (2006), GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*: 9(3 Suppl):309–317.

Tang TS, Tu H, Chan EY, et al. (2003), Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*: 39(2): 227–239.

Tanzi RE (2012), The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*: 2(10):a006296.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002), Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 58(12):1791–1800.

Tong BC, Lee CS, Cheng WH, Lai KO, Foskett JK, Cheung KH (2016), Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca^{2+} entry. *Sci Signal*: 9(444):ra89.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.

Tsai RY, Reed RR (1997), Using a eukaryotic GST fusion vector for proteins difficult to express in *E. coli*. *Biotechniques*: 23(5):794–800.

Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, et al. (2006), Presenilins form ER Ca^{2+} leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*: 126(5): 981–993.

Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. (2013), Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*: 12(4):357–367.

Villemagne VL, Pike KE, Chételat G, et al. (2011), Longitudinal assessment of $\text{A}\beta$ and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol*:69(1):181–192.

Voytas D (2000), Agarose Gel Electrophoresis. *Curr Prot in Mol Biol* 51: 2.5A.1-2.5A.9.

Wang ZJ, Zhao F, Wang CF, et al. (2019), Xestospongins C, a Reversible IP_3 Receptor Antagonist, Alleviates the Cognitive and Pathological Impairments in APP/PS1 Mice of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*: 72(4):1217–1231.

WHO (2012), Dementia: a public health priority. Abgerufen über https://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/ am 31.03.2020.

Wingfield, PT (2015), Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci*: 80 6.1.1- 6.1.35.

Wolfe MS (2019), Dysfunctional γ -Secretase in Familial Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. 44(1):5–11.

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999), Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*: 398(6727): 513–517.

Yamin G, Teplow DB (2017), Pittsburgh Compound-B (PiB) binds amyloid β -protein protofibrils. *J Neurochem*: 140(2):210–215.

Yan Y, Xu TH, Melcher K, Xu HE (2017), Defining the minimum substrate and charge recognition model of gamma-secretase. *Acta Pharmacol Sin*: 38(10):1412–1424.

Yang J, Vais H, Gu W, Foskett JK (2016), Biphasic regulation of InsP3 receptor gating by dual Ca^{2+} release channel BH3-like domains mediates Bcl-xL control of cell viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 113(13): E1953–E1962.

Yoo AS, Cheng I, Chung S, et al. (2000), Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron*: 27(3):561–572.

Zeiger W, Vetrivel KS, Buggia-Prévot V, et al. (2013), Ca^{2+} influx through store-operated Ca^{2+} channels reduces Alzheimer disease β -amyloid peptide secretion. *J Biol Chem*: 288(37):26955–26966.

Zhang H, Liu R, Wang R, Hong S, Xu H, Zhang YW (2008), Presenilins regulate the cellular level of the tumor suppressor PTEN. *Neurobiol Aging*: 29(5):653–660.

Zhang H, Wu L, Pchitskaya E, et al. (2015), Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*: 35(39):13275–13286.

Zhang S, Zhang M, Cai F, Song W (2013), Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Transl Neurodegener*: 2(1):15.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die an der Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Form beteiligt waren.

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. med. Markus Glatzel für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Beratung sowie für die sehr hilfreichen Anmerkungen und Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Diego Sepulveda-Falla für die umfassende Betreuung sowie die enorme Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Weiterhin danke ich Beata Andersen (geb.Szalay) für die umfassende Einführung in die Laborwelt und für die Unterstützung bei diversen technischen Fragestellungen. Auch danke ich Liliana Rojas-Charry und Sergio Calero-Martinez für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Darüber hinaus gilt mein Dank sämtlichen Mitgliedern des neuropathologischen Labors, die mir bei kleineren und größeren Herausforderungen der Laborarbeit stets mit rat- und tatkräftiger Hilfe zur Seite standen.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und insbesondere meiner Freundin Janna, die mich in dieser Zeit immer unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: