



Karlsruher Institut für Technologie

Interaktionen von Transmembranhelix-Substraten mit einem Präsenilin-Homolog

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Celine Marcella Moser

1. Referentin: PD Dr. Claudia Muhle-Goll
 2. Referentin: Prof Dr. Anne Ulrich
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.Oktober 2024



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

„Wenn du es dir vorstellen
kannst, kannst du es auch
machen.“

(Walt Disney)

Eidesstattliche Erklärung

Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

„Interaktionen von Transmembranhelix-Substraten mit einem Präsenilin-Homolog“,

angefertigt in dem Zeitraum von November 2020 bis September 2024 an dem Karlsruher Institut für Technologie, handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer anderen Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach dem besten Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Karlsruhe, 09.09.24

Unterschrift

Publikationen

- 1) Altincekic, N.; Korn, S. M.; Qureshi, N. S.; Dujardin, M.; Ninot-Pedrosa, M.; Abele, R.; Abi Saad, M. J.; Alfano, C.; Almeida, F. C. L.; Alshamleh, I.; de Amorim, G. C.; Anderson, T. K.; Anobom, C. D.; Anorma, C.; Bains, J. K.; Bax, A.; Blackledge, M.; Blechar, J.; Böckmann, A.; Brigandat, L.; Bula, A.; Bütkofer, M.; Camacho-Zarco, A. R.; Carlomagno, T.; Caruso, I. P.; Ceylan, B.; Chaikuad, A.; Chu, F.; Cole, L.; Crosby, M. G.; de Jesus, V.; Dhamotharan, K.; Felli, I. C.; Ferner, J.; Fleischmann, Y.; Fogeron, M. L.; Fourkiotis, N. K.; Fuks, C.; Fürtig, B.; Gallo, A.; Gande, S. L.; Gerez, J. A.; Ghosh, D.; Gomes-Neto, F.; Gorbatyuk, O.; Guseva, S.; Hacker, C.; Häfner, S.; Hao, B.; Hargittay, B.; Henzler-Wildman, K.; Hoch, J. C.; Hohmann, K. F.; Hutchison, M. T.; Jaudzems, K.; Jović, K.; Kaderli, J.; Kalniņš, G.; Kaņepe, I.; Kirchdoerfer, R. N.; Kirkpatrick, J.; Knapp, S.; Krishnathas, R.; Kutz, F.; Zur Lage, S.; Lambertz, R.; Lang, A.; Laurens, D.; Lecoq, L.; Linhard, V.; Löhr, F.; Malki, A.; Bessa, L. M.; Martin, R. W.; Matzel, T.; Maurin, D.; McNutt, S. W.; Mebus-Antunes, N. C.; Meier, B. H.; Meiser, N.; Mompeán, M.; Monaca, E.; Montserret, R.; Mariño Perez, L.; **Moser, C.**; Muhle-Goll, C.; Neves-Martins, T. C.; Ni, X.; Norton-Baker, B.; Pierattelli, R.; Pontoriero, L.; Pustovalova, Y.; Ohlenschläger, O.; Orts, J.; Da Poian, A. T.; Pyper, D. J.; Richter, C.; Riek, R.; Rienstra, C. M.; Robertson, A.; Pinheiro, A. S.; Sabbatella, R.; Salvi, N.; Saxena, K.; Schulte, L.; Schiavina, M.; Schwalbe, H.; Silber, M.; Almeida, M. D. S.; Sprague-Piercey, M. A.; Spyroulias, G. A.; Sreeramulu, S.; Tants, J. N.; Tārs, K.; Torres, F.; Töws, S.; Treviño, MÁ; Trucks, S.; Tsika, A. C.; Varga, K.; Wang, Y.; Weber, M. E.; Weigand, J. E.; Wiedemann, C.; Wimmer-Bartoschek, J.; Wirtz Martin, M. A.; Zehnder, J.; Hengesbach, M.; Schlundt, A. (2021). "Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-Throughput and Structural Biology Applications". *Front. Mol. Biosci.*, 8, 653148. doi.org/10.3389/fmlob.2021.653148

Diese Publikation ist nicht Inhalt der Dissertation.

- 2) **Moser, C.**; & Muhle-Goll, C. (2024). „Cell-free protein production of a gamma secretase homolog”. *Protein Expr. Purif.*, 215, 106407. doi.org/10.1016/j.pep.2023.106407
- 3) **Moser, C.**; Guschtschin-Schmidt, N.; Silber, M.; Flum, J.; Muhle-Goll, C. (2024). „Substrate Selection Criteria in Regulated Intramembrane Proteolysis”. *ACS Chem. Neurosci.*, 15, 1321-1334. doi.org/10.1021/acschemneuro.4c00068

Abstract

The present work examines the substrate interaction of the intramembrane protease γ -secretase, or more precisely, a simpler homologue (PSH) from the archaeon *Methanoculleus marisnigri JR1*. The γ -secretase enzyme cleaves the most extensively studied substrate amyloid precursor protein (APP) within the transmembrane domain (TMD), generating a series of A β peptides with varying lengths. This can result in the formation of aggregations (plaques), which have become increasingly important in the context of Alzheimer's disease in recent decades. In familial Alzheimer's disease (FAD), a variety of mutations can result in an altered cleavage mechanism between the enzyme γ -secretase and its substrate APP. This can result in an increased formation of plaques, which can lead to irreparable brain damage. The precise mechanism of recognition and processing remains unclear, as there is no substrate consensus sequence. It is known that the substrate APP is converted within the membrane and is cleaved in several steps by the γ -secretase. This results in two main products, A β 40 and A β 42. The higher the amount of A β 42 peptides, the more pathogenic plaques are formed in general.

The initial section of the thesis deals with the production and characterisation of the proteolytic activity of PSH. The objective was to optimise the expression of PSH with regard to nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and to perform comparative studies on various substrates. An established protocol was initially employed and subsequently modified for this purpose. PSH was successfully produced recombinantly in TB medium, as a replacement for LB medium. Yield and activity of PSH were significantly increased in Western Blot-based proteolysis assays. However, the enzyme was observed to degrade after two to four weeks, resulting in a significant reduction in proteolytic activity. Consequently, an alternative protocol was sought, whereby resource-optimised, cell-free protein expression was employed. With cell-free protein expression, PSH could be successfully expressed *in vitro* with a significant reduction in the time required. Various conditions, including the cell extracts used, the magnesium concentration applied, and the expression temperature, were investigated.

An NMR and a fluorescence polarisation measurement protocol were established to generate time-resolved data on proteolysis. The NMR data revealed the presence of new peaks after 24 hours, indicating substrate cleavage by PSH. With regard to parallel screening applications for testing a variety of conditions, the fluorescence polarisation assays represented a novel approach to more efficient quantification of proteolysis. Furthermore, the proteolysis of APP was successfully detected.

To gain a deeper understanding of the mechanism of interaction and substrate selection, proteolysis assays were conducted on APP and various mutants. The two FAD mutations, V44M and I45T, as well as the two di-glycine mutations, G38P and G38L, were employed in this study. These were designed in previous works with the intention

Abstract

of destabilising the substrate with G38P and stabilising it with G38L. It was unexpected that the G38P mutant exhibited an increased cleavage by PSH compared to the wildtype (WT), in marked contrast to the human γ -secretase.

The second part of the thesis focussed on the structural investigation of a range of γ -secretase substrates. In recent years, in addition to APP, a growing number of γ -secretase substrates have been identified that play roles in a diverse range of physiological functions. These include the homologue APLP2, which is closely related to APP, the TWEAK receptor Fn14, the tyrosine protein kinase receptor ErbB4, and the non-substrate ITGB1. The structures of the individual protein TMDs were calculated from NMR measurements, utilising NOE data. Furthermore, hydrogen-deuterium exchange measurements were employed to gain insights into the dynamics and flexibility of the proteins. APLP2 exhibited similarities to APP. Fn14 and ErbB4 revealed increased dynamics, whereas ITGB1 displayed a markedly rigid, extended α -helical structure. Conclusions regarding the enzyme-substrate interaction could be drawn from a comparison of the structural and dynamic data. The presence of one or more motifs, such as flexibility, the formation of a C-terminal β -sheet, and a basic C-terminal sequence, appear to be favourable for proteolysis. However, none of the motifs should be regarded as an exclusive selection criterion.

Furthermore, residual dipolar couplings (RDC) of APP and its mutants were measured in stretched polyethylene glycol (PEG) gels to narrow down the structural bundles. In the case of APP and the mutants G38L and G38P, straight structures were observed to be favoured in the alignment medium employed. This indicates a high adaptability to the PEG gel and the associated flexibility of the substrates. In contrast, the V44M and I45T mutants exhibited a pronounced bending motion, indicating a heightened rigidity in their conformations. This suggests that these mutants have reduced adaptability to the surrounding environment. Additionally, I45T exhibited a tilt away from the APP structure at an opposing angle, which may contribute to the observed reduction in proteolytic efficiency.

In conclusion, the results demonstrate that PSH is highly responsive to a multitude of variables. This explains the high degree of variability observed in the enzyme, also with regard to the human γ -secretase. The determined substrate structures indicate that a certain degree of flexibility and the presence of additional structural motifs are positively associated with cleavage efficiency. Given its extensive range of activity, research into the interactions between γ -secretase and its substrates will remain the subject of intensive research.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Substratinteraktion der Intramembranprotease γ -Sekretase beziehungsweise genauer mit einem einfacher aufgebauten Homolog (PSH) aus dem Archaeon *Methanoculleus marisnigri* JR1. Die γ -Sekretase schneidet das am besten untersuchte Substrat Amyloid-Precursor Protein (APP) innerhalb der Transmembrandomäne (TMD) und generiert dabei sogenannte A β -Peptide in unterschiedlicher Länge. Dabei können sich Aggregationen (Plaques) ausbilden, welche im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung erlangten. Bei der sogenannten Familiären Alzheimer Erkrankung (FAD), kann es aufgrund von unterschiedlichen Mutationen zu einem veränderten Schneidemechanismus zwischen dem Enzym γ -Sekretase und dessen Substrat APP kommen. Die Folge kann die verstärkte Ausbildung von Plaques sein, welche zu irreparablen Hirnschädigungen führen können. Der genaue Mechanismus der Erkennung und Prozessierung ist dabei noch nicht vollständig geklärt worden, da zudem keine Konsensussequenz vorliegt. Bekannt ist, dass das Substrat APP innerhalb der Membran umgesetzt und dabei in mehreren Schritten von der γ -Sekretase gespalten wird. Im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung entstehen dabei zwei Hauptprodukte, A β 40 und A β 42, wobei vor allem A β 42-Peptide die pathogenen Plaques ausbilden können.

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Herstellung sowie der Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von PSH. Hierbei stand die Optimierung der Expression von PSH im Hinblick auf Nuklearmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)- sowie vergleichende Studien an verschiedenen Substraten im Fokus. Hierfür wurde zunächst ein etabliertes Protokoll verwendet und verbessert. PSH konnte dabei anstatt in LB-Medium erfolgreich rekombinant in TB-Medium kultiviert werden. Dabei zeigte PSH eine deutlich gesteigerte Ausbeute sowie in Western Blot-basierten Proteolyse-Assays eine erhöhte Aktivität. Allerdings konnte eine Degradation des Enzyms nach zwei bis vier Wochen festgestellt werden, wodurch sich die proteolytische Aktivität drastisch reduzierte. Aufgrund dessen wurde nach einem alternativen Protokoll gesucht, wobei auf die ressourcenoptimierte, zellfreie Proteinexpression zurückgegriffen wurde. Bei der zellfreien Proteinexpression konnte PSH erfolgreich in-vitro exprimiert werden. Hierbei wurden unterschiedliche Bedingungen wie die verwendeten Zellextrakte, die eingesetzte Magnesiumkonzentration und die Expressionstemperatur untersucht.

Für das Generieren von zeitaufgelösten Daten der Proteolyse wurden ein NMR- sowie ein Fluoreszenzpolarisationsmessungs-Protokoll etabliert. Bei den generierten NMR-Daten konnte das Aufkommen neuer Peaks nach 24 Stunden beobachtet werden, welches auf eine Umsetzung durch PSH hindeutete. Insbesondere im Hinblick auf parallele Screening-Anwendungen zum Testen vieler unterschiedlicher Bedingungen

stellten die Fluoreszenzpolarisations-Assays einen innovativen Ansatz zur effizienteren Quantifizierung der Proteolyse dar. Auch hier konnte erfolgreich die Proteolyse von APP detektiert werden.

Um den Mechanismus der Interaktion und Substratauswahl besser kategorisieren zu können, wurden darüber hinaus Proteolyse-Assays an APP, sowie unterschiedlichen Mutanten durchgeführt. Verwendet wurden hier die beiden FAD Mutationen V44M und I45T, sowie zwei Di-Glycin Mutationen G38P und G38L. Diese wurden in vorausgehenden Arbeiten dahingehend entworfen, dass G38P das Substrat destabilisieren und G38L dieses stabilisieren sollte. Es zeigte sich dabei überraschenderweise eine bevorzugte Umsetzung der G38P Mutante gegenüber des Wildtyps APP von PSH im Gegensatz zur humanen γ -Sekretase.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Strukturuntersuchung unterschiedlicher γ -Sekretase Substrate. In den letzten Jahren wurden neben APP immer mehr Substrate entdeckt, welche in den unterschiedlichsten physiologischen Funktionen von der γ -Sekretase geschnitten werden. Darunter wurden das mit APP eng verwandte Homolog APLP2, der TWEAK-Rezeptor Fn14, der Tyrosin-Protein Kinase Rezeptor ErbB4, sowie das Nicht-Substrat ITGB1 untersucht. Es wurden aus NOE-Daten von NMR-Messungen Strukturen der einzelnen Protein-TMDs berechnet. Des Weiteren konnten anhand von Wasserstoff-Deuterium Austauschmessungen Informationen über die Dynamik und Flexibilität der Proteine gewonnen werden. APLP2 zeigte dabei Ähnlichkeiten zu APP. Fn14 und ErbB4 wiesen eine erhöhte Dynamik auf und ITGB1 wiederum zeigte eine sehr starre, lange α -helikale Struktur. Aus dem Vergleich von Struktur- und Dynamik-Daten können Rückschlüsse auf die Enzym-Substrat-Interaktion gezogen werden. Dabei scheinen das Vorhandensein von einem oder mehrerer Motive wie Flexibilität, die Ausbildung eines C-terminalen β -Strangs und eine basische C-terminale Sequenz von Vorteil für die Proteolyse zu sein. Dabei ist jedoch keines der Motive als exklusives Selektionskriterium zu betrachten.

Im Zuge der Strukturuntersuchung wurden zur näheren Eingrenzung der Strukturen dipolare Restkopplungen (RDC) in gestreckten Polyethylenglykol (PEG)-Gelen von APP und dessen Mutanten gemessen, welche bereits in den Proteolyse-Assays untersucht wurden. Dabei zeigten sich für APP und die Mutanten G38L und G38P bevorzugt gerade Strukturen im verwendeten Alignmentmedium. Dies deutet auf eine hohe Anpassungsfähigkeit auf das PEG-Gel und damit einhergehende Flexibilität der Substrate hin. V44M sowie I45T zeigten dagegen eine stärkere Biegung, wodurch sich beide Mutanten starrer in ihren Konformationen erwiesen, da die Anpassung an die Umgebung reduziert wurde. I45T neigte zudem in einem entgegengesetzten Winkel von der APP Struktur weg, wodurch die verminderte proteolytische Effizienz erklärt werden konnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass PSH sehr sensibel auf eine Vielzahl von Faktoren reagiert. Dies verdeutlicht die hohe Variabilität des Enzyms, auch in Hinblick auf die humane γ -Sekretase. Die ermittelten Substratstrukturen legen nahe, dass eine gewisse Flexibilität sowie das Vorhandensein von weiteren Strukturmotiven von Vorteil sind, um umgesetzt zu werden. Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums bleibt die γ -Sekretase und die Substratinteraktion weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	i
Abstract.....	iii
Kurzfassung	v
Inhaltsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Intramembranproteolyse.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktionsweise der γ -Sekretase.....	3
1.1.2 Substrate der γ -Sekretase	6
1.1.3 Präsenilin-Homolog PSH.....	10
1.2 Kernspinresonanzspektroskopie.....	13
1.2.1 Prinzip der Kernspinresonanzspektroskopie	13
1.2.2 Mehrdimensionale Experimente	17
1.2.2.1 NOESY – Experiment.....	17
1.2.2.2 HSQC – Experiment.....	19
1.2.2.3 TOCSY – Experiment.....	19
1.2.2.4 Dreidimensionale Triple-Resonanz Experimente	20
1.2.3 Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen	22
1.2.3.1 Sekundäre chemische Verschiebung.....	22
1.2.4 Dipolare Restkopplung	23
1.2.5 Proteindynamik Ermittlung mittels Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Messungen	25
1.2.6 Strukturberechnung	26
1.3 Zellfreie Proteinexpression	29
1.4 UV-Vis-Spektroskopie.....	32
1.5 Proteolytische Untersuchungsmethoden	33
1.5.1 Nachweis über Immunoblotting	33
1.5.2 Nachweis über Kernspinresonanzspektroskopie.....	34
1.5.3 Nachweis über Fluoreszenzpolarisierung	35
2 Ziel der Arbeit.....	37
3 Material und Methoden.....	39
3.1 Klonierung.....	39
3.1.1 Präsenilin-Homolog (PSH)	40
3.1.2 C99 und Mutanten	41
3.1.3 APP Transmembrandomäne und Mutanten	41
3.2 Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung.....	42
3.3 Zellfreie Proteinexpression und Aufreinigung	44
3.3.1 S12 Extrakt Präparation	44
3.3.2 Zellfreie Proteinexpression	44
3.4 UV-Vis Spektroskopie.....	46

3.5	Proteolyse-Assays mittels Immunoblot	47
3.5.1	SDS-PAGE und Western Blot.....	48
3.6	Fluoreszenzpolarisationsmessungen.....	49
3.7	Synthetische Peptide und NMR-Messungen	50
3.7.1	Proteolyse-Messungen mittels NMR-Spektroskopie	51
3.7.2	Sekundäre chemische Verschiebung	51
3.7.3	Wasserstoff-Deuterium-Austausch	51
3.7.4	Strukturrechnungen mit ARIA2	52
3.7.5	Anisotrope Messungen	53
TEIL A - Proteolytische Untersuchung und zellfreie Proteinexpression des Präsenilin-Homolog MCMJR1	55
4	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	Optimierung des in-vitro Proteolyse-Assay mit rekPSH.....	57
4.1.1	Zellmedium und Proteinumgebung.....	57
4.1.2	Einfluss des pH-Wertes	62
4.1.3	Degradation	63
4.1.4	Umsatzrate	64
4.1.5	In-vitro Proteolyse-Assay des Amyloid-Precursor Fragments C99 und vier Mutanten mittels rekPSH	66
4.1.5.1	Proteolyse-Assay mit rekombinanten C99 und Mutanten	66
4.1.5.2	Proteolyse-Assay mit zellfreiem C99 und Mutanten	71
4.2	Zellfreie Proteinexpression von PSH und proteolytische Untersuchungen....	75
4.2.1	Zellextrakte und Zellmedium.....	75
4.2.2	Magnesiumkonzentration.....	78
4.2.3	Expressionstemperatur.....	79
4.2.4	Umsatzrate	81
4.3	Proteolytische Untersuchung mittels Kernspinresonanzspektroskopie	83
4.4	Proteolytische Untersuchung mittels Fluoreszenzpolarisationsmessungen ..	89
5	Fazit und Ausblick der proteolytischen Untersuchung.....	93
TEIL B - Strukturanalyse von γ- Sekretase Substraten	97
6	Ergebnisse und Diskussion	99
6.1	Strukturuntersuchungen in TFE-d ₂ /H ₂ O	99
6.1.1	Amyloid-Precursor Protein (APP) Homolog Amyloid beta Precursor like Protein (APLP2).....	100
6.1.1.1	Analyse der Transmembransequenz.....	100
6.1.1.2	Auswertung der experimentellen Daten	102
6.1.2	TWEAK-Rezeptor - Fn14	105
6.1.2.1	Analyse der Transmembransequenz.....	105
6.1.2.2	Auswertung der experimentellen Daten	106
6.1.3	Tyrosin-Protein Kinase Rezeptor - ErbB4.....	108
6.1.3.1	Analyse der Transmembransequenz.....	108

6.1.3.2	Auswertung der experimentellen Daten	109
6.1.4	Nicht-Substrat Integrin β-1- ITGB1	111
6.1.4.1	Analyse der Transmembransequenz	111
6.1.4.2	Auswertung der experimentellen Daten	112
6.1.5	Vergleichende Diskussion der Substrat Strukturen	113
6.2	Strukturuntersuchung anhand dipolarer Restkopplungen	117
6.2.1	Isotrope und anisotrope Messungen	117
6.2.2	Strukturuntersuchung der APP TMD und Mutanten	119
6.2.2.1	APP WT TMD.....	119
6.2.2.2	G38P TMD	121
6.2.2.3	G38L TMD.....	123
6.2.2.4	V44M TMD	124
6.2.2.5	I45T TMD	126
6.2.2.6	Strukturvergleich sowie hypothetische Interaktion mit Präsenilin...127	
6.2.3	Literaturvergleich der dipolaren Restkopplungen des APP WT mit bekannten Strukturdaten	130
7	Fazit und Ausblick der Strukturuntersuchungen	133
	Literaturverzeichnis	135
	Abkürzungsverzeichnis	153
	Abbildungsverzeichnis	157
	Tabellenverzeichnis	160
	Anhang.....	161
	Abbildungen	161
	Tabellen.....	175
	Danksagung	187

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde anhand unterschiedlicher biologischer und analytischer Methoden die Funktionsweise eines Präsenilin-Homolog, kurz **PSH**, welches eine Intramembranprotease darstellt, untersucht. In diesem Zusammenhang wurden bekannte Substrate in Hinblick auf ihre strukturellen Eigenschaften eingehender betrachtet. Im Folgenden soll zunächst näher auf den allgemeinen Aufbau und die Funktionen von Intramembranproteinen eingegangen werden, um deren Prozesse besser verstehen zu können. Zudem soll ein Überblick über die angewendeten analytischen Methoden gegeben werden.

1.1 Intramembranproteolyse

Proteasen, auch Peptidasen genannt, sind Enzyme, die Proteine durch katalytische Prozesse, wie die Hydrolyse von Aminosäuren, in kürzere Fragmente umwandeln können.^[1] Dabei kann je nach Angriffsstelle der Protease zwischen zwei Hauptgruppen, den Endopeptidasen und Exopeptidasen, unterschieden werden. Eine Endopeptidase spaltet ein Protein inmitten seiner Polypeptidkette auf, während eine Exopeptidase einzelne Aminosäuren oder kurze Peptidfragmente am Ende der Polypeptidkette abspaltet.^[2] Diese Proteasen spielen in der Natur eine überaus wichtige Rolle, nicht nur in der Verdauung von Nahrungsproteinen, sondern auch in der Blutgerinnung, der Immunabwehr, der Zellregulierung, oder beim programmierten Zelltod.^[2, 3] Derzeit sind mehr als 500 Gene bekannt, welche für Proteasen beim Menschen kodieren und mehr als 2 % aller Gene in Organismen ausmachen.^[4] Proteasen weisen Bindungstaschen auf, in denen ihre Substrate umgesetzt werden können. Dabei spielt der Aufbau der Bindungstaschen bei der Proteolyse der Substrate eine entscheidende Rolle und definiert, ob eine spezifische Aminosäureabfolge oder ein weiter Bereich an Substratarten geschnitten wird.^[5]

Die Hauptfamilien der Proteasen können in vier Klassen unterteilt werden: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Metalloproteasen und Aspartatproteasen.^[2] Die katalytischen Reste von Serinproteasen umfassen Serin, Histidin und Asparaginsäure, welche in der aktiven Seite des Enzyms nacheinander geschaltet sind und somit auch als katalytische Triade bezeichnet werden.^[6] Prominente Vertreter sind hierbei Trypsin in der Verdauung und Thrombin bei der Blutgerinnung. Die nukleophile Hydroxylgruppe des Serins ist in der Lage den Carbonylsauerstoff einer Amidbindung anzugreifen und somit das Peptidrückgrat zu spalten. Das Serin wird über eine Esterzwischenstufe hydrolysiert und der gebildete Carboxy-Terminus freigesetzt.^[7] Cysteinproteasen durchlaufen einen ähnlichen Mechanismus, allerdings sind hierbei die katalytischen Reste Cystein und Histidin. Das Cysteinthiol dient als Nukleophil, welches das Amid-

Carbonyl angreift. Bekannte Vertreter hierfür sind Caspasen, welche Einfluss auf den programmierten Zelltod haben.^[2, 8, 9]

Metalloproteasen bilden hingegen keine kovalenten Zwischenprodukte, sondern interagieren direkt mit Wasser und aktivieren es für die Katalyse. Dabei befindet sich im aktiven Zentrum vorwiegend ein Zink Atom, welches an zwei Histidin- oder Glutamat/Aspartat-Resten koordiniert ist. Die Carboxypeptidasen der Verdauung sind hier als Beispiel aufzuführen.^[9]

Die letzte Enzymklasse, die Aspartatproteasen, sind bekannt durch ihre prominenten Vertreter Pepsin (Verdauung) und die HIV-Proteasen viraler Enzyme. Aspartatproteasen tragen in ihrem katalytischen Zentrum zwei Asparaginsäuren, welche mit Wasser und dem Carbonyl-Sauerstoff der spaltbaren Amidbindung interagieren. Dabei entsteht ein nicht-kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat. Während der Umwandlung der Carbonylgruppen und des Austritts der Aminogruppen entstehen gleichzeitig neue N- und C-Termini, wie in **Abbildung 1.1** dargestellt ist.^[1]

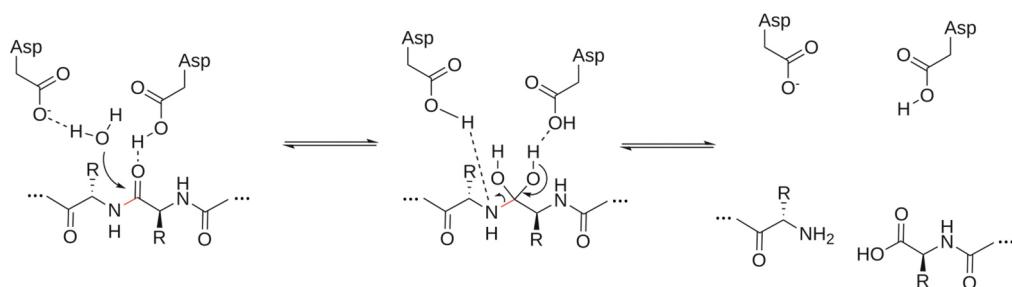


Abbildung 1.1 Reaktionsgleichung des allgemeinen Ablaufs der Aspartat-Proteolyse. Aspartat aktiviert ein Wassermolekül, indem es ein Proton entzieht, wodurch das Wasser das Carbonylkohlenstoffatom der Spaltbindung des Substrates angreift. Infolgedessen entsteht ein tetraedrisches Zwischenprodukt. Durch anschließende Protonierung des Amids kommt es zu Umlagerungen und der Bildung neuer Termini.

Ein wesentlicher Bestandteil der Proteasen ist in intrazellulären Organellen oder an zellulären Membranen lokalisiert und wird als Intramembranproteasen (engl. *Intramembrane-Cleaving Protease, I-CLIPs*) bezeichnet.^[10] Dazu gehören unter anderem die Zink-Protease S2P^[11] sowie die Rhomboid Familie^[12, 13]. Diese Intramembranproteasen sind eingebettet in einer hydrophoben Lipiddoppelschicht und führen die Hydrolyse ihrer Substrate, welche Transmembranhelices darstellen, in der wasserabweisenden Umgebung der Membran durch.^[14] Aufgrund sterischer Hinderung können die Amidbindungen des Rückgrats nicht zugänglich gemacht werden, sodass die Substrate aufgewunden werden müssen, um eine Hydrolyse zu ermöglichen.^[15] Ein zunehmend wichtiger Vertreter dieser Klasse stellt die Präsenilin-Aspartatprotease **γ-Sekretase** dar, welche ihre Bekanntheit durch die Alzheimer-Erkrankung erlangte.^[10, 16] Hierbei wird das Substrat **APP** (engl. *Amyloid Precursor Protein*) umgesetzt, wobei Amyloid-β Peptide (**Aβ**) geformt werden, welche Alzheimer charakteristische Plaques ausbilden können.^[17] Trotz intensiver Forschung ist der genaue Mechanismus dieser Interaktion zwischen **γ-Sekretase** und Substrat noch nicht

vollständig geklärt. Im Folgenden soll zunächst näher auf die Struktur und die Funktionsweise des Enzyms eingegangen werden.

1.1.1 Aufbau und Funktionsweise der γ -Sekretase

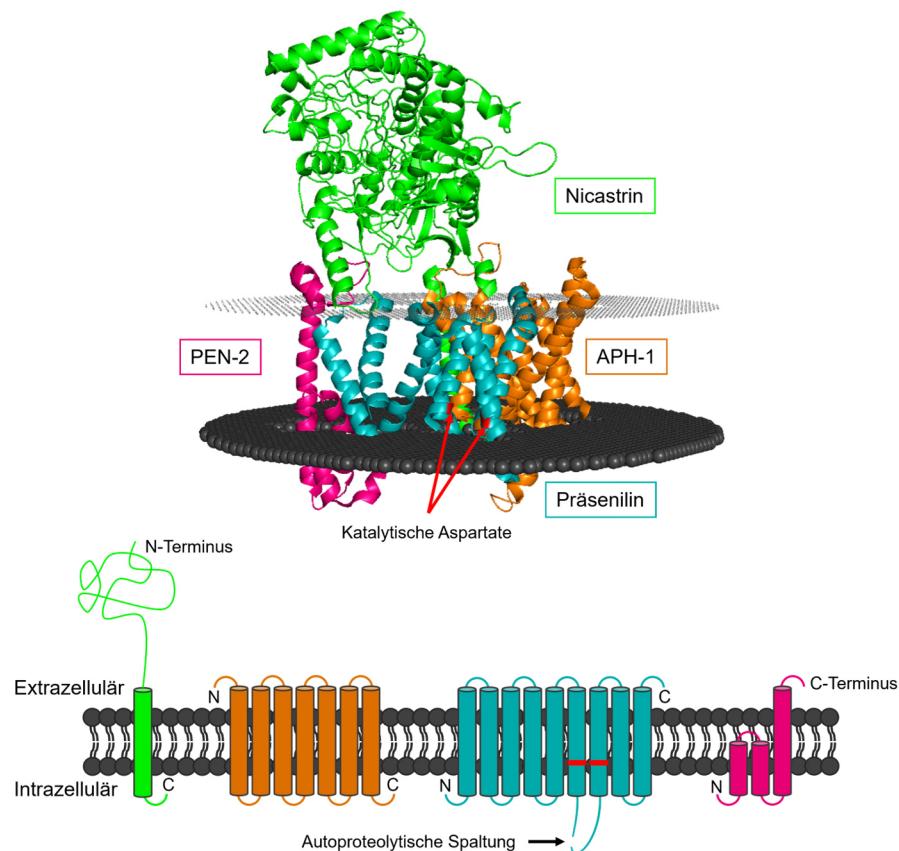


Abbildung 1.2 Schematischer Aufbau der γ -Sekretase in einer Membranumgebung (PDB: 5A63). Zusammengesetzt aus den vier Untereinheiten Nicastin (grün), APH-1 (orange), Präsenilin (türkis) und PEN-2 (pink) ergibt sich eine hufeisenförmige Struktur. Das Präsenilin trägt die katalytischen Aspartate (rot) auf TMD6 und 7 und wird autoproteolytisch in zwei aktive Fragmente geteilt.

Die γ -Sekretase ist eine Intramembranprotease, welche für die Spaltung von Typ-I-Transmembranproteinen verantwortlich ist.^[18] Diese Klasse von Proteinen wird auch als „Single-Pass-Proteine“ bezeichnet, da der C-Terminus intrazellulär und der N-Terminus extrazellulär oder im Lumen von Organellen liegt. Die γ -Sekretase ist eine Aspartat-Protease mit zwei katalytischen Aspartaten an Position 257 und 385, welche das aktive Zentrum darstellen.^[19] Dabei bildet die γ -Sekretase einen heterotetrameren Proteinkomplex aus vier Untereinheiten, bestehend aus Präsenilin-1 (mit den Isoformen **PS1** und **PS2**, 67 % Übereinstimmung), **Nicastin**, Stabilisierungsfaktor (**APH-1**, mit drei Isoformen 1as, 1aL, und 1b) sowie dem Präsenilin-Enhancer 2 (**PEN-2**).^[20, 21] Präsenilin ist hierbei das Zentrum der proteolytischen Aktivität, bestehend aus neun Transmembrandomänen (**TMD**).^[22] Dieses wird vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum (**ER**) exprimiert und im Golgi-Apparat durch Autoproteolyse in zwei Stücke

zwischen der TMD6 und 7 geteilt. Die Autoproteolyse wird hierbei durch limitierende zelluläre Faktoren reguliert,^[16, 23] wobei ein größeres N-terminales Fragment (**NTF**), sowie ein kleineres C-terminales Fragment (**CTF**) entstehen.^[24-26] Nicastin gilt als der Substrat-Rezeptor der γ -Sekretase und stellt ein 110 kDa großes Gerüstprotein des Typ-I Transmembranproteins dar, welches im Golgi-Apparat durch N-Glykolation auf 130 kDa anwächst.^[27] Nicastin überspannt dabei die Untereinheiten PS1/PS2, APH-1 sowie PEN-2 und bildet eine deckelartige Struktur, welche für die Substratselektion von Bedeutung ist. Es unterstützt die Verankerung des Substrates im Komplex und verhindert, dass Membranproteine mit einer langen Ektodomäne hineingelangen können.^[28] APH-1 ist für die Lokalisation des Nicastin verantwortlich und PEN-2 für die Formatierung des γ -Sekretase-Komplexes.^[29] Der Präsenilin Enhancer überspannt dabei die Membran mehrfach, wobei die Termini in das Lumen des ER ragen. Veranschaulicht ist dies in **Abbildung 1.2**, welche die Kryo-Elektronenmikroskopie (**EM**) Struktur der γ -Sekretase, gemessen von der Arbeitsgruppe um Y. Shi^[30], in einer Membranumgebung darstellt.

Alle Bestandteile der γ -Sekretase zusammen betrachtet ergeben eine hufeisenförmige Struktur mit insgesamt 19 Transmembrandomänen und einer Gesamtmasse von etwa 230 kDa.^[31] Elektronenmikroskopische Strukturen zeigen eine globuläre Struktur mit mehreren extrazellulären Domänen, sowie einer Kammer im Inneren des Komplexes mit einer geringen Dichte sowie für Wasser zugängliche Hohlräume (apicale- und basale Poren).^[32] Durch die Poren können die generierten Substrat-Fragmente nach der Umsetzung in den extrazellulären- und zytosolischen-Bereich gelangen. Die Komplexbildung und Aktivierung der γ -Sekretase erfolgt zunächst durch die Unterkomplexbildung von Nicastin und APH-1, an welche sich anschließend Präsenilin anschließt. Die Autoproteolyse des Präsenilin in seine zwei Fragmente wird durch die darauffolgende Interaktion mit PEN-2 katalysiert.^[33]

Im Allgemeinen besitzt ein Substrat mehrere Bindungsstellen für die Sekretase. Die erste Interaktion findet dabei zwischen der beweglichen Juxtamembrandomäne des Substrates, welche unmittelbar an der Membran liegt, PEN-2 und der Nicastin-Untereinheit statt. Letztere fungiert dabei als Art Torwächter. Veranschaulicht ist dies in **Abbildung 1.3**. Die Transmembrandomäne der Substrate interagiert weiterhin mit dem N-terminalen Fragment des Präsenilin. Durch die Zusammenlagerung des Präsenilin mit der PEN-2 wird diese autokatalytisch in ihre zwei aktiven Domänen proteolysiert. Das Substrat bewegt sich folglich vom N-terminalen Teil der Sekretase weiter zum katalytischen Zentrum des N- und C-Terminus der Sekretase, in der sich die beiden katalytischen Aspartate in der TMD6 (D257) und TMD7 (D385) befinden. Es erfolgt die Spaltung der Substrate in die jeweiligen Fragmente. Im Fall von APP lassen sich die folgenden zwei Fragmente unterscheiden: zum einen die C-terminalen **AICD** (engl. *APP IntraCellular Domain*), welche ins Zytosol entlassen werden und zum anderen die

N-terminalen A β -Fragmente, deren Freisetzung in das extrazelluläre Milieu erfolgen.^[33, 34]

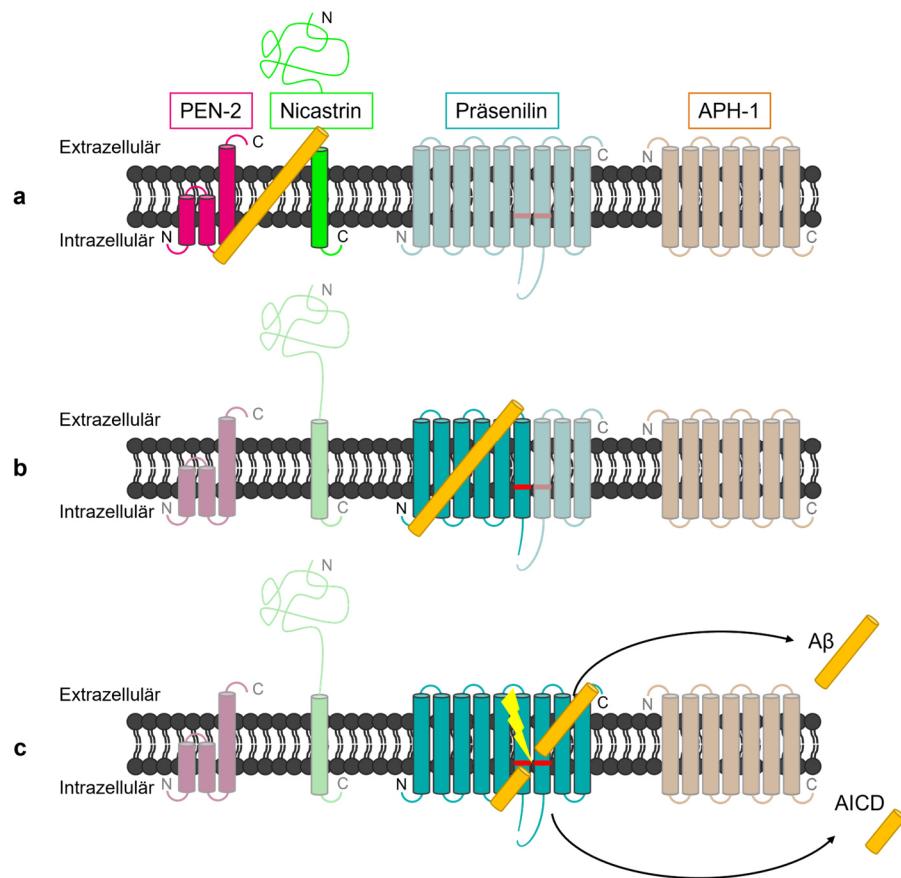


Abbildung 1.3 Schematischer Prozess der Proteolyse durch die γ -Sekretase. Erste Erkennung des Substrates APP (gelb) findet zwischen PEN-2 und Nicastrin statt (a), gefolgt von der Umsetzung in Präsenilin durch die katalytischen Aspartate (rot) (b). Dabei werden nach der Proteolyse das A β -Fragment extrazellulär und das AICD intrazellulär entlassen (c). In Anlehnung an^[34]

Der genaue Mechanismus der Erkennung und Prozessierung der einzelnen Substrate der γ -Sekretase ist bislang jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies liegt unter anderem daran, dass im Gegensatz zu löslichen Proteasen keine Konsensussequenz für die Substrate bekannt ist.^[35] Elektronenmikroskopie Studien (PDB: 8K8E) der γ -Sekretase in Verbindung mit einem Substrat zeigten die Ausbildung eines zweisträngigen β -Faltblattes am Ende des N-Terminus sowie am Anfang der TMD7 des C-Terminus des Präsenilin, an welcher das C-terminale Ende des Substrates bindet. Außerdem wurde gezeigt, dass der katalytische Spalt hochflexibel ist, wohingegen die meisten Teile des Komplexes unbeweglich sind. Das Substrat muss für die Proteolyse tief in die Enzymstruktur eindringen, wobei Teile der Helix entwunden werden und die Interaktion zwischen Enzym und Substrat verändert wird. Für diesen Mechanismus wird eine gewisse Form an Flexibilität der Substrate vermutet^[15, 36-38], doch auch andere strukturelle Signaturen könnten hierfür von Relevanz sein.

1.1.2 Substrate der γ -Sekretase

Die bekanntesten Substrate der γ -Sekretase sind APP^[39] und Notch^[40] (engl. *Neurogenic locus notch homolog protein*), wobei in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf APP gelegt wird. APP wird vor allem in Neuronen hergestellt und ist an vielen metabolischen Prozessen beteiligt. Dabei fungiert es unter anderem als Rezeptor für den durch Kinesin vermittelten axonalen Transport.^[41] APP durchläuft bei der Spaltung durch die γ -Sekretase zwei mögliche Wege, veranschaulicht in **Abbildung 1.4**. Zunächst wird APP von der β -^[42] oder α -Sekretase^[43] in 99 beziehungsweise 83 Aminosäure lange Fragmente, genannt C99 oder C83, geschnitten. Dabei entsteht der durch die α -Sekretase **ADAM10** hervorgerufene nicht-amyloidogene Weg, wobei das C83 Fragment und darauffolgende kurze p3 Peptide entstehen. Bei ADAM10^[44], sowie den weiteren Kandidaten ADAM17/TACE^[45] und MDC-9^[46], handelt es sich um Disintegrin und Metalloproteasen. Bei dem amyloidogenen Weg wird durch die β -Sekretase **BACE1**^[47] (engl. *β -site APP-Cleaving Enzyme*) C99 hergestellt. Der Schneidemechanismus der γ -Sekretase umfasst mehrere Schritte. Der erste Schnitt erfolgt am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne, wodurch ein kurzes Fragment (AICD) resultiert, welches in das Zytosol entlassen wird. Weiterhin entstehen Amyloid- β Peptide unterschiedlicher Längen (A β 37-A β 49).^[48]

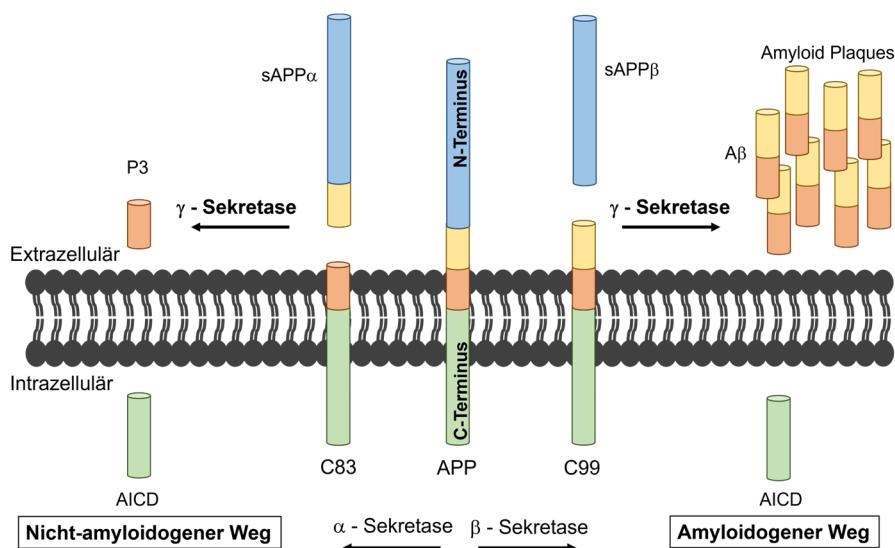


Abbildung 1.4 Veranschaulichung der nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Prozessierung vom Substrat APP durch die γ -Sekretase. Voraussetzung ist die Proteolyse des Substrats durch die α - und β -Sekretasen in C83- bzw. C99-Peptide. Der amyloidogene Weg erzeugt A β -Fragmente unterschiedlicher Längen ausgehend von C99 sowie die AICD, welche intrazellulär ins Zytosol entlassen wird. Der nicht-amyloidogene Weg schließt die Bildung von A β -Fragmenten aus. In Anlehnung an^[48, 49]

Der initiale Schnitt erfolgt an der ε -Schnittstelle, woraus A β 49 resultiert. Dieses wird sequenziell in die weiteren Tripeptide A β 46, A β 43 und A β 40 geteilt. Zudem kann alternativ eine Position weiter N-terminal geschnitten werden, wobei das A β 48 Fragment

entsteht.^[48] Folglich werden nun die Tripeptide A β 45 und A β 42 prozessiert. Die Wahrscheinlichkeit für die Produktionslinie eines A β 40 Fragments, welches nicht toxisch ist, liegt bei 80 %. Die Produktionslinie für A β 42 hingegen liegt bei 10 %, ebenso die A β 38 Produktion.^[50] Die A β 42 Peptide stellen eine pathogene Spezies dar, welche in einem hohen Maßstab aggregieren und in Zusammenhang mit der Plaquebildung bei Alzheimer stehen.^[31]

Im Laufe der Jahre wurden etliche Mutationen auf Präsenilin und APP entdeckt, welche diese pathogene Produktionsreihe fördern. Dabei ist insbesondere die familiäre Alzheimer-Variante (engl. *Familial Alzheimer Disease, FAD*) von Bedeutung. Diese Form wird autosomal-dominant vererbt, und kann zwischen drei Typen unterschieden werden. Bei Typ 1 liegt die Mutation auf dem APP-Gen (Chromosom 21 Genort q21.3), wobei mittlerweile über 20 Mutationen^[51, 52] bekannt sind, welche auf der Transmembrandomäne von APP lokalisiert sind. Typ 2 ist die am häufigsten auftretende Form. Hier sind die Mutationen im PS1-Gen verankert (Chromosom 14 Genort q24.2). Typ 3 hingegen ist auf dem PS2-Gen (Chromosom 1 Genort q42.13) lokalisiert. Die FAD-Mutationen gehören zu den seltenen genetischen Veränderungen und sind für lediglich 5 % der Alzheimer-Krankheitsfälle verantwortlich. Dabei tritt diese Form der Erkrankung zumeist vor dem 60. Lebensjahr auf.^[52-54]

Zu der Typ 1-Variante zählen beispielsweise die beiden Mutationen V44M^[55-57] und I45T^[58-60]. Die V44M-Mutation (französische Mutation) führt dazu, dass die N-terminale Produktionslinie auf ε 48 verschoben und somit die Produktion von A β 42 erhöht wird. Insgesamt wird die Herstellung von A β jedoch reduziert. Es wird vermutet, dass die V44M-Mutation zu einer Destabilisierung des T48 in der Helix führt, wodurch diese Position vermehrt angreifbar gegenüber der L49 Produktionslinie ist.^[57] Die I45T-Mutation ist soweit bekannt nur einmal aufgetreten, wobei der Patient mit 36 Jahren erkrankte.^[61] Bei dieser Mutation wird der ε -Schnitt reduziert und die Produktionsline in Richtung A β 42-Produktion verschoben. Eine mögliche Ursache dafür kann die erhöhte Wasserstoffbrückenbindung an dieser Stelle sein, welche die Flexibilität herabsetzt und somit die Schnittposition verschieben kann.^[62] Zudem zeigen neueste Studien, dass die verwandte I45F-Mutante zusätzlich den Sekretase-Substrat-Komplex blockiert.^[63]

Die G38P und G38L Mutanten, welche wie I45T und V44M in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (**Abbildung 1.5**), zeigen keine natürlichen Mutationen, sondern wurden in der Forschergruppe FOR 2290 gewählt, um das sogenannte Di-Glycin-Motiv näher zu betrachten. Dieses Motiv scheint einen Einfluss auf die Prozessierung des APP Wildtyp (**WT**) zu nehmen und äußert sich in einem Knick in der Struktur an der Stelle G37-G38. G38P sowie G38L produzieren kein A β 42, sondern erhöhen die A β 40 (G38P) oder die A β 37(G38L) Rate.^[36, 64, 65]

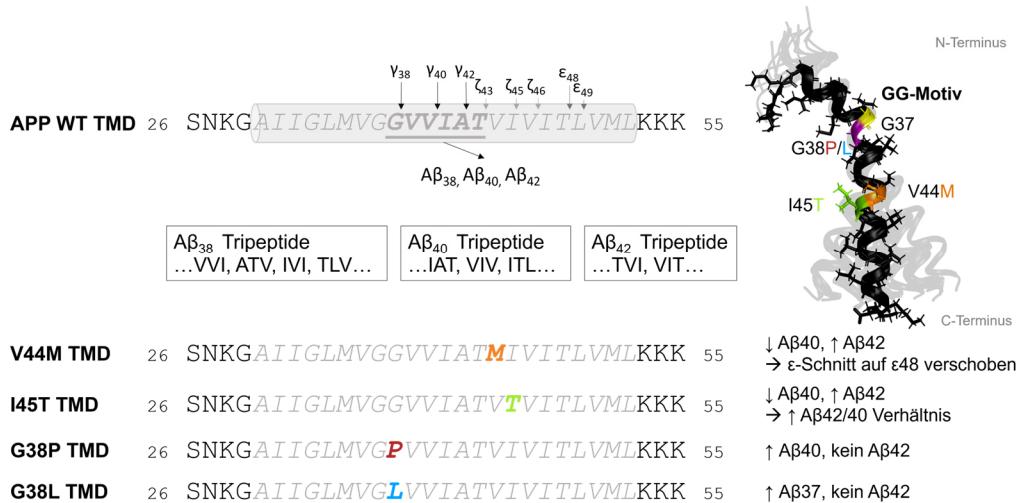


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Proteolyse der Transmembrandomäne (kursiv, grau hinterlegt) des APP. Des Weiteren sind die hier verwendeten Mutanten V44M (orange), I45T (grün), G38P (rot) und G38L (blau) mit den bevorzugten $\text{A}\beta$ -Produktlinien aufgeführt. Zusätzlich ist die Struktur des APP (PDB: 6YHF) mit dem charakteristischen Di-Glycin-Motiv sowie den jeweiligen Mutationen dargestellt.

Ein weiteres physiologisch wichtiges Substrat stellt Notch1 dar, welches von der γ -Sekretase während der Entwicklung geschnitten wird. Dadurch entsteht eine intrazelluläre Domäne (engl. *Notch IntraCellular Domain, NICD*) welche im Zellkern lokalisiert wurde und für die transkriptionelle Regulation von Genen für die Zelldifferenzierung verantwortlich ist.^[66, 67] Weitere bekannte Substrate, welche in dieser Arbeit näher betrachtet wurden, sind APLP2, ErbB4 und Fn14 sowie das Nicht-Substrat ITGB1. Diese werden im Folgenden kurz erläutert und in Kapitel 6.1 eingehender betrachtet.

APLP2^[68] (engl. *Amyloid Beta Precursor Like Protein 2*) ist wie APLP1^[69] ein nahes Homolog von APP. APLP2 und APLP1 sind als wichtige Modulatoren beim Gleichgewichtszustand von Glucose und Insulin (Homöostase) beteiligt^[70] und können folglich im gesamten Körper gefunden werden. Studien zeigen, dass APLP2 zudem am perinatalen Überleben eines Individuums beteiligt ist.^[71] Die Transmembrandomäne ist nahezu identisch zu APP, wohingegen sich der extrazelluläre Bereich deutlich unterscheidet. Somit liegt der initiale Schnitt der γ -Sekretase an gleicher Position (L713) wie in APP (L49)^[72] (**Abbildung 1.6**).

Fn14 (Synonyme: TNFRSF12a, CD26 oder TNFR12) oder auch TWEAK-Rezeptor (engl. *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*) genannt, gehört zur Tumornekrosefaktor Rezeptor Superfamilie (TNFSF), welche verantwortlich ist für Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose.^[73] Vorwiegend wird Fn14 von Zellen des Immunsystems gebildet und gehört mit 129 Aminosäuren zum kleinsten Vertreter seiner Familie. Die Bindung von TWEAK führt zu einer intrazellulären Signalkaskade, überwiegend im NF κ B-Pfad.^[74] Der extrazelluläre Bereich von Fn14 ist konserviert und beinhaltet drei Disulfidbrücken, wodurch es zu einer Trimerisierung bei Aktivierung der

Signalkaskade kommt. Fn14 wird von der γ -Sekretase in mehreren Schritten umgesetzt.^[75]



Abbildung 1.6 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen (kursiv, farblich hinterlegt) der untersuchten γ -Sekretase Substrate APP (grau), APLP2 (gelb), Fn14 (lila), ErbB4 (flieder) und dem Nicht-Substrat ITGB1 (rosa). Die bekannten γ -Schnittstellen (pinker Pfeil) von APP und APLP2 sowie die postulierten γ -Schnittstellen (blauer Pfeil) von Fn14 und ErbB4 sind markiert. Die bekannten initialen ϵ -Schnittstellen von APP und APLP2 sind mit einem grünen Pfeil dargestellt.

Der Tyrosin-Protein Kinase Rezeptor **ErbB4** (engl. *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4*) dient als Zelloberflächenrezeptor für Neureguline und reguliert mit der EGF-Familie (ErbB1(HER/EGFR), ErbB2(HER2), ErbB3 und ErbB4) unter anderem Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose.^[76, 77] Durch Liganden-Bindung wird ErbB4 dimerisiert und die Signalkaskade gestartet. Die γ -Sekretase Schnittstellen sind bisher nicht eindeutig bestätigt, postuliert werden jedoch als initialen Schnitt die Positionen V673 und V675.^[78]

Bislang sind nur einige wenige Nicht-Substrate der γ -Sekretase bekannt. Darunter ist das Integrin- β -1 (**ITGB1**, CD29), welches von den Gruppen um D. Selkoe^[35] und M. Stoffel^[79] als Nicht-Substrat erstmalig identifiziert wurde. ITGB1 gehört zur Klasse der Oberflächenproteine und stellt ein Zelladhäsionsmolekül dar. Zusammen mit weiteren Integrinen bildet es einen heterodimeren Rezeptorkomplex für unter anderem Kollagen, Fibronectin oder Laminin aus.^[2, 80] ITGB1 ist somit an verschiedenen Signaltransduktionen beteiligt und außerdem in Tumorzellen an der Aufrechterhaltung der Stammzellenfunktion zu finden. Daher spielt es in der Krebsforschung eine entscheidende Rolle. Die Aminosäuresequenz der Integrine ist hoch konserviert und die Struktur lässt sich in drei Teile eingliedern: eine große extrazelluläre Domäne, eine kurze Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne.^[81]

Mittlerweile sind über 149 Substrate der γ -Sekretase bekannt, welche ein breites Spektrum an physiologischen Funktionen abdecken.^[82] Allerdings besitzen diese, wie bereits in Kapitel 1.1.1 erwähnt, keine gemeinsame Konsensussequenz und auch sonstige mögliche Auswahlkriterien sind noch nicht vollständig untersucht. Daher ist es umso wichtiger Gemeinsamkeiten der Substrate zu finden, um mögliche Arzneimittel für Krankheiten wie Alzheimer entwickeln zu können.

1.1.3 Präsenilin-Homolog PSH

Im Jahr 2013 wurde von der Arbeitsgruppe um Y. Shi die Kristallstruktur eines 34 kDa großen Präsenilin-Homologs (**PSH**) veröffentlicht,^[83] welches erstmalig von der Gruppe um I. Ubarretxena-Belandia als Präsenilin-ähnliche Protease beschrieben wurde.^[84] Das Homolog entstammt dem Archaeon *Methanoculleus marisnigri* JR1 (MCMJR1), weist wie auch das Präsenilin neun Transmembrandomänen auf und wird ebenfalls zwischen der TMD6 und TMD7 autoproteolytisch geteilt. Dadurch entstehen ein längeres N-terminales und ein kürzeres C-terminales Fragment, jeweils mit einem katalytischen Aspartat auf TMD6 (D162) und TMD7 (D220).^[85] Für die Kristallisation wurde der flexible Loop zwischen den Resten 182-209 entfernt sowie fünf Punktmutationen (D40N, E42S, A147E, V148P und A229V) eingefügt, welche keinerlei Auswirkung auf die PSH-Aktivität verursachten.^[83]

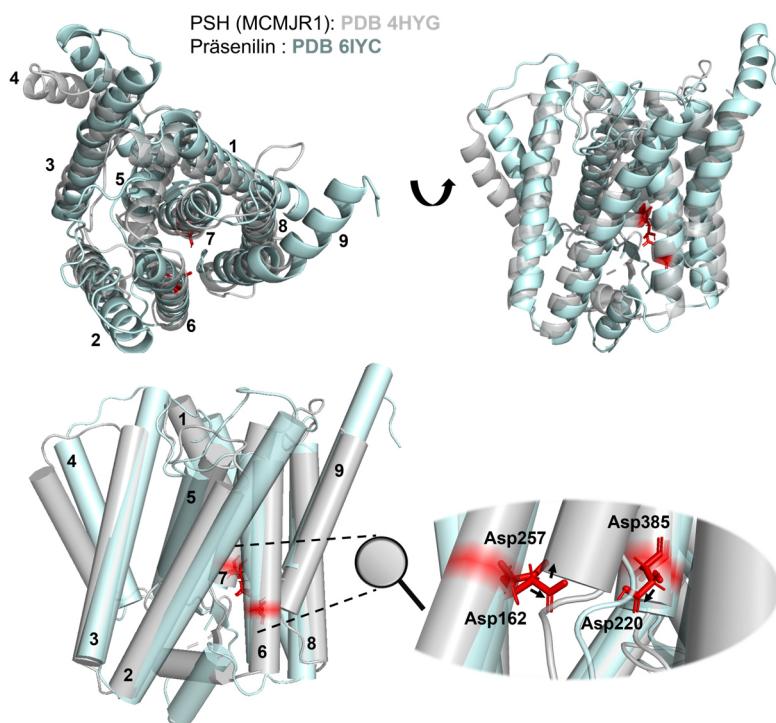


Abbildung 1.7 Vergleich der Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur von Präsenilin (γ -Sekretase) in hellblau (PDB: 6IYC) mit der modifizierten Kristallstruktur von PSH^[86] in grau (PDB: 4HYG) durch Überlagerung. Gezeigt sind zudem die schwach unterschiedlichen Ausrichtungen der katalytischen Aspartate von Präsenilin (Asp 257 und Asp385) und PSH (Asp162 und Asp220).

Es konnte gezeigt werden, dass PSH einen tetrameren Kristall-Komplex formt, wobei jedes Monomer neun α -helikale Transmembrandomänen aufweist. Wie auch bei dem humanen Präsenilin zeigen die TMD1-6 des Homolog eine hufeisenförmige Struktur, wobei die TMD7-9 zum Teil C-terminal umrundet werden. Die TMD1-6 weisen dabei eine leichte Neigung von 15-35° gegenüber der Lipidoberfläche auf, während die TMD7-9 weniger geneigt sind. Außerdem ist eine Lücke zu erkennen, die durch die hydrophoben Reste der TMD2, 3, 5 und 7 gebildet wird und in welcher Wechselwirkungen mit kleinen

Ionen stattfinden kann.^[83] Bislang unterscheidet sich das humane Präsenilin der γ -Sekretase und das Homolog deutlich von weiteren bekannten Intramembranproteasen wie **Rhomboid**, **SPP/SPPL** (engl. *Signal Peptide Peptidase/ peptidase-like*) oder **S2P** (engl. *Site-2-Protease*) in der Struktur und Faltung der TMDs, weshalb die ausgebildete Konformation auch als „*Presenilin fold*“ beschrieben wird.^[83]

Aufgrund der weiten Entfernung der beiden katalytischen Aspartate von 6,7 Å in der Kristallstruktur kann angenommen werden, dass es zu einer Konformationsänderung bei der Interaktion mit einem Substrat kommen muss. Diese könnte vor ungewollter, nicht-spezifischer Spaltung schützen, wie Y. Shi spekuliert.^[83] Des Weiteren zeigt PSH einen hohen Zugang an Wassermolekülen durch einen großen Hohlraum auf Seiten des Zytosols, wodurch die Proteolyse der Peptidbindungen von Substraten ermöglicht werden kann.

Die Sequenzen von Präsenilin und dem Homolog weisen eine Identität von 19,3 % und eine Ähnlichkeit von 52,8 % auf, wobei die für die Katalyse wichtigen Motive (wie beispielsweise die Aspartate) konserviert sind.^[87] Kristallographie- und NMR-Daten (PDB: 2KR6) zeigten dabei schwache Unterschiede in der Ausrichtung der Aspartate. Das Asp385 von Präsenilin zeigt zudem in der C-terminalen NMR-Struktur,^[88] im Gegensatz zur Kristallstruktur, in die entgegengesetzte Richtung des Asp257.^[83] So weisen die Aspartate bei Überlagerung der Strukturen von Präsenilin und PSH (hier modifizierte Struktur von 4HYG dargestellt)^[86] ebenfalls leicht unterschiedliche räumliche Ausrichtungen auf, wie aus **Abbildung 1.7** entnommen werden kann. Dennoch ist PSH aufgrund der Ähnlichkeit zu Präsenilin ein gutes Modellprotein für das Studium der Intramembran-Proteolysen. Aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zum γ -Sekretase-Komplex besteht zudem die Möglichkeit das System anhand von Kernspinresonanzspektroskopie zu untersuchen. Zudem benötigt es keine zusätzlichen Proteine, um aktiv zu sein. Wie unter anderem S. Dang et al., L. Feilen et al. sowie N. Clemente et al. zeigen konnten, ist es in der Lage APP umzusetzen.^[84, 86, 87, 89] Allerdings ist das Substratspektrum des Homologs bis dato unbekannt.

1.2 Kernspinresonanzspektroskopie

1.2.1 Prinzip der Kernspinresonanzspektroskopie

Die Untersuchung molekularer Strukturen kann durch die Wechselwirkungen des magnetischen Moments eines Atomkerns mit dem äußeren magnetischen Feld eines Magnets sowie Spulen eines Spektrometers verwirklicht werden. Diese Methode der Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) ist seit dem Nachweis von Kernresonanzsignalen im Jahr 1938 durch I. Rabi^[90], welcher 1944 hierfür den Nobel-Preis erhielt, sowie 1946 durch die beiden Arbeitsgruppen um F. Bloch und E. M. Purcell,^[91-94] welche den Nobelpreis 1952 erhielten, ein wichtiges Werkzeug. Die Weiterentwicklung hingehend zur Anwendung der Fourier-Transformationen durch R. Ernst und W. Anderson^[95] 1966 bereitete den Weg zu einer schnelleren Messmethodik mit gesteigerter Empfindlichkeit. Hierfür gewann R. Ernst 1991^[96] den Nobel Preis für Chemie und 2002 ging dieser für die Weiterentwicklung der dreidimensionalen Strukturbestimmung an Proteinen in der NMR an K. Wüthrich.^[97] Im Folgenden soll auf die Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie^[98-101] und dessen Anwendung auf Biomoleküle eingegangen werden.

Im homogenen Magnetfeld eines Spektrometers werden die Energieniveaus der Kerne der zu untersuchenden Moleküle in ihre unterschiedlichen Zustände aufgespalten. Die Übergänge der Energiezustände in den Kernen werden durch Einstrahlen von Radiowellen erzeugt. Voraussetzung hierfür ist, dass die Elektronen der Kerne einen Eigendrehimpuls besitzen. Dies wird als Spin S bezeichnet und muss ungleich Null sein, da nur solche Kerne ein magnetisches Moment aufweisen. Beispiele für Kerne, die diese Eigenschaft erfüllen, sind Wasserstoff ^1H , sowie die Isotopenkerne Stickstoff ^{15}N und Kohlenstoff ^{13}C , welche insbesondere in der Untersuchung biologischer Systeme relevant sind. Ein weiterer wesentlicher Parameter hierbei ist der Drehimpuls \vec{P} , welcher den Eigendrehimpuls des Kernspins widerspiegelt. Dieser ist wie folgt definiert:

$$|\vec{P}| = \sqrt{I(I+1)\hbar} \quad [1]$$

Gegeben sind die Drehimpuls- oder Kernspinquantenzahl I sowie das Planck'sche Wirkungsquantum $\hbar (\equiv \frac{h}{2\pi})$. Wird nun ein äußeres Magnetfeld entlang der z-Achse angelegt, ergibt sich ein Zusammenhang mit der Magnetquantenzahl m :

$$\vec{I}_z = I_z \hbar = m \hbar \quad [2]$$

Die Spinquantenzahl von den häufig genutzten Kernen beträgt somit $\frac{1}{2}$. Wasserstoff ^1H hat hierbei eine natürliche Häufigkeit von 99,99 %, wohingegen Kohlenstoff ^{13}C 1,07 %

und Stickstoff ^{15}N lediglich 0,37 % aufweisen. Der Spin eines Elektrons mit der Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$ kann laut dem Pauli-Prinzip zwei gequantelte Zustände in einem magnetischen Feld annehmen.^[98] Diese werden als Spin up ($\uparrow +\frac{1}{2}$) und Spin down ($\downarrow -\frac{1}{2}$) bezeichnet und liegen somit parallel oder antiparallel zum angelegten Magnetfeld B_0 . Wenn kein äußeres Magnetfeld angelegt ist, liegen die Zustände entartet vor, wohingegen der parallele Zustand energetisch begünstigt ist. Bei Anlegen eines magnetischen Feldes kommt es zur Energieaufspaltung der Zustände, welches im direkten Zusammenhang mit dem Eigendrehimpuls der Kerne steht. Dieser Eigendrehimpuls ist proportional zum magnetischen Moment und wird als gyromagnetisches Verhältnis γ ausgedrückt:

$$\gamma = \frac{\vec{\mu}}{\vec{P}} \quad [3]$$

$\vec{\mu}$ beschreibt die Richtungsquantelung der präzidierenden Kerndipole und \vec{P} stellt den Drehimpulsoperator dar.

Da es sich bei den Kernen in der klassischen Betrachtungsweise um magnetische Dipole handelt, beträgt die Energie eines Kerns in einem homogenen Magnetfeld B_0 :

$$E = -\mu_z B_0 = -m\gamma\hbar B_0 \quad [4]$$

Hieraus ergeben sich verschiedene Orientierungsmöglichkeiten der Kerne, welche die Aufspaltung in unterschiedliche Energieniveaus zufolge hat. Dies wird als Zeemann-Effekt^[102] beschrieben und erläutert die Aufspaltung der Spektrallinien durch den Einfluss eines magnetischen Feldes. Hierbei gibt es die Orientierungsmöglichkeit von $(2I+1)$ mit der Kernspinquantenzahl I . Der Abstand zwischen den Kern-Zeemann-Niveaus ergibt sich aus der Larmor-Frequenz ω . Mit dieser Frequenz präzidiert der Kern um das magnetische Feld und ist somit abhängig vom angelegten Magnetfeld und dem Drehimpuls des Kernes:

$$\omega = \hbar\gamma B_0 \quad [5]$$

Die Larmor-Frequenz entspricht dem Abstand zwischen den einzelnen Niveaus, welche in der Quantenmechanik auch als Spinfunktion α ($+\frac{1}{2}$) und β ($-\frac{1}{2}$) bezeichnet wird und ist daher gleichzusetzen mit dem Energieunterschied ΔE zwischen den benachbarten Niveaus. Somit ergeben sich beispielsweise für den Wasserstoff ^1H zwei mögliche Zeemann-Niveaus und für Kerne wie ^2H ergeben sich drei mögliche Niveaus (+1, 0, -1). Die Besetzungsverteilung auf die verschiedenen Energiezustände kann mit der Boltzmann-Statistik ermittelt werden. N_α sind hierbei Kerne in energieniedrigeren Niveaus und N_β Kerne in energiehöheren:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\Delta E/k_B T} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad [6]$$

k_B stellt dabei die Boltzmann-Konstante dar und T die Temperatur in Kelvin. Die Energieunterschiede der Kerne sind sehr klein im Gegensatz zu der mittleren Energie der Wärmebewegung, woraufhin die Besetzung der Energieniveaus nahezu identisch ist. Der geringe Überschuss an energieärmeren Kernen reicht jedoch aus, um eine makroskopische Magnetisierung M_0 in Feldrichtung zu erhalten (siehe Abbildung 1.8).^[101]

Um die Übergänge zwischen den einzelnen Energieniveaus sichtbar machen zu können, werden die Kerne mit einer elektromagnetischen Welle ν_1 , in diesem Fall mit einer Radiofrequenz, bestrahlt. Hierbei erfolgen Energieabsorption und Energieemission zu gleichen Teilen, wobei es zu Umkehrungen in der Kernspin-Orientierung kommt. Aufgrund der Boltzmann-Verteilung und dem damit verbundenen Überschuss an energieärmeren Niveaus, überwiegt die Energieabsorption, welche schlussendlich auch als Signal messbar wird. Die Signalintensität ist somit direkt proportional zur Gesamtzahl an Spins und damit zur Konzentration des Analyten. Seit den 60er Jahren wird hierfür das Impuls-Verfahren angewendet, wobei alle Kerne gleichzeitig mit einem Hochfrequenzimpuls angeregt werden. Durch die auftretende Präzessionsbewegung kommt es zu einer komplexen Bewegung der Magnetisierung, wobei der Puls eine Rotation der Magnetisierung um eine bestimmte Achse und Winkel verursacht. Durch Übertragung dieser Magnetisierung präzidiert eine transversale Magnetisierung um eine Achse, womit diese Präzessionsbewegung in einer oszillierenden Frequenz resultiert. Die durch die Pulse angeregte Magnetisierung relaxiert mit der Zeit von selbst, wodurch es zur Rückkehr in den Gleichgewichtszustand kommt. Hierbei kann zwischen der longitudinalen- (T_1) und transversalen- (T_2) Relaxationszeit unterschieden werden. In der Empfängerspule des Spektrometers wird durch die Änderung des elektromagnetischen Feldes eine Spannung induziert, welche durch die Relaxation wieder abnimmt. Mit Hilfe der Fourier-Transformation ist es möglich aus den vorliegenden Daten, auch als freier Induktionszerfall (engl. *Free induction decay, FID*) bezeichnet, ein Signal in ein Spektrum umzuwandeln.^[98-101]

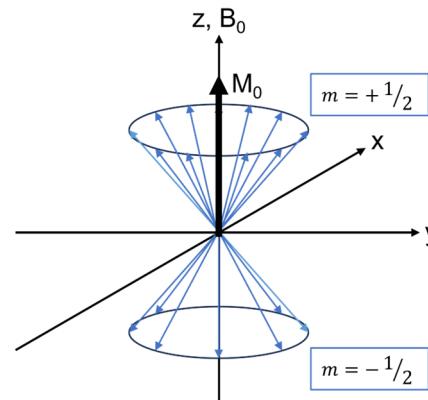


Abbildung 1.8 Darstellung der makroskopischen z-Magnetisierung, welche um das Magnetfeld B_0 präzidiert. Zum Magnetisierungsvektor M_0 addieren sich die z-Komponenten der magnetischen Momente der einzelnen Spins auf. Die Besetzung von N_α ist größer, weshalb der Vektor in Richtung +z-Achse zeigt. In Anlehnung an^[101]

Bei sogenannten eindimensionalen Experimenten wirkt im simpelsten Fall ein einfacher 90° Puls auf das elektromagnetische Feld der Kerne des zu untersuchenden Moleküls ein. Es kann grundsätzlich in zwei Phasen unterteilt werden: Der Präparation, wobei alle Spins in einen definierten Zustand gebracht werden und der Detektion, welche die Antwort darauf in Form von Quadratursignalen mit Imaginär- und Realteil enthält. Durch vielfaches Wiederholen dieser Phasen, genannt Scans, können die ermittelten Messwerte aufaddiert und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. *Signal-to-Noise Ratio, SNR*) optimiert werden.

$$SNR \sim N\sqrt{n}$$

[7]

N stellt die Anzahl an Spins dar und \sqrt{n} die Anzahl an Scans. SNR ist somit proportional zur Quadratwurzel der Anzahl an Spins.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die chemische Verschiebung. Ein Kern erfährt um sich herum aufgrund der elektromagnetischen Eigenschaften in einem Magnetfeld ein eigenes schwaches Magnetfeld der Elektronen. Dieses Feld überlagert sich geringfügig aufgrund der verschiedenen chemischen Umgebungen mit dem Hauptfeld, wodurch eine Resonanzverschiebung, die sogenannte chemische Verschiebung, entsteht. Angegeben wird diese Abschirmung zur besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Spektrometern in **ppm** (engl. *parts per million*) im Zusammenhang mit der Larmor-Frequenz:

$$\delta = \frac{\omega_{Signal} - \omega_{Referenz}}{\omega_{Referenz}} (10^6 ppm) \quad [8]$$

$\omega_{Referenz}$ steht hierbei für die Frequenz eines Referenzsignales, wie beispielsweise Natriumtrimethylsilylpropionat (**TSP**), dessen Frequenz als 0 ppm definiert wird. Folglich führt die elektronische Umgebung eines Kerns zu einer Störung der Resonanzfrequenz benachbarter Kerne.

Die elektromagnetischen Felder der Kerne wirken sich jedoch nicht nur auf die chemischen Verschiebungen aus, sondern interferieren auch innerhalb des Moleküls. Dabei wird die Magnetisierung von einem Kern auf den nächsten (oder weiter) übertragen, wodurch das jeweilige magnetische Feld erhöht oder abgeschwächt wird. Dieser Effekt führt zu einer zusätzlichen Abschirmung der einzelnen Kerne, die als skalare Kopplung bezeichnet wird. Daraus entstehen NMR-charakteristische Aufspaltungsmuster in Singulett, Dublett, Triplet und so weiter. Wird ein Übergang durch die gleiche Energie herbeigeführt, entsteht keine Kopplung (Symmetrie-äquivalente Kerne). Aus der Stärke der Kopplung zwischen den einzelnen Kernen kann zudem eine Aussage über die elektronische Bindung getroffen werden. Die Multiplizität M der

Signale wird durch $M = 2nI + 1$ (oder vereinfacht für $I = \frac{1}{2} \rightarrow M = n + 1$) erhalten. I steht für den Kernspin und n für die Anzahl an benachbarten Kernen. Die Multiplizität und die Intensität gehen einher mit dem Prinzip des Pascal'schen Dreiecks. Die Distanz und die Äquivalenz der Wechselwirkungen werden durch die Kopplungskonstante bestimmt, welche unabhängig der magnetischen Flussdichte ist und folglich in Hz angegeben wird.^[98-101]

1.2.2 Mehrdimensionale Experimente

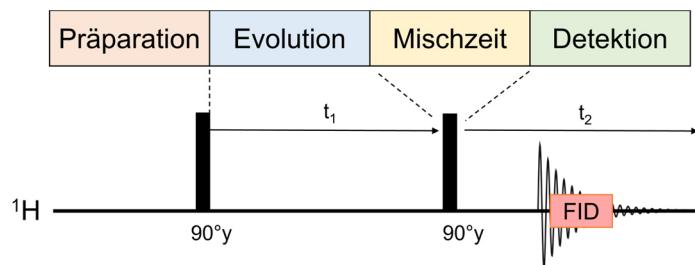


Abbildung 1.9 Grafische Darstellung einer einfachen Pulssequenz eines zweidimensionalen NMR-Experimentes. Im Verlauf der Evolution und Detektion entwickelt sich das System mit den t_1 - und t_2 -Zeiten. Während der Mischzeit können die Korrelationen zwischen wechselwirkenden Spins aufgebaut werden, wie hier mit einem einfachen 90° Puls dargestellt ist. Die Detektion erfolgt durch den FID. In Anlehnung an^[101]

Zweidimensionale Experimente basieren auf dem gleichen Prinzip wie eindimensionale, nur, dass hier eine zweite, indirekte Dimension hinzukommt. Gestartet wird mit einer **Präparationszeit**, bei welcher die Spins aus der Gleichgewichtsmagnetisierung angeregt werden, beispielsweise durch einen einfachen 90° Puls. Darauf folgt die **Evolutionszeit**, bei welcher die t_1 -Entwicklungszeit in aufeinanderfolgenden Scans inkrementiert wird. Dies entspricht den Zeitinkrementen des digitalisierten FIDs der t_2 -Zeit. In der darauffolgenden **Mischzeit** werden die Magnetisierungen auf die nächsten Spins übertragen. In der anschließenden **Detektionszeit** wird der FID aufgenommen. Somit bestehen zweidimensionale Experimente aus einer vielfachen Aneinanderreihung eindimensionaler Experimente, wobei die t_1 -Zeit inkrementiert wird. Aus der Fourier-Transformation nach der t_2 -Zeit resultiert eine Serie von Einzelspektren, die in einem weiteren Schritt erneut Fourier-transformiert werden und senkrecht zur Dimension ω_2 dargestellt werden können.^[99, 101]

1.2.2.1 NOESY – Experiment

Das NOESY-Experiment (engl. *Nuklear Overhauser Enhancement Spectroscopy, NOESY*) baut auf den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Kernen durch den Raum auf, wodurch die Möglichkeit entsteht, strukturelle Informationen des zu untersuchenden Moleküls zu erhalten. Die dipolare Kopplung ist dabei nicht nur vom Abstand beider Spins zueinander abhängig, sondern auch von der Richtung, beziehungsweise dem Winkel des Abstandsvektors zwischen den Spins in Bezug auf das statische Magnetfeld:

$$D_{IS} \sim \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$$

[9]

Die Brownsche Molekularbewegung führt allerdings dazu, dass die dipolare Wechselwirkung in isotropen Medien im Mittel Null ist, wodurch keine dipolaren Kopplungen im Spektrum beobachtet werden können. Die Dipol-Dipol Wechselwirkungen führen jedoch bei Besetzungsunterschieden der Kernniveaus zu Kreuzrelaxationen zwischen den Kernen, welche zum Magnetisierungstransfer genutzt werden können. Die dipolare Wechselwirkung ist folglich abstandsabhängig mit r^{-6} und die Übertragung der Magnetisierung auf einen oder mehrere Nachbarkerne durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung wird als Kern-Overhauser-Effekt bezeichnet (engl. *Nuclear Overhauser-Effect, NOE*). Durch anhaltende Einstrahlung auf die Resonanz eines Protons wird diese gesättigt und die Gleichgewichtspopulation des Kerns gestört. Die Besetzungsverhältnisse sind somit nicht mehr im Gleichgewicht und durch Spin-Gitter-Relaxation wird nun der Gleichgewichtszustand über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen wieder versucht herzustellen. Damit sind nicht nur Einquantenübergänge möglich, welche bei Relaxationsprozessen auftreten, sondern auch Doppel- und Nullquantenübergänge. Dadurch ändern sich auch die Signalintensitäten von Kernen in der Nachbarschaft. Diese Übergänge können nicht elektromagnetisch angeregt werden und treten somit vorwiegend bei Dipol-Dipol-Relaxationen auf.^[99, 100]

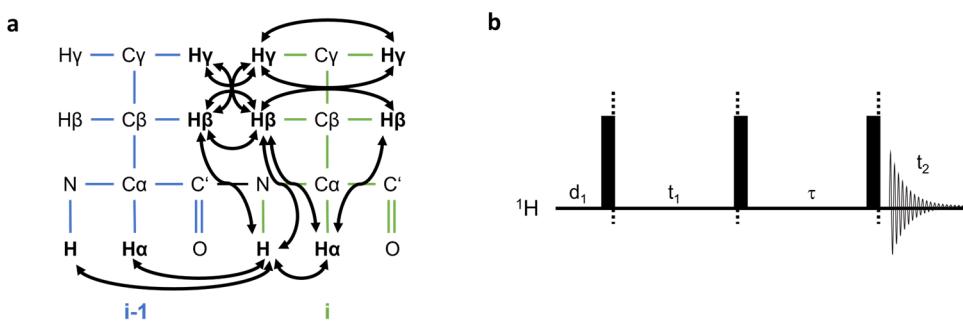


Abbildung 1.10 Schematische Darstellung des NOESY-Experiments. (a) Der Magnetisierungstransfer verdeutlicht die Korrelation über den Raum eines Proteinrückgrats, wobei dieser zwischen allen Wasserstoffatomen ausgetauscht wird. In Anlehnung an^[103] (b) Vereinfachte NOESY-Pulssequenz. Während der t_1 -Zeit entwickelt sich die transversale Magnetisierung, welche durch den zweiten 90° Puls auf die z-Achse transferiert und in der Mischzeit auf andere Spins übertragen werden kann. Während der anschließenden Akquisitionszeit entwickelt sich die chemische Verschiebung. In Anlehnung an^[100]

Gerade in der Proteinuntersuchung ist dieser Mechanismus von großer Bedeutung. Mit dem entsprechenden NOESY-Experiment und mithilfe von molekulardynamischen Simulationen ausgehend von NOESY-Daten können Strukturen des zu untersuchenden Moleküls berechnet werden. Grund hierfür ist, dass durch die Wechselwirkungen über das gesamte Proteinrückgrat die einzelnen Verbindungen und somit intra- und intermolekulare Abstandsinformationen erhalten werden.^[104] Der Magnetisierungstransfer, veranschaulicht in **Abbildung 1.10 (a)**, verläuft über das Rückgrat und die Aminosäure-Seitenketten durch das vollständige Proteingerüst.

Beim entsprechenden Experiment wird die t_1 -Zeit inkrementiert und eine verhältnismäßig lange Mischzeit τ (ca. 50-200 ms für Peptide) eingebracht, damit die Korrelation zwischen den Kernen erfolgen kann. Eine dabei auftretende restliche Quermagnetisierung kann mit Gradienten zerstreuert werden. In **Abbildung 1.10 (b)** ist eine simple NOESY-Pulssequenz dargestellt. Nach einer kurzen Wartezeit d_1 erfolgt ein 90° Puls, welcher die Protonen vollständig anregt. In der Evolution der t_1 -Zeit entwickelt sich die Spin-Spin-Kopplung. In der darauffolgenden Mischzeit τ korrelieren die Kerne und es kommt zu einer dipolaren Kreuzrelaxation von in der Nähe liegenden Kernen ($\sim 5 \text{ \AA}$). Zuletzt erfolgt der FID und somit die Detektion.^[100]

1.2.2.2 HSQC – Experiment

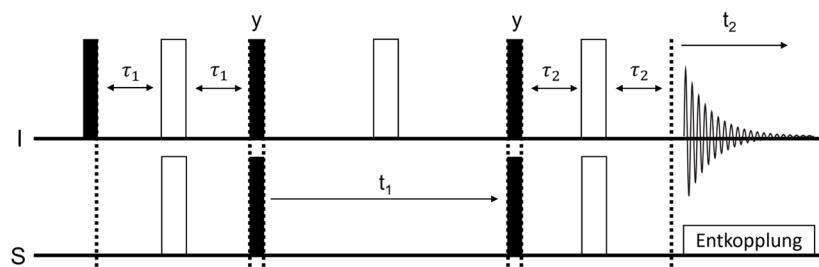


Abbildung 1.11 HSQC-Pulssequenz für heteronukleare Korrelationen. Die Gleichgewichtsmagnetisierung wird von Spin I auf Spin S übertragen, wobei sich diese während der t_1 -Zeit entwickelt. Das darauffolgende Spin-Echo wandelt die Anti-Phasen Signale in In-Phasen Signale um, sodass diese mittels einer Breitband-Entkopplung (Spins S) detektiert werden können. In Anlehnung an^[100]

Das HSQC-Experiment (engl. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, **HSQC**) wird genutzt, um die Magnetisierungsübertragung über einzelne Bindungen (^1J -Kopplung) zwischen Protonen und ^{13}C - oder ^{15}N -Kernen zu detektieren. Somit kann dies vor allem für die Zuordnung eines Proteinrückgrates in der Protein-NMR verwendet werden. Die Gleichgewichtsmagnetisierung wird hierbei von Spin I (Wasserstoff) auf den zweiten Spin S (^{13}C oder ^{15}N) übertragen (sogenannter **INEPT** (engl. *InSensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*) Kohärenztransfer mittels Anti-phase). Die chemische Verschiebung des Spins S wird während der t_1 -Zeit entwickelt und die Kopplung kann durch einen 180° Puls auf Spin I refokussiert werden. Durch die reverse INEPT-Sequenz erfolgt somit der Rücktransfer auf das Proton. Während der Aufnahme des FIDs wird in der Regel eine Breitband Entkopplung des Spins S durchgeführt (**Abbildung 1.11**).

1.2.2.3 TOCSY – Experiment

Das TOCSY-Experiment (engl. *Total Correlation Spectroscopy*, **TOCSY**) ist ein homonukleares Experiment, wobei der Transfer über skalare Kopplungen zwischen benachbarten Kernen erfolgt. Dabei werden Korrelationen durch das Spinsystem ermöglicht. Essenziell hierfür ist das isotrope Mischen τ_{mix} , auch „*Spin-Locking*“ genannt, wodurch die z-Magnetisierung von einem Spin auf den nächsten übertragen

wird.^[100] Veranschaulicht ist dies in **Abbildung 1.12**. Während des *Spin-Lockings* werden die Kerne durch einen andauernden Puls auf einer Achse fixiert, wodurch die chemischen Verschiebungsdifferenzen klein werden. Dadurch können sich die Spinzustände mischen und die Magnetisierung auf alle anderen Protonen innerhalb eines Spinsystems übertragen werden.^[99]

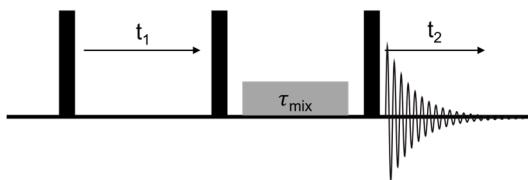


Abbildung 1.12 TOCSY-Pulssequenz mit initialem 90°-Puls, welcher die Magnetisierung auf die z-Achse dreht, gefolgt von einem Spin-Locking (τ_{mix}), in welchem die Magnetisierung zwischen den Kernen der Spinsysteme übertragen wird. In Anlehnung an^[100]

1.2.2.4 Dreidimensionale Triple-Resonanz Experimente

Dreidimensionale Triple-Resonanz NMR-Experimente werden verwendet, um vor allem von größeren Proteinen (> 10 kDa) die Resonanzen des vollständigen Proteinrückgrats bestimmen zu können. Bei kleinen Proteinen reichen zumeist TOCSY-, HSQC- und NOESY-Spektren aus, allerdings kommt es mit zunehmender Größe des Moleküls zu starken Signalüberlagerungen.^[105] In Triple-Resonanz-Experimenten werden Magnetisierungen in der Regel ausgehend von Amidprotonen über das gesamte Rückgrat, folglich über Wasserstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffatome, übertragen. Somit basieren dreidimensionale Experimente auf zweidimensionalen Experimenten (x, y-Ebene), mit dem Unterschied, dass eine dritte Dimension (z-Ebene) hinzukommt, welche die Zuordnung der Resonanzen vereinfacht. Voraussetzung hierfür ist die Isotopenmarkierung der Moleküle, damit die Anregung und Übertragung ausreichend Signal liefern, da die natürliche Häufigkeit von ^{13}C -Kohlenstoff mit 1,07 % und ^{15}N -Stickstoff mit 0,37 % nicht ausreicht.^[106]

Vier der bekanntesten Pulssequenzen sind im Folgenden kurz erläutert und der resultierende Magnetisierungstransfer kann **Abbildung 1.13** entnommen werden. Im **HNCA**^[105] wird die Magnetisierung vom Amidproton auf den Stickstoff übertragen, dann mittels J-Kopplung zwischen den $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ und $^{13}\text{C}\alpha$ weiter geleitet und schlussendlich auf den Stickstoff und das Amidproton zurück transferiert. Im Spektrum (^{15}N - ^1H Dimension) sind dadurch jeweils das eigene $\text{C}\alpha$ und das des Vorgängers (i-1) zu sehen.

Die Magnetisierung beim **HN(CO)CA**^[107] wird ausgehend vom Amidproton auf den Stickstoff und weiter auf das Carbonyl übertragen. Hiervon wird die Magnetisierung weiter auf das $\text{C}\alpha$ transferiert und anschließend wieder rückwärts auf das Amidproton. Die chemischen Verschiebungen von $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ und $^{13}\text{C}\alpha$ werden entwickelt, aber nicht

die des Carbonyls. Im Spektrum ($^{15}\text{N}-^1\text{H}$ Dimension) ist somit das $^{13}\text{C}\alpha$ des vorherigen (i-1) Restes zu sehen.

Das **HNCACB**^[108] transferiert die Magnetisierung ausgehend vom $^1\text{H}\alpha$ und $^1\text{H}\beta$ zu den entsprechenden $^{13}\text{C}\alpha$ und $^{13}\text{C}\beta$. Des Weiteren wird vom $^{13}\text{C}\beta$ die Magnetisierung direkt auf das $^{13}\text{C}\alpha$ übertragen, von wo diese weiter auf das $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ und folglich auf das $^1\text{H}^{\text{N}}$ gelangt und detektiert wird. Im Spektrum werden so auf einer $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ Frequenz vier ^{13}C Peaks sichtbar. Das $^{13}\text{C}\alpha$ und $^{13}\text{C}\beta$ des eigenen Restes, sowie $^{13}\text{C}\alpha-1$ und $^{13}\text{C}\beta-1$ des Vorgängers.

Die Magnetisierung des **HN(CO)CACB**^[109] wird entsprechend dem HNCACB vom $^1\text{H}\alpha$ und $^1\text{H}\beta$ auf $^{13}\text{C}\alpha$ und $^{13}\text{C}\beta$ übertragen und anschließend vom $^{13}\text{C}\beta$ auf das $^{13}\text{C}\alpha$. Von hier wird allerdings die Magnetisierung auf das Carbonyl (^{13}CO) transferiert, wobei diese weiter auf das $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ gelangt und anschließend beim $^1\text{H}^{\text{N}}$ detektiert wird. Im Spektrum sind somit in der $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ Dimension das $^{13}\text{C}\alpha-1$ und $^{13}\text{C}\beta-1$ des Vorgängers zu sehen.

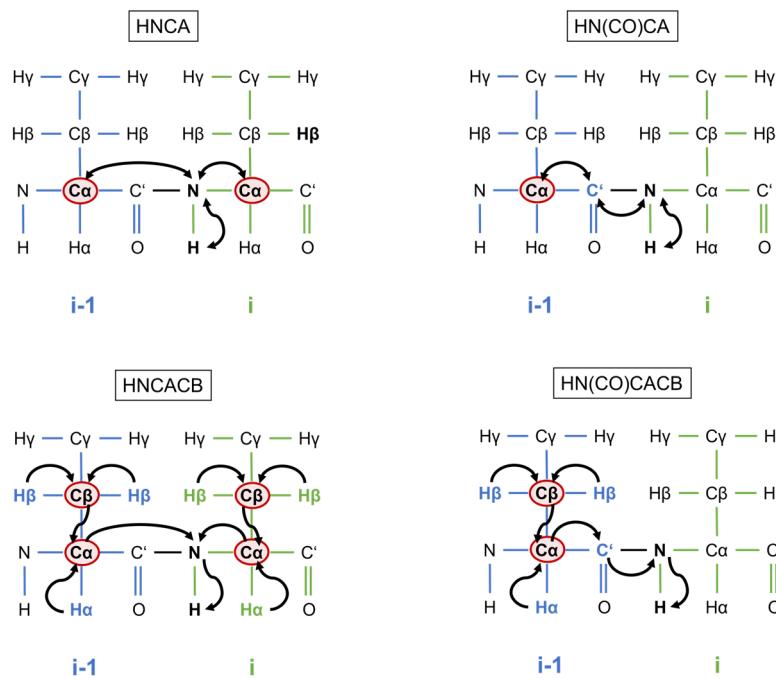


Abbildung 1.13 Dreidimensionale NMR-Experimente. Dargestellt sind die vier klassischen Experimente HNCA, HN(CO)CA, HNCACB und HN(CO)CACB, welche häufig für Strukturbestimmungen verwendet werden. Gezeigt ist der entsprechende Magnetisierungstransfer (schwarze Pfeile) zwischen den Atomen der Seitenketten der zu betrachtenden Aminosäure i (grün) und der vorhergehenden Aminosäure i-1 (blau). Die im Spektrum in der $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ Dimension sichtbaren ^{13}C -Reste sind rot markiert. In Anlehnung an^[103]

1.2.3 Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen

1.2.3.1 Sekundäre chemische Verschiebung

Die chemischen Verschiebungen stellen reproduzierbare Parameter dar, welche durch verschiedene äußere Einflüsse beeinträchtigt werden können.^[110] Nicht nur die Umgebung der Moleküle, sondern auch die Temperatur oder der pH-Wert können die chemische Verschiebung verändern.^[111-113] Durch diese Abhängigkeit von der Umgebung für einen bestimmten Kern können die chemischen Verschiebungen ideal für die Zuordnung einer Proteinstruktur verwendet werden.^[114] In Flüssigkeiten tritt zumeist die isotrope Verschiebung auf, da aufgrund der Molekülbewegung die Proteine eine zeitabhängige Bewegung vollführen. Diamagnetische Materialien, wie zum Beispiel ¹H, ¹³C oder ¹⁵N markierte Proben, zeigen eine Verschiebung aufgrund der Ladung der Kerne. Anisotrope Verschiebungen treten in Festkörpern auf, welche im nachfolgenden Kapitel 1.2.4 näher betrachtet werden.^[114]

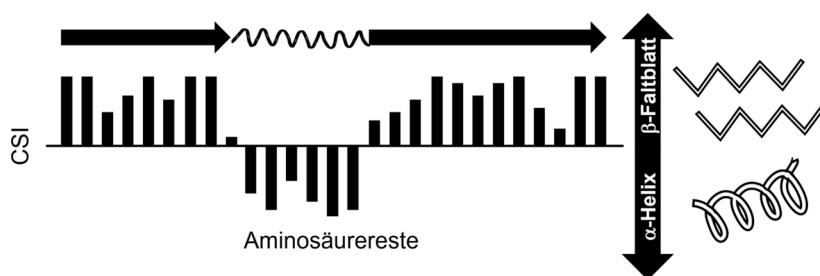


Abbildung 1.14 Modellhafte Darstellung der sekundären chemischen Verschiebung. Die x-Achse repräsentiert die einzelnen Aminosäurereste eines Proteinkettens. Die y-Achse zeigt den entsprechenden chemischen Verschiebungsindex (CSI), welcher Aussagen über die Sekundärstruktur liefert.

Die Sekundärstruktur eines Proteins lässt sich in drei Hauptkonformationen unterteilen: α -Helix, β -Faltblatt und Random Coil. Eine α -Helix definiert sich durch 3,6 Aminosäureseitenketten pro Windung mit definierten Längen von 5,4 Å. Die Helix Struktur wird dabei durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, welche zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff der n-ten Aminosäure und dem Amidproton (NH) der n+4 ten Aminosäure ausgebildet werden. Das β -Faltblatt zeigt eine ziehharmonikaähnliche Struktur, bedingt durch die Verknüpfung der Seitenketten. Entlang des Polypeptidrückgrats werden Wasserstoffbrückenbindungen im Abstand von 1,8 Å ausgebildet, welche der Struktur Stabilität verleihen. Random Coil Strukturen weisen im Gegensatz zur α -Helix und dem β -Faltblatt eine ungeordnete Struktur auf.^[2] Jede dieser Strukturen zeigen in der NMR charakteristische chemische Verschiebungsänderungen und ermöglichen dadurch strukturelle Bestimmungen. Anwendung finden hier für kleine Proteine (< 70 Aminosäuren) und Peptide zumeist das ¹H-¹H-TOCSY-, ¹H-¹⁵N/¹³C-HSQC- und ¹H-¹H-NOESY-Spektrum. Nach erfolgter Zuordnung der Atome im Spektrum können bekannte Random Coil Werte von den erhaltenen chemischen Verschiebungen abgezogen werden, wie aus der untenstehenden Gleichung zu entnehmen ist.^[114, 115]

$$\Delta\delta = \delta_{obs} - \delta_{rc} \quad [10]$$

Damit ergeben sich aus den sekundären chemischen Verschiebungen (engl. *Secondary Chemical Shift, SCS*) Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins. Graphische Darstellungen der chemischen Verschiebungen nach dem chemischen Verschiebungsindex (engl. *Chemical Shift Index, CSI*) ergeben ein Muster entsprechend der Struktur des Proteins. So weisen negative $\text{H}\alpha$ -Werte auf eine α -helikale Struktur und positive auf ein β -Faltblatt hin. Dies gilt in umgekehrter Weise auch für den Kohlenstoff $\text{C}\alpha$.

Zur Quantifizierung einer Strukturänderung in einem Protein, zum Beispiel durch Ligandenbindung, kann zudem die sogenannte Störung der chemischen Verschiebung (engl. *Chemical Shift Perturbation, CSP*) ermittelt werden. Dabei werden die chemischen Verschiebungen der ^1H - sowie ^{15}N - oder ^{13}C -Kerne aus mehreren gemessenen Spektren in Abhängigkeit von der Zeit oder der Ligandenkonzentration voneinander subtrahiert und nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta\delta = \sqrt{\delta_H^2 + (\delta_N * A)^2} \quad [11]$$

A stellt einen Faktor dar, welcher die Unterschiede der gyromagnetischen Verhältnisse der Kerne ausgleichen soll und hier mit 0,1 gewichtet wird.^[116, 117]

1.2.4 Dipolare Restkopplung

Der Kern-Overhauser-Effekt sowie die ^3J -Kopplungskonstante ermöglichen die Ermittlung struktureller und konformationelle Aussagen über ein Molekül. Allerdings liefern diese Methoden keine Informationen über die relative Orientierung der einzelnen Atome zueinander. Basierend auf der dipolaren Kopplung D_{IS} , von welcher ebenfalls der NOE abhängt (vergleiche Kapitel 1.2.2.1), können solche Orientierungen mittels sogenannter dipolarer Restkopplung, kurz **RDC** (engl. *Residual Dipolar Coupling*), zugänglich gemacht werden.^[118] Hierbei handelt es sich um direkte Spin-Spin-Wechselwirkungen, die vom Winkel θ zwischen den Kernen (hier I und S), sowie dem Winkel zwischen dem Verbindungsvektor r_{IS} und dem angelegten Magnetfeld B_0 abhängen und nicht nur vom Abstand r , wie es beim NOE der Fall ist:^[119, 120]

$$D_{IS} = -\frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S h}{(2\pi r)^3} \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) \quad [12]$$

μ_0 ist hierbei die Vakuum-Permeabilität, γ das gyromagnetische Verhältnis der Kerne und h die Planksche Konstante. Im Festkörper ergeben sich große dipolare Kopplungen,

welche durch die unterschiedlichen Ausrichtungen der Moleküle zu einer extremen Linienverbreiterung in Festkörperspektren führen (sogenannte Pulverspektren). Dagegen mitteln die hohen Geschwindigkeiten der Brownschen Molekularbewegungen, die zu unterschiedlichen Orientierungen der Kernspins im Raum führen, in isotropen Medien die dipolaren Wechselwirkungen zu Null. Die dipolare Restkopplung kann folglich in sogenannten Alignmentmedien gemessen werden, welche Moleküle in Lösung in eine partielle Ausrichtung zwingen und dabei kleinere dipolare Kopplungen als in den Festkörpern erzeugt werden.^[121] Verwirklicht wird dies mit Hilfe von organischen Flüssigkristallen^[122], Pf1 Phagen^[123, 124], orientierten Bizellen^[125-127] oder auch gestreckten Polymergelen^[128, 129] als Alignmentmedien. Dabei kann in Abhängigkeit des Ausmaßes der Richtung die restliche dipolare Kopplung gemessen werden. Eine Kombination von dipolar gekoppelten Spinpaaren erzeugt eine eindeutige Orientierung dieser zueinander. Daraus lassen sich unter anderem die räumliche Anordnung und Konformation eines Moleküls ableiten.

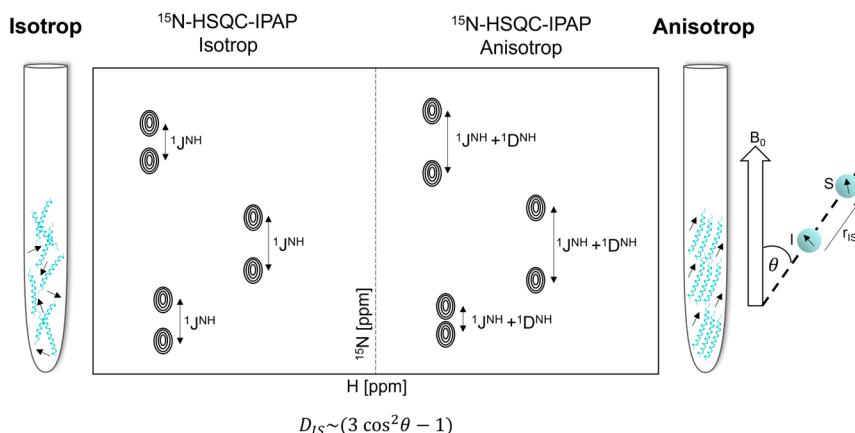


Abbildung 1.15 Ermittlung von dipolaren Restkopplungen anhand isotroper und anisotroper Proben. Die resultierenden totalen Kopplungen $1J^{NH}+1D^{NH}$ sind in der anisotropen Probe dargestellt, wobei die dipolaren Restkopplungen positive oder negative Werte annehmen können. Zusätzlich ist die Winkelabhängigkeit der Kernspins zum Magnetfeld veranschaulicht. In Anlehnung an^[130]

Hierfür werden Messungen sowohl in isotroper als auch in anisotroper Umgebung durchgeführt (**Abbildung 1.15**). Aus den isotropen Spektren werden die skalaren Kopplungen J erhalten und aus den anisotropen die totale Kopplung T . Aus diesen beiden Werten wird die dipolare Restkopplung berechnet, welche sowohl positive als auch negative Werte annehmen kann:

$$D = T - J \quad [13]$$

Aus diesen kann der sogenannte Alignmenttensor bestimmt werden und damit die Ausrichtung des Moleküls im zeitlichen Mittel.^[119]

Die Analyse der RDCs kann anschließend mittels eines Programmes, wie beispielsweise **PALES** (engl. *Prediction of AlignmEnt from Structure*) von M. Zweckstetter^[131], erfolgen.

Zur Validierung der ermittelten RDCs werden dabei zusätzlich theoretische, aus der 3D-Struktur des Moleküls berechnete RDCs herangezogen und mit den experimentellen Daten verglichen. Die daraus erhaltenen Gütefaktoren wie der Q-Faktor (Saupe) und der R-Korrelationsfaktor (Pearson's Linearkorrelations Koeffizient) geben Rückschlüsse auf die Qualität der ermittelten Daten.^[132, 133]

1.2.5 Proteindynamik Ermittlung mittels Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Messungen

Mobilität, Flexibilität und damit die Dynamik eines Proteins sind zeitabhängige Mechanismen. Das Brechen von Wasserstoffbrücken, Rotationen sowie translationale Diffusionen liegen im 1-10 ps Bereich. Relaxationen in Wasser liegen bei 10-100 ps und Fluktuationen von Seitenketten bei 10-100 ns. Größere Proteinbewegungen und konformationelle Übergänge liegen zwischen 10-100 ns bis hin zu wenigen ms.^[134-136] Die Möglichkeit, den Austausch von zumeist gut zugänglichen Amidprotonen zu ermitteln (ms-h)^[137, 138], eröffnet die Chance, diesen als gut messbaren Parameter als Maß der Dynamik eines Proteins zu nutzen.^[139]

Mittels dem Wasserstoff-Deuterium-Austausch (engl. *Hydrogen-Deuterium eXchange*, HDX) ist dies seit Ende der 80iger Jahre des letzten Jahrhunderts^[140, 141] eine etablierte Methode, welcher auch anhand von Massenspektrometrie messbar ist.^[142]

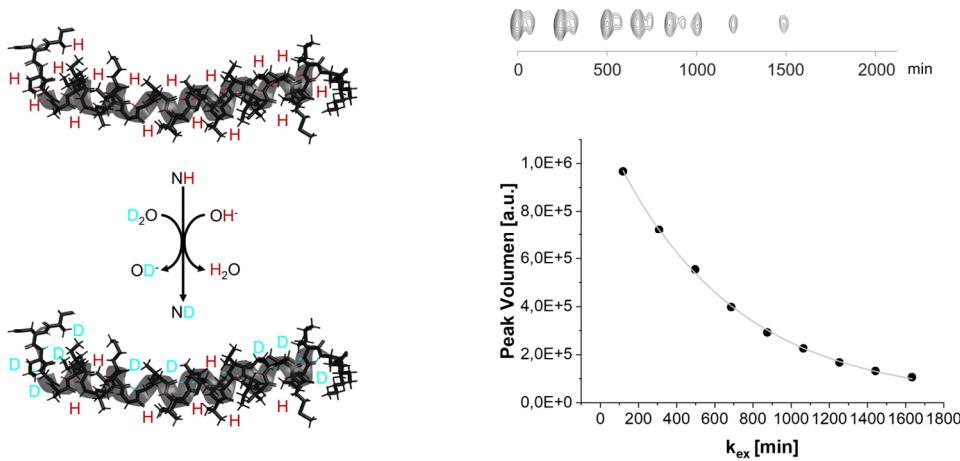


Abbildung 1.16 Schematische Darstellung des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs, bei welchem die frei zugänglichen Amidprotonen gegen Deuteriumionen ausgetauscht werden können. Aus den abnehmenden Peak-Volumina über die Zeit werden die Austauschraten k_{ex} ermittelt, welche als Maß für die Flexibilität eines Proteins gewertet werden können.

Beim Wasserstoff-Deuterium-Austausch werden die Amidprotonen durch die im Lösemittel enthaltenen Deuteriumionen ausgetauscht. Dies gleicht einer Austausch-Rate pseudo-erster-Ordnung, wobei leicht zugängliche Amid-Wasserstoffe, wie solche an den C- oder N-Termini, schneller ausgetauscht werden können als sterisch

gehinderte Wasserstoffe oder solche, die Wasserstoffbrücken ausbilden. Die daraus ermittelte Austauschrate gibt Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit und somit die Dynamik eines Proteins. **Abbildung 1.16** veranschaulicht dieses Prinzip und zeigt eine schematische Abnahme der Volumenintensitäten eines Aminosäurerestes und dessen exponentielle Abnahme mit der Zeit. Je schneller ein Wasserstoffatom im Proteinrückgrat austauscht, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für eine gesteigerte Dynamik in diesem Bereich und umgekehrt. Aus den ermittelten Austauschkonstanten k_{ex} kann somit die Flexibilität eines Proteins grafisch abgebildet werden.

1.2.6 Strukturberechnung

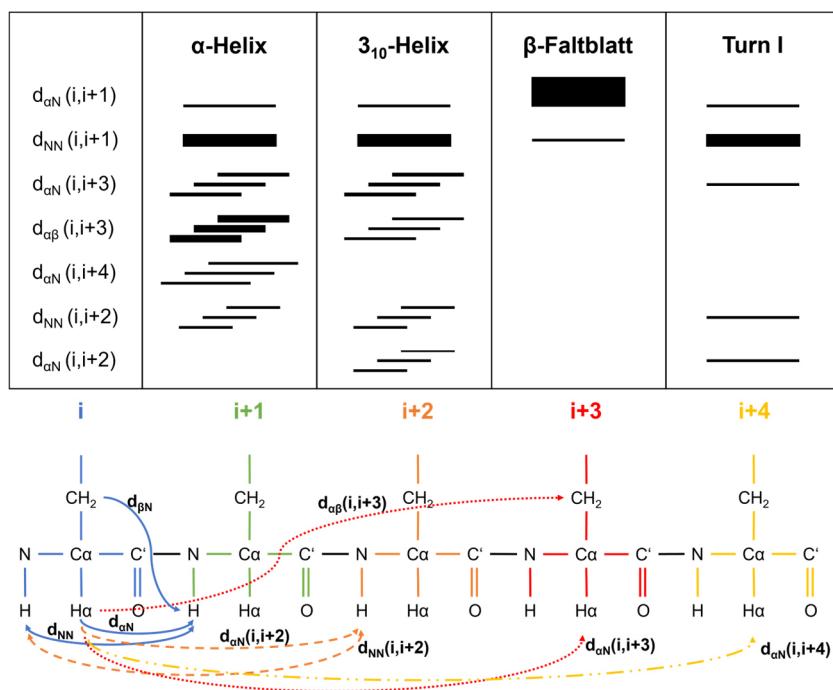


Abbildung 1.17 Charakteristische NOEs der Sekundärstrukturverschiebung. Die Balkenstärke repräsentiert die Peakintensität des zugehörigen Spektrums. Zudem sind die messbaren Abstände (bis ~5 Å im NOESY) zwischen den einzelnen Aminosäureseitenketten in einem Peptidrückgrat farblich hervorgehoben. In Anlehnung an^[143]

Seit Ende des letzten Jahrhunderts existieren verschiedene Programme zur automatisierten Zuordnung und Strukturberechnung von Molekülen, wie CANDID/CYANA^[144] oder AUTOSTRUCTURE^[145]. Ausgehend von intra- und intermolekularen Abständen einzelner Atome in einem Molekül kann mit dem Python-basierten Programm **ARIA2**^[146] (*engl. Ambigious Restraints for Iterative Assignment*), ausgehend von NOESY Spektren, eine Strukturermittlung ermöglicht werden. ARIA2 verwendet hierbei ein iteratives Protokoll und besitzt die Möglichkeit durch das Konzept der „mehrdeutigen Abstandsbeschränkung“ (*engl. Ambiguous Distance Restraints, ADR*^[147]) NOE-Peaks automatisch sowie mehrfach bei Überlagerung zuzuordnen. Die Abstände zwischen einzelnen Atomen in einem Proteinrückgrat sind abhängig von der

Sekundärstruktur. Hierbei gibt es unterschiedliche charakteristische Abstandsinformationen. Bei einer α -Helix sind vor allem Korrelationen zwischen $H\alpha$ und Amidproton ($d_{\alpha N}$ (i,i+4)), $H\alpha$ und $H\beta$ ($d_{\alpha\beta}$ (i,i+3)), $H\alpha$ und Amidproton ($d_{\alpha N}$ (i,i+3)) sowie den Amidprotonen (d_{NN} (i,i+2)) zu nennen. Dies wird in einem β -Faltblatt nicht beobachtet, wodurch aus charakteristischen NOEs und den bekannten chemischen Verschiebungen Rückschlüsse auf die Sekundärstrukturen gezogen werden können (**Abbildung 1.17**).

Die NOE-Kreuzpeaks werden von ARIA2 nun mit einer Liste von chemischen Verschiebungen abgeglichen. In dieser Arbeit wurden die einzelnen Zuordnungen manuell getätigt, doch ARIA2 bietet auch die Möglichkeit der automatisierten Zuordnung an. Die Abstandsrestriktionen werden aus den jeweiligen Peak-Volumina generiert, indem mit Hilfe einer Näherung für isolierte Spinpaare die Volumina mit dem Zusammenhang $\frac{1}{r^6}$ des Abstandes in Distanzen umgerechnet werden. Nicht-eindeutige Zuordnungen werden hierbei in ADRs umgewandelt. ARIA2 errechnet aus den so erstellten zugeordneten Distanzen ein anfängliches Ensemble an Strukturen (Strukturbündel) und vergleicht in einem zweiten Schritt, wie gut die experimentellen Distanzen mit diesem Strukturbündel übereinstimmen. Daraus ergibt sich eine verbesserte Zuordnungsliste, welche in der nächsten Iteration für eine erneute Strukturrechnung genutzt wird. Die Strukturen der berechneten Bündel werden in Hinblick auf die niedrigste totale Energie geordnet und dienen als Ausgangsstrukturen für die nachfolgende Rechnung. Dieser Schritt wird insgesamt noch weitere siebenmal wiederholt.

Aus dem Programm **CCPN**^[148] (engl. *Collaborative Computing Project for NMR*) können die Informationen der ausgewerteten Spektren direkt in ARIA2 übertragen werden. Zusätzlich können mit **TALOS+** (engl. *Torsion Angle Likeliness Obtained from Shift and Sequence Similarity*) die Torsionswinkel zwischen den einzelnen Atomen des Proteinrückgrats abgeschätzt werden, wobei TALOS+ auf eine Datenbank mit über 200 Proteinen sowie auf ein künstliches neuronales Netzwerk mit einer Vorhersagewahrscheinlichkeit von $88,0 \% \pm 2,5 \%$ zurückgreift.^[149]

1.3 Zellfreie Proteinexpression

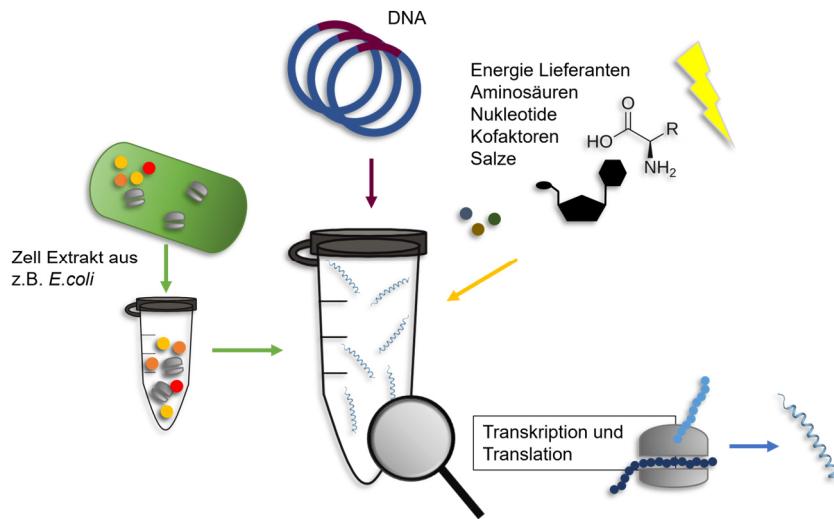


Abbildung 1.18 Graphische Darstellung der zellfreien Proteinexpression. Benötigt werden die drei Hauptkomponenten: Zellextrakte, Plasmid-DNA und Energielieferanten; sowie zusätzlich Aminosäuren, Nukleotide, Kofaktoren, Salze und weitere Komponenten zur Expression. Die Transkription und Translation laufen dabei parallel ab. In Anlehnung an^[150]

Die zellfreie Proteinexpression hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer etablierten Methode entwickelt, nachdem sie 1961 durch die Arbeit von M.W. Nirenberg und J. H. Matthaei erstmals ihren Durchbruch in der in-vitro-Translation erlangte.^[151] Sie bietet einige Vorteile gegenüber der klassischen rekombinanten Expression, wie eine deutlich schnellere Expression von zwei versus fünf Tagen bis zum vollständig aufgereinigten Protein, das einfache Einbringen von nicht proteinogenen und gelabelten Aminosäuren oder sogar das Herstellen Zell-toxischer Proteine.^[152-155] Des Weiteren bietet das System optimale Bedingungen für Screening-Assays^[156], da im kleinen Maßstab von wenigen Mikrolitern gearbeitet werden kann, wodurch Material und Kosten gespart werden. Durch die fehlenden Zellwände ist zudem die chemische Umgebung direkt beeinflussbar und einzelne Konzentrationen, wie exemplarisch die der zugeführten Salze, sind einfach zu kontrollieren. Zudem ist es möglich dem System Metallionen oder Kofaktoren zuzufügen, wodurch sich die Methodik hervorragend für schwierig zu exprimierende Systeme wie Membranproteine eignet.^[157-159]

Das in-vitro System besteht aus vielen einzelnen Komponenten, wobei diese wiederum in drei Hauptkomponenten, Zellextrakte, Plasmid-DNA sowie Energielieferanten, unterschieden werden können. Die Zellextrakte sind hierbei ein zentraler Bestandteil. Diese können aus verschiedenen Organismen wie dem Bakterium *Escherichia coli* aber auch aus Weizenkeimen^[160, 161], Kaninchenretikulozyten^[162] oder Insektenzellen^[163] gewonnen werden. Die enthaltenen Bestandteile wie Ribosomen, biologisch aktive Organellen oder Membranteile werden für die Proteinsynthese benötigt. Dadurch können Transkription und Translation miteinander gekoppelt ablaufen, wobei als

Template für die Expressionen zirkuläre oder lineare Plasmidvektoren^[164] dienen. Die Translation stellt einen energetisch aufwendigen Prozess dar, bei dem ATP in einem hohen Maß verbraucht wird. Zur Regenerierung werden der zellfreien Proteinexpression Energielieferanten wie Phosphatverbindungen (Bsp. Phosphoenolpyruvat) und Kinasen (Bsp. Pyruvakinase) beigesetzt, doch auch andere Regenerationssysteme sind möglich.^[165] Zusätzlich werden Enzyme und Substrate zugegeben, da die Extrakte ebenfalls ATP hydrolysierten. Des Weiteren spielen Salze wie Kalium und Magnesium^[166] eine entscheidende Rolle, da die meisten Enzyme nur in der Lage sind Komplexe aus Nukleotid und Magnesiumionen zu erkennen. Somit sind die Zellextrakte, die DNA und die Energielieferanten essenziell für die zellfreie Proteinexpression.

Weiterhin werden für die Transkription RNA-Polymerase sowie Nukleotide benötigt. Zum Bau des Proteingerüstes müssen außerdem Aminosäuren zur Verfügung gestellt werden. Aminoacyl-tRNAs stellen die Substrate der Proteinsynthese dar, wobei das Ganze durch einen Puffer im Gleichgewicht gehalten wird. Die in den Extrakten enthaltene Glutaminsäure kann sehr schnell zu Glutamat oder auch dem zelltoxischen Ammoniak abgebaut werden, weshalb zusätzlich Kalium- und Ammoniumacetate als Energiequelle zugegeben werden.^[156, 167] Zur Stabilisierung des Systems werden neben dem Puffer auch Polyethylenglycol (**PEG**) und RNase-Inhibitoren integriert. PEG wird zur Simulierung der Dichte der Biomoleküle in-vitro verwendet^[168] und Folsäure dient als wichtiger Lieferant für Methylgruppen und ist an der Herstellung von Purin-Basen sowie der DNA-Replikation beteiligt.^[169] Zur Unterdrückung der Ausbildung von Disulfidbrücken kann Dithiotreitol^[170] verwendet werden und Natriumazid sollte zur Verhinderung des Wachstums von Mikroorganismen hinzugefügt werden.

Das System kann somit individuell für das zu exprimierende Protein variiert und optimiert werden. Als Reaktionsformate sind zwei Hauptaufbauten gegeben: das Batch-Verfahren sowie der kontinuierliche Austausch (engl. *Continuous Exchange Cell Free, CECF*). Ein schematischer Aufbau ist **Abbildung 1.19** zu entnehmen. Beim Batch-Verfahren werden alle benötigten Komponenten zusammen in ein Gefäß gegeben. Dies wird gerne für Screenings verwendet, da hier in einem sehr geringen µL Maßstab gearbeitet werden kann. Die Expressionen laufen zwischen 1-8 h mit Ausbeuten im niedrigen mg/mL Bereich ab,^[171] haben allerdings den Nachteil, dass es zur Bildung von toxischen Nebenprodukten kommen kann, welche die Reaktion beeinträchtigen können.^[157, 172] Eine Weiterentwicklung gab es durch die Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen der Reaktionslösung und der Oberfläche des Reaktionsgefäßes. Dies ist mit dem CECF-Verfahren durch die Abtrennung mittels einer Dialyse Membran gegeben. Hierbei sind der sogenannte Reaktionsmix (engl. *Reaction Mix, RM*) und die Nährösung (engl. *Feeding Mix, FM*) durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt.^[173, 174] Die Nährösung beinhaltet alle für die Synthese benötigten Substanzen, welche während der Expression verbraucht werden. Durch die Membran besteht die Möglichkeit in das Innere, zur Reaktionslösung, zu gelangen und den kontinuierlichen Fortlauf der

Synthese zu gewährleisten. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass toxische Nebenprodukte aus dem Reaktionsgemisch diffundieren. Die Reaktionslösung beinhaltet die Zellextrakte, wodurch in diesem Bereich das Protein synthetisiert wird. Im Vergleich zum Batch-Verfahren können hier bis zu zehnfach höhere Proteinausbeuten erzielt werden.^[175, 176]

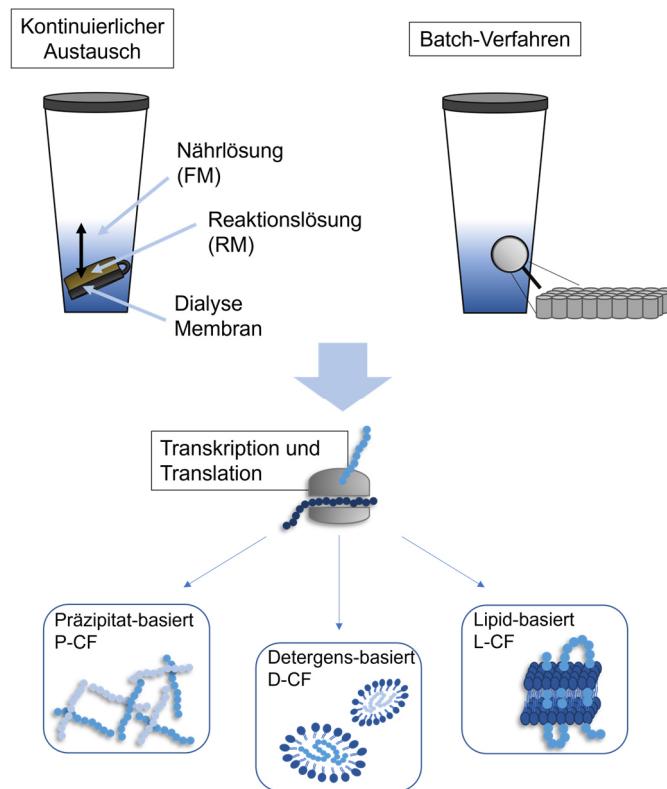


Abbildung 1.19 Vergleich zwischen kontinuierlichem Austausch und dem Batch-Verfahren, sowie den unterschiedlichen Expressions-Modi. Großer Vorteil beim kontinuierlichen Austausch ist die Unterteilung in zwei Kompartimente. Dadurch erfolgt ein optimierter Austausch zwischen der Nährlösung und der Reaktionslösung. Die Batch-Verfahren sind gut geeignet für Screening-Anwendungen im niedrigen µL Bereich. Bei der Expression kann zudem zwischen Präzipitat-basierter, Detergens-basierter oder Lipid-basierter Methode unterschieden werden. In Anlehnung an^[158]

Neben der Auswahl des passenden Expressionssystems ist die Wahl des Reaktionsmodus ein entscheidender Faktor der zellfreien Membranproteinexpression. Es kann dabei zwischen drei Modi unterschieden werden, wie in **Abbildung 1.19** dargestellt ist. Die Präzipitat-basierte Methode verzichtet auf die Zugabe von hydrophoben Umgebungen, wodurch es im Anschluss der Translation zur Bildung von Präzipitaten kommt. Diese können dann gewaschen und nach Bedarf in unterschiedlichen Reagenzien gelöst werden. Die Detergenzien-basierte Methode verhindert eine Präzipitation, indem direkt ein gewünschtes Detergens in den Reaktionsmix zugefügt wird. Dabei wird während der Expression das hydrophobe Membranprotein in das Detergens eingebaut, wodurch zudem die sterisch korrekte Faltung des Proteins unterstützt wird. Die dritte Variante beruht auf der Verwendung von Lipiden. Hier wird ebenfalls das gewünschte Lipid direkt in die Reaktionslösung

eingefügt. Dieser Modus ist vor allem für Membranproteine gerne gesehen, da sie die realen Umgebungen der Proteine am besten widerspiegeln.^[157, 158, 177-179]

1.4 UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektroskopie stellt eine gängige Methode der Konzentrationsbestimmungen von Proteinen dar, bei welcher Licht einer bestimmten Wellenlänge (elektromagnetisches Spektrum von etwa 200 nm bis 800 nm) auf eine Probe eingestrahlt und durch diese absorbiert wird. Das austretende Licht, genauer die Extinktion von sichtbarem Licht, wird von einem Detektor empfangen und ausgewertet. Dabei gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz für die Extinktion E_λ , sprich die Absorbanz der Probe für Licht einer bestimmten Wellenlänge:

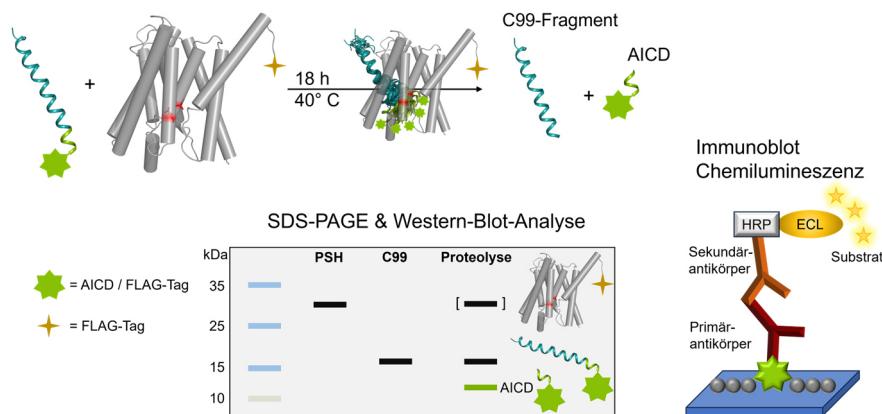
$$E_\lambda = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad [14]$$

d [cm] ist dabei die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers, ε stellt den Extinktionskoeffizienten dar, welcher eine wellenlängenabhängige Stoffkonstante ist [$M^{-1}cm^{-1}$] und c steht für die Konzentration der Probe [$mol\ L^{-1}$]. Die Messmethode weist einige limitierende Faktoren in der Genauigkeit der Analyse auf. Streulicht (engl. *stray light*), welches durch nicht perfekte Wellenlängenselektoren hindurchgelassen werden kann, stellt dabei einen störenden Faktor dar, welcher zu Messfehlern führt. Auch Lichtstreuung (engl. *light scattering*) kann durch suspendierende Feststoffe in flüssigen Proben verursacht werden. Diese können durch Kontaminationen oder Aggregationen auftreten und ebenfalls Messgenauigkeiten verursachen. Die Ausbildung von Bläschen in den Proben führt zu Streuung und nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Nichtsdestotrotz bietet die UV-Vis-Absorption große Vorteile als Analysemethode wie die schnelle Anwendung, das einfache Prozessieren und die Möglichkeit des Wiederverwendens der Proben. Infolgedessen hat sich diese Methode in der wissenschaftlichen Praxis etabliert.^[180, 181]

1.5 Proteolytische Untersuchungsmethoden

Der Mechanismus der Interaktion von Substrat und Präsenilin ist wie bereits erläutert nicht vollständig geklärt. Umso wichtiger ist es daher, den Proteolyse-Vorgang der Substrate nachvollziehen zu können. Neben den klassischen molekularbiologischen Verfahren wie Gelektrophorese (SDS-PAGE, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamid Gel Electrophoresis*) und Immunoblotting (Western Blot Analyse) können auch die NMR und andere spektroskopische Methoden, wie zum Beispiel Fluoreszenzpolarisierung zur Analyse von molekularen Änderungen eines Proteins herangezogen werden. Im Folgenden soll daher ein kurzer Überblick über die Funktionsweise sowie die Anwendung in der vorliegenden Arbeit gegeben werden.

1.5.1 Nachweis über Immunoblotting



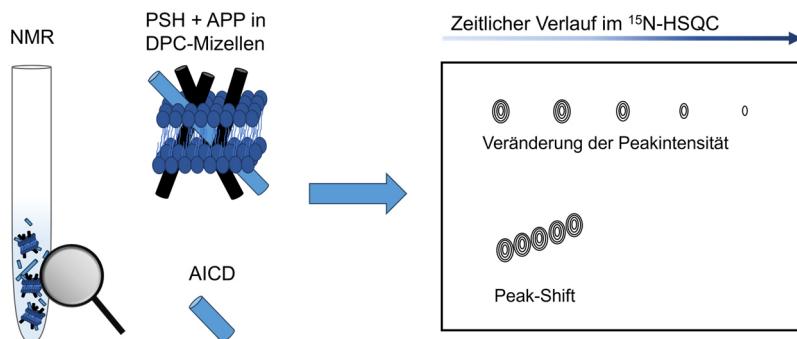
Schema 1 Allgemeiner Ablauf des Proteolyse-Assays mit anschließender Immundetektion. Das Substrat C99 (blaue Helix) ist mit einem C-terminalen FLAG-Tag und der AICD-Sequenz (grün) versehen; PSH (grau) entsprechend mit einem C-terminalen FLAG-Tag (ocker). Nach elektrophoretischer Auf trennung (SDS-PAGE) erfolgt die Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL-Substrat), wobei entweder die AICD des APP oder der FLAG-Tag detektiert wird. Die Zweitantikörper sind dabei HRP konjugiert.

Beim Immunoblotting, hier speziell die Western Blot Analyse, welche erstmals als Proteinnachweis im Jahre 1979^[182] von H. Towbin eingeführt wurde, werden die zuvor elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und anschließend je nach Sequenz/ Tag beziehungsweise Antigenen mit einem entsprechenden Antikörper (AK) sichtbar gemacht.^[2, 101] Vorteil bei dieser Art der Immundetektion ist die hohe Empfindlichkeit und die breite Palette an photostabilen Fluorophoren, die zur Detektion der Antikörper verwendet werden. Je nach Detektionsmethode können Konzentrationen im piko- bis femtomol^[183] Bereich detektiert werden. Neben kolorimetrischer Detektion (zum Beispiel mit dem Enzym Alkalische Phosphatase in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) und Fluoreszenz-Detektion (wie Alexa Fluor oder Cyanine Dye) wird gerne auf das Luminol basierte Chemilumineszenz-Verfahren zurückgegriffen.^[184] Hierbei wird in Gegenwart von **HRP**

(Meerrettichperoxidase, engl. *HorseRadish Peroxidase*) sowie einem Peroxidpuffer Luminol oxidiert, welches ein Produkt in einem angeregten Zustand ausbildet und beim Zerfall folglich Licht emittiert.^[184]

Zur Veranschaulichung ist in **Schema 1** der hier angewendete Proteolyse-Assay basierend auf Elektrophorese sowie Immunoblotting^[86] und die Auswertung am Beispiel von der Interaktion von APP-C99 und PSH zusammengefasst dargestellt. Das APP-C99 Substrat trägt C-terminal einen His- sowie FLAG-Tag, an welchen spezifische Antikörper binden können. Ebenfalls konnte hier ein sequenzspezifischer Tag gegen das AICD (C-terminal) verwendet werden. Auch PSH ist mit einem FLAG-Tag versehen. Dadurch ist dies eine indirekte Immunblot-Methode, wobei der Zweitantikörper mit HRP konjugiert ist, welches die Detektion ermöglicht. Bei erfolgreicher Proteolyse kann das geschnittene C-terminale Fragment des APP als molekular niedrigste Bande auf der Membran sichtbar gemacht werden.

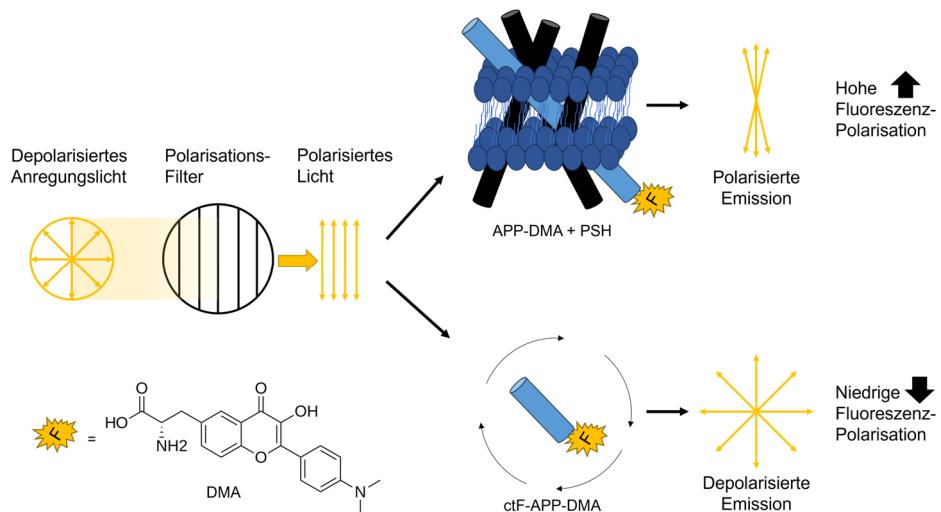
1.5.2 Nachweis über Kernspinresonanzspektroskopie



Schema 2 Schematische Darstellung der NMR-proteolytischen Untersuchung. Zur Detektion von Peakintensitäten sowie Peak-Shfts werden hier ¹⁵N-HSQC-Spektren verwendet, welche bei erfolgreicher Enzym-Substrat-Interaktion Veränderungen aufzeigen. Die kleineren AICD-Fragmente weisen unterschiedliche chemische Verschiebungen aufgrund der veränderten Relaxationszeiten sowie der chemischen Umgebung auf.

Wie in Kapitel 1.2 ausführlicher erläutert, bietet die NMR eine hervorragende Messmethode, um strukturelle Veränderungen verfolgen zu können. Auf Basis der chemischen Verschiebungsänderungen (Kapitel 1.2.3) können während des Ablaufs der Proteolyse chemische Verschiebungen gemessen werden, insbesondere sogenannte Peak-Shfts, welche aufgrund von Modifikationen in der Umgebung des Kernes durch beispielsweise einer Konformationsänderung auftreten, sowie Intensitätsänderungen. Zurückgegriffen wird hier auf das ¹⁵N-HSQC, welches die ¹H-¹⁵N-Signale einer vollmarkierten (¹³C, ¹⁵N) APP-Probe detektiert, wie in **Schema 2** skizziert ist. Bei Substrat-Enzym-Interaktionen, hier in einer DPC-Mizellen-Umgebung, können folglich die Peaks der involvierten Aminosäuren betrachtet werden, um Änderungen in der Struktur und der räumlichen Anordnung sowie der Bildung des C-terminalen Fragmentes (AICD) nachzuvollziehen.

1.5.3 Nachweis über Fluoreszenzpolarisation



Schema 3 Vereinfachte Darstellung von Fluoreszenzpolarisationsmessungen der Proteolyse des APP mittels PSH. Das depolarisierte Anregungslicht wird durch einen Polarisationsfilter polarisiert und trifft anschließend auf die zu untersuchende Probe. Bei erfolgreicher Proteolyse entsteht ein kurzes C-terminales Fragment, welches mit einem Fluorophor (hier DMA) gekoppelt ist. Die Emission des Fragments ist depolarisiert und die Fluoreszenzpolarisation somit niedrig. In Anlehnung an^[185]

Das Prinzip der Fluoreszenzpolarisation beruht auf der Tatsache, dass Moleküle in Lösung frei beweglich sind und aufgrund von Größenunterschieden langsamere oder schnellere Rotationsbewegungen vollführen. Das eingestrahlte, depolarisierte Licht wird dabei durch einen Polarisationsfilter polarisiert. Dieses polarisierte Licht strahlt auf die Probenmoleküle, wobei ein Fluorophor angeregt wird, welcher an einem der zu untersuchenden Molekülen (meist der Ligand) fusioniert ist. Freie Moleküle emittieren das eingestrahlte Licht in depolarisierter Weise aufgrund ihrer schnellen Rotationsdiffusion und zeigen dadurch eine niedrige Fluoreszenzpolarisation. Die fluoreszierenden Moleküle/ Liganden, welche mit einem größeren Protein interagieren, vollführen eine langsamere Bewegung und emittieren somit polarisiertes Licht mit hoher Fluoreszenzpolarisation. Dies ist anhand der Interaktion zwischen APP und PSH in **Schema 3** vereinfacht dargestellt. Dabei hat die Lebensdauer des verwendeten Fluorophors einen entscheidenden Einfluss auf die Fluoreszenzpolarisation, wobei diese abhängig ist von der Änderung der Rotationskorrelationszeiten und folglich der Größe des Moleküls.^[185]

Die physikalische Grundlage für die Fluoreszenzpolarisation beschrieb erstmals F. Perrin im Jahre 1926,^[186] wobei er die Fluoreszenzpolarisation in Abhängigkeit des fluoreszierenden Moleküls wie folgt annähert.

$$\frac{1}{FP} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{FP_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{1}{\theta} \tau \right) \quad [15]$$

FP_0 stellt dabei die intrinsische Fluoreszenzpolarisation dar, τ die Fluoreszenzlebensdauer und θ die Rotationskorrelationszeit, welche definiert ist durch:

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \quad [16]$$

η ist die Viskosität der Probe, V das molare Volumen, R die universelle Gaskonstante und T die absolute Temperatur in Kelvin. Die Fluoreszenzpolarisation ist damit direkt proportional zum molaren Volumen der Moleküle, wobei der fluoreszenzmarkierte Ligand die Rotationskorrelationszeit bestimmt. Die emittierte Fluoreszenzintensität wird dabei parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) zum Vektor des Anregungslichtes gemessen.

$$FP = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad [17]$$

Durch Auftragung der Fluoreszenzpolarisation gegen die Zeit kann somit eine Interaktion zwischen Enzym und Substrat verfolgt werden.^[187]

2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Hauptteile und befasst sich übergreifend mit der Charakterisierung der Substratwechselwirkungen der γ -Sekretase mit verschiedenen Substraten.

Zur genaueren Aufklärung der Wechselwirkung zwischen Präsenilin und seinen Substraten sollten unterschiedliche Methoden eingesetzt werden. Die zellfreie Proteinexpression von PSH und dessen Optimierung stehen dabei im Fokus des ersten Teils der Arbeit. Um eine schnellere und effizientere proteolytische Analyse, auch im Hinblick auf Screening-Anwendungen zu erreichen, wurde PSH im direkten Vergleich zur herkömmlichen rekombinannten Methode zellfrei hergestellt und mit verschiedenen rekombinannten Substraten mittels Proteolyse-Assays getestet. Verwendet wurde hierbei ein Fragment des Amyloid-Precursor Proteins C99 und dessen Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L. Auch eine Weiterentwicklung des Proteolyse-Assays zu NMR-Messungen wurde untersucht, sowie auf Fluoreszenzpolarisationsmessungen zur effizienteren und zeitaufgelösten Untersuchung der Proteolyse ausgeweitet.

Der zweite Teil konzentriert sich auf strukturelle und dynamische Untersuchungen einiger Substrate mittels Kernspinresonanzspektroskopie, um Rückschlüsse auf die Substrat Spezifikationen der γ -Sekretase ziehen zu können. Untersucht wurden verschiedene bekannte Substrate APLP2, ErbB4 und Fn14 sowie ein Nicht-Substrat ITGB1 der γ -Sekretase. Mit Hilfe von Wasserstoff-Deuterium-Austauschmessungen sollten Informationen über die Dynamik der Substrate gewonnen werden. Die Untersuchung der Flexibilität und der Konformationen der Substrate stand hierbei im Vordergrund. Dies sollte durch Messung von dipolaren Restkopplungen an zellfrei hergestellten APP und seinen Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L weiter ergänzt werden. Im Anschluss sollten diese mit den bereits bekannten Strukturbündeln der Substrate verglichen werden, um daraus Rückschlüsse auf die Konformation zu ziehen.

3 Material und Methoden

3.1 Klonierung

Die nachfolgenden Klonierungen wurden unter Verwendung der Gibson Assemblierung^[188] mit 30 **bp** (Basenpaaren) Überhang durchgeführt. In **Tabelle 3.1** sind alle hierfür verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 3.1 Verwendete Oligomere für die Polymerase-Kettenreaktionen.

Nr.	Primer
P1	CGGATTGGCTACCACCAACCACCATGATGGTGGTGATGATGCATGTATCTCCTTC
P2	CACCACCATCATGGTGGTGGTAGCCAAATCCGTGACTGGCTGCCGCTGC
P3	GGTGGTAGCGATTATAAAGATGATGATGATAAATAATGAGATCCGGCTGCTAACAAA GCCCG
P4	CATCTTTATAATCGCTACCACCAACCGAACGGCAGCCAGGAAAATGAACCCG
P5	GATTATAAAGATGATGATGATAAAGGTGGTGGTAGCCATACCATACCATCAC TAAGCTTAATTAG
P6	TTTATCATCATCATCTTATAATCTCCGTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA
P7	GGTATATCTCCTCTTAAAGTTAACAAAATTATTC
P8	TTTGTTAACTTAACAGAAGGAGATATACCATGCATCATCACCACCATCATGGT
P9	TGAAAGGGCGAATTCCAGCACACTG
P10	GTGTGCTGGAATTGCCCTTCATTATTTATCATCATCATCTTATAATCGCTACC
P11	CATGGTATATCTCCTCTTAAAGTTAACAAAATTATTCAGAGG
P12	TTTGTTAACTTAACAGAAGGAGATATACCATGGATGCAGAATCCGACATGAC
P13	ATGATGATGATGATGAGAACCCCCCCCAGATCTGGATCCGTTCTGCAT
P14	GGGGGGGGTCTCATCATCATCATC
P15	TTTATCATCATCATCTTATAATCTCCGTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA GATTATAAAGATGATGATGATAAAGGTGGTGGTAGCCATACCATACCATCAC TAATAAAAGGGCG
P17	CTC ATG GTG GGC CTT GTT GTC ATA GCG
P18	GCC CAC CAT GAG TCC AAT GAT TGC
P19	CTC ATG GTG GGC CCT GTT GTC ATA GCG
P20	GTC ATA GCG ACA GTG ACG GTC ATC ACC TTG
P21	CAC TGT CGC TAT GAC AAC ACC GCC
P22	GTT GTC ATA GCG ACA ATG ATC GTC ATC ACC
P23	TGT CGC TAT GAC AAC ACC GCC CAC

Die Polymerase-Kettenreaktionen (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) wurden entsprechend der Vektoren und Primer mit einer Elongationszeit von 30 s pro 1000 bp und einer Temperatur von 65 °C-60 °C durchgeführt. Verwendet wurde die Phusion Polymerase und es erfolgte ein Screening von 0-3 µL **DMSO** (Dimethylsulfoxid) für alle Klonierungen (siehe **Tabelle 3.2**).

Tabelle 3.2 Allgemeines Pipettierschema der Polymerase-Kettenreaktion.

Volumen	Substanz	Konzentration
66 µL	ddH ₂ O	
20 µL	GC/HF Phusion Reaktionspuffer	5x
2 µL	dNTPs	10 mM
5 µL	Forward Primer	10 µM
5 µL	Reverse Primer	10 µM
1 µL	Template	1 ng

Die Verifizierung der PCR erfolgte durch 1 %-ige Agarose Gele mit 0,5 TAE-Puffer als Laufmittel (Stock 50x: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA, pH 8). Die erfolgreichen Klonierungen wurden mit einem *Clean and Concentrator Kit* von *Zymo Research* aufgereinigt.

Anschließend folgte die Gibson Assemblierung mit einem dreifachen Überschuss an einzufügendem DNA-Strang (Insert) zu Vektor. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 100 ng und die Reaktion wurde für 1 h bei 50 °C auf dem Thermoschüttler durchgeführt. Der DPNI -Verdau erfolgte mit 20 µL der Gibson Assemblierung, 2 µL Cut Smart Buffer und 1 µL DPNI. Dies wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Konstrukte wurden anschließend in DH5α mit den entsprechenden Antibiotika Resistzenzen transformiert. Einzelne Kolonien konnten gepickt und vervielfältigt sowie mittels einer MiniPrep (*Qiagen*) aufgereinigt werden. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch *LGC Genomics* sowie *Eurofins* sequenziert und verifiziert.

3.1.1 Präsenilin-Homolog (PSH)

Das Präsenilin-Homolog (MCMJR1, Uniprot: A3CWV0), kurz PSH, wurde ausgehend eines pET21 Vektors vom Shi Labor^[83] (mit fünf Punktmutationen D40N, E42S, A147E, V148P, A229V) in einen pET22b+ Vektor mit einem N-terminalen His-Tag und einem C-terminalen FLAG-Tag für rekombinante Expression kloniert. Das Rückgrat wurde mit den Primern 1 und 3 linearisiert und mit den Primern 2 und 4 amplifiziert.

Für die zellfreie PSH-Proteinexpression wurde dieser in einen Pivex2.3d Vektor mit einem N-terminalen FLAG-Tag sowie einem C-terminalen His-Tag subkloniert. Der leere Pivex2.3d Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Daniel Huster zur Verfügung gestellt. Für die Linearisierung des Backbones wurden Primer 7 und 9 verwendet und für die Amplifizierung des Inserts die Primer 8 und 10. Die Sequenz mit eingefügten Tags sowie den vorhandenen Mutationen ist in **Abbildung 3.1** dargestellt.

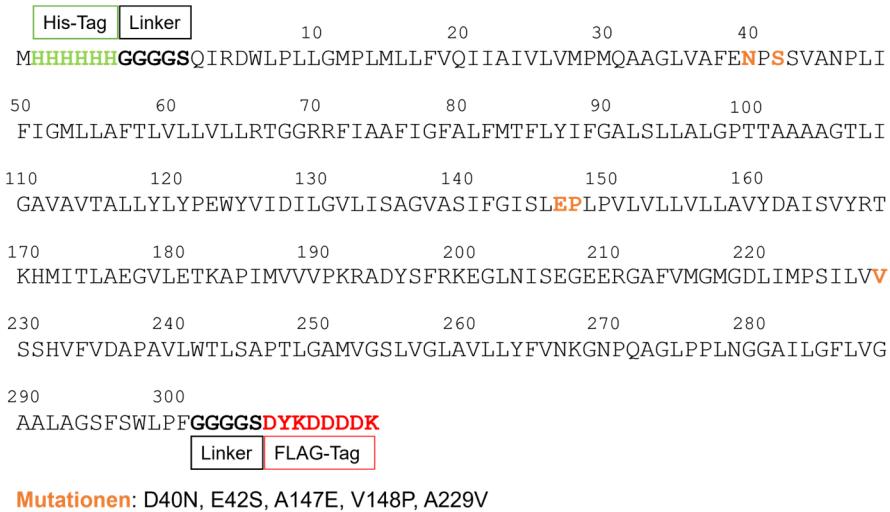


Abbildung 3.1 Verwendete Proteinsequenz von PSH mit His- (grün) und FLAG-Tag (rot) (Uniprot: A3CWV0) sowie den vorhandenen Mutationen (orange).

3.1.2 C99 und Mutanten

Der originale pQE60 Vektor, welcher die Sequenz des C99 (Uniprot: P05067) mit einem C-terminalen His-Tag beinhaltetet, wurde freundlicherweise vom Steiner Labor zur Verfügung gestellt.^[20] Für die Proteolyse-Assays wurde ein zusätzlicher C-terminaler FLAG-Tag angefügt. Dies erfolgte mit Primer 5 und Primer 6.

Für die zellfreie Proteinexpression wurde das Backbone mit den Primern 11 und 14 geöffnet und mit den Primern 12 und 13 amplifiziert. Ein zusätzlicher FLAG-Tag wurde über die Primer 15 und 16 eingefügt. Für die Einführung der Punktmutationen wurden die Primer 17 und 18 (G38L), Primer 18 und 19 (G38P), Primer 20 und 21 (I45T) und Primer 22 und 23 (V44M) verwendet. Die Sequenz mit Tags ist in **Abbildung 3.2** dargestellt.

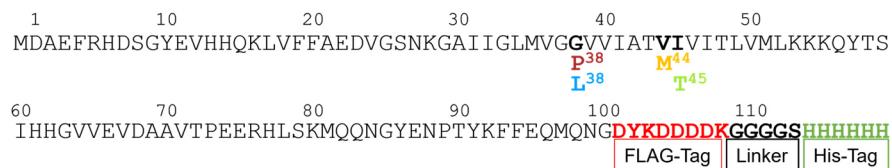


Abbildung 3.2 Verwendete Proteinsequenz der APP Domäne C99 mit FLAG- (rot) und His-Tag (grün) (Uniprot: P05067), sowie den entsprechenden Mutationen G38P (rot), G38L (blau), V44M (orange) und I45T (grün).

3.1.3 APP Transmembrandomäne und Mutanten

Der bereits aus vorhergehenden Arbeiten^[65] vorhandene Vektor der kürzeren APP Transmembrandomäne-Sequenz (Uniprot: P05067) in Pivex2.3d mit einem

C-terminalen His-Tag wurde für die gewünschten Mutationen subkloniert. Zur Einführung der Punktmutationen konnten ebenfalls die Primer 17 und 18 (G38L), Primer 18 und 19 (G38P), Primer 20 und 21 (I45T) und Primer 22 und 23 (V44M) verwendet werden. Die Sequenz mit Tag ist in **Abbildung 3.3** dargestellt.

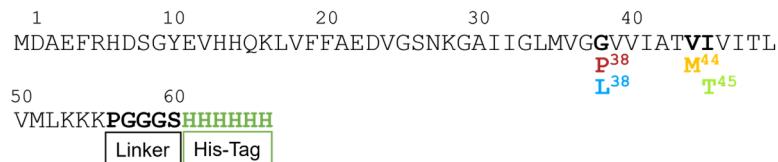


Abbildung 3.3 Verwendete Proteinsequenz der APP Transmembrandomäne mit His-Tag (grün) (Uniprot: P05067), sowie den entsprechenden Mutationen G38P (rot), G38L (blau), V44M (orange) und I45T (grün).

3.2 Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung

Bei den rekombinant hergestellten Proteinen handelte es sich um PSH, C99 und dessen Mutanten (G38P, G38L, I45T, V44M). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte erläutert, wobei in **Tabelle 3.3** alle verwendeten Puffer gesammelt aufgelistet sind.

Die BL21 DE3 *E. coli* Bakterien mit dem für PSH codierenden Plasmid wurden in 1 L **TB**- (engl. *Terrific Broth*^[189]) oder **LB**-Medium (engl. *Lysogeny Broth*^[190]) bis zu einem OD von 1-1,5 beziehungsweise 0,6-0,8 kultiviert. Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 25 °C durchgeführt. Anschließend konnten die Zellen im entsprechenden Puffer resuspendiert und mittels einer Ultraschallsonde (67 % duty cycle, 30 s on/off, 3x) lysiert werden. Die PSH-Lysate wurden zunächst für 10 min bei 23.000 g und 4 °C abzentrifugiert sowie anschließend der Überstand bei 45.000 g für 1 h bei 4 °C erneut zentrifugiert. Die unlösliche Membranfraktion wurde für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend erneut für 1 h bei 45.000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Filtration (0,45 µM Durapore PVDF Membran, *Steriflip Milipore*) gesäubert und anschließend über eine Nickel Affinitätschromatographie aufgereinigt (*Äkta pure liquid chromatography system; GE Healthcare, Germany*). Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine 5 mL His-trap FF Ni-NTA Säule (*GE Healthcare, Germany*). Aufgereinigtes PSH konnte für einen gewissen Zeitraum bei 4 °C im Elutions-Puffer gelagert werden.

Die BL21 DE3 *E. coli* Bakterien mit dem für die C99 (und Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L) codierenden Plasmid wurden in LB-Medium bis OD 0,6-0,8 hochgezogen. Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und die Zellen über Nacht bei 25 °C inkubiert. Nach der Zellernte und dem anschließenden Resuspendieren des Pellets wurden die Zellen für 1 h bei 45.000 g und 4 °C zentrifugiert und die unlösliche Membranfraktion anschließend nochmals gelöst, sowie erneut zentrifugiert. Der

Überstand wurde analog zu PSH filtriert und über die Äkta aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte im Lager Puffer bei -20 °C.

Tabelle 3.3 Verwendete Puffersubstanzen der rekombinanten Proteinexpressionen von PSH und C99.

PSH	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Resuspendierungs-Puffer 1	Tris	25 mM	pH 8,0
	NaCl	150 mM	
	Protease Inhibitor (cOmplete™)		
Resuspendierungs-Puffer 2	Tris	25 mM	pH 8,0
	NaCl	150 mM	
	DDM	2 % (w/v)	
	Protease Inhibitor (cOmplete™)		
Wasch Puffer	Tris	25 mM	pH 8,0
	NaCl	150 mM	
	DDM	0,6 %(w/v)	
	Imidazol	20 mM	
Elution Puffer	Tris	25 mM	pH 8,0
	NaCl	150 mM	
	DDM	0,6 %(w/v)	
	Imidazol	250 mM	
C99	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Resuspendierungs-Puffer 1	Tris	75 mM	pH 7,8
	NaCl	300 mM	
	EDTA	0,3 mM	
Resuspendierungs-Puffer 2	Tris	20 mM	pH 7,8
	NaCl	150 mM	
	Harnstoff	8 M	
	SDS	0,2 % (w/v)	
Wasch Puffer	Tris	20 mM	pH 7,8
	NaCl	150 mM	
	SDS	0,2 % (w/v)	
	Imidazol	20 mM	
Elution Puffer	Tris	20 mM	pH 7,8
	NaCl	150 mM	
	SDS	0,2 % (w/v)	
	Imidazol	250 mM	
Lager Puffer	Tris	25 mM	pH 8,0
	NaC	150 mM	
	SDS	0,2 % (w/v)	

3.3 Zellfreie Proteinexpression und Aufreinigung

3.3.1 S12 Extrakt Präparation

Die Herstellung der S12-Extrakte erfolgte ausgehend von Rosetta- oder BL21 DE3-Zellen, welche in Übernachtkulturen bei 37 °C in TB-Medium angezogen wurden. Es wurde anschließend die Hauptkultur in 2 L TB-Medium inkuliert und bei 37 °C bis OD 2-3 kultiviert. Die Zellen wurden bei 5000 g für 15 min und 4 °C abzentrifugiert sowie in S30 Puffer resuspendiert (siehe **Tabelle 3.4**). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4000 g für 15 min bei 4 °C und eine erneute Resuspendierung mit S30 Puffer. Anschließend konnten die Zellen über Nacht bei 4 °C gelagert werden und am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe von EDTA sowie 1 mM DTT bevor die Zellen geschallt wurden (67 % duty cycle, 30 s on/off, 3 x). Die Zellen wurden daraufhin für 30 min bei 12.000 g und 4 °C abzentrifugiert und an diesem Punkt in den R- und P-Extrakt unterteilt. Der R-Extrakt wurde für 2 h bei 150 rpm und 30 °C inkubiert sowie anschließend gegen S30 Puffer mit 250 mM Mercaptoethanol dialysiert (4 °C, 12 kDa CutOff). Der P-Extrakt wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, danach mit 400 mM NaCl für 45 min bei 42 °C präzipitiert und folgend gegen S30 Puffer mit 0,5 mM DTT bei 4 °C über Nacht dialysiert (12 kDa CutOff). Die Extrakte konnten schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.^[191, 192]

Die R- und P-Extrakte wurden jeweils für PSH getestet. Für die C99 und APP Konstrukte wurden lediglich die P-Extrakte gewählt.

Tabelle 3.4 Pufferkomponenten des S30-Puffers.

S12 Extrakte	Substanz	Konzentration	pH-Wert
S30 Puffer 10x	Tris	100 mM	pH 8,2
	Magnesiumacetat	140 mM	
	Natriumacetat	600 mM	

3.3.2 Zellfreie Proteinexpression

Die zellfreien Proteinexpressionen wurden für die jeweiligen Proteine sequenzspezifisch angepasst. Verwendung fanden die in **Abbildung 3.4** dargestellten, selbstentworfenen Reaktionscontainer, bereits beschrieben in der Dissertation von **Dr. Mara Silber**^[65], mit 150 µL, 650 µL oder 1 mL Reaktionsvolumen. Bei der dritten Variante (**Abbildung 3.4 (c)**) wurde das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis durch die Verwendung von zwei Dialysemembranen optimiert.

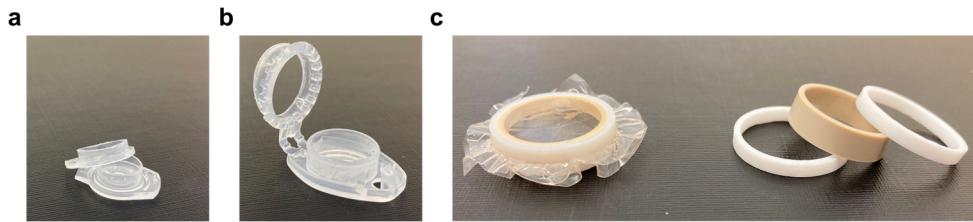


Abbildung 3.4 Photographische Darstellung der Reaktionscontainer zur zellfreien Proteinexpression für einen Reaktionsansatz von 150 µL (a), 650 µL (b) beziehungsweise für 1 mL mit optimiertem Oberflächenzu-Volumen-Verhältnis (c).

Das Verhältnis von Nährösung (engl. *FeedingMix*, **FM**) zu Reaktionslösung (engl. *ReactionMix*, **RM**) betrug 12:1 in allen durchgeführten Reaktionen. **Abbildung 3.5** zeigt eine allgemeine Übersicht über die verwendeten Substanzen und den entsprechenden finalen Konzentrationen. Für PSH wurden die Magnesiumkonzentrationen zwischen 10 mM und 30 mM variiert. Die Reaktionszeiten wurden auf 20 h angesetzt, bei Temperaturen zwischen 20 °C und 37 °C. Die für die Reaktion verwendeten Aminosäuren wurden entsprechend dem zu exprimierenden Protein angepasst. Die einzelnen, finalen Konzentrationen lagen zwischen 0,25 mM und 2 mM, je nach Häufigkeit der Aminosäure in der Proteineinsequenz.

Zellfreie Protein Expression			FM:RM 12:1			Aminosäure Mix		
Substanz	Stock Konzentration	Finale Konzentration	MM (µL)	FM (µL)	RM (µL)	APP	C99	PSH
ddH ₂ O								
HEPES (pH 8.4)	2510 mM	100,00 mM	518					
Mg(OAc) ₂	2021 mM	5,63 mM	36					
KOAc	4002 mM	94,78 mM	308					
PEG 8000	40,03 % m/V	2,00 % m/V	649					
NaN ₃	10,25 % m/V	0,05 % m/V	63					
Folinic acid	20,00 mg/mL	0,10 mg/mL	65					
DTT	515 mM	2,00 mM	50					
NTP	75,00 x	1,00 x	173					
Complete	50,00 x	1,00 x	260					
PEP	1016 mM	20,00 mM	256					
AcP	1000 mM	20,00 mM	260					
aa-Mix	4,00 mM	1,00 mM	1625					
Mastermix								
S30 C Puffer	1,00 x	0,35 x		4028	237			
PK	2,40 mg/mL	0,04 mg/mL		4200				
tRNA	40,00 mg/mL	0,50 mg/mL			17			
T7RNAP	200,00 U/µL	6,00 U/µL			13			
Ribolock	40,00 U/µL	0,30 U/µL			30			
DNA	1000,00 µg/mL	26,00 µg/mL			8			
S30-Extrakt	100,00 %	40,00 %			26			
ddH ₂ O					400			
Total (µL)			4265	12000	1000			
Mg ²⁺	14 mM							
K ⁺	280 mM							
Plasmid	1000 µg/mL							

Abbildung 3.5 Schematisches Pipettierschema der zellfreien Proteinexpression mit entsprechenden finalen Konzentrationen der eingesetzten Substanzen sowie des Aminosäure Mix für APP (und Mutanten), C99 (und Mutanten) und PSH.

Da es sich bei den Ansätzen um eine Präzipitat-basierte Methode handelte, wurde nach der Expression das Pellet mehrfach mit einem entsprechenden Puffer gewaschen, für 20 min ins Ultraschallbad gelegt und anschließend bei 16.060 rpm für 20 min bei 20 °C abzentrifugiert. Das PSH-Pellet wurde in einem Puffer mit 2 % DDM resuspendiert und bei 4 °C gelagert. C99 und Mutanten wurden nach der Aufreinigung in einem Puffer mit 0,2 % SDS bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.5 Wasch- und Resuspendierungs-Puffer für die zellfrei exprimierten Proteine PSH, C99 und APP (und Mutanten).

PSH	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Wasch Puffer	Tris NaCl	25 mM 150 mM	pH 8,0
Resuspendierungs-Puffer	Tris NaCl DDM	25 mM 150 mM 2 %	pH 8,0
C99	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Wasch Puffer	Tris NaCl	25 mM 150 mM	pH 8,0
Resuspendierungs-Puffer	Tris NaCl SDS	25 mM 150 mM 0,2 %	pH 8,0
APP	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Wasch Puffer	HEPES	0,1 M	pH 7,4

Das Pellet der kurzen APP Konstrukte (und dessen Mutanten) wurde mehrfach mit einem 0,1 M Na-HEPES Puffer sowohl einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und nach der Zentrifugation in HFIP/H₂O 80:20 aufgenommen, lyophilisiert, in Cyclohexan gelöst und erneut lyophilisiert. Je nach Anwendungsgebiet wurde das Protein anschließend in dem entsprechenden Puffer resuspendiert. Für die NMR-Messungen der Proteolyse wurde DPC oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration zum Lyophilisations-Schritt hinzugefügt (30 mM).

3.4 UV-Vis Spektroskopie

Die Konzentrationen der hergestellten Membranproteine (sowohl der rekombinanten als auch der zellfreien Expressionen) wurden mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Verwendet wurde hierbei der *NanoDrop™ One/OneC* von ThermoFischer, wobei 2,5 µL Probenvolumen aufgetragen wurden. Als Blank dienten die jeweiligen Puffer der Proteine. Die Absorptionen der Proben wurden dabei mehrfach vermessen (n=3) und die erhaltenen Werte gemittelt. Ausgehend des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnten folglich die Konzentrationen [Mol/L] berechnet werden:

$$c = \frac{E_\lambda}{\varepsilon \cdot d} \quad [18]$$

Die Schichtdicke d betrug bei allen Messungen 10 mm. Die Extinktionskoeffizienten sind **Tabelle 3.6** zu entnehmen.

Tabelle 3.6 Extinktionskoeffizienten der rekombinant und zellfrei hergestellten Proteine PSH, C99 und APP.

Protein	Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]
PSH	35410
APP	1490
C99	7450

3.5 Proteolyse-Assays mittels Immunoblot

Tabelle 3.7 Zusammensetzung der Pufferkomponenten für den Proteolyse-Assay.

Proteolyse-Assay	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Puffer POPC SUV	Natriumcitrat	5 mM	pH 6,4
	Glycerol	3,5 %	
Proteolyse Puffer 10 x	Bicin	0,2 M	pH 7,0
	HEPES	0,2 M	
	MES	0,2 M	
	NaCl	1,5 M	
4x SDS-Probenpuffer	Tris	0,2 M	pH 6,8
	DTT	0,4 M	
	SDS	8 % (w/v)	
	Bromphenolblau	6 mM	
	Glycerol	4,3 M	

Die Proteolyse-Assays wurden basierend auf dem Protokoll vom Steiner Labor durchgeführt^[86]. In **Tabelle 3.7** sind die verwendeten Puffer aufgelistet. Zur Herstellung der POPC-Vesikel wurden 10 mg/mL POPC in Wasser für 1 h inkubiert und anschließend geschallt. (20 % duty cycle, 15 min on/off, 4x). Die Suspension wurde daraufhin abzentrifugiert und die Partikelgröße mittels **DLS**-Messungen (engl. *Dynamic Light Scattering*) bestimmt (siehe Anhang **Abbildung A. 1**, auch für DDM- und SDS-Messungen). Die erhaltenen POPC-Vesikel (engl. *Small Unilamellar Vesicles*, **SUV**) wiesen im Durchschnitt einen Durchmesser von 70-80 nm auf und wurden im Puffer POPC SUV auf 3,45 mg/mL verdünnt. Für die Proteolyse-Assays wurden die POPC-Vesikel um das 2,5-fache mit zusätzlich 30 mM DTT weiter verdünnt.

Gesamtvolumen	25	μL				
PSH (ist)	4,0	μM				
PSH (soll)	2,0	μM				
C99 (ist)	12	μM				
C99 (soll)	0,5	μM				
Inhibitor L-685,458 (ist)	200	μM				
Inhibitor L-685,458 (soll)	20	μM				
Bezeichnung	PSH [μL]	C99 [μL]	Inhibitor [μL]	PI 25 x [μL]	10 x Puffer [μL]	H2O [μL]
PSH Kontrolle	12,5	0	0	1,0	2,5	9,0
C99 Kontrolle	0	1,0	0	1,0	2,5	20,5
PSH + C99	12,5	1,0	0	1,0	2,5	8
PSH + C99 + Inhibitor	12,5	1,0	2,5	1,0	2,5	5,5

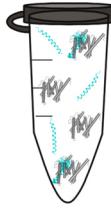


Abbildung 3.6 Schematisches Pipettierschema des Proteolyse-Assays am Beispiel von PSH (2 μM) und C99 (0,5 μM) mit den jeweiligen Kontrollen von PSH und C99, sowie der Zugabe des Inhibitors L-685,458.

Abbildung 3.6 zeigt ein vereinfachtes Pipettierschema für den Proteolyse-Assay. In den Assays wurden 2-4 μM PSH und 0,5-1 μM C99 eingesetzt. Bei der Proteolyse in POPC-Vesikeln wurde zusätzlich 0,17 mM DDM zu den Reaktionen hinzugeben. Als Inhibitor wurde L-685,458^[193] (Aspartylprotease-Übergangszustand-Imitat, *Merck*) verwendet. Die Reaktion lief über 18 h bei 40 °C unter kontinuierlichem Schütteln ab, wurde mit 4x SDS-Proben Puffer abgestoppt und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.5.1 SDS-PAGE und Western Blot

Für die durchgeführten SDS-PAGEs wurden 4-14 % Mini-PROTEAN TGX Gele (*Biorad*) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA pro vorhandenem Gel durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind in der nachfolgenden **Tabelle 3.8** aufgelistet.

Der Western Blot wurde direkt im Anschluss mittels Sandwich-Methode bei 300 mA für 2 h bei 4 °C durchgeführt. Der Blot wurde anschließend kurz in PBS aufgekocht und für 1 h mit Blockier-Lösung (Tropix® I-Block™, *ThermoFischer*) fixiert. Bei den verwendeten Primärantikörpern handelte es sich um FLAG-Tag Antikörper (DYKDDDDK tag, Mouse, Clone: FG4R, (*Abnova*)) oder um einen APP-Antikörper, welcher sich spezifisch gegen den C-Terminus vom APP-Protein (C31, C80, C83, C99) richtet (Amyloid-Precursor Protein antibody [Y188] ab32136 (*Abcam*)). Diese wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der Blot 3x 10 min in TTBS gewaschen. Die Zweitantikörper waren beide HRP-konjugiert: entweder ein Anti-Maus- (IgG (H+L) HRP-Antikörper (*Promega*)), oder ein Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (IgG H&L HRP preabsorbed ab7090 (*Abcam*)). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT mit anschließendem dreimaligem Waschen mit TTBS für 5 min. Die verwendeten Puffer sind in **Tabelle 3.9** aufgelistet. Nach Anfärbung mit einem Pierce® ECL Substrat (*ThermoFischer*) konnten die Western Blots mittels eines Imagers (*VILBER Fusion FX*) visualisiert und mit dem Programm *ImageJ*^[194] ausgewertet werden.

Tabelle 3.8 Pufferkomponenten der SDS-PAGE Analyse.

SDS-PAGE	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Anodenpuffer	Tris	0,2 M	pH 8,9
Kathodenpuffer	Tris	0,1 M	pH 8,8
	Tricin	0,1 M	
	SDS	3,5 mM	
Fixierlösung	Ethanol	50 %	
	Eisessig	7 %	
Färbelösung	Coomassie R250	2 % (w/v)	
	Eisessig	10 %	
Entfärbler	Ethanol	5 %	
	Eisessig	7,5 %	

Tabelle 3.9 Pufferkomponenten der Western Blot Analyse.

Western Blot	Substanz	Konzentration	pH-Wert
10 x Transfer Puffer	Tris	250 mM	pH 8,3
	Glycin	2 M	
10 x TBS	Tris	200 mM	pH 7,6
	NaCl	150 mM	
1 x TTBS	10 x TBS	100 mL/L	pH 7,6
	Tween 20	2 mL/L	
10 x PBS	NaCl	1,4 M	pH 7,4
	Na ₂ HPO ₄	100 mM	
	KH ₂ PO ₄	17,5 mM	
	KCL	27 mM	
Blockier-Lösung	PBS	1 x	pH 7,4
	Tropix® I-Block™	0,2 %	
	Tween20	0,1 %	

3.6 Fluoreszenzpolarisationsmessungen

Die Fluoreszenzpolarisationsmessungen erfolgten am *SPARK Multimode-Mikroplatten-Reader* von *Tecan* in *Corning 96-well Half Area Black/Clear Flat Bottom Polystyrene NBS* Mikrotiterplatten. Zur Minimierung der Evaporation der Proben wurden lichtdurchlässige Klebefolien von *Th. Geyer* verwendet. Die Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen der Kontrollproben wurden bei 30 °C durchgeführt und die optimale Anregungswellenlänge auf 402 nm eingestellt. Die Fluoreszenzpolarisation der Proteolyse wurde bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm bei 40 °C gemessen. Die Messdauer betrug 19 h, mit einem Kinetik-Intervall von 2 min (für 1 h) sowie 5 min (für 18 h). Die Zusammensetzung der Komponenten wurde identisch gewählt wie in Abschnitt 3.5.1. Hierbei wurde PSH rekombinant exprimiert eingesetzt, sowie synthetische mit einem Fluorophor DMA (3-(2-[4-(Dimethylamino)-phenyl]-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)-L-Alanin) gekoppelte APP-Peptide, welcher in einer betreuten Masterarbeit durch **M. Sc. Julia Flum** unter Anleitung von Dr. Serhii Koniev und Dr. Sergii Afonin hergestellt wurden. Die synthetischen Peptide wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Reversed-Phase-HPLC*) (*Jason-HPLC-System, C4-Säule/ Gradient: 35 %-60 %/ 1,7 %*

Eluent B·min⁻¹ / A: 95 % H₂O; 3 % IP; 2 % AcN; 0,1 % TFA / B: 80 % IP; 15 % AcN; 5 % H₂O; 0,1 % TFA / 1 mL x min⁻¹ / RT) analysiert, sowie durch mehrmaliges Waschen mit Diethylether (5 min Schütteln, danach 10.000 rpm, 5 min, 4 °C Zentrifugation, 6x WDH) aufgereinigt. Die Auswertung des Assays erfolgte mit dem Programm *Origin*^[195], wobei die parallelen und senkrechten Intensitätswerte verwendet und mit Formel [17] die Polarisationswerte berechnet wurden.

$$FP = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Die zusätzliche Massenspektrometrische Analyse erfolgte anhand der *Dried-Droplet-Methode* mit einer 1:3 Verdünnung, wobei zuvor bereits der Analyt 1:20 in der Matrix verdünnt wurde. Diese bestand aus α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure. Gemessen wurde in einem *Autoflex III Smartbeam Vertical MALDI-TOF*-Massenspektrometer von *Bruker*.

3.7 Synthetische Peptide und NMR-Messungen

Die synthetischen Peptide Fn14, APLP2 und ITGB-1 wurden von *Core Unit Peptidtechnologien*, Universität Leipzig, Deutschland erworben. Das Peptid ErbB4 wurde von Prof. Dr. Dieter Langosch zur Verfügung gestellt.^[196]

Die NMR-Messungen fanden an einem 600 MHz *Bruker Avance III* Spektrometer mit ¹H, ¹³C, ¹⁵N CPTCI heliumgekühlten Probenkopf für hochauflösende NMR-Spektroskopie statt. Die genutzten Pulsprogramme sind untenstehend in **Tabelle 3.10** aufgelistet. Die Prozessierung wurde mit *TopSpin 4.2.0*, *Bruker BioSpin GmbH* sowie *MestReNova v14.1.0-24037* durchgeführt. Die Visualisierung und Zuordnung der einzelnen Spektren erfolgte mit dem Programm *CcpNmr*^[148].

Tabelle 3.10 Verwendete *Topspin* Pulsprogramme.

Pulsprogramm	Bezeichnung	Dimension	
<i>zggpw5</i>	¹ H mit Wasserunterdrückung (Watergate)	1D	[197]
<i>hsqcetgp</i>	¹ H- ¹³ C HSQC	2D	[198-200]
<i>hsqcetf3gpsi</i>	¹ H- ¹⁵ N HSQC	2D	[198-200]
<i>b-hsqcetf3gpsi</i>	Best ¹ H- ¹⁵ N HSQC	2D	[198-200]
<i>hsqcf3gpiaphwg.2</i>	¹ H- ¹⁵ N HSQC-IPAP (H-1X Korrelation)	2D	[201]
<i>dispi2gpphpri/ dipsi2gpph19</i>	¹ H- ¹ H TOCSY	2D	[202, 203]
<i>noesygpphpri/ noesygpph19</i>	¹ H- ¹ H NOESY	2D	[202-205]
<i>b-hncagp3d.2</i>	HNCA	3D	[206-210]
<i>b-hncacbgp3d.2</i>	HNCACB	3D	[206-210]
<i>b-hncocagp3d.2</i>	HN(CO)CA	3D	[206-210]
<i>b-hncocacbpgp3d.2</i>	HN(CO)CACB	3D	[206-210]

3.7.1 Proteolyse-Messungen mittels NMR-Spektroskopie

Die Untersuchungen der proteolytischen Aktivität mittels NMR erfolgte mit rekombinant exprimierten PSH, welches nach der Aufreinigung durch Affinitätschromatographie in Puffer 1 mit Zugabe von 60 mM DPC umgepuffert wurde. Der pH-Wert mit DPC betrug 6,65. Das Substrat APP wurde zellfrei (Kapitel 3.3.2) hergestellt, mit 30 mM DPC_{d38} in HFIP/H₂O sowie Cyclohexan lyophilisiert und in Puffer 2 resuspendiert. Der pH-Wert mit DPC_{d38} lag bei 6,40. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 313 K (39,85 °C) mit einem Best ¹H-¹⁵N HSQC (F1 800 Punkte, F2 256 Punkte, 20/40 Scans). Die Datenanalyse erfolgte mittels Exponentieller-Anpassung der Punkte durch das Programm *Origin*^[195].

Tabelle 3.11 Pufferkomponenten für die Proteolyse-Messung von PSH mit APP mittels NMR.

NMR-Proteolyse	Substanz	Konzentration	pH-Wert
Puffer 1	Tris	25 mM	pH 8,0
	NaCl	150 mM	
Puffer 2	MES	20 mM	pH 5,25
	HEPES	20 mM	
	Bicin	20 mM	
	NaCl	150 mM	

3.7.2 Sekundäre chemische Verschiebung

Die sekundäre chemische Verschiebung der H_α, C_α und C_β aller synthetischer TMDs wurde ausgehend der TOCSY- und ¹H-¹³C-HSQC Experimente ermittelt. Die synthetischen Peptide wurden hierfür in TFE-d₂/H₂O 80:20, pH 7 aufgenommen. Durch den Einfluss der benachbarten Aminosäuren wurde ein Korrekturfaktor für Random-Coil Werte miteinbezogen^[114]. Die sekundäre chemische Verschiebung ergibt sich somit aus der Differenz der chemischen Verschiebung δ_{obs} und der Random-Coil Werte δ_{rc}.

$$\Delta\delta = \delta_{obs} - \delta_{rc} \quad [19]$$

Die Aminosäurereste wurden anschließend gegen die chemischen Verschiebungen Δδ aufgetragen.

3.7.3 Wasserstoff-Deuterium-Austausch

Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch (**HDX**) wurde ausgehend von ¹H-¹H-TOCSY-Spektren bei 303 K (29,85 °C) von den synthetischen Peptiden bestimmt. Hierfür wurden diese in TFE-d₃/D₂O 80:20 (oder Acetat d₄) gelöst und der pH-Wert ermittelt. Dieser unterscheidet sich in 0,4 Einheiten zum tatsächlichen pD-Wert der Proben, worauf in den anschließenden Berechnungen Rücksicht genommen werden musste. Die Auswertung

erfolgte mit *CcpNmr* und die Datenanalyse mit dem Programm *Origin*. Um die Geschwindigkeitskonstante k_{ex} zu ermitteln, wurden die Peakvolumina über die Zeit exponentiell angepasst. Der verwendete Iterationsalgorithmus war *Levenberg-Marquardt*,^[211, 212] wobei a den theoretischen ersten Wert bei t_0 , c den Endwert und t die Zeit in Minuten darstellt:

$$y = c + a \cdot e^{-k_{ex} \cdot t} \quad [20]$$

Als Grenzen wurden einige Bedingungen ausgewählt, sodass der Endwert c niemals unter Null fallen durfte und der Endwert c nicht größer als der Anfangswert a werden konnte.

$$a > c > 0 \quad [21]$$

Die gemessenen Werte wurden zur Vergleichbarkeit auf pD 5 skaliert.

$$k_{ex,s} = k_{ex} * 10^{(5-pD)} \quad [22]$$

Zusätzlich wurde eine Fehlerbetrachtung mit einbezogen:

$$\begin{aligned} \Delta \log(k_{ex,s}) &= \sqrt{\left(\frac{\partial \log(k_{ex,s})}{\partial k_{ex}}\right)^2 * \Delta k_{ex}^2 + \left(\frac{\partial \log(k_{ex,s})}{\partial pD}\right)^2 * \Delta pD^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{1}{k_{ex}}\right)^2 * \Delta k_{ex}^2 + (-\ln(10))^2 * \Delta pD^2} \end{aligned} \quad [23]$$

Hierbei wurden die Δk_{ex} Fehler für die Geschwindigkeitskonstanten aus dem berechneten Fit erhalten und die Ungenauigkeiten der pH-Elektrode mit $\Delta pD = 0,09$ einbezogen.

3.7.4 Strukturrechnungen mit ARIA2

Mit Hilfe der Linux basierten Software *ARIA2*,^[146] beruhend auf CNS,^[213] konnten die aus den NMR Spektren generierten Daten für Strukturrechnungen verwendet werden. Hierbei wurden die $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY-Kreuzpeaks der Transmembrandomänen sowie weitere essenzielle chemische Verschiebungen zur Generierung von Abstandsinformationen der Sekundärstruktur der Proteine genutzt. *ARIA2* berechnet aus folgenden gegebenen Daten dreidimensionale mögliche Strukturen:

- **.seq** enthält die Sequenz des Proteins und folglich die Aminosäurereste

- **.prot** enthält die nummerierte Liste der chemischen Verschiebungen der N, C _{α} , C _{β} und H _{α} , sowie die dazugehörigen Standardabweichungen
- **.peaks** enthält eine fortlaufend nummerierte Peakliste der Aminosäureseitenketten, welche die Informationen über chemische Verschiebungen in beiden Dimensionen, Peakvolumen sowie die Zuordnung zu den jeweiligen Resonanzen beinhaltet
- **.assign** verknüpft die Peaknummern aus **.peaks** mit den Nummern der Resonanzen
- **.tbl** enthält die Zuordnung der Aminosäurereste zu den jeweiligen Nachbarn mit den chemischen Verschiebungen aller Stickstoff-, Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen. Daraus können mittels **TALOS+** in einer **.tab** Datei Diederwinkel berechnet werden.

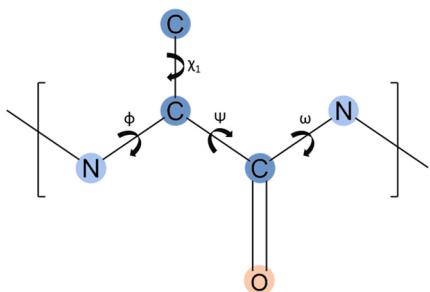


Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der Diederwinkel im Proteindrückgrat.

Die Diederwinkel (**Abbildung 3.7**) wurden mit **TALOS+**^[149, 214] generiert. Mit den gegebenen chemischen Verschiebungen können somit die φ und ψ Winkel des Proteinrückgrates berechnet werden. Das schlussendlich generierte **.xml** File enthält alle gegebenen Informationen sowie Parameter für die Berechnungen. Für Fn14, ErbB4, APLP2 und ITGB1 wurden in sieben Iterationen 200 Strukturen berechnet und in der letzten Iteration 400 Strukturen, wovon die 40 Strukturen mit der niedrigsten Energie erhalten wurden. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm **Pymol**.^[215]

Die berechneten Strukturen von APLP2 und ITGB1 wurden in der Protein Daten Bank PDB (<https://www.rcsb.org>) hinterlegt:

APLP2 PDB ID: 8RQ6

ITGB1 PDB ID: 8RPQ

3.7.5 Anisotrope Messungen

Die Polyethylenglykol-Gele (genauer PEG-DA 35 k, fortlaufend als **PEG** bezeichnet), welche als Alignment-Medium verwendet wurden, konnten auf Basis der Doktorarbeit von **Dr. Thomas Gloger**^[129] von **B. Sc. Franziska Krause** sowie von **M. Sc. Yannik Woordes** hergestellt werden.

Die 14 %-igen PEG-Gele wurden ausgehend von PEG 35 k Diacrylat durch radikalische Polymerisation erstellt, wobei Tetramethylethylendiamin (**TEMED**) als Katalysator diente (Reaktionsmechanismus siehe Anhang **Abbildung A. 2**). Die Suspension wurde für 30 s

zentrifugiert, daraufhin mit Argon (mittels „Schlenk-Line“) gespült und erneut für 30 s zentrifugiert. Mit Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat (**APS**) wurde erneut gevortext und das Gel in einen Teflonschlauch gezogen. Dieses wurde über Nacht bei 40 °C in einem Wasserbad inkubiert.^[129]

Tabelle 3.12 Mengenangaben für die PEG-Gel Herstellung von 14 % Gelen.

Massenprozent [%]	Gesamtmasse [g]	H ₂ O [mL]	PEG 35k [g]	TEMED 1 % [mL]	APS 1 % [mL]
14	1	0,76	0,14	0,05	0,05

Nach erfolgter Polymerisation konnte das Gel in ~ 2 cm lange Teile geschnitten und anschließend für die Trocknung einen Tag in den Trockenschrank bei 40 °C gelegt werden. Die getrockneten Gele sind anschließend bei Raumtemperatur zu lagern.

Die zellfrei hergestellten Proteine wurden vor der Verwendung angesäuert, in HFIP/H₂O 80:20 (v/v) sowie in Cyclohexan lyophilisiert und anschließend in TFE-d₂/H₂O/D₂O 80:10:10 (v/v/v) aufgenommen. Die Proben wurden zunächst isotrop vermessen, anschließend erfolgte eine zweitägige Inkubation mit dem PEG-GEL bei 4 °C. Nachdem die Lösung vollständig in das Gel aufgenommen wurde, konnte dieses in einen *Kalrez®*-Schlauch überführt werden. Dadurch wurde das Gel um etwa das Zweifache gestreckt. Daraufhin wurden die anisotropen NMR-Messungen durchgeführt und die Spektren mittels *TopSpin* 4.2.0, *Bruker BioSpin GmbH* analysiert.

Die Analyse der residualen Restkopplungen (RDC) erfolgte mit dem Programm *PALES*^[131]. Hierfür wurden die ermittelten Kopplungen der anisotropen Probe *T* von der skalaren Kopplung der isotropen Probe *J* abgezogen.

$$D = T - J \quad [24]$$

Die ermittelten RDCs wurden *PALES* als Input Datei (.tab) geliefert, sowie die dazugehörigen Strukturdaten (.pdb) mit Informationen über die jeweiligen Aminosäurereste. Daraus ergaben sich Qualitäts-Faktoren, welche die Güte der Strukturen widerspiegeln.

TEIL A - Proteolytische Untersuchung und zellfreie Proteinexpression des Präsenilin-Homolog MCMJR1

4 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln wird die proteolytische Aktivität des Präsenilin-Homologs **PSH** aus dem Organismus *Methanoculleus marisnigri* JR1 (MCMJR1) anhand durchgeföhrter Proteolyse-Assays untersucht. Diese basierten auf dem von **Dr. Lukas Feilen** entwickelten Assay, welcher im Rahmen der Forschergruppe FOR 2290 auf das hier verwendete PSH-System übertragen wurde.^[86] Die zu untersuchenden Substrate wurden dabei zusammen mit PSH bei 40 °C über 18 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der Proben nach den Molekulargewichten mittels SDS-PAGE sowie die Detektion der Ergebnisse des Proteolyse-Assays mittels Immunoblot. Bei erfolgreicher Proteolyse konnte somit das geschnittene AICD-Fragment ermittelt werden (siehe Kapitel 1.5.1). Zur Kontrolle der erfolgreichen proteolytischen Spaltung wurde der Protease Inhibitor L-685,458^[193] verwendet. Im Rahmen der Untersuchungen wurde deutlich, dass sowohl PSH als auch die Substrate aufgrund ihrer Eigenschaften als Membranproteine eine signifikante Variabilität in der Expression und Aktivität aufweisen. Infolgedessen wurden diese Prozesse auch im Hinblick auf Screening-Anwendungen optimiert.

Zunächst wird dies ausgehend von rekombinant exprimierten PSH (fortlaufend als **rekPSH** bezeichnet) erläutert. Als Substrat diente das sowohl rekombinant als auch zellfrei generierte Amyloid-Precursor-Fragment C99 in Verbindung mit einem C-terminalen His- und FLAG-Tag. Im Rahmen dessen gelang es erstmalig PSH in einer zellfreien Umgebung zu exprimieren (fortlaufend als **zfPSH** bezeichnet) und somit eine schnellere und effizientere Proteinexpression zu erreichen. Des Weiteren erfolgten proteolytische Untersuchungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie sowie Fluoreszenzpolarisation mit der kürzeren Transmembrandomäne, hier als **APP TMD** bezeichnet, wobei eine zeitaufgelöste Analyse des Proteolyse-Mechanismus das Ziel war (siehe Kapitel 1.5.2 sowie 1.5.3)

4.1 Optimierung des in-vitro Proteolyse-Assays mit rekPSH

4.1.1 Zellmedium und Proteinumgebung

Zunächst galt es den bereits entwickelten Proteolyse-Assay von L. Feilen et al.^[86] für die hier verwendeten Systeme in Hinblick auf die PSH-Expressionskonzentration und folgender erfolgreicher Proteolyse anzupassen und zu optimieren. Hierfür wurde PSH mit den eingeführten Punktmutationen D40N, E42S, A147E, V148P und A229V^[83] von Dr. Yigong Shi verwendet. Um die nachfolgende Analyse anhand von Antikörpern (**AK**) zu erleichtern, wurde zunächst das Plasmid aus einem pET21b+-Vektor in einen pET22b+-Vektor subkloniert. Ziel war hierbei die Einführung eines C-terminalen

FLAG-Tags, welcher als Epitop-Tag für die Immundetektion benutzt wird. Der Vorteil des FLAG-Tags gegenüber des His-Tags in der Immundetektion ist die vielfach gesteigerte Intensität, welche benötigt wird, um die geringen Mengen an proteolytischem Produkt detektieren zu können. Auch ist er aufgrund der geringen Größe und der erhöhten Hydrophilizität hervorragend als Tag geeignet, da er zu keiner Inaktivierung oder Denaturierung der angeknüpften Proteine führt.^[216] Dieser wird aufgrund seiner Aminosäureabfolge (DYKDDDDK) im Vergleich zu den Aminosäuren des His-Tags (HHHHHH) zudem als selektiver betrachtet, da die gegen den His-Tag gerichteten Antikörper auch andere Sequenzen, welche dem Poly-Histidin ähnlich sind, binden können. Der bereits vorhandene N-terminale His-Tag in der Proteinsequenz konnte für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie beibehalten werden.

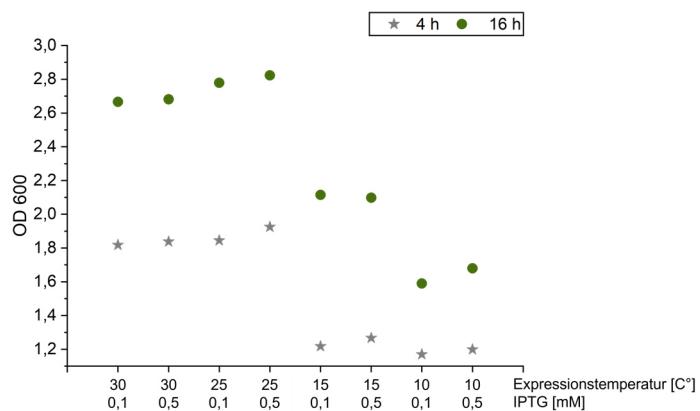


Abbildung 4.1 Bestimmung der Optischen Dichte von rekPSH in LB-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen an zwei Zeitpunkten nach der Induktion (4 h, grauer Stern und 16 h, grüner Kreis).

Für die Expressionen wurden das **LB**- (engl. *Lysogeny Broth*^[190]) und **TB**- (engl. *Terrific Broth*^[189]) Medium als Nährmedium zur Kultivierung der Bakterien verwendet. Zunächst wurde das herkömmliche LB-Medium genutzt und verschiedene **IPTG**-Konzentrationen (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) sowie Temperaturen nach der Induktion getestet, um das optimale Bakterienwachstum zu gewährleisten. Die Expression von Proteinen kann durch Anpassung der IPTG-Konzentrationen reguliert werden, wodurch bei niedrigeren Expressionen die Löslichkeit und Aktivität einiger Proteine erhöht werden kann. Die IPTG-Induktion wird dabei zur Induktion von lac-Repressor-regulierten Promotoren verwendet, wobei die eingesetzten Konzentrationen einen drastischen Einfluss auf die Expression zeigen.^[217] Zur Induktion wurden 0,1 mM und 0,5 mM IPTG-Konzentrationen bei Temperaturen von 10 °C, 15 °C, 25 °C und 30 °C über Nacht getestet. Die optische Dichte (OD600) wurde zu zwei Zeitpunkten bestimmt und zusätzlich erfolgte eine Gelelektrophorese zur Quantifizierung der hergestellten Proteinkonzentrationen (Anhang **Abbildung A. 3**). Wie der **Abbildung 4.1** zu entnehmen ist, zeigt die OD-Messung das beste Wachstum bei 25 °C. Bei höheren oder niedrigeren Temperaturen konnten deutlich geringere OD-Werte bestimmt werden. Die

eingesetzte IPTG-Menge hatte dabei keinen nennenswerten Einfluss auf die Ausbeute, weshalb eine Expressionstemperatur von 25 °C für alle nachfolgenden rekPSH-Expressionen sowie 0,1 mM IPTG gewählt wurden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das TB-Medium zur Anzucht der Bakterien getestet, da sich im direkten Vergleich mit dem LB-Medium eine deutlich erhöhte Expressionsrate zeigte (**Abbildung 4.2 (a)**). Die durchschnittliche Ausbeute für rekPSH liegt im TB-Medium bei 5 mg/mL im Gegensatz zu 2 mg/mL im LB-Medium. TB-Medium weist gegenüber dem herkömmlichen LB-Medium eine gesteigerte Pufferkapazität auf, wodurch höhere Zelldichten erzielt werden können. Die anschließende Aufreinigung von rekPSH erfolgte über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie. Hierbei ist anzumerken, dass bereits ein großer Teil rekPSH bei einem Waschschnitt mit 20 mM Imidazol eluiert wird (siehe Anhang **Abbildung A. 4**). Dieser Schritt soll Verunreinigungen sowie nur schwach gebundene Produkte von der Säule eluieren, welche keine intakte Konformation aufgrund der Unzugänglichkeit des Tags aufweisen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei rekPSH daher um fehlgefaltete und somit inaktive Varianten des Enzyms handelt, und der N-terminale His-Tag aufgrund dessen nicht vollständig zugänglich ist. Die Ausbeute an aktivem rekPSH reduziert sich dadurch drastisch.

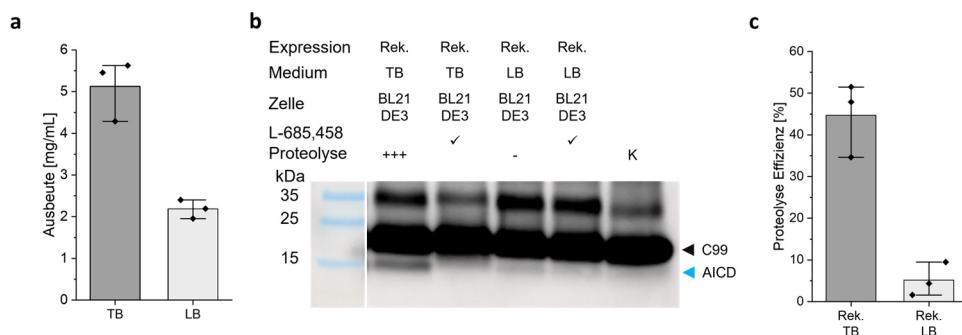


Abbildung 4.2 Vergleich der Expressionsmedien. **(a)** rekPSH-Ausbeute aus TB- oder LB-Medium in mg/mL (n=3 technische Replikate). **(b)** Western Blot (APP-AK) veranschaulicht den Proteolyse-Assay mit in TB- und LB-Medium exprimierten rekPSH; mit Protease-Inhibitor (L-685,458) zur Kontrolle der erfolgten Spaltung (AICD blauer Pfeil) sowie reines C99 als Kontrolle (K, schwarzer Pfeil). **(c)** Gegenüberstellung der proteolytischen Effizienz in TB- und LB-Medium (n=3 technische Replikate).

Proteolyse-Assays zeigten, dass die Umsetzung des rekombinanten Substrates C99 mit rekPSH, hergestellt in TB-Medium, im Vergleich zu rekPSH aus LB-Medium deutlich erhöht ist (**Abbildung 4.2 (b)**). Für alle Analysen ist dabei zu berücksichtigen, dass die Molekulargewichte von PSH und C99 in den SDS-Gelen und Western Blots verschoben sind. Es wird angenommen, dass die Transmembranproteine trotz Zugabe von SDS nicht vollständig denaturieren und somit entfaltet werden können. Für alle nachfolgenden Assays gilt somit, dass PSH knapp über 25 kDa (anstatt 34,3 kDa) erscheint, C99 bei ca. 16 kDa (anstatt 13,5 kDa) und das AICD-Fragment über 10 kDa (anstatt 8,1 kDa). Dabei ist ebenfalls zu beachten, dass die Analysen mittels Immundetektion rein qualitative Ergebnisse zeigen, da jeder Western Blot unterschiedliche Expositionzeiten

benötigt. Somit sind die erhaltenen proteolytischen Effizienzen nur relativ zueinander zu betrachten und nicht als Absolutwert. Zur Verifizierung der erfolgreichen Proteolyse ist zudem auf jedem Western Blot eine reine C99 (7 pmol) Probe (mit **K** gekennzeichnet) aufgetragen.

Wie **Abbildung 4.2 (c)** entnommen werden kann, liegt die ermittelte proteolytische Effizienz des in TB-Medium hergestellten rekPSH bei 45 % und des in LB-Medium lediglich bei 5 %. Daraufhin wurde beschlossen, dass TB-Medium als Kulturmedium für rekPSH in allen nachfolgenden Expressionen zu verwenden ist, um die Ausbeute zu maximieren sowie eine höhere Aktivität zu erlangen. Bislang konnte allerdings nicht geklärt werden, wie genau die Diskrepanzen der PSH-Aktivitäten bei den unterschiedlichen Kultivierungsmedien zustande kommen. In den Proteolyse-Assays wurden für jede Probe die identische finale Konzentration an rekPSH aus TB- und LB-Medium eingesetzt, wodurch die Vermutung zustande kommt, dass PSH in den Medien unterschiedlich gut gefaltet wird. Durch unterschiedliche Konformationen kann sich sowohl der Zugang zum aktiven Zentrum als auch die mögliche Antikörperbindung verändern, welches zu einer verminderten Detektion führen kann. Dies zeigt, dass PSH sehr sensibel auf die Umgebung sowie auf andere Faktoren zu reagieren scheint, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die erfolgreiche Proteolyse stellte folglich nicht nur das Expressions-Medium dar, sondern auch die Umgebung, in welcher die Protease nach der Expression rekonstruiert wird. PSH ist ein Transmembranprotein mit neun TMDs, welches hydrophob und daher nicht wasserlöslich ist. Während und nach der Expression muss daher ein geeignetes Milieu geschaffen werden, um eine Aggregation zu verhindern und somit die Aktivität der Protease zu gewährleisten. Für die Expression wurde das milde, nicht-ionische Detergens **DDM** (n-Dodecyl- β -D-Maltosid) verwendet, welches eine kritische Mizellbildungskonzentration von 0,17 mM aufweist, bei welcher Tenside beginnen Mizellen auszubilden. Es wird häufig zur Expression, Aufreinigung oder Kristallisation von Membranproteinen verwendet, da in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, dass die Aktivität des Membranproteins intakt bleibt.^[218-220] Wie allerdings aus L. Feilen et al. hervorgeht, zeigten die Proteolyse-Assays im Detergens DDM, dass es zu einer erhöhten Produktion des toxischen A β 42 Fragments kommt.^[86] Daher wurde ebenfalls das in biologischen Membranen häufig auftretende Phospholipid **POPC** (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin) als Umgebung getestet. Wie die Gruppen um Prof. Dr. Harald Steiner und Prof. Dr. Martin Zacharias^[86] in molekulardynamischen Simulationen zeigen konnten, ist die wichtige β -Faltblatt Interaktion des Substrates (in diesem Fall C83) mit PSH in beiden Umgebungen identisch. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Fluktuation des beweglichen Loops1 zwischen TMD1 und 2, welches in DDM erhöht war. Zudem konnte gesehen werden, dass die TMD6, welche eines der katalytisch aktiven Aspartate beinhaltet, in DDM aufgewundener ist als in POPC. Diese Erkenntnisse lassen darauf

schließen, dass eine Lipid Umgebung wie POPC-Vesikel die Enzym-Substrat-Interaktion stabilisieren kann.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde PSH in POPC-Vesikeln rekonstruiert, wodurch sich eine gesteigerte Aktivität zeigte (**Abbildung 4.3 (a)**). Dies bestätigte die Vermutung, dass PSH in der POPC-Umgebung eine vermehrt geordnete Struktur annehmen kann, wobei das aktive Zentrum stabilisiert und die Zugänglichkeit für die Substrate erhöht wird. Die proteolytische Effizienz liegt in POPC-Vesikeln somit über 50 %, im Vergleich zu ca. 20 % im Detergens DDM. Die Inhibition (L-685,458) erfolgte zu gleichen Maßen.

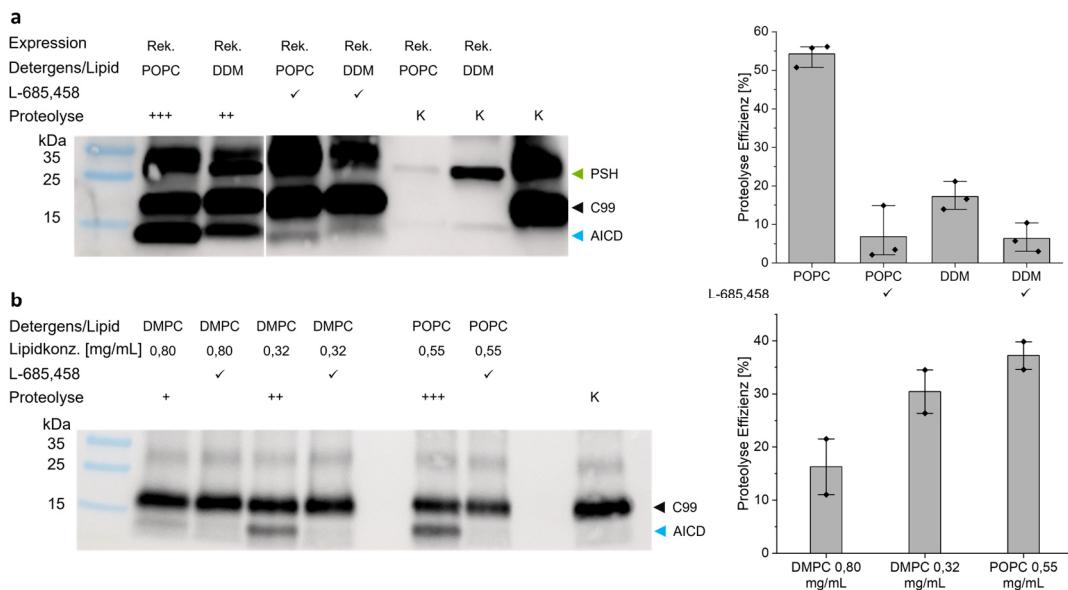


Abbildung 4.3 Vergleich der proteolytischen Effizienz von rekPSH in POPC und DDM sowie DMPC. **(a)** Western Blot mit FLAG-Tag AK, und die daraus resultierende proteolytische Effizienz mit rekonstruiertem rekPSH in POPC oder DDM (n=3 technische Replikate). Die AICD ist mit einem blauen Pfeil, rekPSH mit einem grünen Pfeil und C99 mit einem schwarzen Pfeil markiert. Zusätzlich sind rekPSH Kontrollen in POPC und DDM sowie die C99 Kontrolle aufgetragen (K). **(b)** Western-Blot mit APP-AK und der direkte Vergleich der proteolytischen Aktivität in DMPC und POPC (n=2 technische Replikate). Die AICD ist mit einem blauen Pfeil und C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Im Hinblick auf zukünftige proteolytische Untersuchungen mittels NMR- oder Fluoreszenzpolarisationsmessungen (Vergleich Kapitel 4.3 und 4.4) wurde PSH zudem in Lipid **DMPC**-Vesikeln (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin) testweise rekonstruiert. Hierbei wurden zwei verschiedene Konzentrationen von 0,80 mg/mL (1,18 mM) und 0,32 mg/mL (0,47 mM) eingesetzt, wobei die kritische Mizellbildungskonzentration von DMPC bei 6 nM^[221] liegt. Aus DLS-Messungen ergab sich eine durchschnittliche Partikelgröße von 82 nm (pers. Kommunikation M. Sc. Julia Flum, Daten nicht abgebildet). Die POPC-Vesikel hingegen hatten hier eine Konzentration von 0,55 mg/mL (0,72 mM) und eine durchschnittliche Partikelgröße von 82 nm (siehe Anhang **Abbildung A. 1**). DMPC wird gerne in Verbindung mit dem Detergens **DHPC** (Dihexanoylphosphatidylcholin) für die Rekonstruktion von Membranproteinen verwendet, wobei sich sogenannte Disk-ähnliche Bizzellen

ausbilden^[222]. Dies wird vor allem in der Festkörper-NMR angewandt, da diese Bizzellen magnetisch ausrichtbar sind^[223] und es dadurch ermöglicht wird, Strukturstudien in Membran-Mimetika durchzuführen. Um das System zunächst so einfach wie möglich zu halten, wurde DMPC allein getestet, welches eine Lipiddoppelschicht ausbildet. Wie hier in **Abbildung 4.3 (b)** gezeigt werden kann, weist rekPSH eine ähnlich gute Aktivität in DMPC wie in POPC auf. Die proteolytische Effizienz liegt bei einer Konzentration von 0,32 mg/mL bei ca. 30 % im Vergleich zu 37 % in POPC. Der Einfluss von Bizzellen auf die PSH-Aktivität stellt jedoch einen Aspekt dar, den es im Rahmen zukünftiger Studien noch zu untersuchen gilt.

4.1.2 Einfluss des pH-Wertes

Nachdem die rekombinante Expression und die PSH-Umgebung optimiert wurden, galt es weitere Faktoren in Hinblick auf die rekPSH-Aktivität und somit einer erfolgreichen Proteolyse anzupassen. Die korrekte Faltung eines Proteins und die damit einhergehende Aktivität wird maßgeblich vom pH-Wert beeinflusst.^[224] Wie gezeigt werden konnte, ist die humane γ -Sekretase bei einem pH-Wert von 6,5 am aktivsten.^[225] PSH weist hingegen einen leicht verschobenen Trend zu einem neutralen pH-Wert von 7,0 auf, wie aus L. Feilen et al.^[86] entnommen werden kann. Experimentell wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Puffer Komponenten MES, HEPES und Bicin sowohl einzeln als auch in Kombination getestet, um einen breiten pH-Bereich abdecken zu können. MES besitzt eine Pufferkapazität im Bereich von pH 5,5-6,5, HEPES von pH 7,0-8,0 und Bicin von pH 8,5-9,0. Wie in **Abbildung 4.4 (a)** zu sehen ist, zeigt rekPSH wie erwartet bei einem pH-Wert von 7,0 die höchste Aktivität. Bei einem sauren pH-Wert von 5,5 sowie bei einem leicht basischen pH-Wert von 8 liegen die proteolytischen Effizienzen lediglich um die 5-15 % (**Abbildung 4.4 (b)**).

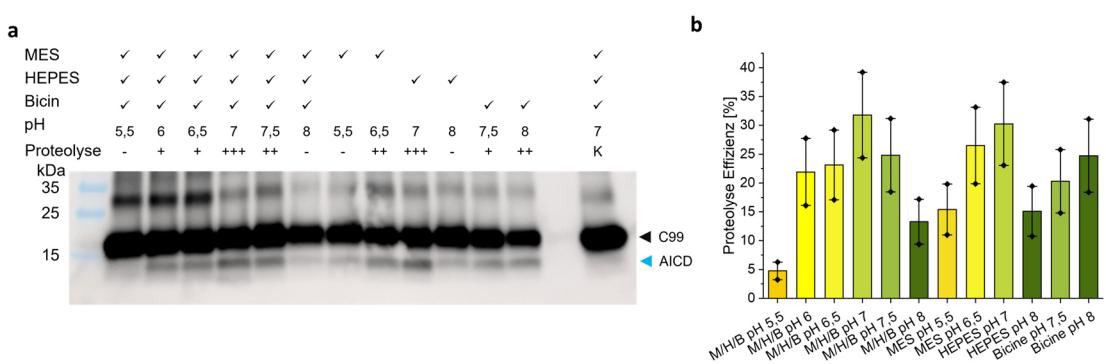


Abbildung 4.4 Vergleich der proteolytischen Effizienz in unterschiedlichen Puffern. **(a)** Gezeigt ist ein Western Blot der Proteolyse mit APP-AK für verschiedene Pufferzusammensetzungen und pH-Werten, sowie C99 als Kontrolle. Die AICD ist mit einem blauen Pfeil markiert, C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil. **(b)** Zusammenfassende Darstellung der proteolytischen Effizienz bei unterschiedlichen Pufferkomponenten (M=MES, H=HEPES, B=Bicin) (n=2 technische Replikate).

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass aus Zeitgründen nur zwei Messpunkte herangezogen werden konnten, sodass eine exaktere Effizienzberechnung auf Basis einer größeren Datenmenge erforderlich wäre. Es zeigte sich hier deutlich, dass PSH wie bereits erwähnt, nicht nur sensibel auf die Umgebung sowie den pH-Wert reagiert, sondern auch, dass die Aktivitäten zum Teil großen, bislang ungeklärten Schwankungen unterliegen. Somit weisen die vorliegenden Daten eine gewisse Unsicherheit und zum Teil große Abweichungen in den Aktivitätsstudien auf. Nichtsdestotrotz kann der vorliegende Trend des pH-Wertes auf die Assays angewendet werden. Für alle weiteren proteolytischen Untersuchungen wurde somit die Kombination aus allen drei Pufferkomponenten mit einer Konzentration von jeweils 20 mM sowie einer Salzkonzentration (NaCl) von 150 mM bei pH 7 verwendet, da diese im Zuge der Zusammenarbeit ebenfalls in der Forschergruppe FOR 2290 für das System gewählt wurden.

4.1.3 Degradation

Die humane γ -Sekretase wird durch die Assemblierung ihrer vier Untereinheiten autoproteolytisch am beweglichen Loop zwischen TMD6 und 7 in ein aktives N- und C-terminales Fragment gespalten. Diese Art der Autoproteolyse konnte ebenfalls für PSH beobachtet werden.^[85] Allerdings ist weiterhin bekannt, dass PSH keine Hilfsproteine benötigt, um katalytisch aktiv zu sein. Daher kann vermutet werden, dass das untersuchte Enzym die Fähigkeit besitzt, sich selbst zu schneiden. Im Folgenden wird diese Hypothese näher erläutert.

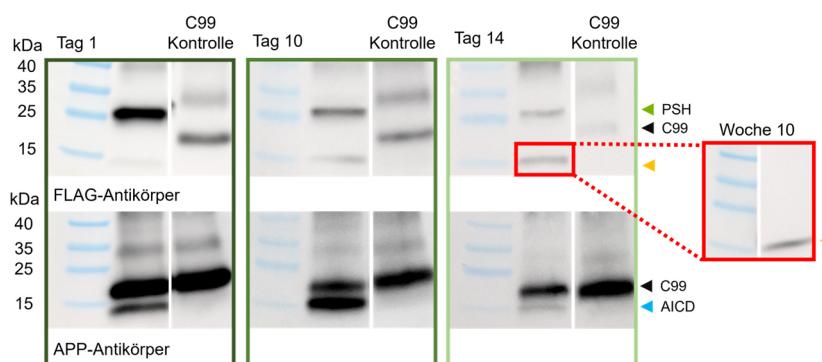


Abbildung 4.5 Veranschaulichung der rekPSH-Degradation. Vergleich der Proteolyse nach unterschiedlich langen Lagerzeiten (1, 10 und 14 Tage), visualisiert mit APP- und FLAG-AK. Die vollständige Degradation von rekPSH nach 10 Wochen Lagerung ist in Rot dargestellt. Jeweils mit Pfeilen markiert sind C99 (schwarz), PSH (grün), AI CD (blau) und die PSH-Degradation (orange).

Abbildung 4.5 (außerdem Anhang **Abbildung A. 5**) zeigt, dass in einem Zeitraum von zweiwöchiger Lagerung des Enzyms in den Proteolyse-Assays eine Abnahme der PSH-Bande von 25 kDa (grüner Pfeil) hin zu einer Bande bei 15 kDa (oranger Pfeil) zu sehen ist. Abgebildet sind hier sowohl ein Western Blot mit einem FLAG-Tag-Antikörper, welcher PSH detektiert, als auch ein Blot mit einem sequenzspezifischen APP-

Antikörper (ausschließlich gegen den C-Terminus von C99 gerichtet), welcher an das AICD (blauer Pfeil) bindet. Die proteolytische Effizienz nimmt mit Zunahme der zweiten PSH-Bande ab, bis nach insgesamt zehn Wochen Lagerung ein vollständiger PSH-Abbau zu sehen ist. Die ursprüngliche PSH-Bande bei knapp über 25 kDa ist vollständig verschwunden und nur ein Produkt bei 15 kDa ist sichtbar (roter Kasten). Dieses könnte dem C-terminalen PSH-Fragment entsprechen, das den FLAG-Tag enthält. Dabei könnte davon ausgegangen werden, dass PSH von Beginn in zwei Fragmenten, ähnlich zu der γ -Sekretase, vorliegt. Das N-terminale Fragment kann aufgrund des hier fehlenden Tags folglich nicht detektiert werden. Allerdings stellt sich dann die Frage, weshalb nicht von Beginn an ausschließlich die niedrigere Bande des C-Terminus zu sehen ist. Durch Zugabe von SDS besteht die Möglichkeit, dass die beiden Fragmente nicht getrennt voneinander vorliegen, wodurch das C-terminale Fragment als einzelnes nicht erkennbar wäre. Dies erklärt jedoch nicht die Tatsache, dass sich die PSH-Aktivität stark reduziert und folglich die AICD-Produktion herabsetzt. Bei Vorliegen der beiden „aktiven“ Fragmente wäre eine fortlaufende PSH-Aktivität zu erwarten. Aufgrund dieser Tatsachen kann angenommen werden, dass es sich hierbei um eine Art der Degradierung handeln könnte, welche nach zwei- bis vierwöchiger Lagerung bei 4 °C auftritt. Der Auslöser der Degradation sowie der Mechanismus ist bislang nicht näher bekannt. Durch Einfrieren und Auftauen nahm die Aktivität des Enzyms zusätzlich deutlich ab (persönliche Kommunikation Dr. Lukas Feilen, Stand 2021). Die Detektion der PSH-Degradations-Bande bei 15 kDa führt neben der Inaktivität von rekPSH zu einer starken Beeinträchtigung der Auswertung des Proteolyse-Assays, da die geschnittenen AICD-Fragmente an ebendieser Position auftreten. Somit beschränkte sich die Lagerzeit des aktiven rekPSH bislang auf maximal zwei bis vier Wochen bei 4 °C.

4.1.4 Umsatzrate

Die γ -Sekretase ist wie das Rhomboid eine sehr langsame Intramembranprotease in der Umsetzung der Substrate. Wie F. Kamp et al. und andere^[28, 226] zeigen konnten, liegt die Umsatzrate k_{cat} in Proteoliposomen bei 4,33 h⁻¹. Damit ist die γ -Sekretase 10⁵-mal langsamer als Chymotrypsin,^[227] welches eine weitere Aspartatprotease darstellt. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m der γ -Sekretase liegt somit bei 5,6 s⁻¹M⁻¹ im Vergleich zu 2,9·10⁶ s⁻¹M⁻¹ bei Chymotrypsin. F. Kamp et al. konnten außerdem zeigen, dass die γ -Sekretase nur zu etwa 11 % in einer aktiven Konformation vorliegt, wobei lediglich ~ 35 % des eingesetzten Substrates prozessiert werden.^[226] L. Feilen et al.^[86] zeigten zudem, dass die Enzym-Substrat-Affinität von PSH wie auch die der humanen γ -Sekretase sehr gering ist.

In Studien von Y. Wu et al.^[228] aus dem Jahr 2023, sowie von S. Naing et al.^[229] von 2018 wurden katalytische Daten über PSH mittels **FRET** (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) erhoben. Verwendet wurde dabei das Homolog ohne eingebaute Mutationen.

Es wurden verschiedene Substrate in DDM- sowie in Bizellen- (DMPC-CHAPSO) Umgebung untersucht. Für die Umsetzung des Substrates C99 ergab sich dabei ein k_{cat} von $1,34 \text{ h}^{-1}$ sowie eine katalytische Effizienz k_{cat}/K_m von $49,6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Zudem wurde aufgeführt, dass PSH andere Substrate wie ErbB4 oder Notch langsamer umsetzen kann als APP und dass die PSH-Aktivität in DDM-Mizellen im Vergleich zur humanen γ -Sekretase in POPC-Vesikeln erhöht ist (**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1 Vergleich der katalytischen Aktivitäten aus der Literatur zwischen humaner γ -Sekretase in POPC-Vesikeln und PSH in DDM-Mizellen.

Protease	Substrat	$K_m (\text{mM})$	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$k_{cat}/K_m (\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$	
γ -Sekretase in POPC	C100-His ₆	0,216	0,00120	5,6	[226]
PSH in DDM	C100FRET	0,0075	0,00037	49,6	[228]
PSH in DDM	ErbB4FRET	0,0049	0,000047	9,6	[228]
PSH in DDM	NotchFRET	0,0042	0,000033	7,9	[228]

In dieser Arbeit wurden proteolytische Assays in POPC über einen Zeitraum von 65 h erhoben und mit den Ergebnissen nach 18 h (Standard Assay Dauer) verglichen. Gemäß **Abbildung 4.6 (a)** verdoppelt sich das AICD-Produkt nahezu, wenn die Proteolyse-Dauer erhöht wird. So zeigt rekPSH nach 65 Stunden einen prozentualen Umsatz von etwa 40 %. Diese Daten stimmen mit den bekannten Ergebnissen der humanen γ -Sekretase sowie PSH in DDM überein. Dabei wird angenommen, dass sowohl Substrat als auch Enzym zufällig in der Membran ausgerichtet sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich diese in der richtigen Konformation treffen, liegt bei weniger als 50 %. Eine erfolgreiche Interaktion ist daher stark reduziert, und Aggregationen oder Dimerisierungen der Transmembranproteine können dies ebenfalls behindern. Somit zeigt die Umsatzrate nach 65 h vermutlich einen nahezu vollständigen möglichen Umsatz. Die Schneideeffizienz in Hinblick auf den Wildtyp (**WT**) C99 ist für humane γ -Sekretase und PSH dabei nahezu identisch (persönliche Kommunikation Prof. Dr. Harald Steiner und Dr. Nadine Werner, Stand 2022), wobei PSH eine schwache Erhöhung der Prozessivität zeigte.

Fraglich ist, warum die γ -Sekretase und auch PSH vergleichsweise langsame und schlechte Effizienzen in der Umsetzung der Substrate zeigen. Eine mögliche Ursache kann dem Western Blot mit FLAG-Antikörper in **Abbildung 4.6 (b)** entnommen werden. Bei der abgebildeten PSH-Kontrollprobe nach 65 h ist eine schwache Bande bei 15 kDa zu erkennen. Diese stimmt mit den zuvor in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Banden der PSH-Degradation überein, wobei die proteolytische Effizienz mit zunehmender Degradation abnahm. Da dieser Prozess bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C im Gegensatz zur Lagerungstemperatur von 4 °C schneller einzutreten scheint, könnte dies einen gesteigerten negativen Einfluss auf die PSH-Aktivität haben. Somit ist nicht auszuschließen, dass sowohl PSH als auch die humane γ -Sekretase eine zunehmende

Inaktivierung durch Alterungsprozesse erfahren. Für eine weitere Klassifizierung dessen sollten in zukünftigen Messungen kinetische Studien, wie beispielsweise Michaelis-Menten, durchgeführt werden. Dabei könnten sowohl FRET-basierte Studien als auch Immunoblots eingesetzt werden, um weitere Anhaltspunkte für die Aktivitäten zu erhalten.

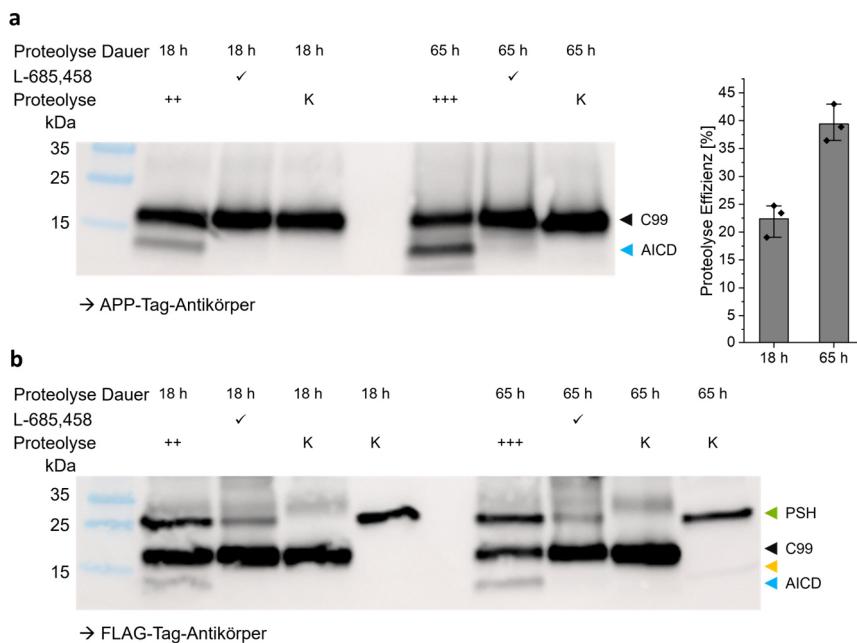


Abbildung 4.6 Veranschaulichung der Umsatzrate der Proteolyse mit der Zeit. Vergleich der Standard Proteolyse Dauer von 18 h zu 65 h mittels APP- (**a**) und FLAG-Tag-AK Färbung (**b**), sowie die vereinfachte Darstellung der proteolytischen Effizienz als Balkendiagramm (n=3 technische Replikate). Jeweils mit Pfeilen markiert sind C99 (schwarz), PSH (grün), AICD (blau) und die vermutliche PSH-Degradation (orange). Kontrollen von PSH und C99 sind mit K gekennzeichnet.

4.1.5 In-vitro Proteolyse-Assay des Amyloid-Precursor Fragments C99 und vier Mutanten mittels rekPSH

Im Zuge der Zusammenarbeit mit der Forschergruppe FOR 2290 wurden von **Dr. Mara Silber** unter anderem vier APP Mutanten in Hinblick auf ihre Konformation und Schneidfähigkeit analysiert.^[65] Im Folgenden wird die Proteolyse von ebendiesen zwei FAD Mutanten V44M^[51, 57] und I45T^[36, 62, 230] sowie zwei Di-Glycin Mutanten G38P und G38L^[64] durch rekPSH untersucht. Zur spezifischeren Analyse wurde ein FLAG-Tag eingebaut und die Substrate entsprechend subkloniert. Zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie enthielten diese ebenfalls einen His-Tag (siehe Kapitel 3.1.2).

4.1.5.1 Proteolyse-Assay mit rekombinanten C99 und Mutanten

Abbildung 4.7 (a) zeigt wie effizient rekPSH die verschiedenen Substrate schneidet, wobei die produzierte AICD-Menge sich dabei stark unterscheidet. Die Mutanten I45T

und G38P weisen eine erhöhte AICD-Produktion auf im Vergleich zum WT C99, wohingegen V44M und G38L weniger gut umgesetzt werden.

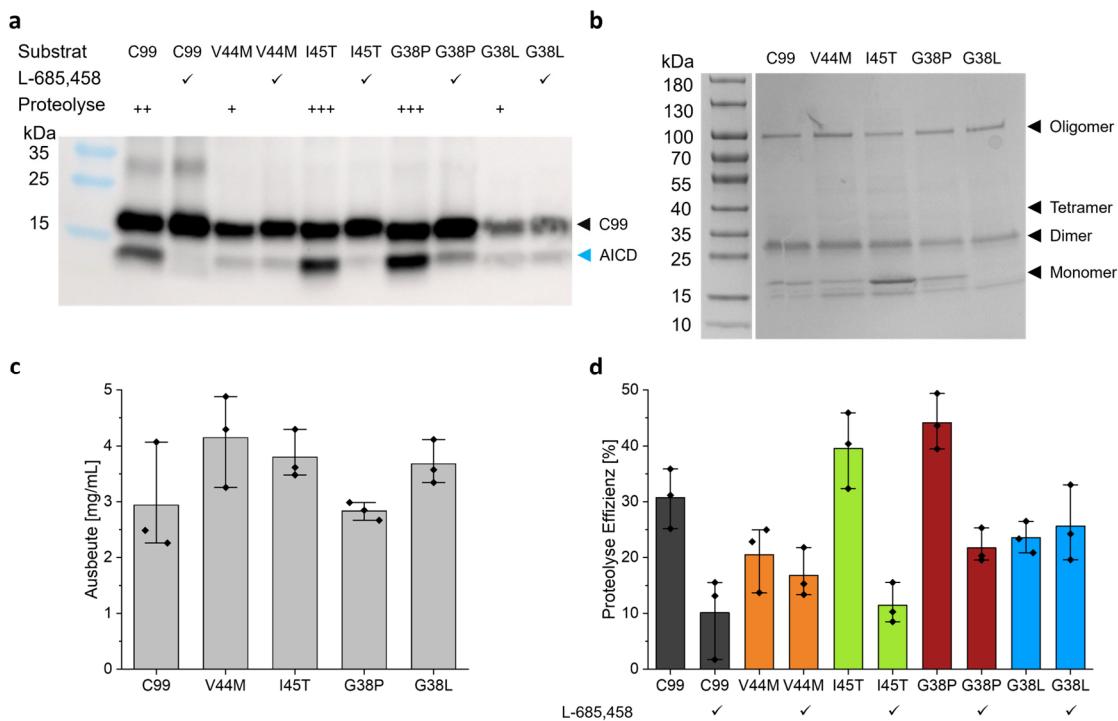


Abbildung 4.7 Proteolyse-Assays mit APP Fragment C99, sowie den Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L. **(a)** Western Blot des Proteolyse-Assays mit APP-AK; AICD ist mit einem blauen und C99 mit einem schwarzen Pfeil markiert. **(b)** SDS-PAGE der rekombinant exprimierten und aufgereinigten Substrate inklusive der Markierung der möglichen Multimerisierungen. **(c)** Ausbeute der rekombinanten Expression der Substrate im Vergleich (ausgehend von 1 L Zellmedium) ($n=3$ technische Replikate). **(d)** Vergleich der rekPSH-proteolytischen Effizienz mit den einzelnen Substraten, jeweils mit und ohne Zugabe des Inhibitors L-685,458 ($n=3$ technische Replikate).

Die rekombinant exprimierten Substrate zeigen nach der Aufreinigung neben der gewünschten monomeren Form auch Oligomere (**Abbildung 4.7 (b)**). C99 neigt zur Homodimerisierung, welche die proteolytische Effizienz beeinträchtigt und gegebenenfalls herabsetzen kann, wie E. Winkler et al. zeigen konnten.^[231] Dabei weisen in etwa 65 % der Proteine in der hier vorliegenden SDS-PAGE keine monomere Form auf. Des Weiteren ist unterhalb der monomeren Bande bei allen Substraten, abgesehen von der G38L Mutante, eine zweite Bande zu erkennen, welche in etwa 36 % der monomeren Form darstellt. Eine mögliche Ursache hierfür könnten Verunreinigungen durch andere Proteasen sein, welche die Proteine zersetzt haben könnten. Auffällig sind ebenfalls die sichtbaren Konzentrationsunterschiede der Mutanten im SDS-Gel im Vergleich zum Western Blot. Die Konzentrationen (**Abbildung 4.7 (c)**) wurden mittels UV-Vis-Spektrometrie bestimmt (vergleiche Kapitel 1.4), wobei es durch die SDS-Mizellenumgebung zu Beeinträchtigungen der Messungen kommen kann. Diese verursachen Streulicht, welches die gemessene Absorption überlagert. Dadurch weichen die gemessenen Konzentrationen von den tatsächlichen ab. Des Weiteren kann

es durch Fehlfaltungen der Proteine ebenfalls zu Diskrepanzen zwischen den SDS-PAGEs und den Western Blots kommen. Die Detektion mittels Antikörper setzt den vollständigen Zugang zur Epitop-Bindestelle voraus. Bei Fehlfaltung kann dieser Zugang blockiert sein, wodurch eine vollständige Bindung der Antikörper nicht möglich ist. Auch Aggregationen und Dimerisierungen können dies negativ beeinträchtigen. Für die Anfärbung in der SDS-PAGE wird keine korrekte Faltung vorausgesetzt, da das CoomassieTM nicht-kovalente Komplexe über Van-der-Waals sowie elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Protein ausbildet.^[232]

In der Western Blot Analyse zeigt vor allem G38L eine niedrigere Konzentration als die anderen Mutanten. In der Annahme, dass die relativen Konzentrationen der Substrate zueinander unabhängig der Tatsächlichen sind, weisen I45T und G38P mit etwa 40 % proteolytischer Effizienz eine gesteigerte Umsatzrate zum C99 WT mit nur 30 % auf (**Abbildung 4.7 (d)**). Auffällig ist hierbei, dass der verwendete Inhibitor L-685,458 bei G38P weniger effizient zu sein scheint. Reduzierungen der Inhibition sind ebenfalls bei V44M sowie G38L zu beobachten, wobei die allgemeine Proteolyse-Effizienz hier lediglich bei 20-25 % liegt. In Bezug auf die G38L Mutante zeigt sich, dass diese am wenigsten effizient durch den Inhibitor vor der proteolytischen Spaltung geschützt wird.

Die proteolytische Effizienz der G38L und G38P Mutanten wurde bereits in HEK239 Membran-Faktionen mit γ -Sekretase getestet, wobei G38L effizienter umgesetzt wurde als G38P.^[64] Ebenfalls ergibt sich ein veränderter Mechanismus für V44M und I45T. Laut Studien von S. Devkota et al.^[51] werden beide Mutanten schlechter geschnitten als der WT, wobei V44M besser prozessiert wird als I45T. Auch hierfür wurde die humane γ -Sekretase aus HEK-Zellen verwendet. Für I45T stimmt dies mit rekPSH überein, wobei die Effizienz bei ca. 45 % liegt. V44M hingegen weist mit 20 % eine deutlich verringerte AICD-Produktion auf. Die Vermutung liegt nahe, dass die Substrate in der hier getesteten Umgebung aufgrund ihrer Neigung zur Dimerisierung ein anderes Proteolyseverhalten zeigen wie in der humanen γ -Sekretase, wie ebenfalls K. Nadhezin et al.^[233] postulierten. Aufgrund von Fehlfaltungen oder Dimerisierungen können die Substrate nicht korrekt in das aktive Zentrum binden. Zusätzlich kann die notwendige Ausbildung eines β -Stranges der C99 Mutanten aufgrund von unterschiedlichen Konformationen vermindert sein, wodurch die Schneideeffizienz herabgesetzt ist.

Damit lässt sich auch die verminderte Inhibition der Mutanten erklären. Der Inhibitor L-685,458^[193], welcher einen Hydroxyethylen-Dipeptid-Isostere darstellt, reduziert die $\text{A}\beta$ 40 und $\text{A}\beta$ 42 Produktion. Hierbei kommt es zur Bildung von Wasserstoffbrücken ausgehend von der isosteren Hydroxylgruppe im Übergangszustand des Inhibitors, welche die helikale Konformation der Substrate stabilisieren. M. Hitzenberger und M. Zacharias zeigten mittels molekulardynamischer Simulationen, dass die Bindungsgeometrie des Inhibitors zu den C99 Resten L49-L52 passt und somit die β -Strang Formierung widerspiegelt.^[234] Dadurch ist nicht die Enzym-Substrat-Interaktion

per se inhibiert, jedoch die Ausbildung der β -Faltblätter der Substrate, welche für die erfolgreiche Proteolyse benötigt werden. Somit zeigen die Mutationen der Substrate Einfluss auf die räumliche Ausrichtung, wie im nächsten Absatz näher erläutert wird, sowie auf die Helizität. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Konformation des rekPSH für eine erfolgreiche Inhibition verantwortlich ist. Eine PSH-Kristallstruktur (PDB: 4Y6K) konnte zeigen, dass der verwandte Inhibitor L-682,679 die beiden katalytischen Aspartate mit einer hohen Elektronendichte durch eine Phenol-Gruppe separiert.^[87] Bei möglicher Fehlfaltung könnte folglich der Inhibitor nicht passend in die Tasche zwischen TMD6 und TMD9 eingelagert werden und somit eine verminderte Inhibition stattfinden. Zudem zeigten die Kristallstrukturen eine hohe Variabilität der TMDs, sowie des beweglichen Loops. Dies deutet zusätzlich auf eine hohe Mobilität des Enzyms hin.

Basierend auf den experimentellen Ergebnissen der Proteolyse-Assays wurden bekannte Strukturdaten von humanen Präsenilin und PSH in Zusammenhang mit den vorliegenden Mutanten hinsichtlich ihres Einbaus in das katalytische Zentrum untersucht. Dabei wurde eine modifizierte PSH-Kristallstruktur^[86] verwendet, sowie die Kryo-Elektronenmikroskopie Struktur des humanen Präsenilin (PDB: 6IYC). Das verwendete PSH-Modell wurde von L. Feilen et al. ausgehend der bekannten Kristallstruktur (4HYG) so modifiziert, sodass die Reste H171-E177 und A213-G217 zusätzlich modelliert wurden. Außerdem wurde eine C83-Struktur während der Enzym-Substrat-Interaktion simuliert. Diese Struktur wurde mit der Präsenilin-Struktur superpositioniert. Die katalytischen Aspartate zeigen dabei leicht veränderte Ausrichtungen, wie bereits in Kapitel 1.1.3 aufgeführt wurde. In Zusammenhang mit dreidimensionalen NMR-Substratdaten^[36] von Dr. M. Silber zeigen sich für die APP-Mutanten ebenfalls unterschiedliche räumliche Ausrichtungen der Strukturbündel (**Abbildung 4.8**). Verwendet wurden hierfür die PDB-Daten des Wildtyps und der Mutanten der Transmembrandomäne von APP (WT 6YHF, G38L 6YHI, G38P 6YHO, V44M 6YHP, I45T 6YHX), welche auf die C83 Struktur in den Proteasen superpositioniert wurden. Dadurch ergibt sich eine grobe Modellierung der Substrate mit den Enzymen, wobei zu beachten ist, dass die Flexibilität von Präsenilin und PSH hier nicht berücksichtigt wurde.

Wie M. Silber et al.^[36] anhand von Abstandsabhängigkeiten durch NOESY-Spektren sowie Torsionswinkel zeigen konnten, weisen APP und die untersuchten Mutanten unterschiedliche Biege- und Drehwinkel auf. Dabei neigt sich vor allem G38P um fast 90° entgegen des APP WT. Bei näherer Betrachtung des Modells kollidieren einige Strukturen bei einem Abstand unter 3 Å mit den Strukturen des Präsenilin und PSH. G38P kollidiert mit PSH weniger oft im Vergleich zur Präsenilin-Struktur, während G38L dafür eine höhere Kollisionsrate aufweist. Dieses Verhalten würde zu den aufgenommenen Western Blot Analysen passen, wobei PSH die G38P Mutante deutlich effizienter umsetzt als die G38L Mutante, umgekehrt zu dem Verhalten der γ -Sekretase. In vorhergehenden Studien konnte zudem gezeigt werden, dass PSH vermehrt A β 40

anstatt A β 42 produziert, was ebenfalls zur Bevorzugung der G38P Mutante passt. Die unterschiedlichen strukturellen Gegebenheiten und die damit verbundene Interaktion mit der Protease scheinen einen Einfluss auf die Prozessivität zu haben, wie im folgenden Kapitel sowie in Kapitel 6.2.2 weitergehend erörtert wird.

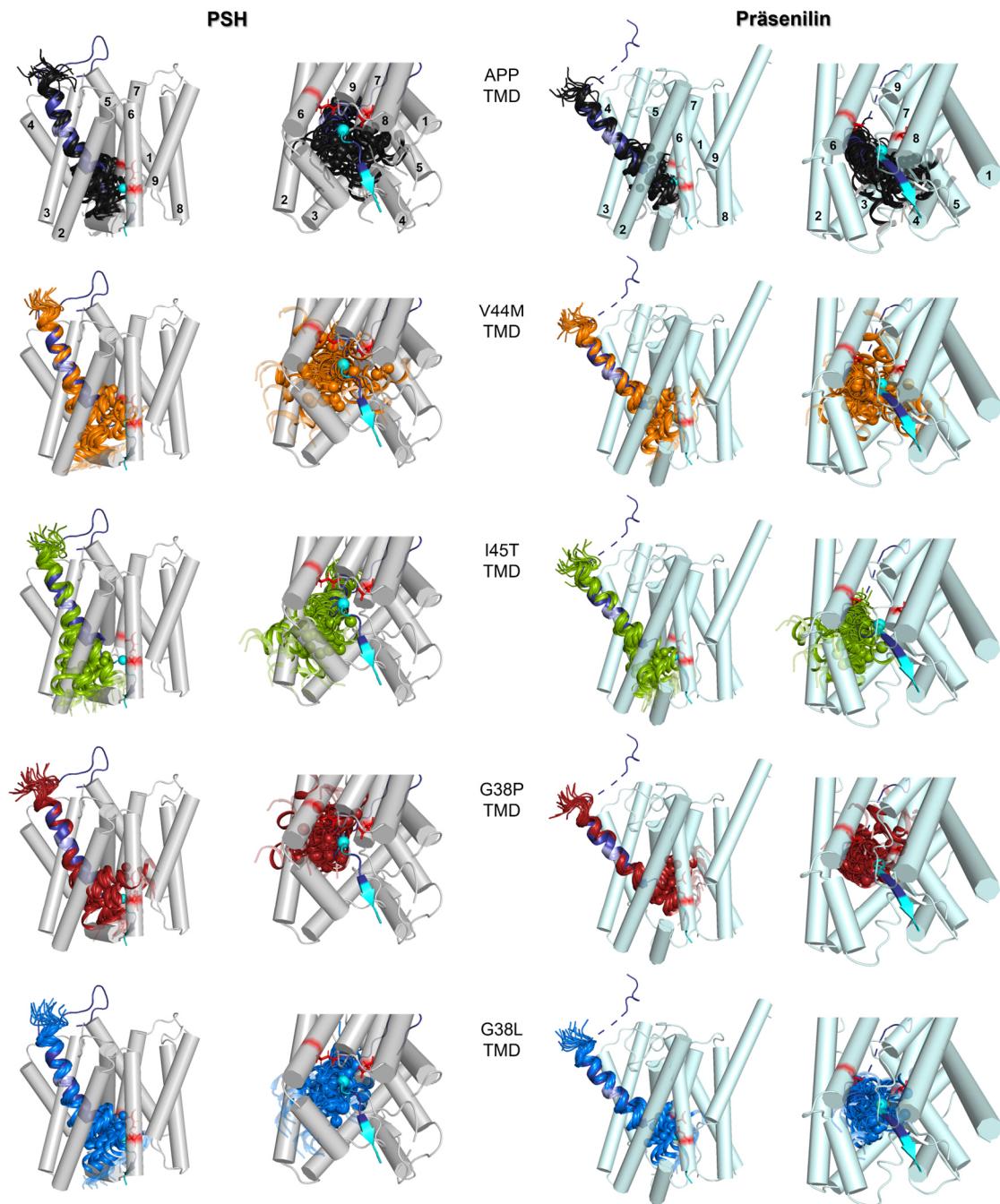


Abbildung 4.8 Hypothetischer Vergleich des Enzym-Substrat-Komplexes der APP Transmembrandomäne des Wildtyps und der Mutanten (PDB: WT 6YHF (schwarz), V44M 6YHP (orange), I45T 6YHX (grün), G38P 6YHO (rot), G38L 6YHI (blau)) in einer modifizierten PSH-Struktur (PDB: 4HYG) von L. Feilen et al.^[86] sowie der γ -Sekretase Präsenilin-Struktur (PDB: 6IYC). Die Strukturen wurden auf den N-Terminus von den vorhandenen APP I31-I41 überlagert (dunkelblau, K53-K55 des β -Strangs in hellblau). Die initiale Schnittstelle L49 ($C\alpha$) ist als Kugel dargestellt.

4.1.5.2 Proteolyse-Assay mit zellfreiem C99 und Mutanten

Die Herstellung der rekombinanten Substrate ist verhältnismäßig zeitaufwändig und führt zu partieller Oligomerisierung und Aggregation. Infolgedessen wurde ein schnelleres und vereinfachtes Verfahren gesucht. Dabei wurde auf das zellfreie System zurückgegriffen, bei welchem Zellextrakte und weitere wichtige Komponenten wie Aminosäuren und Energielieferanten mit einem Vektor kombiniert werden. Hierfür wurde der ursprüngliche pQE60 Vektor in einen Pivex2.3d^[235] Vektor subkloniert. Die Expression erfolgte durch eine Präzipitat-basierte Methode (in P-Extrakten) mit kontinuierlichem Austausch zwischen Reaktions- und Nährlösung. Nach der Expression wurden die Substrate mehrfach mit Puffer und Wasser gewaschen und anschließend in einem Puffer mit 0,2 % SDS aufgenommen.

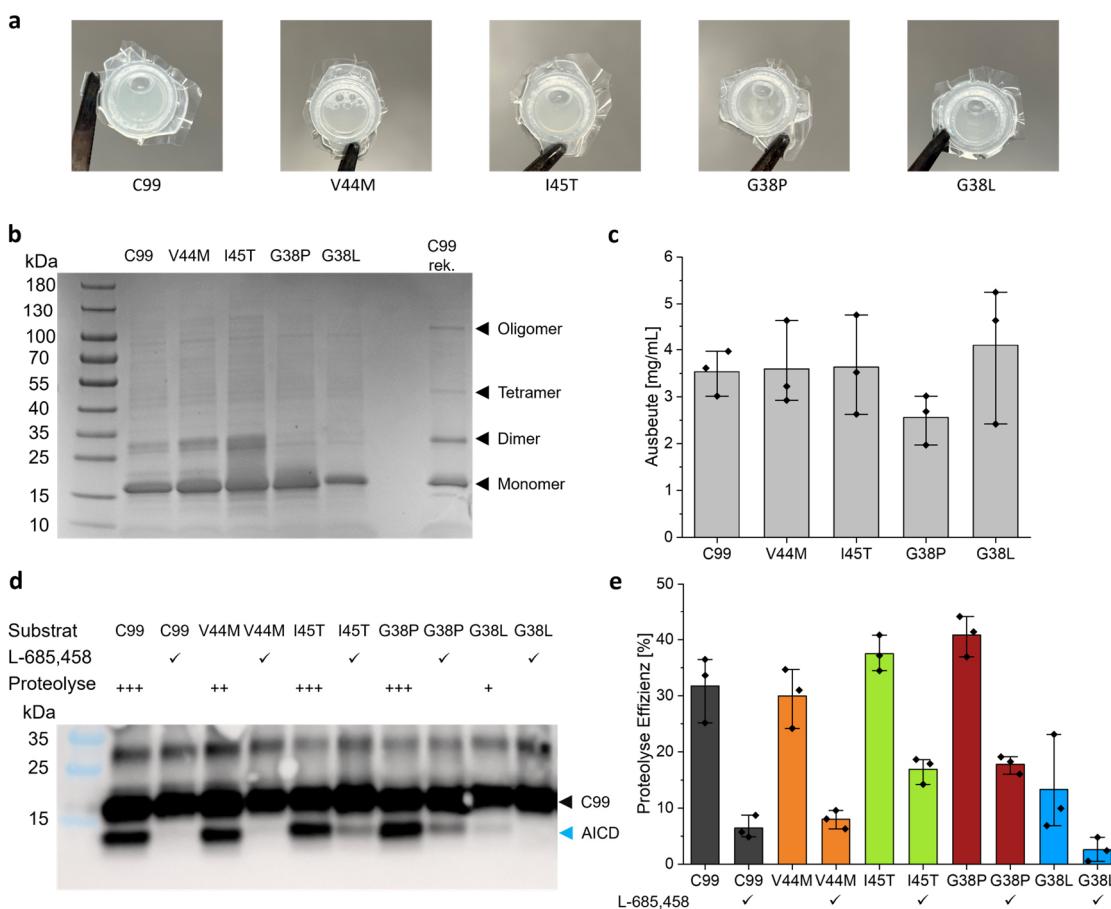


Abbildung 4.9 Proteolyse-Assays mit zellfrei exprimierten APP Fragment C99 sowie den Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L. **(a)** Gezeigt sind die Reaktionscontainer der zellfreien Proteinexpression von C99 sowie den Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L. **(b)** SDS-PAGE der zellfrei exprimierten und aufgereinigten Substrate im Vergleich mit rekombinanter C99. **(c)** Ausbeuten der zellfreien Expression der Substrate in mg/mL (hochskaliert von 150 µL Reaktionsvolumen auf 1 L zur Vergleichbarkeit mit rekombinanter Expression) (n=3 technische Replikate). **(d)** Western Blot des Proteolyse-Assays mit APP-AK; jeweils mit und ohne Zugabe des Inhibitors L-685,458. Die AICD ist mit einem blauen und C99 mit einem schwarzen Pfeil markiert. **(e)** Balkendiagramm der rekPSH proteolytischen Effizienzen der Substrate (n=3 technische Replikate).

Abbildung 4.9 (a) zeigt die zellfrei exprimierten Proteine (C99 und dessen Mutanten) in den Expressionskapseln. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE (**Abbildung 4.9 (b)**) analysiert, wobei die Konzentrationen mittels UV-Vis Absorption ermittelt wurden. Die Probenkonzentrationen wurden hierbei identisch gewählt und der rekombinant exprimierte C99 WT zur Gegenüberstellung mit aufgetragen. Konzentrationsmessungen ergaben, dass alle Substrate mit \pm 3,5 mg/mL Ausbeute exprimiert werden können, abgesehen von G38P. Hier liegt die Ausbeute bei ca. 2,5 mg/mL (**Abbildung 4.9 (c)**). Zu beachten ist, dass die ermittelten Ausbeuten ausgehend dem kleinen Reaktionsvolumen von 150 μ L auf ein größeres Reaktionsvolumen linear hochskaliert wurden, um die Expressionen mit den rekombinant exprimierten Proteinen vergleichen zu können. Die zellfrei exprimierten Proteine weisen dabei eine deutlich geringere Konzentration an Dimeren, Tetrameren und Oligomeren im SDS-Gel auf. Im Western Blot der Proteolyse (**Abbildung 4.9 (d)**) sind für die zellfrei hergestellten Substrate allerdings ebenfalls Dimer-Banden zu erkennen. Diese scheinen im Vergleich zu den rekombinanten Substraten im Western Blot stärker vorhanden zu sein. Dies könnte allerdings auf die Zugänglichkeit des C-Terminus zurückzuführen sein, an welcher sich der Epitop-Tag befindet. Möglicherweise ist dieser bei den zellfreien Peptiden besser zugänglich, wodurch die erhöhten Dimer-Banden erklärt werden könnten. Wie nachfolgend aufgeführt, scheint die Dimerisierung der Substrate die Proteolyse allerdings nur bedingt zu beeinflussen. Die Vermutung liegt nahe, dass die Dimere bei Interaktion mit rekPSH zum Großteil aufgelöst werden, da ansonsten keine Proteolyse möglich ist. Dadurch könnten die Oligomer-Banden im SDS-Gel jedoch vermehrt sichtbar sein. Die Dimerisierung der zellfreien Proteine ist insgesamt zu etwa 30 % ausgeprägt und somit geringer gegenüber der rekombinanten Expression. Durch die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie zeigt die rekombinante Probe allerdings eine insgesamt höhere Reinheit und weniger unspezifische Banden im Hintergrund. Die zellfrei hergestellten Substrate weisen dahingegen prozentual gesehen 15 % mehr Verunreinigungen auf, da für diese lediglich das gebildete Präzipitat gewaschen und resuspendiert wurde, wodurch dies eine mögliche Erklärung für die Unreinheiten darstellen könnte. Die rekombinante Aufreinigungsmethode beinhaltet einen Waschschnitt mit Imidazol, wobei ungewünschte Fragmente, welche eine fehlerhafte Konformation und somit keinen intakten His-Tag aufweisen, herausgewaschen werden können. Auffällig ist außerdem, dass die zweite unspezifische Bande unterhalb des Monomers, wie es bei den rekombinanten Proben der Fall war, bei den zellfreien Substraten nicht zu sehen ist. Dies könnte die Proteolyse der rekombinanten Proteine durch unerwünschte Proteasen im vorherigen Kapitel bestätigen.

Die zellfrei hergestellte V44M-Mutante wird mit etwa 30 % nahezu identisch zum C99 WT umgesetzt (siehe **Abbildung 4.9 (d) und (e)**). Laut S. Devkota et al.^[51] produziert V44M abhängig von den Produktionslinien unterschiedlich viel A β -Fragmente. Das A β 49 \rightarrow A β 46 ITL-Tripeptid wird ausgehend der Literatur deutlich häufiger generiert als es beim WT der Fall ist, wohingegen die anderen Produktionslinien der Tripeptide

herabgesetzt sind. Bei dem AICD-Produktionslevel wurde zudem eine gesteigerte Proteolyse an der ε -Schnittstelle im Vergleich zum WT festgestellt. Nach S. Devkota ist die AICD aus den Produktionslinien der A β 49 Produktion niedriger als die des WT, wohingegen die AICD-Produktion der A β 48 Produktion stark erhöht ist. Demgegenüber wird I45T mit 35 % im hier vorliegenden Western Blot Assay sogar besser proteolytisch gespalten als der WT. In der Literatur wird jedoch eine allgemeine Abnahme der Generierung von A β -Tripeptiden wie auch der AICD unter Verwendung der γ -Sekretase bei dieser Mutante verzeichnet. Die zellfrei hergestellte Mutante G38P zeigt einen experimentellen Umsatz von 41 % und die G38L Mutante von 13 %. Dabei ist die Umsatzrate der zellfreien G38L Mutante im Vergleich zur rekombinant generierten um einen Faktor 2 geringer. Allerdings weisen die Replikate eine große Diskrepanz auf. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Harald Steiner in der Forschergruppe FOR 2290 (unveröffentlichte Daten, Stand 2022) konnte gezeigt werden, dass die A β -Produktionen der G38 Mutanten im Vergleich zum WT in der humanen γ -Sekretase herabgesetzt, in der Proteolyse mit PSH für G38L jedoch um das Dreifache erhöht sind. Auch für die generierten AICD zeigte H. Steiner für die humane γ -Sekretase niedrigere Werte, wohingegen die Proteolyse mit PSH für G38P im Vergleich zum WT gesteigert war. Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls für die rekombinant sowie für die zellfrei exprimierten Mutanten bestätigt werden. Außerdem verschieben sich laut H. Steiner die Produktionslinien hingehend zu ε 49 für beide Mutanten. Die G38P Mutante sollte ursprünglich die Proteolyse Effizienz der γ -Sekretase erniedrigen, wohingegen die G38L Mutante diese erhöhen sollte.^[64] Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnten die Annahmen für rekPSH allerdings nicht bestätigt werden, wobei weitere Analysemethoden wie die massenspektrometrischen Analysen der Proteolyse Produkte noch ausstehen.

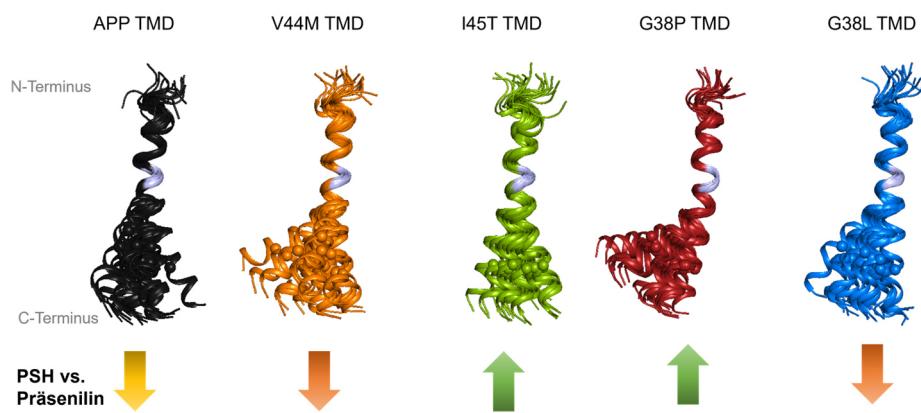


Abbildung 4.10 Proteolytische Effizienz von rekPSH im Vergleich zu humaner γ -Sekretase in Hinblick auf AICD-Produktion. Nach oben gerichtete Pfeile (grün=stark) deuten auf eine Zunahme und nach unten gerichtete Pfeile (gelb=schwach, orange=stark) entsprechend auf eine Abnahme der Effizienz hin (PDB-Dateien: WT 6YHF, V44M 6YHP, I45T 6YHX, G38P 6YHO, G38L 6YHI).

Die Ergebnisse der rekombinanten und zellfrei hergestellten Substrate des Proteolyse-Assays deuten zusammengefasst darauf hin, dass die γ -Sekretase und PSH veränderte Produktionslinien oder möglicherweise bevorzugte Substratkonformationen aufweisen. Somit prozessiert PSH V44M und G38L schlechter, und I45T sowie G38P besser als die humane γ -Sekretase in Hinblick auf den WT, wie in **Abbildung 4.10** grafisch dargestellt ist. Eine nähere Betrachtung der Konformationen von Substraten und dessen etwaigen Einfluss auf die Proteolyse erfolgt in Teil zwei der vorliegenden Arbeit.

4.2 Zellfreie Proteinexpression von PSH und proteolytische Untersuchungen

Da rekPSH durch Degradation an Reaktivität verliert und sich nicht lange für Aktivitätsstudien lagern lässt, wurde eine alternative Expression getestet. Die zellfreie Proteinexpression hat den Vorteil, dass schwer zu exprimierende Membranproteine wie APP und PSH in kleinem Maßstab und in kurzer Zeit hergestellt werden können. Dies ist von besonderem Interesse im Hinblick auf Screenings, welche für die Aufklärung des Schneidemechanismus der γ -Sekretase Verwendung finden. Außerdem stellt die zellfreie Expression ein sehr variables System dar, welches insbesondere für die sensible Protease von großem Vorteil ist. Teile dieser Arbeit sind in der Publikation „*Cell-free protein production of a gamma secretase homolog*“ von C. Moser und C. Muhle-Goll (2024) veröffentlicht.^[236]

Für die zellfreie Proteinexpression von PSH wurde der vorhandene Vektor in einen Pivex2.3d-Vektor^[235] subkloniert. Dieser ist optimiert für His-markierte Proteine im sogenannten Rapid Translation System (**RTS**). Zusätzlich wurde ein C-terminaler FLAG-Tag angefügt. Die Expressionen fanden anfänglich unter Standardbedingungen von 20 h bei 34 °C statt. Dabei wurde zunächst getestet, ob PSH zellfrei hergestellt und anschließend in einem passenden Reagenz gelöst werden kann. Die Ergebnisse der SDS-PAGE und Western Blot Analyse sind dem Anhang, **Abbildung A. 6**, zu entnehmen. Dabei kann gesehen werden, dass die Präzipitat-basierte Expression und die anschließende Resuspension in den Detergenzen DDM sowie SDS erfolgreich war. Das Präzipitat-basierte System wurde zur schnellen und unkomplizierten Herstellung des Membranproteins gewählt, wobei dieses im Anschluss in einer gewünschten Umgebung resuspendiert werden kann und es keiner aufwendigen Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie bedarf. Als Kontrolle wurden identische, zellfreie Expressionen ohne Zugabe des entsprechenden Vektors durchgeführt. Diese zeigen in der Western Blot Analyse wie erwartet kein Produkt. Im SDS-Gel ist jedoch zu erkennen, dass die zellfrei hergestellten Proteine verglichen mit den zellulären Proteinen eine stärkere Verunreinigung aufweisen, bedingt durch die reduzierte Waschung des Präzipitats und folglich keiner vollständigen Aufreinigung. Dies beeinträchtigt im Folgenden die Konzentrationsbestimmung mittels UV-Vis-Spektroskopie, wie bereits in Kapitel 4.1.5.1 für C99 erläutert. Aus diesem Grund wurden stellenweise zusätzlich Western Blots mit FLAG-Antikörper als Kontrolle zur Verifizierung der relativen PSH-Konzentrationen herangezogen.

4.2.1 Zellextrakte und Zellmedium

Die Ergebnisse der rekombinanten Expression zeigten, dass im TB-Medium eine höhere Zelldichte erzielt werden konnte als im LB-Medium (Vergleich Kapitel 4.1.1). Aufgrund

dessen wurden die benötigten Zellextrakte zur Herstellung des zfPSH ebenfalls in diesem Medium kultiviert. Hierbei muss angemerkt werden, dass für die Herstellung der Extrakte meist das 2xYPTG-Medium (10 g/L Hefe Extrakt, 16 g/L Trypton, 5 g/L NaCl, 0.1 M Glucose, 4,4 mM KH₂PO₄, 8 mM K₂HPO₄) verwendet wird.^[237] Dieses Medium bietet im Gegensatz zum TB-Medium zusätzlich Glucose an, wodurch es eine weitere Kohlenstoffquelle für Bakterien bietet und somit das Zellwachstum unterstützt.^[238] In Anbetracht der Tatsache, dass die rekombinant exprimierten Proteine im TB-Medium kultiviert wurden, wurde dieses Medium ebenfalls für die Zellextrakte hinsichtlich der Vergleichbarkeit gewählt. Zudem zeigten erste Analysen einer von mir betreuten Masterarbeit, durchgeführt von **B. Sc. Franziska Krause**, dass die Ausbeuten für PSH in YPTG-Medium generierten Zellextrakten nahezu identisch zu jenen in TB-Medium ist (siehe Anhang **Abbildung A. 7**). Erste Analysen zur PSH-Aktivität in den Extrakten gewonnen aus YPTG ergaben allerdings eine Steigerung der proteolytischen Effizienz von 30 % auf 45 % (gegenüber TB) sowohl mit zellfrei, als auch mit rekombinant exprimierten Substrat C99. Nähere Studien hinsichtlich der PSH-Aktivität in diesen Zellextrakten müssen jedoch noch erfolgen.

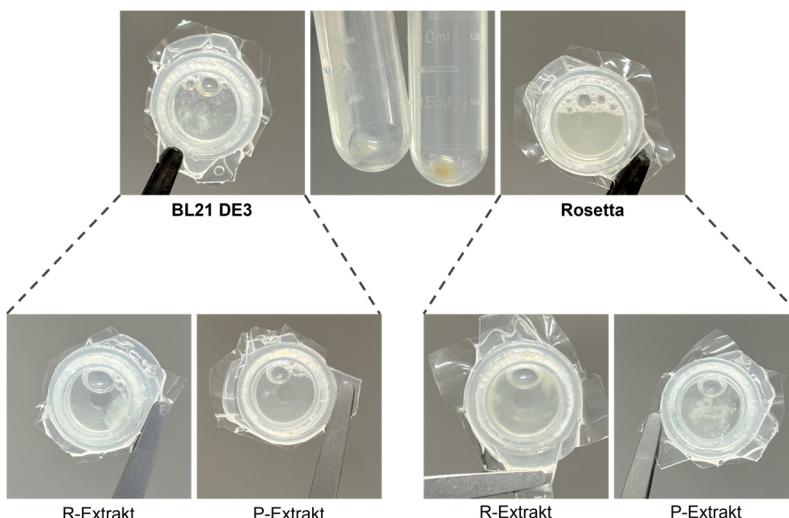


Abbildung 4.11 Reaktionscontainer der zfPSH. Unterscheidung zwischen BL21 DE3 und Rosetta Zellextrakten sowie in die weitere Untergliederung der R- und P-Extrakte.

Bei der Herstellung der Extrakte in TB-Medium wurden zwei unterschiedliche Zellstämme verwendet: Zum einen BL21 DE3, welche standardmäßig zur Proteinexpression verwendet werden und zum anderen Rosetta Zellen, welche speziell für die Expression von eukaryotischen Proteinen mit seltenem Codon entwickelt wurden. Wie **Abbildung 4.11** anhand der Präzipitat Bildung/Trübung zeigt, weist PSH in Rosetta Zellen eine gesteigerte Expression auf. Diese Beobachtung kann ebenfalls auf die PSH-Aktivität übertragen werden. In **Abbildung 4.12 (a)** ist ein Western Blot dargestellt, welcher den Unterschied in den Aktivitäten zwischen Rosetta- und BL21 DE3-Zellextrakt des zfPSH, sowie rekPSH aus TB- und LB-Medium verdeutlicht (Kontrolle Anhang **Abbildung A. 8**). Der beste Umsatz des Substrates kann mit rekPSH aus TB beobachtet

werden. Als Zweites folgt zfPSH, welches in Rosetta-Zellextrakten hergestellt wurde. Dieses weist mit 20 % proteolytischer Effizienz in etwa die Hälfte der möglichen Aktivität im Vergleich zur rekombinanten TB-Expression auf. Die Aktivitäten in BL21 DE3 Extrakt (zfPSH) sowie in LB (rekPSH) liegen bei durchschnittlich 5 % (siehe Abbildung 4.12 (b)).

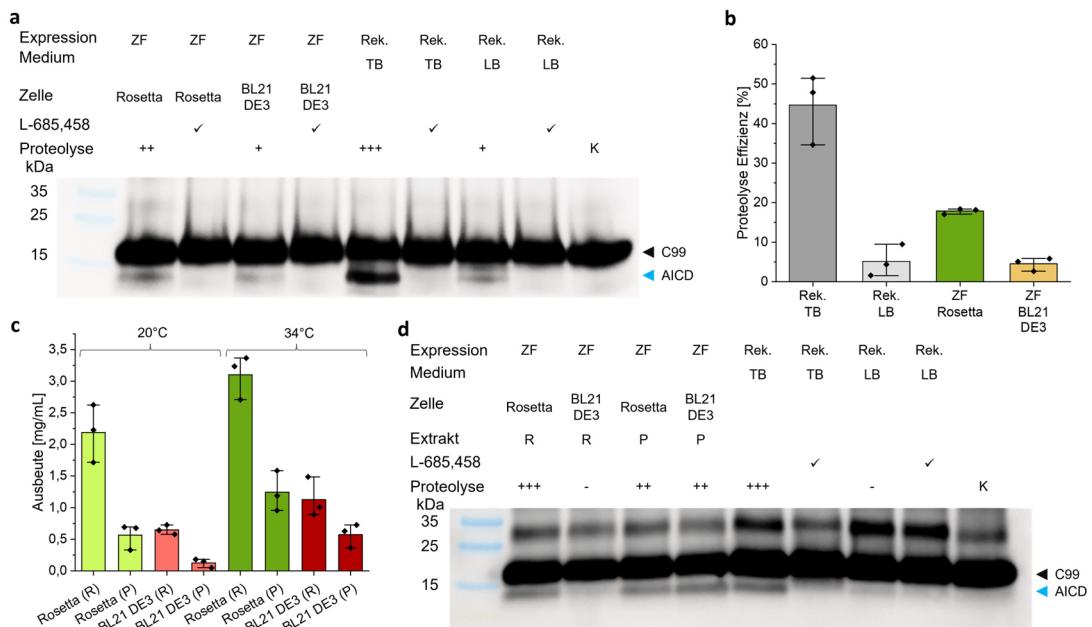


Abbildung 4.12 Zellfreie Proteinexpression von PSH in unterschiedlichen Zellextrakten mit anschließendem Proteolyse-Assay. **(a)** Vergleich der Proteolyse mittels Western Blot Analyse (APP-AK) von zfPSH in Rosetta und BL21 DE3 Zellen sowie der Vergleich mit rekPSH aus TB- und LB-Medium. AICD ist mit einem blauen und C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil markiert. **(b)** Graphische Darstellung der ausgewerteten Proteolyse Effizienz basierend auf (a) ($n=3$ technische Replikate). **(c)** Ausbeute der zfPSH in Rosetta und BL21 DE3 R- und P- Zellextrakten bei 20 °C und 34 °C. ($n=3$ technische Replikate) **(d)** Vergleich der Proteolyse mittels Western Blot Analyse (APP-AK) von zfPSH in Rosetta und BL21 DE3 Zellen; hier mit der Untergliederung in R- und P-Extrakt; sowie der Vergleich mit rekPSH in TB- und LB-Medium. AICD ist mit einem blauen und C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Die hergestellten Zellextrakte können zudem in zwei Varianten unterschieden werden: zum einen in den R-Extrakt, welcher bei der Herstellung weniger häufig zentrifugiert wurde und somit mehr Zellbestandteile enthält, und zum anderen in den P-Extrakt, welcher mehrfach zentrifugiert wurde. Die Ausbeuten zeigen (Abbildung 4.12 (c)), dass sowohl bei 34 °C als auch bei 20 °C Expressionstemperatur der Rosetta R-Extrakt am meisten zfPSH exprimiert. Dies ist der Grund, weshalb in den weiteren Studien dieser Extrakt zur Herstellung gewählt wurde, da nicht nur die Proteolyse, sondern ebenfalls die Optimierung der Ausbeute im Fokus stand. Doch auch der P-Extrakt zeigt in den Proteolyse-Assays einen guten Umsatz (vergleiche Abbildung 4.12 (d)) obwohl die Ausbeuten um etwa 2/3 geringer sind. Der P-Extrakt weist aufgrund seiner mehrfachen Zentrifugationsschritte weniger Zellkompartimente der Bakterien auf und gleicht somit dem S30-Extrakt, welcher bevorzugt für die zellfreie Expression von Membranproteinen verwendet wird.^[237, 239, 240] Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Faltung

des Transmembranproteins mit dem P-Extrakt effizienter erfolgen könnte. Aufgrund der deutlich geringeren Ausbeuten wurde allerdings zunächst auf den R-Extrakt zurückgegriffen. In künftigen Studien sollten daher zusätzlich P-Extrakte aus YPTG-Medium getestet werden. Dabei könnten nicht nur die Ausbeuten optimiert werden, sondern auch eine höhere Tendenz für die richtige Konformation das Ziel sein. Experimente der Detergens- und Lipid-basierten zellfreien Expression von PSH zeigten zudem im Rahmen der von mir betreuteten Masterarbeit ausgeführt von **B. Sc. Franziska Krause** erste positive Ergebnisse (siehe Anhang **Abbildung A. 9** sowie zusätzlich **Abbildung A. 10** für APP WT und C99), wobei weitere Studien in Hinblick auf die PSH-Aktivität ausstehen.

4.2.2 Magnesiumkonzentration

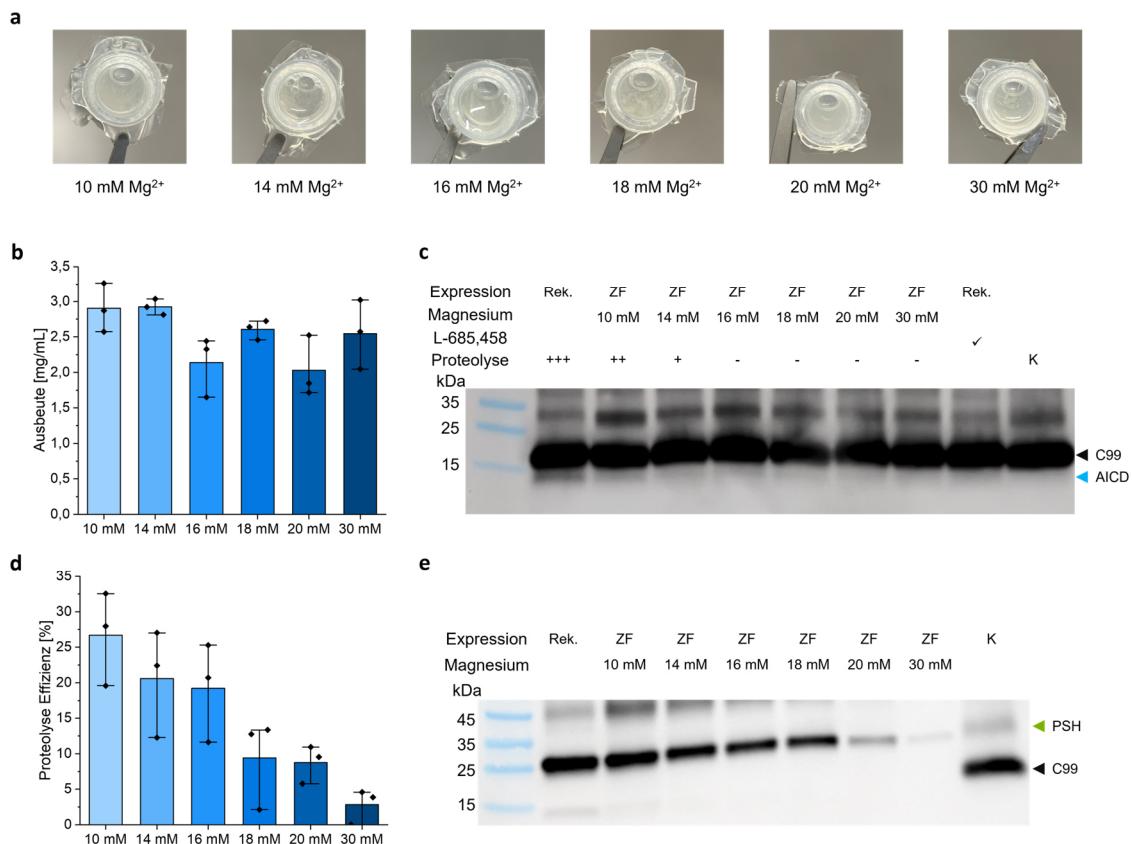


Abbildung 4.13 Magnesiumscreening der zellfreien Proteinexpression von PSH. **(a)** Reaktionsgefäß mit unterschiedlichen Mg²⁺-Konzentrationen, nach erfolgter Expression bei 34 °C über 20 h. **(b)** Ausbeute in mg/mL von zfPSH mit 10 – 30 mM Mg²⁺ (n=3 technische Replikate). **(c)** Western Blot Analyse der Proteolyse bei den getesteten Mg²⁺-Konzentrationen für zfPSH im Vergleich zu rekPSH (APP-AK). AICD ist mit einem blauen und C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil markiert **(d)** Darstellender Vergleich der proteolytischen Effizienz von zfPSH bei unterschiedlichen Mg²⁺-Konzentrationen (n=3 technische Replikate). **(e)** Western Blot der zfPSH als Kontrolle der Expression (FLAG-AK). PSH ist mit einem grünen Pfeil markiert, C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil.

Salze spielen bei der Proteinsynthese sowie der damit verbundenen korrekten Faltung und der Aktivität eines Proteins einen entscheidenden Faktor. Vor allem Magnesium

(Mg²⁺) hat hier einen essenziellen Beitrag.^[241-243] Mg²⁺ ist ein intrazelluläres Kation, dass in vielen enzymatischen Reaktionen eine Rolle spielt, insbesondere in solchen, an denen ATP beteiligt ist. In der zellfreien Proteinexpression wird es damit nicht nur für die Transkription und Translation benötigt, sondern auch für die Aktivierung der RNA-Polymerase und der Aminoacyl-tRNA Synthese.^[244]

Aufgrund dessen wurden für zfPSH Magnesiumkonzentrationen von 10 – 30 mM getestet. In **Abbildung 4.13 (a)** sind die Reaktionsgefäße nach erfolgreicher Expression abgebildet. Auf den ersten Blick sind keine nennenswerten Unterschiede anhand der Präzipitatmenge zu erkennen. In den Reaktionsgefäßen mit 16 mM, 20 mM und 30 mM Mg²⁺ könnte weniger Proteinpellet zu sehen sein, wobei die ermittelten Ausbeuten (**Abbildung 4.13 (b)**) diese Annahme bestätigen. Die maximal erreichten Konzentrationen liegen bei 2,9 mg/mL für 10 mM und 14 mM Mg²⁺, wohingegen bei 16 mM und 20 mM Mg²⁺ im Durchschnitt knapp über 2 mg/mL erzielt wurden. Die Expression bei 30 mM Mg²⁺ hat wie auch bei 18 mM Mg²⁺ eine Ausbeute von etwa 2,5 mg/mL. **Abbildung 4.13 (c) und (d)** (sowie im Anhang **Abbildung A. 11**) zeigen die proteolytischen Effizienzen mit den jeweiligen Magnesiumkonzentrationen ausgehend der Western Blot Analyse. Mit steigender Zunahme der Mg²⁺ Konzentration sinkt die Aktivität des Enzyms. Dies könnte mit der korrekten PSH-Faltung korrelieren. **Abbildung 4.13 (e)** zeigt einen Western Blot, welcher mit FLAG-Antikörpern detektiert wurde. Die eingesetzten PSH-Konzentrationen nach der Expression mit den entsprechenden Mg²⁺-Konzentrationen sind identisch gewählt worden. Wie sich herausstellte, weichen die eingestellten Proteinkonzentrationen signifikant von den detektierten ab, wie auch schon für das Substrat C99 beobachtet werden konnte (Vergleich Kapitel 4.1.5). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass PSH nicht in der korrekten Konformation vorliegt, wobei sich das C-terminale Ende von zfPSH in den POPC-Vesikeln nach innen gelagert haben könnte. Somit ist der Epitiope-Tag, welcher am C-terminalen Ende des Homologs lokalisiert ist, möglicherweise nicht zugänglich und folglich nicht detektierbar. Diese Fehlfaltung verändert zudem die Aktivität des Enzyms und inhibiert die Proteolyse-Effizienz. Aufgrund der Ausbeute und der standardisierten Anwendung wurden 14 mM Mg²⁺ zur weiteren PSH-Herstellung verwendet. Allerdings sollte eine größere Anzahl unterschiedlicher Mg²⁺-Konzentrationen sowie anderer Salze, insbesondere Kalium, untersucht werden, um eine weitere Optimierung der Ausbeute und eine Steigerung der Aktivität von zfPSH zu erreichen.

4.2.3 Expressionstemperatur

Die Konzentration von 14 mM Mg²⁺ aus den vorhergehenden Versuchen zeigte einen guten Mittelwert zwischen Ausbeute und Aktivität und wurde als Standardkonzentration festgelegt. Doch nicht nur die Salz-Konzentrationen spielen bei der Expression von Proteinen eine entscheidende Rolle. Neben Faktoren wie des einwirkenden Druckes oder chemischen Denaturierungsmitteln ist auch die gewählte Expressionstemperatur

4 Ergebnisse und Diskussion

wichtig für die korrekte Faltung eines Proteins.^[245, 246] Niedrigere Temperaturen können aufgrund der langsameren Proteinbewegung die Proteinfaltung dabei positiv beeinflussen. Aufgrund dessen wurden Expressionstemperaturen von 20 °C – 37 °C getestet, wobei die R-Zellextrakte aus BL21 DE3 sowie aus Rosetta Zellen verwendet wurden.

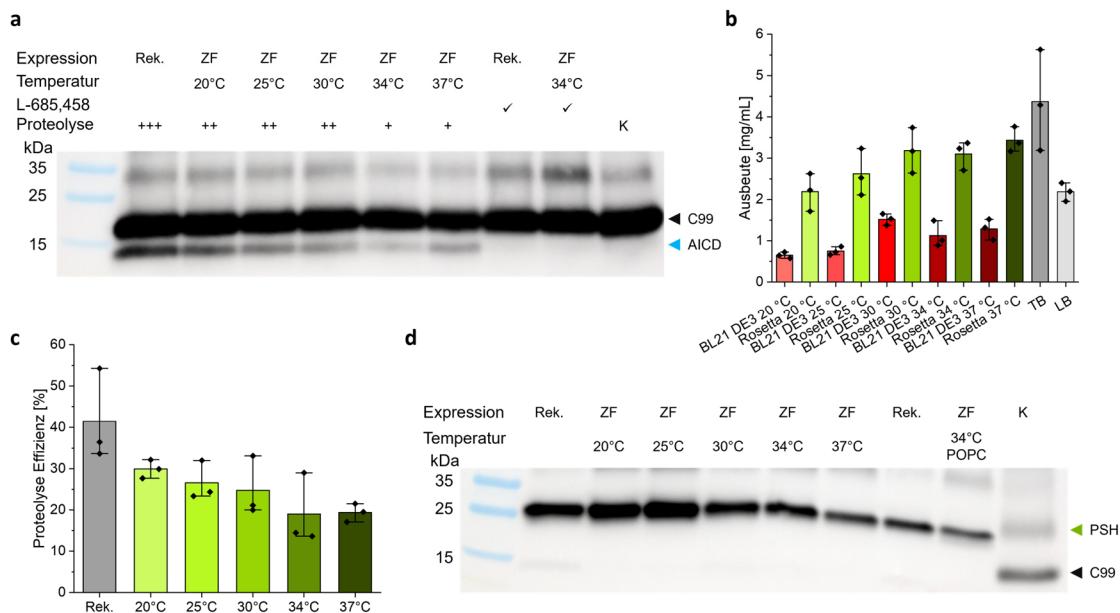


Abbildung 4.14 Vergleich der proteolytischen Effizienz von zfPSH, hergestellt bei unterschiedlichen Temperaturen. (a) Western Blot Analyse (APP-AK) von zfPSH hergestellt (Rosetta Zellen) bei Temperaturen von 20 °C- 37 °C im Vergleich zu rekPSH. Die AICD ist mit einem blauen Pfeil markiert, C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil. (b) Ausbeute des zfPSH in mg/mL in verschiedenen Extracten bei variierenden Temperaturen sowie Vergleich zu rekPSH (n=3 technische Replikate). (c) Zusammenfassung der proteolytischen Effizienz (Rosetta Zellen) (n=3 technische Replikate). (d) Western Blot (FLAG-AK) zeigt Differenzen zwischen den Konzentrationen der aufgetragenen PSH-Proben bei unterschiedlicher Expressionstemperatur. PSH ist mit einem grünen Pfeil markiert, C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil.

Die Ergebnisse sind in **Abbildung 4.14** zusammengefasst dargestellt. Wie dem Western Blot (**Abbildung 4.14 (a)**) entnommen werden kann, ist die beste PSH-Aktivität bei niedrigeren Expressionstemperaturen von 20 °C oder 25 °C gegeben (hier mit Rosetta Zellen). Die erhaltenen Ausbeuten an zfPSH sind allerdings durch die Reduktion der Temperatur reduziert (**Abbildung 4.14 (b)**). Die maximale Ausbeute in der zellfreien Proteinexpression zeigte zfPSH in Rosetta Zellen bei 37 °C mit 3,4 mg/mL. Im Vergleich dazu weist zfPSH aus Rosetta Zellen bei 20 °C die beste Aktivität mit lediglich 2,2 mg/mL Ausbeute auf. Die erhaltenen höheren Ausbeuten bei gesteigerter Expressionstemperatur scheinen dabei keinen Vorteil in der Umsetzung des Substrates zu bieten. Die korrekte Faltung der neun Transmembrandomänen des zfPSH und die damit einhergehende Aktivität könnte durch niedrigere Expressionstemperaturen gefördert werden (siehe **Abbildung 4.14 (c)**). Der in **Abbildung 4.14 (d)** dargestellte Western Blot wurde mittels FLAG-Antikörper detektiert und zeigt die vermeintliche Konzentrationsabnahme von zfPSH bei Zunahme der Temperatur. Wie bereits in Kapitel

4.2.2 wurden die identischen Konzentrationen ausgehend der UV-Vis-Messung aufgetragen. Dabei kann es zu Messfehlern aufgrund der Streuung an den DDM-Mizellen gekommen sein, in welchen PSH gelöst wurde. Allerdings müsste sich dies für alle gemessenen zfPSH-Proben herausmitteln, da jede Probe identisch hergestellt wurde. Es kann somit angenommen werden, dass wie zuvor beschrieben, der C-terminale FLAG-Tag durch Fehlfaltung für die Antikörperdetektion unzugänglich wird, weshalb eine Verringerung der Konzentration wahrgenommen wird. Diese angenommene Fehlfaltung korreliert wiederum mit der gemessenen Aktivität. zfPSH, welches bei 20 °C exprimiert wurde, weist etwa 30 % proteolytische Aktivität auf. Im Gegensatz dazu zeigt die Expressionstemperatur von 37 °C lediglich 20 % proteolytische Effizienz bei gleicher Konzentration.

Im direkten Vergleich zu zfPSH zeigt rekPSH sowohl eine höhere Ausbeute (4,4 mg/mL) als auch eine gesteigerte Aktivität (\pm 40 %). Dies wirft die Frage auf, weshalb sich die zellfreie Expression für dieses Enzym rentiert. In Anbetracht der Tatsache, dass die zellfreie Expression in 150 μ L Reaktionsgefäß erfolgt, während rekPSH aus 1 L TB-Medium gewonnen wird, sind die Ausbeuten und Aktivitäten durchaus akzeptabel. Gerade durch die schnellere Expressionsmöglichkeit der zellfreien Expression von zwei Tagen im Vergleich zur herkömmlichen rekombinanten Expression von fünf Tagen ist diese Methodik in Hinblick auf Screenings hervorzuheben. Durch die kurze Lagerdauer von PSH und dem damit einhergehenden Aktivitätsverlust ist eine schnellere Expression von Vorteil, welche zudem Material und Gerätekosten spart. Zudem bietet die zellfreie Expression ein weites Spektrum an möglichen Substanz-Veränderungen, wie der direkten Zugabe von Detergenzien. In Folgenden Studien ergeben sich somit zahlreiche Möglichkeiten, verschiedene Parameter zu verändern und gegebenenfalls zu optimieren.

4.2.4 Umsatzrate

Die γ -Sekretase weist, wie in Kapitel 4.1.4 dargestellt, einen unterdurchschnittlich langsamen Mechanismus auf. Auch rekPSH zeigte eine vergleichsweise langsame Prozessierung der Substrate. Um die proteolytische Aktivität des zfPSH zu verifizieren, wurden identische Assays durchgeführt. Dabei wurden R-Extrakte aus Rosetta- und BL21 DE3 Zellen verwendet und mit rekPSH aus TB- und LB-Medium verglichen.

Der langsame Schneidemechanismus des zfPSH ist aus den Ergebnissen in **Abbildung 4.15** ersichtlich. Wie den Western Blot Analysen entnommen werden kann, ist die Umsatzrate des zfPSH niedriger als die des Rekombinanten. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund von Konformations- und Faltungsproblemen nicht die gleiche Aktivität erzielt werden kann. So weist rekPSH aus TB-Medium eine proteolytische Effizienz von 48 % nach 65 Stunden auf, im Gegensatz zu 28 % mit zfPSH aus Rosetta Zellen (**Abbildung 4.15 (b)**). Die zfPSH aus BL21 DE3 Zellen zeigt eine

Effizienz von 23 % nach 65 h und rekPSH aus LB-Medium 29 %. Im Durchschnitt erhöht sich die proteolytische zfPSH-Effizienz um 12 % von 18 Stunden auf 65 Stunden Reaktionsdauer. Allerdings fehlen zur Validierung der Daten bislang weitere Analysemethoden wie eine Michaelis Menten Kinetik, um die genaue Umsatzrate k_{cat} ermitteln zu können. Nichtsdestotrotz zeigt dieses Ergebnis die Ähnlichkeit der unterschiedlich exprimierten Proteine in Bezug auf ihre Aktivität auf. Dadurch wurde bestätigt, dass die zellfreie Expression eine effiziente Alternative zur herkömmlichen rekombinanten Expression darstellt.

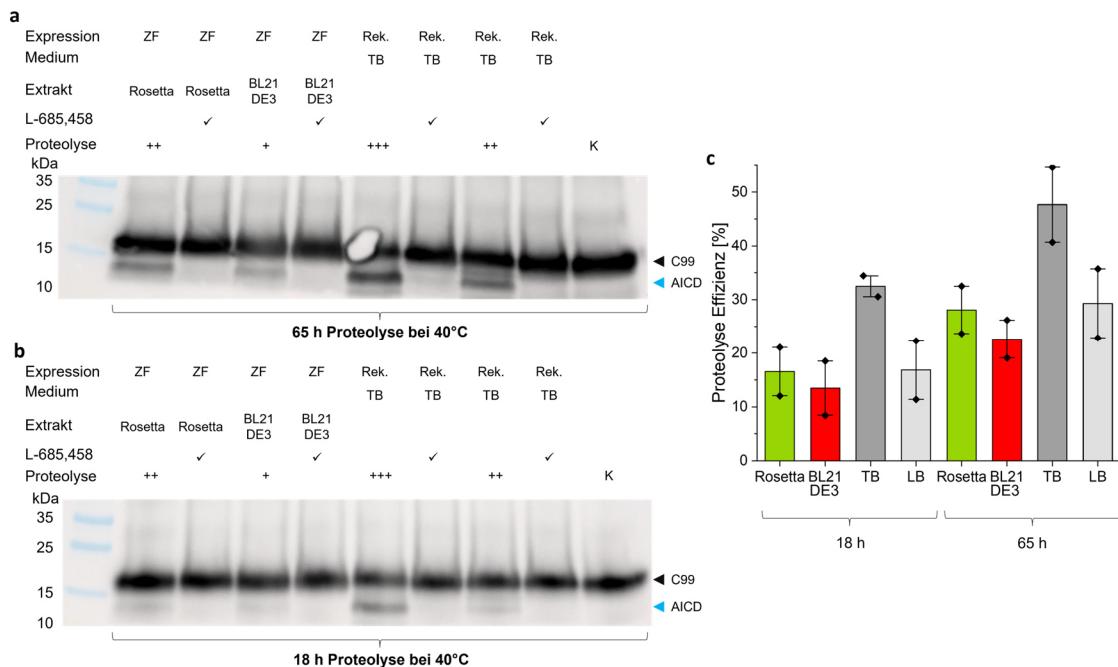


Abbildung 4.15 Veranschaulichung der Umsatzrate der Proteolyse mit der Zeit im Vergleich zwischen zfPSH und rekPSH. Gezeigt sind Western Blot Analysen der Proteolyse von C99 nach 65 h (**a**), sowie 18 h (**b**) durch zellfrei und rekombinant exprimierten PSH aus unterschiedlichen Zellextrakten und Medien. Die AICD ist mit einem blauen und C99 (K) mit einem schwarzen Pfeil markiert. (**c**) Proteolytische Effizienz der zfPSH (Rosetta, grün und BL21 DE3, rot) und rekPSH (TB, dunkelgrau und LB, hellgrau) bei 18 h und 65 h (n=2 technische Replikate).

4.3 Proteolytische Untersuchung mittels Kernspinresonanzspektroskopie

Da die proteolytische Spaltung der γ -Sekretase ein langsam ablaufender Prozess ist (Vergleich Kapitel 4.1.4), können mittels Kernspinresonanzspektroskopie Veränderungen der Peakintensitäten zeitaufgelöst verfolgt werden. Dies gibt aufgrund der chemischen Verschiebungen Aufschluss über lokale Änderungen der Substratstruktur sowie struktureller Eigenschaften einer Enzym-Substrat-Wechselwirkung.

Hierfür wurde PSH aufgrund der benötigten hohen Konzentration sowie erforderlicher Reinheit rekombinant in DDM exprimiert, über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend in einen Puffer mit **DPC** (Dodecylphosphocholin) (60 mM) überführt. Das verwendete Substrat APP mit einer Länge von 55 Aminosäuren und einem C-terminalen Linker sowie His-Tag, konnte durch zellfreie Proteinexpression vollmarkiert (^{15}N und ^{13}C , Vergleiche Kapitel 6.2.1) hergestellt und anschließend in deuteriertem $\text{DPC}_{\text{d}38}$ (30 mM) gelöst werden. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde DPC als membranähnliche Umgebung gewählt, da es eine Phosphocholinkopfgruppe besitzt, die eine Membrangrenzfläche darstellt und stabile Mizellen mit einem Radius von etwa 22 Å bildet. Die Mizellen können sich in Lösung frei bewegen und sind daher gut für NMR-Messungen geeignet.^[247-249] Zudem unterstützt DPC die rekonstitutive Rückfaltung fehlgefalteter Membranproteine^[250] und zeigt Ähnlichkeit zur hydrophoben Kopfgruppe realer Membranprotein Umgebungen. Die kritische Mizellbildungskonzentration liegt bei 1 mM^[251], wobei für NMR-Messungen höhere Konzentrationen verwendet werden.^[249]

Das Substrat APP wurde in einen Puffer bei pH 5,25 aufgenommen, welcher eine identische Zusammensetzung wie der in den Western Blot Analysen verwendete Puffer hat. Da APP in einem basischen pH-Bereich schnell zu Aggregationen neigte, wurde der pH-Wert von APP für die NMR-Messung zunächst auf pH 6,4 eingestellt, sodass es zu keinen drastischen chemischen Verschiebungen aufgrund des pH-Wertes nach PSH-Zugabe kommt. rekPSH wurde aus dem Elutions-Puffer in einen Puffer bei pH 8 überführt, da dieses bei saurem pH-Wert inaktiv ist. Durch Zugabe von DPC ergab sich ein pH-Wert von 6,65, bei welcher PSH nachweislich aktiv ist (Vergleich Kapitel 4.1.2).

In **Abbildung 4.16 (a)** ist das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der zellfrei hergestellten Transmembrandomäne des Substrates APP mit ^{15}N - ^{13}C -Vollmarkierung in DPC_{38} -Mizellen ohne PSH-Zugabe abgebildet. Die Zuordnung erfolgte mittels dreidimensionaler NMR-Experimente durch **Dr. Mara Silber**.^[65] Nach Hinzugabe von rekPSH zeigen die Peaks einen schwachen chemischen Shift (**Abbildung 4.16 (b)**). Dies ist auf den pH-Unterschied zwischen der reinen APP- und der PSH-Probe zurückzuführen, da diese nicht auf den exakt gleichen pH-Wert einzustellen waren.

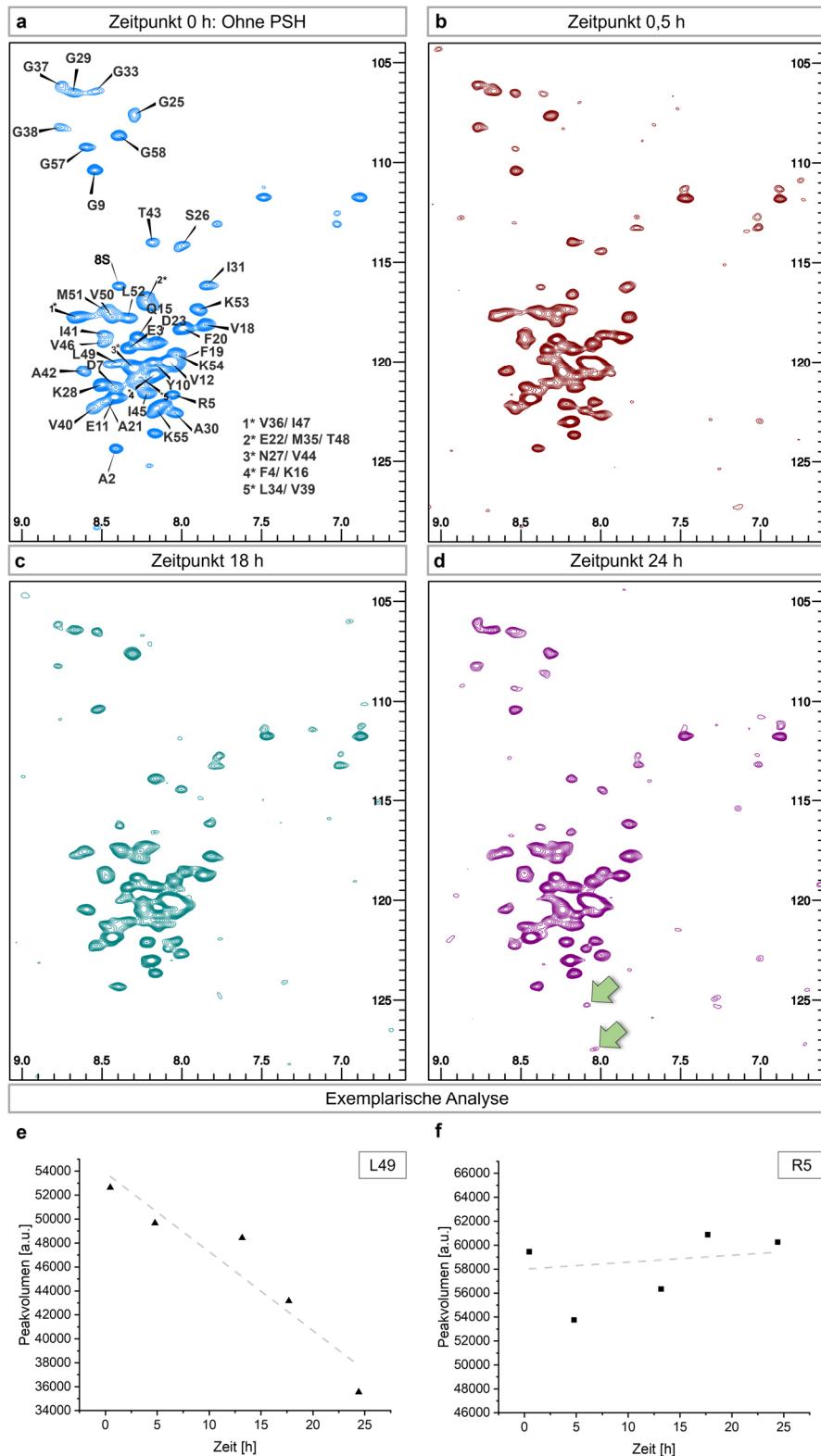


Abbildung 4.16 Proteolytische Untersuchung mittels NMR in einer DPC-Umgebung. **(a-d)** Die Spektren wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h (blau), 0,5 h (rot), 18 h (grün), 24 h (lila), bei 313K) vor und nach rekPSH-Zugabe zur APP Probe analysiert. Die mit Pfeilen markierten Peaks erscheinen nach einer Reaktionszeit von 24 h. **(e-f)** Die Beispielanalyse zeigt die exemplarische Abnahme des Peak-Volumen von L49 sowie keiner Abnahme von R5 über einen Zeitraum von insgesamt 24 h. Die Volumina schwanken stark aufgrund von Linienverbreiterung und zunehmender Verschlechterung des Signal-zu-Rauschen.

Die eindimensionalen NMR-Experimente (Anhang **Abbildung A. 12** und **Abbildung A. 13**) zeigen dabei keine Auffälligkeiten in Hinblick auf eine drastische pH-Wert Veränderung. Bei einem stärkeren pH-Shift gibt es Verschiebungen der NH-Bereiche (Tieffeld, 7,5-9 ppm), jedoch nicht im aliphatischen Bereich (Hochfeld, 0-4 ppm). Im zeitlichen Verlauf weisen die Peaks weiterhin schwache Verschiebungen auf, was auf strukturelle Veränderungen hindeuten könnte.

Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten sind in **Abbildung 4.17** verdeutlicht. Hier ist die Störung der chemischen Verschiebung (**CSP**, engl. *Chemical Shift Perturbation*)^[116, 252] exemplarisch für die einzelnen Zeitpunkte ($\Delta\delta$ 4 h, $\Delta\delta$ 13 h, $\Delta\delta$ 17 h, $\Delta\delta$ 24 h) aufgetragen. Ausgangswert ist das erste Spektrum nach PSH-Zugabe (0,42 h). Dabei werden die chemischen Verschiebungen der ^1H sowie ^{15}N der jeweiligen Spektren voneinander subtrahiert und nach Formel [11], Kapitel 1.2.3.1, berechnet.^[116] Wie aus der **Abbildung 4.16** entnommen werden kann, weisen einige Peaks, vor allem in der Transmembrandomäne, schwache chemische Verschiebungen auf. Aufgrund des bekannten Schneidemechanismus der γ -Sekretase wird eine Veränderung um die Schnittstelle L49/V50 angenommen. Eine signifikante Modifikation der initialen Schnittstelle ist jedoch nicht ersichtlich. L49 weist lediglich Schwankungen in den Shift-Differenzen auf.

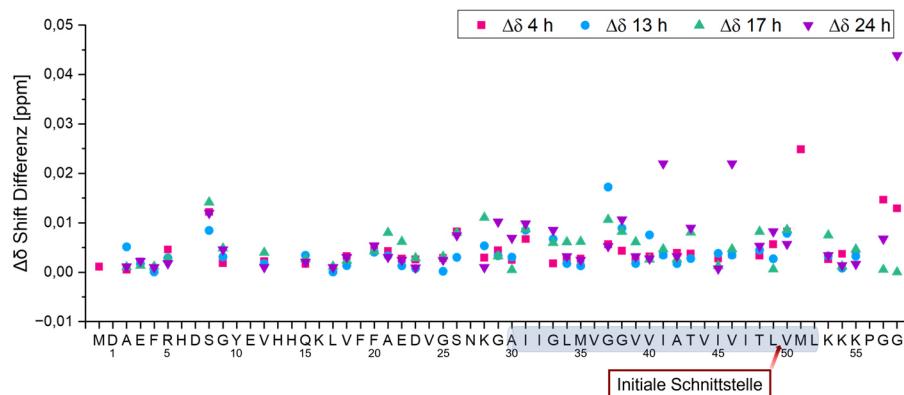


Abbildung 4.17 Störung der chemischen Verschiebungen nach unterschiedlichen Zeitpunkten. ($\Delta\delta$ 4 h, Viereck pink; $\Delta\delta$ 13 h Kreis blau; $\Delta\delta$ 17 h Dreieck grün; $\Delta\delta$ 24 h Dreieck lila). Gezeigt sind hier die Differenzen der Spektren vom Ausgangszeitpunkt 0,42 h in Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen (^1H und ^{15}N) der Aminosäurereste. Die initiale Schnittstelle L49 der γ -Sekretase ist markiert.

Die chemischen Verschiebungen, welche nach knapp 24 h beobachtet wurden, lassen darauf schließen, dass eine Art der Interaktion zwischen PSH und APP nach längerer Zeit stattfinden könnte. Dabei ist fraglich, wie lange Enzym und Substrat in ihrer jeweiligen DPC-Umgebung brauchen, um aufeinander zu treffen und in einer der Mizellen miteinander interagieren zu können. Ausgehend der erhobenen Daten kann angenommen werden, dass eine signifikante strukturelle Änderung in der Transmembrandomäne vorliegt. Das Signal von L49 verliert zunehmend an Intensität (siehe **Abbildung 4.16 (e)**), sowie auch V50, welches auf die initiale Schnittstelle folgt.

R5 hingegen zeigt keine Veränderung der Intensitäten, welches außerhalb der TMD N-terminal lokalisiert ist. Hierbei muss allerdings angemerkt werden, dass eine eindeutige Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Aminosäureresten durch Überlagerungen oder einen primären pH-Shift erschwert waren. Dabei sind die Aminosäuren der Transmembrandomäne E22 und M35, N27 und V44, L34 und V39, V36 und I47, I41 und V46 überlagert. Eine eindeutige Zuordnung der Signale I32 und L52 ist zudem in den vorliegenden Daten nicht möglich. Dies liegt entweder daran, dass die betreffenden Signale verschoben sind, sodass eine Zuordnung erschwert wurde, oder daran, dass sie aufgrund zu starker Dynamiken und veränderter Relaxationszeiten nicht mehr im Spektrum vorhanden sind (hauptsächlich bezogen auf den N-Terminus mit den Resten F4 und L17 sowie D7, Y10, E11, K16, F19, A21 und V24).

Die HSQC-Spektren ab dem Zeitpunkt 24 h zeigen zudem Veränderungen der Signalintensitäten der Aminosäuren G57 und G58 des zugefügten C-terminalen Linkers, welche allmählich aus dem Spektrum verschwinden, doch nach längerer Zeit wieder an Intensität zunehmen. Dies kann auf Dynamiken der C-terminalen Aminosäuren hindeuten, wodurch die Relaxationszeiten der Kerne variieren. Auch eine Möglichkeit ist, dass durch fehlerhafte Einlagerung des APP in das aktive Zentrum von PSH diese Signale aufgrund von Abschirmungen nicht mehr sichtbar sind. Nachdem APP aus dem Enzym-Substrat-Komplex austritt, kann das C-terminale Fragment wieder frei in Lösung sein, wodurch die Signale erneut auftreten können. Allerdings fehlen bislang weitere Analysemethoden, sowie vielfaches Wiederholen des Experiments, um diese Thesen zu stützen. Außerdem könnte es sich hierbei um Artefakte handeln, da mit Zunahme der Zeit auch das Signal-zu-Rausch Verhältnis stark abnimmt.

Des Weiteren konnten zwei Signale (siehe Pfeile in **Abbildung 4.16 (d)**) beobachtet werden, deren Auftreten mit einer Intensitätszunahme im Zeitverlauf einhergeht. Dies ist ab einem Zeitpunkt von 24 Stunden ersichtlich. N. Clemente et al. konnten in einer NMR basierten Proteolyse Studie ebenfalls das Aufkommen von neuen Signalen zwischen 122-130 ppm beobachten, was auf eine erfolgreiche Umsetzung des Substrates hindeuten könnte.^[89] Dadurch entstehen neue, kurze C-terminale Fragmente, welche eine andere chemische Verschiebung aufweisen als die APP TMD. Die zusätzlich auftretende allgemeine Linienverbreiterung lässt auf einen intermediären oder langsamen Austausch zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand von Enzym und Substrat schließen. Des Weiteren sind Konformationsänderungen des Substrats denkbar, bevor es zu einer Interaktion mit PSH kommen kann. Wie bereits gezeigt wurde, winden sich die Substrate der γ -Sekretase in ein β -Strang auf, bevor sie prozessiert werden können. Folglich kann die Linienverbreiterung auch auf eine Neuordnung des Enzym-Substrat-Komplexes während oder nach der Interaktion hindeuten.^[116]

N. Clemente et al.^[89] demonstrieren in ihrer Studie den Schneidevorgang der V44M Mutante durch PSH. Dabei entstand eine starke CSP von K28, die in der hier vorliegenden Arbeit bedingt bestätigt werden konnte. K28 zeigt vor allem nach $\Delta\delta$ 17 h einen stärkeren Shift als die anderen Aminosäuren, jedoch keine eindeutige Veränderung wie N. Clemente et al. es postulieren. Außerdem konnten sie höhere CSP am C-Terminus K53-K55, sowie an T48 und L49 beobachten. Diese Erkenntnisse decken sich zum Teil mit den hier erhobenen Daten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass N. Clemente et al. die These aufgestellt haben, dass APP als Dimer von PSH umgesetzt wird. APP neigt unter verschiedenen Bedingungen zur Dimerisierung, deren Mechanismus bis dato nicht vollständig geklärt ist.^[253] Die Umsetzung als Dimer wird mit dem Fehlen von CSP an der Dimer-Oberfläche begründet (mögliche Dimerisierungsmotive: G25xxxG29, G29xxxG33, G33xxxG37). Diese Annahme wurde von der Arbeitsgruppe bisher jedoch nicht durch weitere Experimente bestätigt. In dieser Arbeit können keine detaillierten Aussagen zu der Dimer-Bildung oder Umsetzung von APP als Dimer getroffen werden, da ebenfalls weitere Daten zur Validierung fehlen. Allerdings konnten ebenfalls K. Nadezhdin et al. zeigen, dass APP in einer DPC-Umgebung ein linkshändiges paralleles Dimer^[233] mit dem Motiv I31xxxM35xxG38xxxA42xxI45xxxL49xxL52 ausbildet. In ihrer Studie demonstrieren sie darüber hinaus, dass die chemischen Verschiebungen von M35 und G38 hervorstechen, was als leichte Krümmung der Reste von I31-I41 interpretiert werden kann und folglich auf eine Dimerisierung hindeutet. Die Analyse der vorliegenden Spektren zeigt eine leichte Verschiebung des G38 sowie Veränderungen in den Intensitäten, wobei diese mit der Zeit geringer werden. Zudem scheint die CSP im Bereich des postulierten Dimers stärker zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich auch hier nach einer gewissen Zeit in DPC-Mizellen ein APP-Dimer ausgebildet haben könnte.

Eine abschließende Beurteilung des Erfolgs der Proteolyse unter NMR-Bedingungen ist jedoch nicht möglich, da sich zwar Veränderungen in den Spektren zeigen, die auf eine erfolgreiche Umsetzung hindeuten könnten, allerdings könnte dies auch auf die Ausbildung eines APP-Dimers nach einer gewissen Zeit zurückgeführt werden oder schlichtweg auf Artefakte. Western Blot Analysen der Proteolyse können keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielen, da das geschnittene Fragment eine zu geringe Molekularmasse besitzt. Wiederholungen des Experiments sind daher unerlässlich, ebenso wie der Einsatz zusätzlicher Analysemethoden wie der Massenspektrometrie zur Kontrolle der geschnittenen Fragmente.

4.4 Proteolytische Untersuchung mittels Fluoreszenzpolarisationsmessungen

Im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von **M. Sc. Julia Flum** entwickelte diese unter meiner Anleitung eine Methode zur Weiterentwicklung des Proteolyse-Assays mittels Fluoreszenzpolarisationsmessungen. Das Ziel war hierbei die Untersuchung der Proteolyse durch ein Verfahren, welches die zeitabhängige Umsetzung der Substrate darstellen sollte. Fluoreszenzpolarisation (**FP**) bietet den Vorteil selektive Wechselwirkungen in Echtzeit verfolgen zu können, wobei die zu untersuchenden Proben durch die Auswahl eines passenden Fluorophors nicht beeinträchtigt werden (Siehe Kapitel 1.5.3).^[254] Die hervorzuhebenden Ergebnisse des Fluoreszenzpolarisations-Assays werden folgend in Kürze zusammengefasst dargestellt.

Als Enzym wurde rekPSH gewählt, da die bislang generierten Ausbeuten und Aktivitäten im direkten Vergleich mit zfPSH am höchsten waren. Der verwendete Fluorophor war hierbei **DMA** (3-(2-[4-(Dimethylamino)-phenyl]-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)-L-Alanin),^[255, 256] welcher von **M. Sc. Julia Flum** mit Hilfestellung des Kooperationspartners Dr. Serhii Koniev unter Anleitung von Dr. Sergii Afonin synthetisiert wurde. Ausgangsstoff der Synthese war die Aminosäure L-Tyrosin, bei welcher die Seitenkette zu einer 3-Hydroxyflavon-Gruppe verlängert wurde, welche eine elektronenabgebende Dimethylaminogruppe beinhaltet.^[257] Der Fluorophor wurde weiterhin an synthetisch hergestelltes APP der Länge S26-K55 gekoppelt, wobei eine Interaktion mit rekPSH erfolgte. Eine erfolgreiche Proteolyse dieses Peptids sollte zu einer Abnahme der Fluoreszenzpolarisation durch die Erhöhung der Molekülrotationen führen.

Abbildung 4.18 zeigt einen Ausschnitt der ersten Ergebnisse des Fluoreszenzpolarisations-Assay mit rekPSH. Der Assay basiert auf den etablierten Analysen, beschrieben in Kapitel 4.1, wobei der Unterschied neben der gewählten Analysemethode in der synthetisch hergestellten APP-Transmembrandomäne liegt, welche mit dem Fluorophor DMA gekoppelt ist. Diese wurde nach erfolgter Synthese mittels RP-HPLC sowie Ether-Waschung aufgereinigt und anschließend aufgrund der starken Hydrophobizität zunächst in **DMSO** (Dimethylsulfoxid) gelöst. Die weiteren Komponenten des Assays, wie der Puffer und die Umgebung der Proteine, wurden identisch zu den bereits erläuterten Analysen gewählt. rekPSH wurde in POPC-Vesikeln rekonstruiert und das Substrat APP konnte für die Interaktion in SDS aufgenommen werden (DLS-Messungen in POPC-, SDS- und DDM-Umgebung siehe Anhang **Abbildung A. 1**). Die erfolgreiche Fluoreszenzpolarisationsmessung der Proteolyse kann **Abbildung 4.18 (a)** entnommen werden. Gemessen wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen an fluoreszenzgekoppelten-APP von 0,5 µM und 1 µM mit 2 µM PSH, jeweils in Triplikaten über einen Zeitraum von 19 h, wobei die FP deutlich abnimmt.

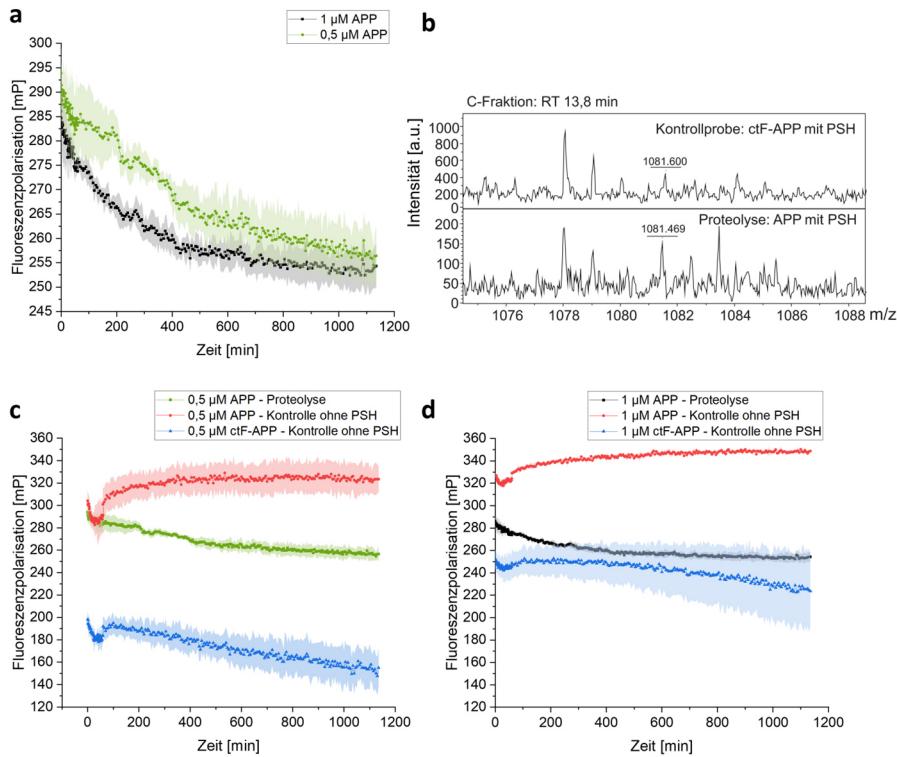


Abbildung 4.18 Auswertung des Proteolyse-Fluoreszenzpolarisations-Assays von APP TMD mit DMA als Fluorophor und rekPSH als Protease. **(a)** Fluoreszenzpolarisations-Messung des Proteolyse-Assays mit 0,5 µM und 1 µM APP mit jeweils 2 µM rekPSH ($n=3$ technische Replikate). **(b)** Repräsentative massenspektrometrische-Analyse der Proteolyse-Fluoreszenzpolarisationsmessung mit 1 µM APP zeigt entstandenes C-terminales Fragment bei 1081 Da. **(c)/(d)** Kontrolle der Proteolyse-Fluoreszenzpolarisationsmessung mit 0,5 µM und 1 µM APP. Gezeigt ist die Proteolyse (grün (c) und schwarz (d)), die Kontrolle der Proteolyse-Umgebung mit APP ohne rekPSH (rot) und das synthetische C-terminale Fragment des APP ohne PSH (blau) ($n=3$ technische Replikate).

Die Abnahme der FP deutet auf eine Produktion des C-terminalen Spaltproduktes (hier als **ctF-APP** bezeichnet) des APP durch erfolgte Proteolyse mittels PSH hin. Die Aufnahme eines **MALDI-TOF**-Massenspektrums (engl. *Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization Time-of-Flight*) von einer Kontrollprobe und der eigentlichen Proteolyse-Messung (**Abbildung 4.18 (b)**) bestätigen diese Annahme. Die Kontrollprobe besteht aus dem ebenfalls synthetisch hergestellten ctF-APP gekoppelt an den Fluorophor DMA, welches das initiale Spaltprodukt der Länge L49-K54 repräsentieren soll. Dieses besitzt eine Masse von 1081,130 Da und kann im MALDI-TOF-Spektrum der Proteolyse eindeutig lokalisiert werden.

Die parallel zur Proteolyse durchgeführten Kontrollmessungen des Peptids, sowie des synthetischen ctF ohne PSH-Zugabe zeigen abweichende FP-Intensitäten im Vergleich zur tatsächlich geschnittenen Probe (Vergleich **Abbildung 4.18 (a)** mit **Abbildung 4.18 (c)+(d)**). Die APP-Kontrolle ohne die PSH-Zugabe zeigt eine Intensitätszunahme mit der Zeit. Dies kann auf erfolgreiche Inkorporation in die POPC-Vesikel hindeuten, welche dem System zugefügt sind und die Rotationsbewegung des Moleküls dadurch verlangsamen. Das C-terminale kurze Fragment hingegen zeigt aufgrund der insgesamt

freieren Rotationsmöglichkeiten eine niedrigere Fluoreszenzpolarisation als die Proteolyse. Die stetige Abnahme der FP der Kontrollen mit der Zeit kann allerdings auf eine nicht gewünschte Reduzierung der Lebensdauer des Fluorophors hindeuten. Auch besteht die Möglichkeit, dass es durch die hohe Anzahl an Einzelmessungen zu Photobleaching kam, wodurch die Fluorophor-Moleküle aufgrund des andauernden Anregungslichtes photochemisch zerstört werden und folglich die Fähigkeit zur Fluoreszenz verlieren. Zudem ist es nicht auszuschließen, dass APP Aggregate bildete, welche ebenfalls die FP reduzieren könnten. Dies vermindert bislang die Aussagekraft des entwickelten Assays.

In künftigen Studien wäre es somit sinnvoll auf einen anderen Fluorophor wie beispielsweise **BODIPY**^[258] (5,5-Difluoro-5H-4λ5-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diaza-borinin-4-ylum-5-uide) mit einer erhöhten Lebensdauer zurückzugreifen. Auch ist die Wahl einer passenden Membran-Umgebung zu überdenken, da aktuell PSH in POPC mit APP in SDS reagieren muss. Eine einheitliche Umgebung wäre für die mögliche Interaktion von Vorteil, sodass es Enzym und Substrat leichter fällt sich zu treffen und eine Interaktion einzugehen. Es wurden bislang Messreihen getätigt (Anhang **Abbildung A. 14**), in welcher die Substrate in DMPC, POPC oder DMSO gelöst wurden. Dabei konnte ein abweichendes Polarisationsverhalten beobachtet werden, wobei ein Optimum für die FP-Messungen ermittelt werden muss. Die Substrate in DMSO zeigen eine niedrigere FP als in DMPC oder POPC, wohingegen sich die Lipide in ihrem Polarisationsverhalten nur geringfügig unterscheiden. Wie bereits in Kapitel 4.1.1 erwähnt, kann DMPC in Verbindung mit DHPC eine Disk-ähnliche Bizelle ausbilden, welche eine Membran besonders gut widerspiegelt. Dies wäre für eine realitätsnahe Untersuchung der Proteolyse Mechanismen wünschenswert. In DMPC konnten bereits erfolgreiche Proteolysen mittels Immunoblot nachgewiesen werden (Kapitel 4.1.1). Die Analyse in DHPC/DMPC Bizellen muss allerdings in kommenden Studien noch durchgeführt werden. Zudem sind etliche Pufferkomponenten dem Assay hinzugefügt, wobei das Verhalten jeder einzelnen Substanz in der empfindlichen Umgebung noch nicht geklärt ist. Zusammenfassend ist jedoch der Erfolg der Fluoreszenzpolarisationsmessung der Proteolyse hervorzuheben.

5 Fazit und Ausblick der proteolytischen Untersuchung

Der erste Teil der Arbeit fokussierte sich auf die rekombinante und zellfreie Proteinexpression von PSH sowie dessen proteolytische Aktivität. Das Waschen der zellfrei hergestellten Protein-Präzipitate wurde anstatt einer zeitintensiven Aufreinigung über Affinitätschromatographie zur schnellen und unkomplizierten Benutzung der Proteine gewählt. Dabei zeigten sich die optimalen Expressionsbedingungen in den aus TB-Medium generierten R-Extrakten mit 10-14 mM Mg²⁺ sowie eine Expressionstemperatur von 20 °C. Die korrekte Faltung des Transmembranproteins wird dabei durch die Rekonstruktion in POPC-Vesikeln unterstützt. zfPSH wies eine vergleichbare Aktivität zu rekPSH in den durchgeführten Proteolyse-Assays auf.

Abschließend kann hervorgehoben werden, dass das schwierig zu exprimierende Transmembranprotein PSH erfolgreich mittels zellfreier Proteinexpression hergestellt werden konnte. Dies ist vor allem zukünftig für mögliche Screening-Anwendungen von Vorteil, da bei den zellfreien Expressionen in einem kostengünstigeren und vor allem zeiteffizienteren Maßstab gearbeitet werden kann. Ebenfalls gelang es das Substrat C99 und dessen Mutanten neben rekombinanter Expression erfolgreich zellfrei herzustellen. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit in einem einfachen System in kurzer Zeit eine Vielzahl an Substraten herzustellen und deren Schneideeffizienzen durch PSH zu testen. Allerdings sollten in folgenden Studien weitere Expressionsmedien, wie YPTG in Betracht gezogen werden, sowie die Expression in P-Extrakten, da sich hier eine möglicherweise optimierte Faltung der Membranproteine zeigte. Außerdem stehen weitere Studien mittels Detergens- und Lipid-basierter zellfreier Proteinexpression für PSH und das Substrat aus, um diese direkt in eine passende Umgebung für Membranproteine zu integrieren.

PSH erwies sich zusammenfassend als sehr umgebungssensibles Protein, welches auf verschiedene Änderungen, wie des pH-Wertes oder der Temperatur, stark reagierte. Dabei kam es zu Veränderungen der Konformation sowie der Aktivität. Die Ausbildung einer aktiven Konformation schien zudem nur in einem geringen Maß gegeben, wie bereits für die humane γ-Sekretase beobachtet werden konnte. Das Präsenilin der γ-Sekretase und PSH sind sich dabei in ihrer Struktur und der katalytischen Aktivität sehr ähnlich, unterscheiden sich allerding in der Prozessierung ihrer Substrate. In Proteolyse-Assays mit dem Substrat C99 sowie den FAD Mutanten V44M und I45T sowie den Di-Glycin Mutanten G38P und G38L wurden unterschiedliche Präferenzen beobachtet. G38P und I45T werden im Vergleich zur humanen γ-Sekretase besser von der PSH prozessiert, wohingegen V44M und G38L schlechter geschnitten werden. Dies kann auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen sein, sowie auf die Fähigkeit mit den Substraten zu interagieren. Nichtsdestotrotz stellt PSH ein gutes Modell-Substrat zur

Erforschung der Substratinteraktionen dar, um langfristig mögliche Arzneimittel für Alzheimer entwickeln zu können.

Die Weiterentwicklungen der Immunoblot basierten Assays hingehend zu zeitaufgelösten Varianten konnten ebenfalls erfolgreich Rückschlüsse auf die Prozessierung der Substrate liefern. Die NMR basierte Variante zeigte Änderungen in den aufgenommenen Spektren sowie in den chemischen Verschiebungen mit der Zeit. Das Aufkommen neuer Peaks sowie die gezeigten CSP können für eine erfolgreiche Proteolyse sprechen. Aufgrund der starken Verschlechterung des Signal-zu Rauschen ist die Aussagekraft des Assays momentan allerdings herabgesetzt. Somit bedarf es weiterer Entwicklung hingehend zur Optimierung der Randbedingungen. Nicht nur DPC sollte als Membranmimetikum in Betracht gezogen werden, sondern auch Bizellen oder Nanodisks können verwendet werden, um die Membranumgebung noch besser abbilden zu können. Dabei muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass Enzym und Substrat Zeit benötigen, um sich zu treffen und miteinander interagieren zu können. Zudem sollten die Pufferkomponenten auf ein Minimum reduziert und die pH-Werte der Proben angepasst werden, sodass Einflüsse dessen ausgeschlossen werden können. Ebenfalls könnte selektives Fluor-markieren von einzelnen Aminosäuren von PSH dazu verwendet werden, in Flüssig- wie auch Festkörper-NMR lokalisationspezifische Änderungen bei Substratinteraktion wahrnehmen zu können. PSH ist aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zum γ -Sekretase-Komplex mit NMR-Methoden messbar. Ein Ansatz besteht darin, einzelne Aminosäuren der PSH-Sequenz in ein Cystein zu mutieren, wobei diese Reste mit Fluor markiert werden können. Aufgrund des zweithöchsten gyromagnetischen Verhältnisses nach ^1H weist ^{19}F eine besonders hohe Nachweisempfindlichkeit für NMR-Experimente auf. Aufgrund des weiten chemischen Verschiebungsfeldes (> 400 ppm) reagiert ^{19}F sehr sensibel auf kleine Änderungen in der chemischen Umgebung des zu untersuchenden Moleküls. Dadurch ermöglicht die Fluor-NMR eine effiziente Untersuchung verschiedener biologischer Prozesse wie Ligandenbindung, Dynamik und Proteinfaltung.

Die zweite Variante des zeitaufgelösten Assays brachte erste vielversprechende Ergebnisse. Die Fluoreszenzpolarisation zeigte eine Abnahme der Polarisation bei Interaktion mit PSH, wodurch auf eine erfolgreiche Proteolyse geschlossen werden kann. Die Kontrollproben ohne Zugabe von PSH ergaben keine Abnahmen der Polarisationen und bestätigten somit die Proteolyse. Damit ist es möglich, viele verschiedene Bedingungen für die Proteolyse parallel untersuchen zu können. Doch auch hier muss die Analysemethode in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit überarbeitet werden, da die einzelnen Messungen zum Teil eine große Variabilität zeigten. Dabei könnte beispielsweise die Verwendung eines anderen Fluorophors wie BODIPY von Vorteil sein. DMA weist eine sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer auf, welche die Messungen negativ beeinträchtigen könnte. Wie auch in der NMR sollten die Pufferkomponenten eingegrenzt werden, um das gesamte System zu vereinfachen.

Zusammengefasst stellt diese Analysemethode jedoch eine gute Möglichkeit dar in Zukunft den Erkennungs- und Schneidemechanismus von Enzym-Substrat-Komplexen wie der γ -Sekretase zeitabhängig verfolgen zu können.

TEIL B - Strukturanalyse von γ - Sekretase Substraten

6 Ergebnisse und Diskussion

Das Wirkungsspektrum der γ -Sekretase ist vielfältig. Es erstreckt sich über zahlreiche Substrate, die beispielsweise eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, der Signaltransduktion sowie dem Proteinabbau spielen. Zuletzt postulierte unter anderem die Arbeitsgruppe um Y. Shi, dass ein Substrat drei Eigenschaften benötigt, um geschnitten zu werden: eine α -Helix, welche von der Präsenilin Untereinheit aufgenommen wird, einen Linker von drei Aminosäureresten, sowie ein β -Strang-Motiv, welches die Substratspaltung leitet. Zudem sind die Aminosäurereste der Substrate an der Schnittstelle entscheidend, ob und in welcher Prozessionskette ($A\beta49/A\beta48$) geschnitten wird. Valin und Leucin sind dabei bevorzugt an der Schnittstelle lokalisiert, wie bereits mehrere Gruppen zeigen konnten.^[82, 259, 260]

Im Folgenden soll auf die Charakterisierung von unterschiedlichen Substraten sowie einem Nicht-Substrat eingegangen werden, um die Erkennung und Prozessierung der γ -Sekretase noch besser verstehen und die bereits gewonnenen Erkenntnisse auf dem Forschungsgebiet vergleichen zu können. Neben der Generierung von Strukturinformationen war ein weiteres Ziel die Transmembrandomäne-Sequenzen der Substrate in wiederkehrende Motive zu untergliedern, welche für eine mutmaßliche Erkennung der Sekretase sprechen könnten. In diesem Zusammenhang erfolgt für jedes Protein eine kurze Einführung über die Prozessierung mittels γ -Sekretase und anschließend die experimentelle Auswertung.

6.1 Strukturuntersuchungen in TFE-d₂/H₂O

Die vorliegenden Ergebnisse wurden auf Grundlage der von **Dr. Mara Silber**^[65] angefertigten Dissertation aus dem Jahr 2021 erhoben und durch erneute Wasserstoff-Deuterium-Austauschmessungen sowie Strukturrechnungen an weiteren Substraten und einem Nicht-Substrat ergänzt. Diese wurden gemeinschaftlich in der Publikation „*Substrate Selection Criteria in Regulated Intramembrane Proteolysis*“ von C. Moser et al.^[261] im März 2024 veröffentlicht.

Um eine nähere Charakterisierung der Strukturen der Transmembrandomänen zu erhalten, sowie um diese mit vorausgehenden Arbeiten von **Dr. Mara Silber**^[65] und **Dr. Nadja Guschtschin-Schmidt**^[262] aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe vergleichen zu können, wurden die Proteine in TFE-d₂/H₂O gelöst und mittels Kernspinresonanzspektroskopie vermessen. TFE wurde hier als Umgebung gewählt, da dieses keinen äußeren Druck auf die Proteine ausübt und somit einen Einblick in die Bestimmung der Konformation durch die Proteinsequenz ermöglicht. Zudem stabilisiert TFE die α -helikale Struktur eines Proteins, ohne es in eine bestimmte Orientierung zu zwingen^[263, 264], wie es in Detergens-Mizellen oder Lipid-Detergens-Bizellen der Fall ist.

6.1.1 Amyloid-Precursor Protein (APP) Homolog Amyloid beta Precursor like Protein (APLP2)

6.1.1.1 Analyse der Transmembransequenz

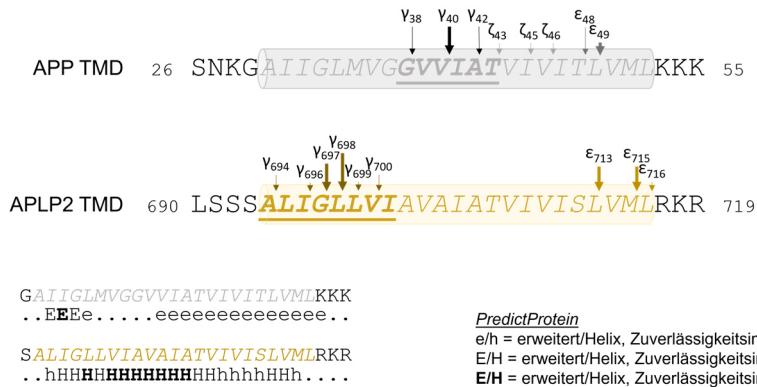


Abbildung 6.1 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und APLP2. Die initialen ϵ -Schnittstellen sind identisch postuliert, wohingegen die Schnittstellen der γ -Sekretase bei APLP2 weiter N-terminal vorliegen. Die Sequenzvorhersage zeigt für APLP2 eine helikale Struktur.

Die Sequenzanalyse der Transmembrandomänen von APP sowie dessen nahe verwandtem Homolog APLP2 zeigt eine 74-%ige Übereinstimmung in der Proteinsequenz. Dies lässt auf eine hohe Ähnlichkeit der beiden Proteine schließen, auch in Bezug auf strukturelle Gegebenheiten der Transmembrandomäne.^[265, 266]

Die initiale ϵ -Schnittstelle wurde an Position L713^[72] postuliert und ist somit vergleichbar mit der ϵ -Schnittstelle in APP an Position L49 (**Abbildung 6.1**). Die Arbeitsgruppe um A. Fukumori konnte zuletzt zusätzliche ϵ -Schnittstellen an Position M715 sowie L716 ausmachen.^[267] Wie bei APP, wird auch bei APLP2 zunächst die Transmembrandomäne von BACE oder ADAM10, einer α -Sekretase oder β -Sekretase (105 bzw. 93 Reste), prozessiert und somit die Ektodomäne gekürzt, bevor das Substrat in das katalytische Zentrum der γ -Sekretase gelangen kann.^[72, 268] Es sei darauf hingewiesen, dass dabei die bevorzugte γ -Schnittstelle im Bereich von L698 liegt. Dies ist insofern bemerkenswert, weil diese Aminosäure deutlich näher am N-Terminus liegt als die Vergleichbare von APP.^[48, 269] Die sequenzielle Ähnlichkeit zwischen den Transmembrandomänen von APP und APLP2 lässt zunächst die Vermutung zu, dass die γ -Schnittstellen identisch zu lokalisieren sind. Dies konnte in bereits vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden. Erstaunlicherweise erfolgt zudem keine Abtrennung der langen Ektodomäne eines weiteren Homologs APLP1 vor dem eigentlichen γ -Sekretase-Schnitt, wodurch der Mechanismus der Sekretase noch undurchsichtiger erscheint.^[270] Daher stellt sich die Frage, welche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten in den Substraten vorliegen und zu einer solchen Diskrepanz führen.

Da es keine bekannte Konsensussequenz der γ -Sekretase gibt, müssen andere Faktoren für die Erkennung und Prozessierung der Substrate verantwortlich sein.

Die Sequenzen der Proteine wurden in dieser Arbeit zunächst durch die Vorhersageprogramme *PredictProtein*^[271], sowie *AlphaFold*^[272] miteinander verglichen, um erste Anhaltspunkte für die Strukturinformationen ausgehend der Aminosäuresequenz zu generieren. *PredictProtein* ist das erste Programm, das 1992 mit der Analyse von Proteinsequenzen begann. Dabei kombiniert *PredictProtein* Struktur- und Funktionsvorhersagen basierend auf maschinellem Lernen in Verbindung mit evolutionären Informationen. Auch *AlphaFold* greift auf neuronale Netzwerke zu und zieht dabei evolutionäre, physikalische und geometrische Einschränkungen von Proteinstrukturen mit ein. Davon ausgehend wurde von *PredictProtein* eine β -Faltblatt Signatur für APP vorhergesagt, welche allerdings nicht für APLP2 postuliert wurde. Dies ist überraschend, da die Sequenzähnlichkeit der beiden Proteine sehr hoch ist. Bei den Proteinsequenzen von APLP2 (R717-R719) und APP (K53-K55) ist zudem ein basischer Anker am C-Terminus zu erkennen. *AlphaFold* zeigte weiterhin einen flexiblen Bereich N-terminal beziehungsweise in der Mitte der Transmembrandomäne für beide Proteine an.

Aus vorhergehenden Studien ist bereits bekannt, dass vor allem der C-Terminus bei der Erkennung und Prozessierung durch die γ -Sekretase eine übergeordnete Rolle spielt, wie beispielsweise anhand von Mutationsstudien gezeigt werden konnte.^[273] Dabei konnten unter anderem die Arbeitsgruppen um S. F. Lichtenthaler sowie H. Steiner und D. Langosch mithilfe von sogenannten „Domain Swaps“ zeigen, dass es bei Veränderungen der C-terminalen Substratsequenzen zu veränderten Schneidemechanismen durch Präsenilin kommt.^[196, 274] Die Arbeitsgruppe von Y. Shi konnte zudem Strukturinformationen auf atomarer Ebene der Enzym-Substrat-Komplexe von C83^[275] und Notch^[276] generieren, welche zeigten, dass eine Umstrukturierung des Komplexes für die Proteolyse notwendig ist. Die Helix der Substrat Transmembrandomäne entwindet sich um die Spaltstelle und bindet in der verlängerten Konformation an ein β -Faltblatt von Präsenilin, welches durch das N-terminale Ende und den Anfang der TMD7 des C-Terminus gebildet wird. Die entsprechenden Regionen des freien Enzyms weisen dabei eine ungeordnete Elektronendichte auf und zeigten sich zudem sehr flexibel.^[277] Im Folgenden soll näher auf die strukturellen Motive, sowie auf die Dynamiken der Proteine eingegangen werden, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede für APLP2 und APP herauszuarbeiten.

6.1.1.2 Auswertung der experimentellen Daten

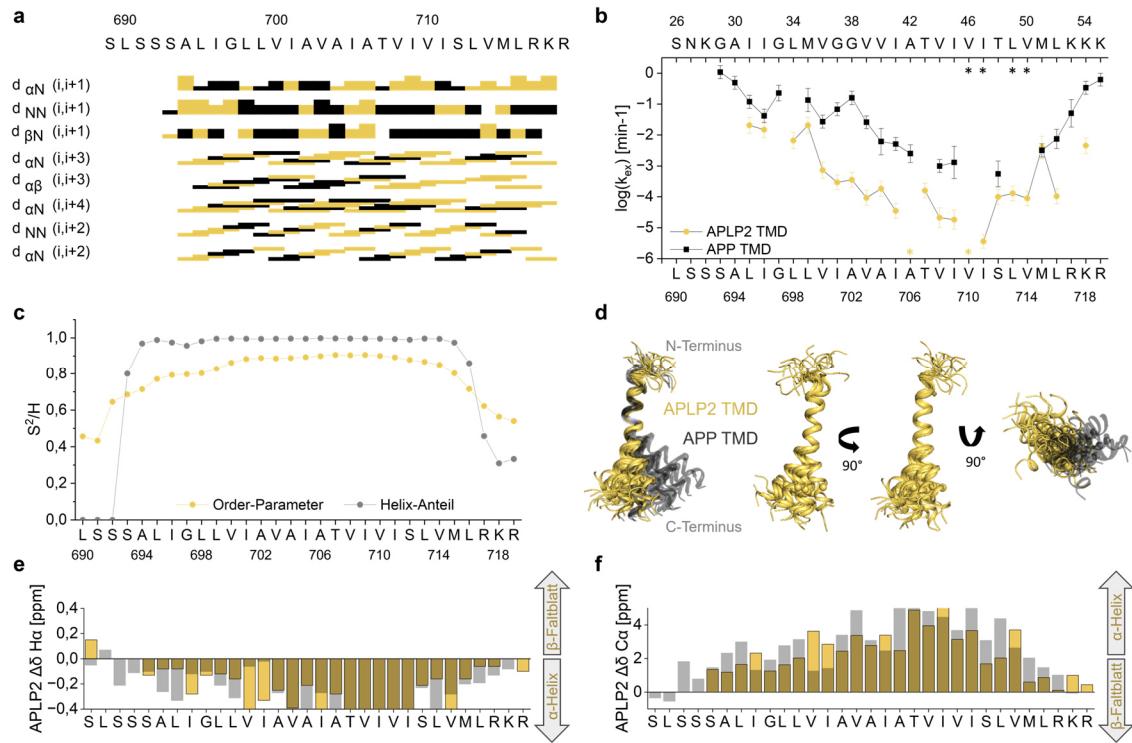


Abbildung 6.2 Strukturanalyse des APLP2. **(a)** Charakteristische sequenzielle NOEs und NOEs mittlerer Reichweite; in schwarz die eindeutigen Signale, in gelb überlagerte/nicht-eindeutige Signale. Die Dicke der Balken ist proportional zur Intensität der NOEs. **(b)** HDX von APLP2 (gelb) im Vergleich zu APP (schwarz). Die mit einem Asterisk markierten Reste tauschten zu langsam aus, um ermittelt zu werden. Die Reste S689-S693, G697, R717 und R718 konnten aufgrund eines zu schnellen Austausches nicht gefittet werden. APLP2 weist einen verminderten Austausch auf. **(c)** Order-Parameter von APLP2 (gelb) im Vergleich zum Helix-Anteil (grau). **(d)** Strukturmodelle von APLP2 (PDB: 8RQ6) ausgehend von NOESY-Spektren. Überlagert auf APLP2 L695-I705 (gelb) und APP I31-I41 (PDB: 6YHF, schwarz transparent). **(e)** und **(f)** Sekundär chemische Verschiebungsdaten von H_α und C_α zeigen eine helikale Struktur. In transparent sind die SCS der APP TMD hinterlegt.

Die gemessenen ¹H-¹H-NOESY-, ¹H-¹H-TOCSY-, ¹H-¹³C-HSQC- und ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren bestätigen die Annahme, dass es sich bei der Transmembrandomäne des APLP2 wie bei APP um eine α -Helix handelt, wobei nahezu alle Signale den entsprechenden Aminosäureresten zugeordnet werden konnten (Vergleich Anhang **Abbildung A. 15** und **Tabelle A. 2**). Die charakteristischen NOEs sind in **Abbildung 6.2 (a)** dargestellt. Dabei zeigen schwarze Balken eindeutig zugeordnete Signale und gelbe Balken nicht-eindeutig zugeordnete beziehungsweise überlagerte Signale. Die Dicke der Balken gibt Auskunft über die Signalintensität und somit über den Abstand der Reste zueinander. Die charakteristischen NOEs für eine α -Helix sind für die Transmembrandomäne gegeben (Vergleich Kapitel 1.2.6), wobei im Bereich von V710-V714 d_{αβ}(i,i+3) NOEs fehlen. Zudem zeigen die d_{αβ}(i,i+3) NOEs des C-Terminus ab der Aminosäure T707 starke Überlagerungen, wodurch eine eindeutige strukturelle Aussage für diesen Bereich erschwert ist. Dies kann zudem auf eine Abschwächung der Helix in

diesen Aminosäureseitenketten hindeuten, da $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ Kontakte essentiell für α -helikale Strukturen sind. Der N-Terminus konnte aufgrund zu schneller Molekularbewegungen des Proteins nicht im Spektrum detektiert werden, wodurch die fehlenden NOEs (S689-S693) erklärt werden.

Die Messungen des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs (**HDX**) zeigen eine insgesamt stabile Helix (**Abbildung 6.2 (b)**). Eine hohe Austauschrate k_{ex} steht dabei für einen schnellen Austausch und damit für eine gewisse Form der Flexibilität, da diese Aminosäuren frei zugänglich sind für das Deuterium. Auffällig ist, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus im Vergleich zu APP deutlich stabilisiert ist. Anstelle des G37-G38-Motives von APP, welches dem Protein an dieser Stelle eine erhöhte Flexibilität erlaubt, sind bei APLP2 die Aminosäuren I701-A702 lokalisiert, welche die Helix zu stabilisieren scheinen. Dies könnte eine mögliche Ursache für die Verschiebung der γ -Sekretase-Schnittstelle von APLP2 in Richtung des N-Terminus sein. Zudem gibt es keine ersichtliche Destabilisierung um V710-V714, wie aus den fehlenden $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ NOEs gedeutet werden könnte. In diesem Bereich scheint sich die Helix nochmals zu stabilisieren, wobei I711 den niedrigsten k_{ex} -Wert aufweist. Die Austauschraten von APP M51 sowie APLP2 M715 sind nahezu identisch, was wiederum zu den postulierten initialen ε -Schnittstellen passt. A706 sowie V710 konnten aufgrund eines zu geringen Austausches nicht exponentiell angepasst werden und die Aminosäuren S689-S693, G697, R717 und R718 zeigten einen zu schnellen Austausch, wodurch keine Signale mehr detektiert werden konnten.

Der Order-Parameter S^2 , beschrieben von Lipari und Szabo^[278] als „modellfreier“ dynamischer Formalismus zur Klassifizierung von makromolekularen Relaxationen, gibt Informationen über die Orientierung eines einzelnen, internen H-X-Bindungsvektors an, welcher während eines dynamischen Prozesses verloren geht.^[279] Bei einer sehr schnellen internen Bewegung nimmt der Order-Parameter einen Wert von 0 an und bei keiner Bewegung den Wert von 1. Die Parameter werden hier ausgehend der durch TALOS+ generierten Diederwinkel basierend auf den sekundären chemischen Verschiebungen vorhergesagt. Die ermittelten Order-Parameter von APLP2 zeigen durchschnittlich keine starke Beweglichkeit der Bindungsvektoren, wobei der N- und C-Terminus niedrigere Werte beinhalten (**Abbildung 6.2 (c)**). Dies ist identisch zu den HD-Austauschwerten und verdeutlicht die erhöhte Flexibilität in diesem Bereich. Die Aminosäuren von A694-I701 zeigen ebenfalls geringere Order-Parameter als die mittlere Transmembrandomäne, welche mit der Schnittstellenlokalisierung der γ -Sekretase übereinstimmt. Dies könnte auf eine Lockerung der Wasserstoffbrückenbindungen in diesem Bereich hinweisen, wodurch die Proteolyse durch die γ -Sekretase ermöglicht werden könnte. Der Helix-Anteil, ebenfalls berechnet von TALOS+, zeigt kontinuierliche Werte ab A694-M715, wobei die Aminosäuren I696 sowie G697 eine leichte Abnahme zeigen. Dies entspricht ebenfalls den lokalisierten Schnittstellen der γ -Sekretase, wodurch diese Beobachtung zu erklären ist.

Mit den Abstandsinformationen der NOESY-Spektren sowie den berechneten Diederwinkeln lassen sich Strukturbündel der Transmembrandomäne von APLP2 berechnen, wobei diese in **Abbildung 6.2 (d)** mit den Aminosäureresten L695-I705 auf die Reste I31-I41 der APP-Strukturen (PDB: 6YHF; transparent) überlagert wurden. Dabei fällt auf, dass APP eine gebogenere Struktur zeigt, welche durch die beiden Glycine G37-G38 begünstigt wird. Zudem richten sich die Strukturbündel in verschiedene Richtungen aus, hervorgerufen durch die Neigung der APP TMD^[36]. Trotz der hohen Identität an Aminosäuren scheinen APP und APLP2 kleine strukturelle Unterschiede aufzuweisen. APLP2 zeigt im Durchschnitt eine etwas geradere Struktur mit geringer Auffächerung im C-Terminus. Die sekundären chemischen Verschiebungen (**SCS**) in **Abbildung 6.2 (e/f)** bestätigen nochmals die stabile, α -helikale Struktur des APLP2. Die Werte der APP TMD sind in transparenter Farbe zugefügt und zeigen einen Einbruch am Di-Glycin-Motiv. Dies kann für das nahe Homolog nicht bestätigt werden. Die Stabilität der Helix ist gegenüber APP auch in Hinblick auf den HDX insgesamt erhöht.

Bis dato gibt es keine bekannten, direkten Proteolyse-Effizienz-Vergleiche von APP und APLP2, doch ausgehend der erhobenen experimentellen Daten wird hier eine Reduzierung aufgrund der erhöhten Stabilität der Transmembrandomäne angenommen. Die initiale Schnittstelle ist zwischen den Aminosäuren Leucin und Valin lokalisiert, an welchen scheinbar bevorzugt geschnitten wird, wodurch eine Prozessierung durch die γ -Sekretase sehr wahrscheinlich ist. Laut *PredictProtein* weist APLP2 kein β -Faltblatt Motiv am C-Terminus auf, wie es für APP gegeben ist. Vermutet wird allerdings, dass diese Domäne von den Vorhersageprogrammen nicht als solche identifiziert wird. *PredictProtein* sowie auch *AlphaFold* sind abhängig von bestehenden Datenbanken, wodurch bei fehlenden Informationen oder unbekannten Mustern eventuell nur unzureichende Vorhersagen getroffen werden können.^[280] Außerdem sind Transmembrandomänen für die Vorhersageprogramme bislang schwieriger zu fassen als lösliche Proteine aufgrund der Proteinumgebung, welche die Aminosäuresequenz beeinflusst sowie die Faltung einschränkt.^[281] Aufgrund der in den experimentellen Strukturrechnungen sichtbaren Flexibilität des C-Terminus kann auf eine Auflockerung der Bindungen in diesem Bereich spekuliert werden und somit auch zu einer möglichen Umstrukturierung hin zu einem β -Strang-Motiv, welches für die Interaktion mit dem Enzym notwendig ist.

6.1.2 TWEAK-Rezeptor - Fn14

6.1.2.1 Analyse der Transmembransequenz



Abbildung 6.3 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und Fn14. Die postulierten Schnittstellen der γ -Sekretase sind mit Pfeilen markiert, wobei die größeren Pfeile die Hauptschnittpunkte darstellen. Fn14 besitzt eine natürliche, kurze Ektodomäne (53 Aminosäuren) und benötigt kein primäres Abtrennen dieser durch andere Proteasen.^[75] Die Sequenz ist helikaler vorhergesagt als bei APP.

Fn14, ein Zelloberflächenrezeptor der TWEAK-Familie, besitzt zahlreiche Funktionen in der Zellproliferation, Apoptose, Zellmigration und Differenzierung. Neben seiner Hauptaufgabe in der Hochregulierung bei Gewebestress oder Verletzungen zeigt sich ein zusätzlicher Mechanismus in der Steuerung der Fn14-Signalgebung nach Prozessierung durch die γ -Sekretase. Aufgrund der somit bestehenden Verbindung zu Krankheiten wie Alzheimer durch synaptische Dysfunktionen^[282] oder Krebs ist Fn14 ein gutes Ziel für die Arzneimittelentwicklung.^[73, 75, 283, 284]

Wegen der natürlichen, kurzen extrazellulären Ektodomäne mit 53 Aminosäuren ist ein primäres Abtrennen dieser bei Fn14 nicht erforderlich. Dies entspricht einer neuen Klasse an γ -Sekretase Substraten, zu denen auch BCMA^[285] (engl. *B-Cell Maturation Antigen*) sowie Syt7^[286] (engl. *Synaptotagmin 7*) zählen. Die von G. Güner et al. postulierten Schnittstellen durch die γ -Sekretase sind in **Abbildung 6.3** zu erkennen, wobei die Hauptschnittstellen mit größeren Pfeilen markiert sind.^[75] Dabei ist auffällig, dass im Vergleich zu APP die γ -Schneidprodukte P80-S87 (*PILGGALS*) zwei Helix-Windungen weiter in der vorhergesagten Transmembrandomäne lokalisiert sind. Dies ist wiederum vergleichbar mit der Lokalisation der Schnittstellen von APLP2. Zudem kann ein zusätzlicher Schnitt N-terminal an F75 erfolgen, welcher bislang nicht bei APP beobachtet werden konnte. Die N-terminale TMD von Fn14 wird zudem insgesamt helikaler postuliert. Es wird weiterhin ein β -Strang-Motiv (F98-V100) vorhergesagt sowie ein N-terminaler basischer Anker (R102-R103...R105-R107). Eine flexible Domäne (G83-T89) ist ausgehend der im folgenden Kapitel beschriebenen experimentellen Daten mit sieben Resten größer postuliert als bei der APP TMD.

6.1.2.2 Auswertung der experimentellen Daten

Die gemessenen ^1H - ^1H -NOESY-, ^1H - ^1H -TOCSY-, ^1H - ^{13}C -HSQC- und ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren zeigten im Allgemeinen eine schlechte Qualität mit einer Vielzahl an Überlagerungen, sowie breiter Linien (Vergleich Anhang **Abbildung A. 16** und **Tabelle A. 3**). Dies könnte auf eine mögliche Dimerisierung des Fn14 zurückzuführen sein. In seiner natürlichen Signalkaskade bildet Fn14 aus der vorhandenen Cystein-reichen extrazellulären Domäne einen Trimeren-Komplex, welcher Disulfidbrücken ausbildet.^[73] Allerdings konnte dies in durchgeführten Titrationsversuchen bei Verwendung unterschiedlicher Fn14 Konzentrationen nicht nachgewiesen werden (qualitativer Vergleich Anhang **Abbildung A. 17**). Bei Variation der Proteinkonzentration müssten hierbei Verschlechterungen (erhöhte Konzentration) oder Verbesserungen (niedrigere Konzentrationen) der Spektrenqualitäten eintreten, falls ein Dimer vorhanden wäre. Die Linienverbreiterung könnte somit auch auf einen Austausch mit dem Lösemittel zurückzuführen sein. Des Weiteren fehlen die charakteristischen NOE-Signale der H α und Amidproton ($d_{\alpha\text{N}}$ (i,i+4); R76-W79, L82-G84), H α und H β ($d_{\alpha\beta}$ (i,i+3); R76-L82, L86-L88)), H α und Amidproton ($d_{\alpha\text{N}}$ (i,i+3) L77-P80) sowie Amidprotonen (d_{NN} (i,i+2) R76-W79, S87-T89) im N-terminalen Bereich (**Abbildung 6.4 (a)**). Dies lässt auf eine Destabilisierung der α -Helix schließen, wobei ebenfalls durchgehend $d_{\alpha\text{N}}$ (i,i+2) Signale vorhanden sind, welche auf eine weniger stabile 3_{10} -Helix hindeuten könnten. Außerdem fehlen die Amidprotonen d_{NN} (i,i+2) der Aminosäuren L86-T89, wodurch ebenfalls auf eine Destabilisierung in diesem Bereich geschlossen werden kann. Die HD-Austauschdaten in **Abbildung 6.4 (b)** zeigen einen stabileren Bereich von I81-L94 im Gegensatz zur überlagerten APP TMD I31-I41. Der C-Terminus ab S96-W101 zeigt schnellere k_{ex} -Werte und scheint somit flexibler zu sein als es bei APP der Fall ist. Daten zwischen R76-L82 fehlen aufgrund eines zu schnellen Austausches in dieser Region.

Die Order-Parameter des Fn14 weisen keinen kontinuierlichen, stabilen Verlauf auf, vielmehr sind mehrere Abschwächungen in der TMD erkennbar (**Abbildung 6.4 (c)**). Dabei sind niedrigere Order-Parameter der Aminosäuren W79-S87 zu beobachten, welche identisch zu den vorhergesagten γ -Sekretase Schnittstellen sind. Auch der Helix-Anteil ist hier verringert, was auf eine mögliche Umstrukturierung des Proteins in diesem Bereich zurückzuführen sein könnte. An der Position L92-L95 sind ebenfalls niedrigere Order-Parameter sichtbar, welche auf eine Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindungen der Helix zurückzuschließen ist. Dies könnte auf die mögliche Dimerisierungsposition des Fn14 hindeuten, da auch der HD-Austausch an dieser Stelle eine gesteigerte Stabilisierung der Aminosäuren L92 und L95 aufweist. Allerdings konnte die Dimerisierung, wie bereits erwähnt, experimentell anhand von Titrationsmessungen ausgeschlossen werden.

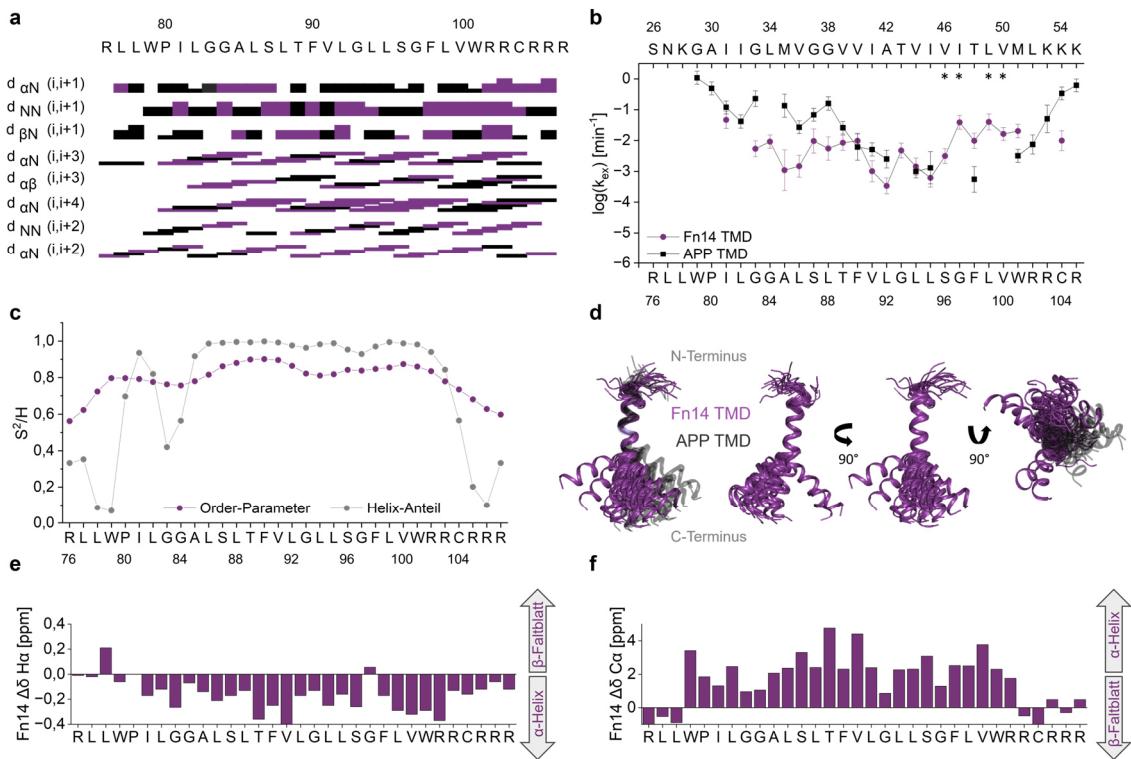


Abbildung 6.4 Strukturanalyse des Fn14. **(a)** Charakteristische sequenzielle NOEs und NOEs mittlerer Reichweite; in lila überlagerte/nicht-eindeutige Signale. Die Dicke der Balken ist proportional zur Intensität der NOEs. In Summe zeigt Fn14 eine helikale Struktur doch auch Elemente der 3_{10} -Helix sind erkennbar. **(b)** HDX von Fn14 (lila) im Vergleich zu APP (schwarz). Signale gekennzeichnet mit einem Asterisk tauschten zu langsam aus. R102 und R103 fehlen aufgrund von Signalüberlagerung. Fn14 weist N-terminal einen verminderten Austausch und in der TMD-Region einen gesteigerten Austausch auf. **(c)** Order-Parameter von F14 (lila) im Vergleich zu dem Helix-Anteil (grau). **(d)** Strukturmodelle von Fn14 ausgehend von NOESY-Spektren. Überlagert auf Fn14 G83-G93 (lila) und APP I31-I41 (PDF: 6YHF, schwarz transparent). **(e)** und **(f)** Sekundär chemische Verschiebungsdaten von H_α und C_α zeigen eine helikale Struktur mit leichtem Einbruch um G97.

Aufgrund der schlechten Qualität der Spektren und der somit zum Teil unsicheren Zuordnung der Aminosäurereste weichen die einzelnen Strukturen der durchgeföhrten Strukturrechnung stark voneinander ab. Dadurch können diese nur als eine Tendenz der möglichen Konformationen betrachtet werden. Aufgrund von Überlagerungen konnten nur eine geringe Anzahl von NOEs für die Strukturberechnungen mit ARIA2 verwendet werden, wodurch diese beeinträchtigt wurde. ARIA2 berechnet in mehreren Iterationsrunden mögliche Strukturen mit der niedrigsten kinetischen Energie ausgehend der Abstandsinformationen, sowie Winkel aus den gegebenen Spektren. Signale, die eine hohe Überlagerung oder eine unzureichende eindeutige Zuordnung aufweisen, werden bei der Erstellung der Rechnungen nicht berücksichtigt, wodurch die Datenmenge weiter reduziert wird. Die ermittelten Strukturbündel des Fn14 zeigen eine gebogene, α -helikale Struktur (**Abbildung 6.4 (d)**). Dabei ist eine ähnlich starke Biegung im Vergleich zur Transmembrandomäne von APP zu erkennen, welche in schwarz transparent dargestellt ist. Es lassen sich zudem zwei Strukturen ausmachen, die eine gegenläufige Neigung aufweisen. Die insgesamt helikale Struktur des Fn14 fächert mit

der hier gewählten Superpositionierung zusätzlich ab der Aminosäure G93 auf. Dies stimmt mit den beobachteten Veränderungen in den Order-Parametern überein. Hier ist ein leichter Einbruch an Position P80-S87 und G93-V100 zu erkennen, sowie eine deutliche Reduktion der Stabilität der Wasserstoffbrückenbindungen an ebendiesen Aminosäuren. Allerdings muss an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der geringen NOE-Daten die Krümmungen der Strukturen stark von der gewählten Überlagerung abhängen, da maßgeblich die TALOS+-Werte zur Strukturberechnung und keine realen Abstandsinformationen beigetragen haben. Die SCS zeigen ebenfalls eine α -Helix (**Abbildung 6.4 (e/f)**) mit einem Einbruch an Position G97 aufgrund des dort vorhandenen Glycins, das wie Prolin aufgrund der kompakten Seitenketten als „Helixbrecher“ bekannt ist.^[287]

Zusammenfassend ist die Umsetzung von Fn14 durch die γ -Sekretase auf der Basis der hier erhobenen modifizierten Flexibilitätsdaten im Vergleich zu APP als geringer einzustufen. Zudem konnten M. Aßfalg et al. bei Experimenten mit einem „TMD-Swap“ zeigen, dass Fn14 eine geringere Effizienz als APP aufweist, wobei die Transmembrandomänen verschiedener Peptide in eine Fn14 Umgebung eingebettet wurden.^[274]

6.1.3 Tyrosin-Protein Kinase Rezeptor - ErbB4

6.1.3.1 Analyse der Transmembransequenz

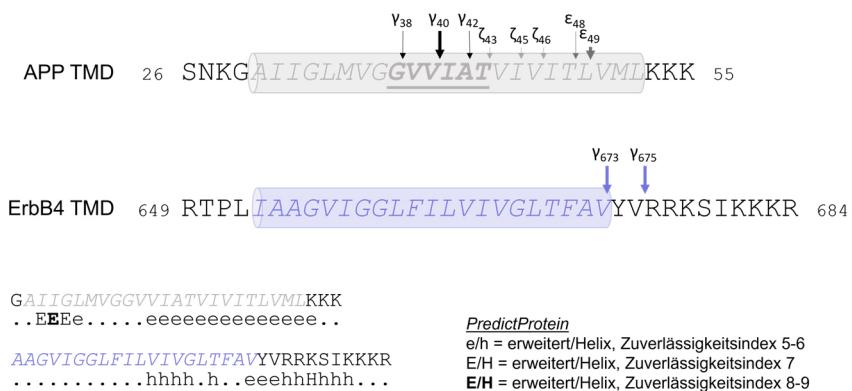


Abbildung 6.5 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und ErbB4. Die postulierten Schnittstellen der γ -Sekretase sind mit Pfeilen markiert, wobei die größeren, dicken Pfeile die Hauptschnittpunkte widerspiegeln. Die γ -Sekretase Schnittstellen sind an Position V673 und V675 vorhergesagt. Die TMD ist schwach helikaler vorhergesagt als bei APP.

ErbB4, ein Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie, besitzt zahlreiche Funktionen in der Zellproliferation sowie der Differenzierung. Dabei wechselt ErbB4 zwischen einem inaktiven Monomer und einem ligandeninduzierten Rezeptor-Dimer, wobei das Dimer die Signalkaskade aktiviert. Zunächst wird ErbB4 von TACE/ADAM17 in der Ektodomäne an Position H641 und S642 geschnitten, bevor es von der γ -Sekretase

umgesetzt werden kann.^[288] Die Schnittstellen sind dabei an den Aminosäuren V673 sowie V675 postuliert (**Abbildung 6.5**).^[289] NMR-spektroskopische Untersuchungen in DHPC/DMPC-Bizellen zeigten die Ausbildung eines rechtsgängigen-Dimers, welches über das G656xxxG660 Motiv interagiert.^[290, 291] Es wird jedoch angenommen, dass die γ -Sekretase ErbB4 bevorzugt in seiner monomeren Form schneidet, da dies ebenfalls für APP beobachtet werden konnte.^[231, 292, 293] Das Sequenzanalyse Programm *PredictProtein* sagt eine Destabilisierung der Helix und folglich ein mögliches β -Strang-Motiv an Position V673-V675 voraus, an welcher die Schnittstellen der γ -Sekretase positioniert sind. C-terminal ist zudem ein basischer Anker vorhanden.

6.1.3.2 Auswertung der experimentellen Daten

Die gemessenen ^1H - ^1H -NOESY-Spektren in TFE-d₂/H₂O zeigen wie auch bei Fn14 eine schlechte Qualität (Vergleich Anhang **Abbildung A. 18** und **Tabelle A. 4**). Es ist zu beachten, dass dem N-Terminus (K649-K651) sowie dem C-Terminus (K676-678) drei nicht native Lysine für die synthetische Herstellung des Peptids angefügt wurden. In den Spektren tritt an zahlreichen Amidprotonen eine starke Linienverbreiterung auf, vor allem im C-Terminus, was für eine Variabilität in der Konformation des Proteins sprechen könnte. Die Linienverbreiterung konnte besonders ausgeprägt für die Reste L661 und F662 beobachtet werden, welche sich direkt im Anschluss an das GxxxG-Motiv befinden. Linienverbreiterungen können dabei Anzeichen für eine Konformationsdynamik darstellen, jedoch auch für Proteinaggregationen. Die geringe Qualität der Spektren erschwert folglich die Strukturberechnung. Aus den NOEs in **Abbildung 6.6 (a)** geht hervor, dass vor allem im Bereich A654-V657 sowie T670-V673 die Amidprotonendistanzen d_{NN} (i,i+2) nicht vorhanden sind. Dies kann auf eine Destabilisierung der α -Helix hindeuten. Außerdem gibt es im GxxxG-Motiv keine d _{$\alpha\beta$} (i,i+3) NOEs, welches zeigt, dass die Helix hier destabilisiert ist.

Die ermittelten HDX-Daten ergeben einen ähnlichen Verlauf wie für die Transmembrandomäne des APP (**Abbildung 6.6 (b)**). Allerdings ist an Position G668-V675 eine leichte Destabilisierung des ErbB4 zu erkennen, die in Übereinstimmung mit den nicht vorhandenen NOE Kontakten d_{NN} (i,i+2) ist. In diesem Bereich befinden sich die γ -Sekretase Schnittstellen V673 und V675. Dadurch würde eine Destabilisierung dieses Bereiches zu einer Umstrukturierung des Substrates passen, welche für eine Interaktion mit der γ -Sekretase vorausgesetzt wird. Im Allgemeinen weist ErbB4 beim Deuterium-Austausch eine geringere Stabilität auf als es beispielsweise für APLP2 der Fall war. Dies ist möglicherweise auf die vier Glycine in der Transmembrandomäne zurückzuführen, welche die helikale Struktur eines Proteins reduzieren. Die Reste V665-V667 sowie L669 konnten aufgrund eines zu langsam Austausches nicht exponentiell angepasst werden. Dahingegen war das Bestimmen der Austauschkonstanten für die beiden Glycin G659 und G660 aufgrund eines zu schnellen Austausches nicht möglich.

Der Order-Parameter in **Abbildung 6.6 (c)** zeigt im Vergleich zu Fn14 geringere Schwankungen. Im Bereich von I658-L662 ist eine Verringerung der Werte erkennbar, möglicherweise aufgrund des Dimerisierungsprofils. Des Weiteren ist auch der Helix-Anteil an dieser Stelle deutlich reduziert, wodurch eine Auflockerung der Wasserstoffbrückenbindungen angenommen wird. Die ermittelten Strukturen auf Basis der qualitativ schlechten Spektren ergeben, wie auch bei Fn14, lediglich eine Tendenz an möglichen Strukturen. Hierbei ist auffällig, dass diese bei der gewählten Überlagerung der Strukturen ähnlich stark auffächern wie bei APP. Allerdings ergibt sich eine Neigung der Strukturbündel entgegengesetzt der APP TMD von etwa 90° (**Abbildung 6.6 (d)**). Doch auch hier wurden die Strukturen maßgeblich von den TALOS+-Werten beeinflusst, wodurch die Aussagekraft stark herabgesetzt wird. Zusammen mit den HD-Austauschmessungen sowie der schlechten Qualität der Spektren wird eine hohe Variabilität der Konformation von ErbB4 angenommen. Die SCS-Daten in **Abbildung 6.6 (e/f)** deuten aufgrund der zum Teil geringen Werte ebenfalls auf eine reduzierte helikale Tendenz der ErbB4 Strukturen hin. Diese zeigen, wie auch die Order-Parameter und der Helix-Anteil, einen Einbruch am GxxxG-Motiv sowie an den Resten G668-L669.

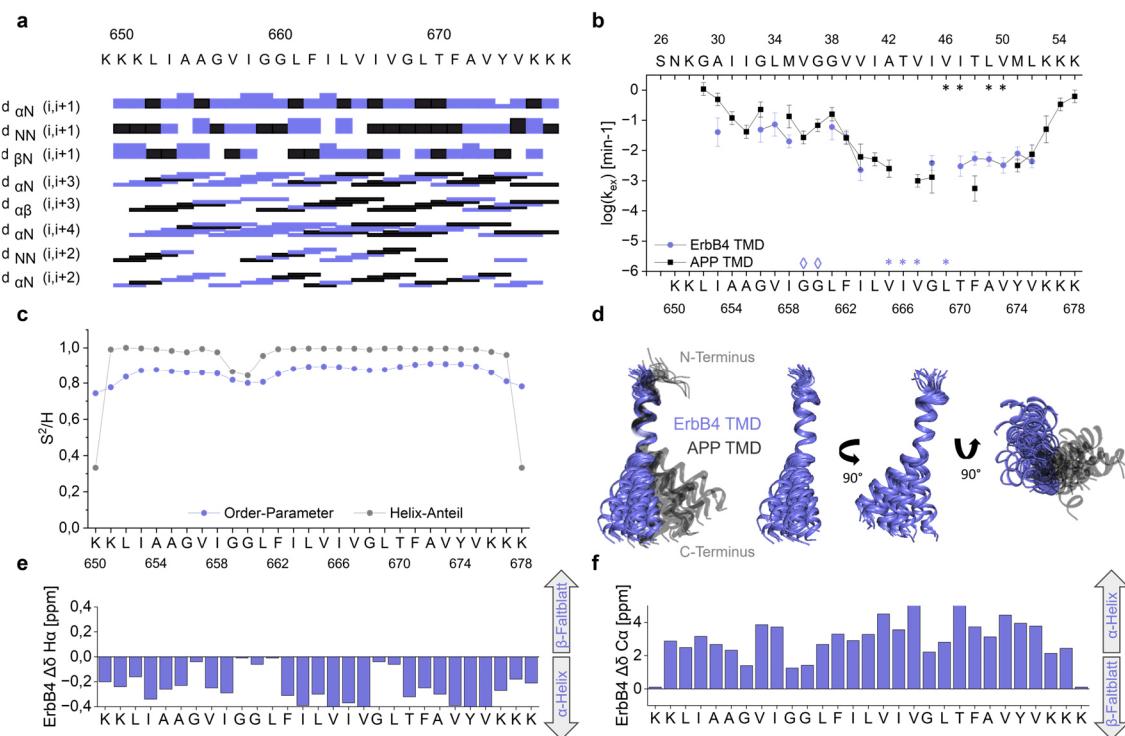


Abbildung 6.6 Strukturanalyse des ErbB4. **(a)** Charakteristische sequenzielle NOEs und NOEs mittlerer Reichweite; in flieder überlagerte/nicht-eindeutige Signale. Die Dicke der Balken ist proportional zur Intensität der NOEs. In Summe zeigt ErbB4 eine helikale Struktur. **(b)** HDX von ErbB4 (flieder) im Vergleich zu APP (schwarz). Sehr langsam austauschende Signale sind durch einen Asterisk markiert; G659 und G660 zeigen sehr schnell austauschende Signale (Rhombus). ErbB4 weist einen vergleichbaren Austausch zu APP auf. **(c)** Order-Parameter von ErbB4 (flieder) im Vergleich zum Helix-Anteil (grau). **(d)** Strukturmodelle von ErbB4 ausgehend von NOESY-Spektren. Überlagert auf ErbB4 A654-L664 (flieder) und APP I31-I41 (PDB: 6YHF, schwarz transparent). **(e)** und **(f)** Sekundär chemische Verschiebungsdaten von $H\alpha$ und $C\alpha$ zeigen eine helikale Struktur mit Einbrüchen bei G659 und G660 sowie G668 und L669.

Eine abschließende Beurteilung zu der proteolytischen Effizienz durch die γ -Sekretase kann nicht getroffen werden, da bislang keine bekannten direkten Vergleichsdaten vorliegen. Aufgrund der hier experimentell ermittelten möglichen unterschiedlichen Ausrichtungen der Transmembrandomänen und folglich der höheren konformationellen Variabilität wird eine schwache Verringerung in der Effizienz angenommen. Allerdings zeigt ErbB4 klare Tendenzen zur Ausbildung eines β -Strangs an der γ -Sekretase Schnittstelle aufgrund der erhöhten Flexibilität in diesem Bereich (HDX), sowie den fehlenden NOE-Kontakten. Dies könnte im Vergleich zu APLP2 die Schneideeffizienz erhöhen. Außerdem sind Valine an den initialen Schnittstellen lokalisiert, welche die Prozessierung zusätzlich unterstützen können.

6.1.4 Nicht-Substrat Integrin β -1- ITGB1

6.1.4.1 Analyse der Transmembransequenz

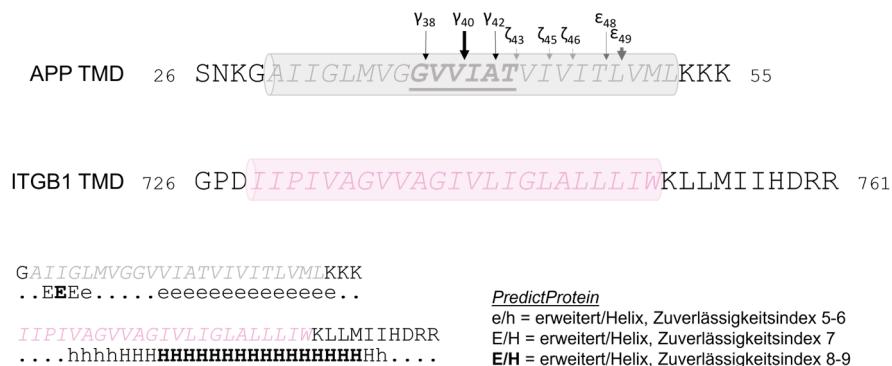


Abbildung 6.7 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und ITGB1. Die postulierten Schnittstellen der γ -Sekretase sind mit Pfeilen markiert, wobei die größeren, dicken Pfeile die Hauptschnittpunkte widerspiegeln. Für ITGB1 sind keine Schnittstellen aufgrund der Einstufung als Nicht-Substrat gegeben.

Bislang sind nur einige wenige Nicht-Substrate der γ -Sekretase bekannt. Darunter fallen der natriuretische Peptid-Rezeptor-A (NPR-A) sowie das Typ-1 Transmembranprotein Integrin β -1 (ITGB1), welches erstmals von der Arbeitsgruppe um D. Selkoe^[35] als solches identifiziert wurde. Bei einer Sequenzanalyse mittels *PredictProtein* zeigt ITGB1 im Gegensatz zu APP eine lange, stark helikale Form. Dadurch wird keine Ausbildung eines β -Strangs am C-Terminus vorhergesagt. Am C-Terminus ist zudem lediglich ein Lysin zu finden, wodurch dieser nicht den gleichen basischen Charakter aufweist wie die APP TMD (**Abbildung 6.7**). Eine bereits bekannte Strukturrechnung des ITGB1 in DPC/DHPC-Bizellen bestätigt die Annahme einer geraden, stark helikalen Struktur in der gewählten Umgebung.^[294]

6.1.4.2 Auswertung der experimentellen Daten

Die NMR-Spektren von ITGB1 zeigten durchweg eine gute Auflösung mit einer weiten Verteilung an chemischen Verschiebungen der Amidprotonen (Vergleich Anhang Abbildung A. 19 und Tabelle A. 5).

Lediglich die Leucine L747-L749 überlagerten aufgrund der gleichen Resonanzen stark, wodurch eine eindeutige Zuordnung erschwert wurde. Dies ist in Abbildung 6.8 (a) an den fehlenden NOEs der Amidprotonen d_{NN} ($i,i+2$) in diesem Bereich (ab I740-L748 sowie L753-I757) zu erkennen. Durch das nicht Vorhandensein der d_{aN} ($i,i+2$) Kontakte am C-Terminus (I750-M755, H758-R761) wird allerdings die Stabilität der α -Helix verdeutlicht, da diese NOEs bevorzugt bei einer destabilisierten 3_{10} -Helix auftreten würden.

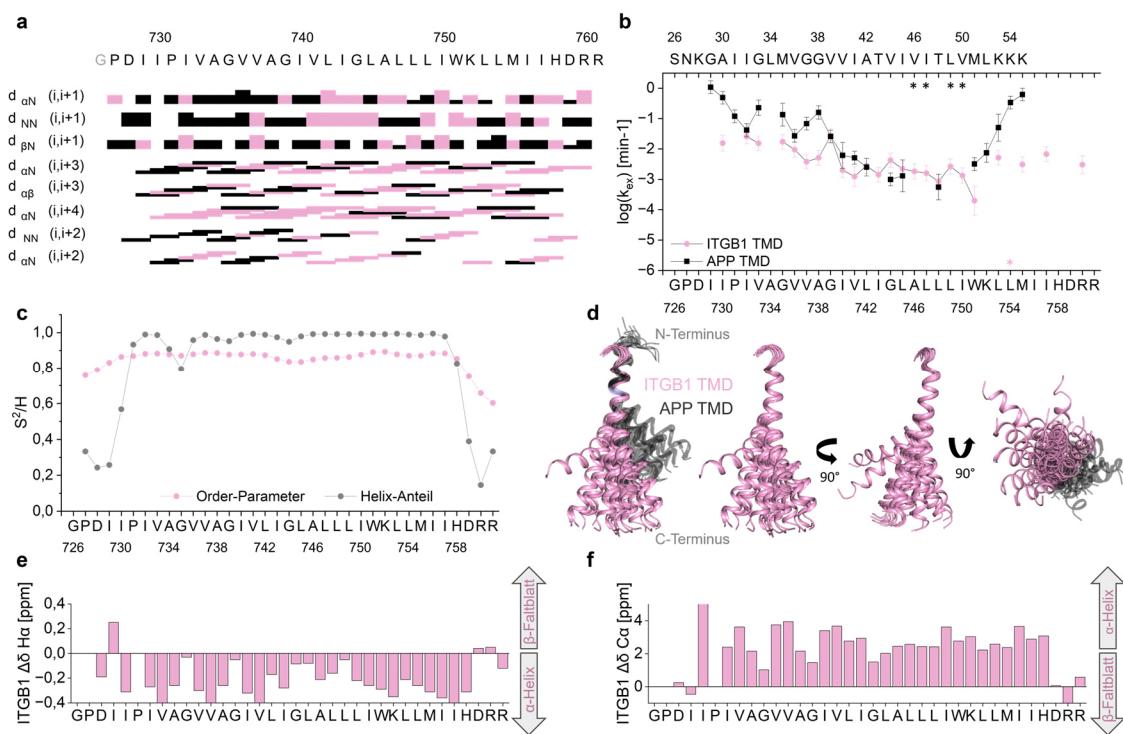


Abbildung 6.8 Strukturanalyse des Nicht-Substrats ITGB1. (a) Charakteristische sequenzielle NOEs und NOEs mittlerer Reichweite; in pink überlagerte/nicht-eindeutige Signale. Die Dicke der Balken ist proportional zur Intensität der NOEs. In Summe zeigt ITGB1 eine helikale Struktur. (b) HDX von ITGB1 (pink) im Vergleich zu APP (schwarz). Zu langsam austauschende Signale sind durch Asteriske markiert; A743 fehlt aufgrund von Überlagerung; die anderen fehlenden Aminosäuren tauschten zu schnell aus. ITGB1 weist N- sowie C-terminal einen langsameren Austausch als APP auf. (c) Order-Parameter von ITGB1 (pink) im Vergleich zum Helix-Anteil (grau). (d) Strukturmodelle von ITGB1 ausgehend von NOESY-Spektren (PDB: 8RPQ). Überlagert auf ITGB1 I730-I740 (pink) und APP I31-I41 (PDB: 6YHF, schwarz transparent). (e) und (f) Die sekundär chemischen Verschiebungsdaten von H α und C α zeigen eine helikale Struktur.

Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch in Abbildung 6.8 (b) deutet ebenfalls auf eine stabile Struktur hin, da die Austauschkonstanten zum Großteil niedriger sind als für APP. Auffällig ist dabei der C-Terminus des ITGB1 ab W751, welcher eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber APP aufweist, wodurch auf eine lange, stabile Struktur des ITGB1

geschlossen werden kann. Aminosäure A734 zeigte starke Überlagerungen, weshalb hier keine Daten ermittelt werden konnten. L754 hingegen war zu stabil, um Daten zu generieren. Die restlichen fehlenden Werte konnten aufgrund zu schneller Bewegungen nicht exponentiell angepasst werden.

Die ermittelten Order-Parameter zeigen nur wenig Bewegung innerhalb der Helix, wodurch auf eine geringe Dynamik des Proteins geschlussfolgert werden kann (**Abbildung 6.8 (c)**). Um G744 zeigt sich ein leichter Abfall der Werte, vermutlich bedingt durch die kleinen Seitenketten des Glycins, sowie des umliegenden Isoleucins, Leucins und Alanins. Der Helix-Anteil zeigt hohe Werte, abgesehen vom Einbruch an G734, ebenfalls bedingt durch die kleine Seitenkette der Aminosäure. Die berechneten Strukturen (PDB: 8RPQ) in **Abbildung 6.8 (d)** ergeben eine deutlich längere, α -helikale Struktur des ITGB1 mit einer leichten Biegung entgegengesetzt zu APP, sowie einer schwachen Auffächerung des C-Terminus. Dies könnte hier in Zusammenhang mit den fehlenden Kontaktinformationen aufgrund der Überlagerung der Leucine L747-L749 in den NMR-Spektren stehen. Durch die geringere Auffächerung sowie den generierten HDX-Daten wird folglich eine Stabilisierung des C-Terminus bestätigt. Im Vergleich zu APP ist somit die α -Helix deutlich verlängert, wie ebenfalls in den Strukturen in DMPC/DHPC-Bizellen^[294] von Z. Lu et al. gesehen werden konnte. Die erhaltenen sekundär chemischen Verschiebungen zeigen ebenfalls eine helikale Struktur des ITGB1. Auch hier ist ein leichter Einbruch im Bereich um die Leucine erkennbar, welche nicht eindeutig den entsprechenden Resten zugeordnet werden konnten.

Mehrere Studien, wie die von M. Hemming^[35] und I. Stützer^[79], belegen die Tatsache, dass ITGB1 als Nicht-Substrat betrachtet wird. Auch in der Forschungsarbeit von M. Aßfalg et al. aus dem Jahr 2024 wird dies bestätigt, wobei eine eindeutige Reduktion der proteolytischen Effizienz im direkten Vergleich zu Fn14, Notch1 und APP beobachtet werden konnte.^[274] Die Umsetzung durch die γ -Sekretase wird vermutlich aufgrund sterischer Hinderungen ausgehend der langen α -helikalen Struktur reduziert. Die dadurch fehlende Flexibilität des Proteins könnte folglich ausschlaggebend für die Bestimmung als Nicht-Substrat sein.

6.1.5 Vergleichende Diskussion der Substrat Strukturen

Abbildung 6.9 zeigt eine hypothetische Einlagerung der untersuchten Substrate in die Kryo-EM-Struktur des Präsenilin der γ -Sekretase (PDB 6IYC) in Verbindung mit dem Substrat C83, worauf die ermittelten Strukturen überlagert wurden (I31-I41). Die TMD des APP WT lässt sich gut in das katalytische Zentrum einlagern, wobei es wie bereits erwähnt (Vergleiche Kapitel 4.1.5) zu wenigen Kollisionen mit den TMDs der γ -Sekretase kommt. APLP2 (Überlagerung auf L695-I705) zeigt eine schwache Drehung der Bündel in Richtung TMD6 und 7 und kollidiert dabei öfter mit der γ -Sekretase als die APP TMD.

Fn14 (Überlagerung auf G83-G93) kollidiert stark mit den umliegenden TMDs der γ -Sekretase und auch ErbB4 (Überlagerung auf A653-L663) fächert stärker auf als der APP WT. Die Auswertung der NMR-Daten ergab jedoch eine geringe Auflösung für die beiden Proteine, wodurch die Bestimmung der Strukturen erschwert wurde. Daher sind die Strukturen hier nur als optische Darstellung zu werten und nicht als tatsächliche Struktur mit exakter Biegung zu betrachten. Die Strukturen wurden zudem aufgrund zu weniger NOEs maßgeblich durch die erstellten TALOS+-Werte (Diederwinkel) zu einer Helix gefaltet, wodurch die realen Konformationen verfälscht werden könnten. Für das Nicht-Substrat ITGB1 (Überlagerung auf I730-I740) ist die lange TMD zu erkennen, welche nicht gut zwischen die TMDs der γ -Sekretase eingelagert werden kann und dadurch mit den umliegenden TMDs kollidiert. Zusammenfassend könnten somit die Konformationen der Substrate einen entscheidenden Faktor bei der Prozessierung spielen.

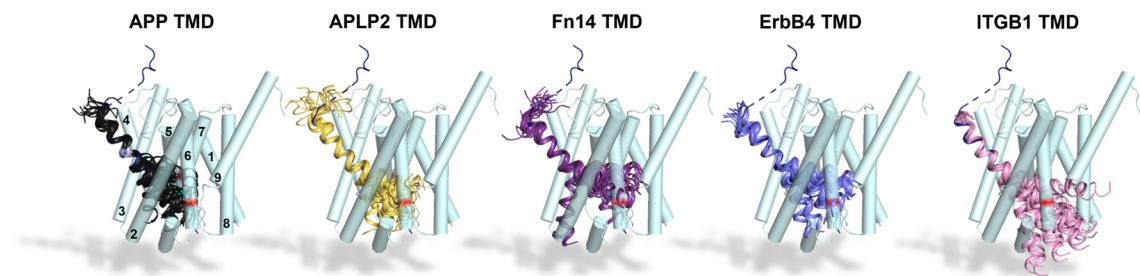


Abbildung 6.9 Vergleich der ermittelten Strukturen bei hypothetischer Interaktion mit der γ -Sekretase Kryo-EM-Struktur (PDB 6IYC). Überlagerungen der Strukturen auf APP TMD Reste I31-I41 (PDB 6YHF, schwarz), APLP2 (PDB 8RQ6, gelb): L695-I705, Fn14: G83-G93 (lila), ErbB4: A653-L663 (flieder), ITGB1 (PDB 8RPQ; pink): I730-I740. Die TMDs der Substrate kollidieren dabei unterschiedlich stark mit Präsenilin.

Ergänzend dazu sollte erwähnt werden, dass eine sogenannte Palmitoylierung der Substrate einen wichtigen Schlüsselpunkt bei der Proteolyse-Effizienz darstellen könnte. Die Palmitoylierung ist ein reversibler Prozess der posttranslationalen Modifikation, wobei Protein-Acyltransferasen die Fettsäure Palmitinsäure kovalent an Cysteinreste von zytosolischen Transmembranproteinen binden. Acylprotein-Thioesterasen können diese Modifikation rückgängig machen. Die genaue Rolle der Palmitoylierung ist noch nicht näher bekannt, allerdings kann die Signalübertragung von Oberflächenrezeptoren sowie die Aktivität der Protease BACE1 beeinträchtigt werden. Dabei erfolgt die Palmitoylierung von Transmembranproteinen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne oder am zytosolischen Ende der Transmembrandomänen, wodurch es zu verminderteren Interaktionen zwischen Enzym und Substrat kommen kann.^[274, 295, 296]

In Hinblick auf die Funktionsweise der Interaktion zwischen Enzym und Substrat konnte die Arbeitsgruppe um Y. Shi Kristallstrukturen von C99 (PDB: 8X54) sowie der Peptide $\text{A}\beta$ 49 (PDB: 8X52) und $\text{A}\beta$ 46 (PDB: 8X53) in Zusammenhang mit der humanen γ -Sekretase bestimmen.^[259] Diese zeigen, dass je kürzer die Peptide werden, desto tiefer dringen diese um eine Helix-Windung weiter in das katalytische Zentrum der γ -Sekretase

ein. Y. Shi postulierte daher, dass die Substrate eine N-terminale α -helikale Struktur benötigen, die über Wasserstoffbrückenbindungen mit der γ -Sekretase interagiert, sowie ein β -Strang, der sich variabel in das katalytische Zentrum einlagern kann, sodass sich die Strukturen „schraubendreherartig“ in das katalytische Zentrum eindrehen und geschnitten werden können.

Abschließend muss hervorgehoben werden, dass sich aus dem Sequenzvergleich der Substrate und des Nicht-Substrates drei strukturelle Motive herauskristallisiert haben, welche vermutlich maßgeblich an der Prozessierung durch die γ -Sekretase beteiligt sind (**Abbildung 6.10**). Diese wurden unter anderem bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen^[38, 56, 259] sowie in den vorausgehenden Arbeiten von **Dr. Mara Silber**^[65] für APP und **Dr. Nadja Guschtschin-Schmidt**^[262] für Notch postuliert. In dieser Arbeit konnten die Motive erstmalig durch die parallele Untersuchung weiterer Substrate und eines Nicht-Substrates unter identischen Bedingungen gefestigt werden. Zum einen zeigten alle hier untersuchten Substrate eine gewisse Form der Flexibilität. Die Formierung eines β -Stranges konnte zum Teil ebenfalls beobachtet werden. Zudem zeigen hier die Substrate einen C-terminalen basischen Anker im Anschluss an die TMD. Doch nicht alle Substrate weisen immer alle Motive im gleichen Ausmaß auf, weshalb diese nicht als exklusive Selektionskriterien zu betrachten sind. Allerdings scheint das Vorhandensein von einem oder mehrerer Motive von Vorteil für die Proteolyse zu sein. Die allgemeine Flexibilität der Substrate könnte eine entscheidende Grundvoraussetzung hierfür darstellen, welche das Nicht-Substrat ITGB1 aufgrund der enormen Stabilität der α -Helix bestätigen könnte. Doch auch hier ist die Flexibilität zwar von Vorteil, aber kein Haupt-Motiv. Zudem zeigt ITGB1 einen schwachen basischen Anker, welcher augenscheinlich jedoch nicht für die Prozessierung auszureichen scheint.

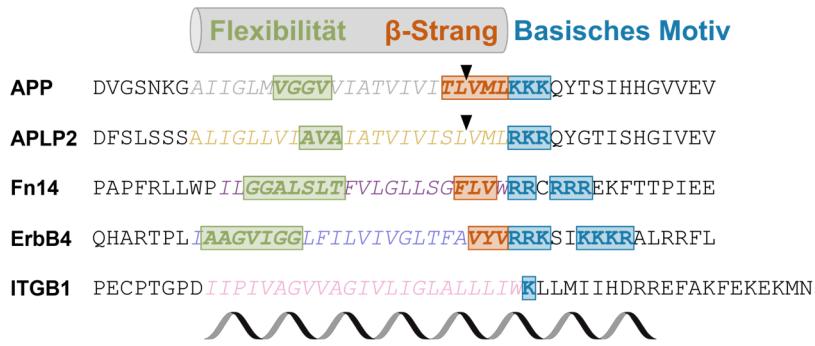


Abbildung 6.10 Zusammengefasster Sequenzvergleich der untersuchten γ -Sekretase Substrate. Ausgehend der experimentellen Daten wird das Vorhandensein von einem oder mehreren Strukturmotive als Vorteil betrachtet. Das Flexibilitäts-Motiv (grün), der β -Strang (orange) sowie ein basischer Anker (blau) sind farblich hervorgehoben. Die TMD-Sequenzen sind kursiv dargestellt.

Doch nicht nur die Substrate müssen eine gewisse Form der Flexibilität und Dynamik aufzeigen. Wie an unterschiedlichen Kristallstrukturen in Zusammenhang mit Inhibitoren

zusätzlich gezeigt werden konnte, weisen auch die TMDs der γ -Sekretase eine große Variabilität auf.^[297, 298] Damit haben etwaige Mutationen sowohl auf der γ -Sekretase als auch auf den Substraten einen erheblichen Einfluss auf die Interaktion, wie bereits in Kapitel 4.1.5 gezeigt werden konnte.

In diesem Zusammenhang müssen in nachfolgenden Arbeiten Interaktionsstudien zwischen γ -Sekretase und Substraten erfolgen, um die oben genannten Kriterien verifizieren zu können. Dies könnte durch die Einführung selektiver Fluoreszenzlabel an dem Enzym und der Messung mittels NMR realisiert werden, wie bereits in Kapitel 5 angesprochen wurde. Das Selektive markieren bietet die Möglichkeit die Enzym-Substrat-Interaktionen vieler verschiedener Substrate in einer kostengünstigen und zeitsparenden Methode miteinander vergleichen zu können.

6.2 Strukturuntersuchung anhand dipolarer Restkopplungen

Einzelne Punktmutationen auf den Sequenzen von Proteinen, wie solche die bei FAD auftreten, führen zu einem veränderten proteolytischen Verhalten durch die Protease γ -Sekretase.^[52, 299] Aufgrund dessen wurden der APP WT und vier Mutanten hinsichtlich ihrer strukturellen Gegebenheiten näher untersucht, um einen strukturellen Zusammenhang mit den Punktmutationen erstellen zu können.

Die Ergebnisse der folgenden Kapitel basieren auf der Zusammenarbeit mit **B. Sc. Franziska Krause** im Rahmen ihrer Bachelor- und Masterarbeit, sowie auf der vorausgehenden Arbeit von **Dr. Mara Silber**.^[36, 65]

6.2.1 Isotrope und anisotrope Messungen

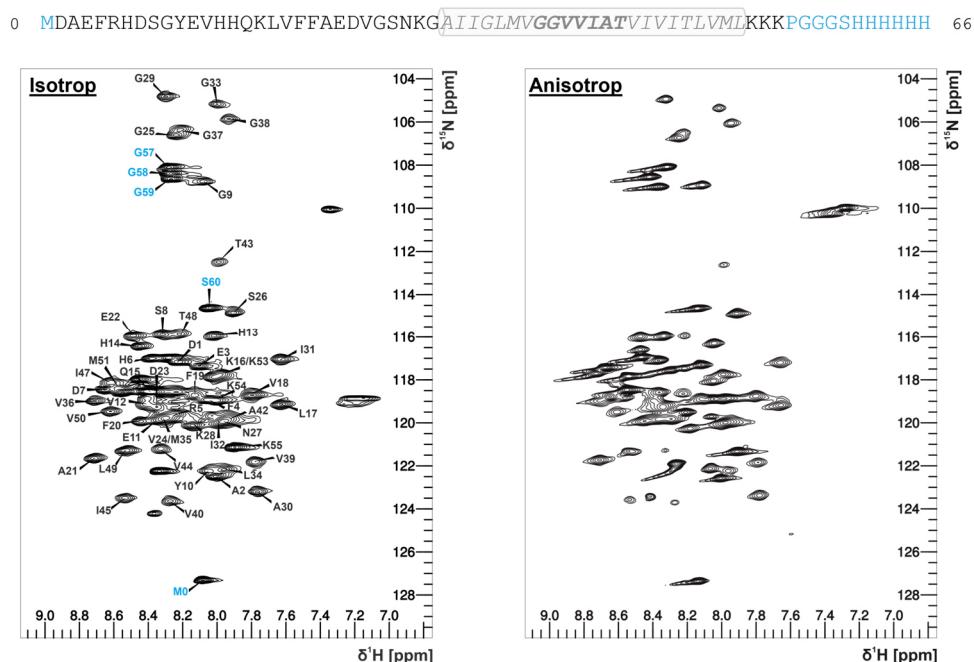


Abbildung 6.11 Isotope und anisotrope ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der APP TMD ausgehend einer zellfreien Proteinexpression. Linker und Tag sind in der obenstehenden Proteinsequenz in blau dargestellt, der TMD-Bereich ist grau hinterlegt. Die anisotropen Spektren zeigen starke Linienverbreiterungen bedingt durch das Alignmentmedium sowie die zusätzlichen anisotropen Kopplungen.

Zur Messung der dipolaren Restkopplung wurden die Transmembrandomänen von APP (volle Sequenz D1-K55, TMD-Bereich A30-L52) sowie dessen Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L mittels zellfreier Proteinexpression hergestellt. Der Sequenz sind ein zusätzlicher Linker, sowie ein His-Tag angefügt, welche bei der Zuordnung und den späteren Berechnungen nicht relevant sind. Nach der Expression wurden die Proteine lyophilisiert und anschließend in TFE-d₂/H₂O aufgenommen. Dabei lagen die durchschnittlichen erhaltenen Konzentrationen bei 250-500 μM aus 1 mL

Reaktionscontainern. Zur Zuordnung der chemischen Verschiebungen wurden von den isotropen Proben ^1H - ^{15}N - HSQC- und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektren (In-Phase/Anti-Phase) und von den Mutanten zusätzlich dreidimensionale Experimente (HNCA, HNCO, HNCOCA, HNCOCACB) gemessen. Im Anschluss folgte das Überführen der Proben in 14 %-PEG-Gele^[129] als Alignmentmedium, sowie erneute Aufnahmen von ^1H - ^{15}N HSQC- und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektren in den gestreckten Polymergelen.

Die Spektren der isotropen Proben zeigen wenig bis keine Linienverbreiterungen, sowie gut separierte Signale. Diese konnten zumeist eindeutig den entsprechenden Aminosäureresten zugeordnet werden. Der Fokus lag dabei auf der Transmembrandomäne der Substrate. Zur Veranschaulichung ist exemplarisch das Spektrum der isotropen und anisotropen Probe der APP TMD in **Abbildung 6.11** dargestellt. Die Spektren der APP Mutanten sind dem Anhang zu entnehmen (**Abbildung A. 20 - Abbildung A. 23, Tabelle A. 7 - Tabelle A. 11**). Bedingt durch die Einlagerung in das 14 %-PEG-Gel und dem anschließenden Strecken des Polymergels zeigen die anisotropen Spektren eine starke Linienverbreiterung. Dies erschwerte eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Signale, weshalb nicht alle RDCs bestimmt werden konnten.

Die ermittelten RDCs wurden anschließend mit Hilfe des Programms **PALES** (engl. *Prediction of AlignmEnt from Structure*)^[131] mit bereits existierenden Strukturdaten der Proteine (erstellt von **Dr. Mara Silber**^[36, 65]) verglichen. Die RDCs liefern wichtige Informationen über die relative Orientierung der einzelnen Untereinheiten eines Proteinmoleküls. **PALES** verwendet dabei die aus den NOEs errechneten dreidimensionalen Strukturbündel des Proteins und berechnet davon ausgehend den Ausrichtungstensor, welcher die Orientierung von Molekülen in einer Umgebung auf Grundlage von elektrostatischen oder sterischen Effekten beschreibt. **PALES** kann somit die gemessenen Dipolkopplungen mit den entsprechenden dreidimensionalen Strukturen abgleichen und folglich die „Richtigkeit“ der Strukturmodelle validieren. Wenn sich die Daten der Strukturen mit den experimentellen RDCs decken, sollten somit auch die vorhergesagten Ausrichtungstensoren von **PALES** mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Die Güte der Übereinstimmung zwischen den RDCs mit jenen aus den Strukturdaten wird mit dem Korrelationsfaktor R (Pearson's Linearkorrelations Koeffizient) sowie dem Q-Faktor (Saupe) ausgedrückt. Ein Korrelationsfaktor von 1 sowie ein Q-Faktor^[133, 300] von 0 spiegeln dabei perfekte Übereinstimmungen der Ergebnisse wider. Ein Q-Faktor unterhalb von 0,2 soll dabei für eine Struktur mit hoher Auflösung (1.5 Å) und somit einer guten Genauigkeit stehen.^[301].

Eine zusammengefasste graphische Darstellung des Vergleichs von berechneten und experimentellen RDCs für die APP TMD und dessen Mutanten kann dem Anhang (**Abbildung A. 24**) entnommen werden. Im Folgenden sollen nun zunächst die

Ergebnisse der einzelnen Substrate in Kürze vorgestellt und anschließend in Kapitel 6.2.2.6 zusammengefasst betrachtet werden.

6.2.2 Strukturuntersuchung der APP TMD und Mutanten

6.2.2.1 APP WT TMD

Zunächst wurde der APP WT betrachtet und die experimentell ermittelten RDCs mit den in TFE-d₂/H₂O (PDB: 6YHF) generierten Strukturbündeln mittels PALES verglichen. Die Strukturbündel zeigen eine weite Auffächerung, sowie einen Knick am Di-Glycin-Motiv an Position G37-G38 (**Abbildung 6.12 (a)**). Die Auffächerung könnte hierbei ein Zeichen für die Dynamik des Proteins sein, wobei dieses unterschiedliche Konformationen im Lösemittel annehmen kann. Dabei stellt sich die Frage, wie sich dies in einer Umgebung mit erhöhtem äußerem Druck ändert. Falls der Knick an der Position des Di-Glycin-Motivs starr wäre, sollte sich dieser auch in den PEG-Gelen zeigen.

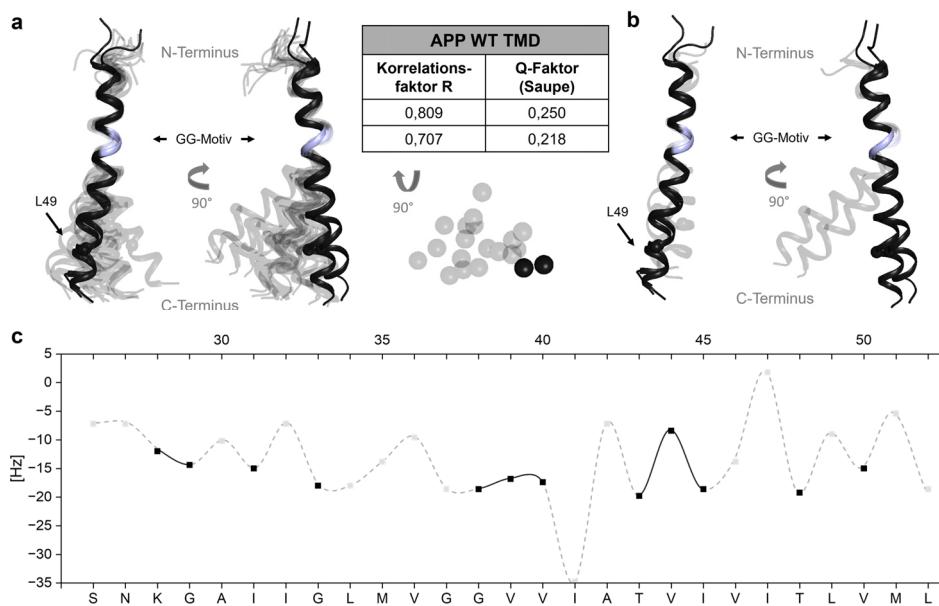


Abbildung 6.12 Auswertung der residualen Restkopplung der APP WT TMD. **(a)** Gegenüberstellung der Strukturbündel (PDB: 6YHF, transparent, Überlagerung auf I31-I41) gegen die beiden besten Strukturen (schwarz) ausgehend von PALES. Die Qualitätsfaktoren der beiden besten Strukturen sind aufgelistet sowie eine Ansicht von unten auf die Strukturbündel; dargestellt sind die L49 C_α als Kugeln. Die beiden Strukturen mit der höchsten Übereinstimmung sind farblich hervorgehoben. **(b)** Gegenüberstellung der beiden besten (schwarz) und der beiden schlechtesten (transparent) Strukturen ausgehend des Vergleichs der experimentellen und generierten RDCs durch PALES. **(c)** Die RDCs in Hz sind für die einzelnen Aminosäurereste der APP TMD als interpoliertes Punkt-Liniendiagramm dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen gemessene, aber aufgrund von zu hohen Unsicherheiten nicht in den Berechnungen verwendete RDCs dar.

Die Strukturen, welche die höchste Übereinstimmung anhand der Qualitätsfaktoren mit den experimentellen RDCs zeigten, sind in der **Abbildung 6.12 (a)** farblich hervorgehoben. Dabei fällt auf, dass diese keinen Knick oder Biegung aufweisen und

nahezu deckungsgleich sind. Der Korrelationsfaktor ergab für diese beiden Strukturen Werte von 0,809 sowie 0,707. Da ein Faktor von 1 eine optimale Übereinstimmung anzeigt, weicht die zweite Struktur bereits um einiges vom optimalen Wert ab. Die Gegenüberstellung der Strukturen mit den höchsten Qualitätsfaktoren und den beiden mit den niedrigsten, zu sehen in **Abbildung 6.12 (b)**, ergibt eine starke Abweichung der Strukturen zueinander. Die Strukturen mit den geringsten Übereinstimmungen mit den experimentellen RDCs zeigen einen starken Knick, beginnend am Di-Glycin-Motiv (Überlagerung auf I31-I41). Ausgehend der weit gefächerten Strukturbündel wäre eine gebogenere Struktur mit den höchsten Qualitätsfaktoren erwartet worden und nicht mit den niedrigsten.

Das verwendete PEG-Gel als Alignmentmedium war dafür gedacht den zu untersuchenden Molekülen eine gewisse Richtung vorzugeben, jedoch keinen starken äußeren Zwang auszuüben, wie es beispielsweise in Lipiddoppelschichten der Fall ist. Allerdings zeigt sich in den hier erhobenen Daten, dass bereits geringe äußere Einwirkungen ausreichend sind, um der offensichtlich flexiblen APP TMD eine Richtung vorzuweisen. Aufgrund der augenscheinlichen Anpassungsfähigkeit von APP an dessen Umgebung wird die bereits von M. Silber et al. und Götz et al. postulierte Flexibilität des Proteins erneut aufgegriffen.^[36, 64] Zusätzlich muss angemerkt werden, dass auch RDCs mit ihrer starken Richtungsabhängigkeit sensibel auf molekulare Bewegungen reagieren, wodurch es zu starken Abweichungen zwischen experimentellen und berechneten RDCs kommen kann.^[302] Dies scheint für die APP TMD bedingt gegeben zu sein, wie in der Gegenüberstellung von experimentellen und berechneten Daten zu erkennen ist (siehe Anhang **Abbildung A. 24**). Folglich deuten die Ergebnisse auf eine flexible Struktur des APP hin.

An dieser Stelle darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es nicht möglich war für alle Aminosäuren RDCs zu ermitteln, beziehungsweise diese aufgrund von zu starken Überlagerungen in die Rechnung mit PALES einfließen zu lassen. Dadurch reduziert sich die Aussagekraft der berechneten RDC-Werte und folglich der Strukturabgleich erheblich, wobei jedoch eine reduzierte Datenmenge an RDCs die Berechnungen mit PALES tendenziell verbessern. Dadurch ergeben die Korrelationsfaktoren gute Übereinstimmungen, welche allerdings nicht unbedingt die strukturelle Realität des Proteins widerspiegeln müssen. **Abbildung 6.12 (c)** stellt die graphische Auftragung der RDCs gegen die jeweiligen Reste dar, wobei die gestrichelten Linien experimentell ermittelte RDCs aber nicht in der Berechnung mit PALES einbezogene Werte repräsentieren. Bei der Auftragung bildet sich allgemein veranschaulicht eine sogenannte „dipolare Welle“. Diese beschreibt die periodische Variation der RDCs und stellt somit eine direkte Verbindung zwischen den experimentellen Messungen in einer ausgerichteten Probe und der Periodizität regelmäßiger Sekundärstrukturelemente her. Die periodische Schwingung der dipolaren Kopplungen zwischen ¹H und ¹⁵N in der helikalen Proteinstruktur veranschaulicht, wie die Struktur durch die Anisotropie der

Kernspin-Wechselwirkungen in ausgerichteten Proben dargestellt wird. Die charakteristische Periodizität von 3,6 Resten pro Helixwindung einer α -Helix führt somit zu dipolaren Wellen mit der gleichen Periodizität. Bei einem „Knick“ oder einer „Krümmung“ der Struktur weicht diese ab. Die Schwankungen der Durchschnittswerte und Amplituden der Sinuskurven reflektieren die Torsionswinkelunterschiede zwischen den einzelnen Resten in der Helix, die zu generellen Änderungen in der Ausrichtung der Helices führen. Hohe RDC-Werte (in Hz) zeigen folglich eine stärkere Ausrichtung der Moleküle parallel zum Magnetfeld.^[301, 303-306] Die APP TMD zeigt somit eine möglicherweise stärkere Änderung der Struktur um das Di-Glycin-Motiv (V36-A42), wobei die RDCs in diesem Bereich keine einheitliche, sinusförmige Kurve beschreiben. Es sei darauf hingewiesen, dass die Aminosäuren N27, I32, L34, M35, G37 und A42 zum Teil starke Überlagerungen aufwiesen. I41 sowie I47 und L49 sind in den anisotropen Spektren nicht eindeutig zuzuordnen, wodurch diese RDCs in den Berechnungen mit PALES nicht mit einbezogen wurden. Nichtsdestotrotz weisen die hier generierten Daten auf eine hohe Flexibilität der APP TMD hin. Im Folgenden wird auf die Mutanten von APP näher eingegangen.

6.2.2.2 G38P TMD

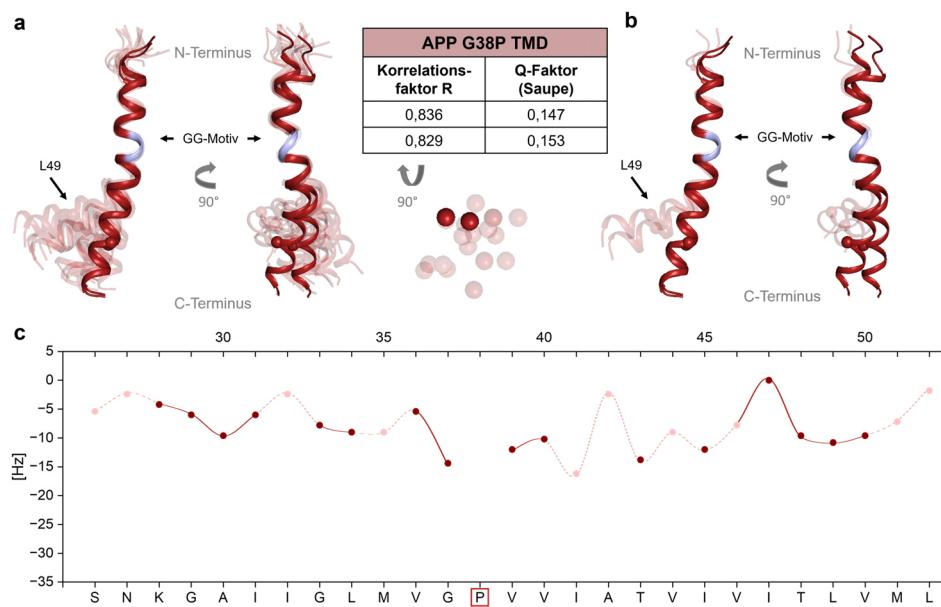


Abbildung 6.13 Auswertung der residualen Restkopplung der APP G38P TMD. **(a)** Gegenüberstellung der Strukturbündel (PDB: 6YHO, transparent, Überlagerung auf I31-I41) gegen die beiden besten Strukturen (rot) ausgehend von PALES. Die Qualitätsfaktoren der beiden besten Strukturen sind aufgelistet sowie eine Ansicht von unten auf die Strukturbündel; dargestellt sind die L49 C α als Kugeln. Die beiden Strukturen mit der höchsten Übereinstimmung sind farblich hervorgehoben. **(b)** Gegenüberstellung der beiden besten (rot) und der beiden schlechtesten (transparent) Strukturen ausgehend des Vergleichs der experimentellen und generierten RDCs durch PALES. **(c)** Die RDCs in Hz sind für die einzelnen Aminosäurereste der APP G38P TMD als interpoliertes Punkt-Liniendiagramm dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen gemessene aber aufgrund von zu hohen Unsicherheiten nicht in den Berechnungen verwendete RDCs dar.

Der Austausch der Aminosäure G38 in der APP TMD gegen ein Prolin wurde innerhalb der Forschergruppe FOR 2290 zur potentiellen Erhöhung der Flexibilität der Domäne eingeführt.^[64] In den proteolytischen Assays mit PSH zeigte sich eine erhöhte AICD-Produktion gegenüber dem WT, wohingegen in Zusammenhang mit der humanen γ -Sekretase eine deutliche Reduktion wahrgenommen werden konnte (Vergleich Kapitel 4.1.5).

In **Abbildung 6.13** sind die Ergebnisse der Strukturuntersuchung basierend auf den experimentell ermittelten RDCs für die G38P Mutante dargestellt. **Abbildung 6.13 (a)** zeigt die Strukturbündel (6YHF) der G38P TMD und hebt die besten zwei Strukturen, ausgehend von *PALES*, farblich hervor. M. Silber et al. zeigten in einem Strukturvergleich mit dem APP WT, dass G38P in TFE-d₂/H₂O eine deutlich gebogenere Struktur aufweist und mit einem Winkel von etwa 80° in die entgegengesetzte Richtung auffächert.^[36] Somit wurde für G38P ähnlich zur ursprünglichen Annahme beim WT eine gebogene Struktur als beste Struktur nach der RDC-Analyse erwartet. Der Vergleich der experimentellen RDCs mit den Koordinaten der Strukturbündel bestätigt dies jedoch nicht. Ähnlich zur APP TMD ergeben sich bevorzugt gerade Strukturen ohne starken Knick am Di-Glycin-Motiv. Im direkten Vergleich mit den beiden niedrigsten Übereinstimmungen sind an dieser Stelle stärker gebogene Strukturen zu sehen (**Abbildung 6.13 (b)**). Dies deckt sich folglich mit der Annahme ausgehend des APP WT (Kapitel 6.2.2.1), dass die Konformation der Mutante ebenfalls sehr flexibel ist und vom Alignmentmedium leicht in eine Richtung orientiert werden kann.

Die Korrelationsfaktoren liegen bei 0,836 und 0,829 und deuten somit auf eine gute Übereinstimmung der RDCs mit den Strukturen hin. **Abbildung 6.13 (c)** stellt die ermittelten RDCs gegen die Aminosäurereste des Proteinrückgrates dar, wobei mehr RDCs verwendet werden konnten als es beim WT der Fall war. Die Spektrenqualität der anisotropen Probe erwies sich für die Mutante besser (Vergleich **Abbildung 6.11** und Anhang **Abbildung A. 20**) und die RDCs weisen dabei eine kleinere Amplitude der sinusförmigen Welle im Vergleich zum WT auf. Damit scheint die Struktur des G38P etwas weniger stark mit dem Alignmentmedium ausgerichtet zu sein, was zur Folge hat, dass die beiden Strukturen mit dem höchsten Korrelationsfaktor eine schwach stärkere Auslenkung im Gegensatz zum WT zeigen. Am N-Terminus (A30-V36) sowie am C-Terminus (T48-L52) sind zudem keine eindeutigen, sinusförmigen Wellen zu erkennen. Dies ist gegenteilig zur APP TMD. Möglicherweise ergibt sich für die Mutante an den Termini eine Auflockerung der Strukturen und somit eine Veränderung der Ausrichtung. Diese Lockerung der Strukturen könnte mit der Ausrichtung im Alignmentmedium einhergehen, weshalb die RDCs eine gerade Struktur vorhersagen. Die Ansicht von unten auf den C-Terminus, bei der die Aminosäure L49 (C α) als Kugel dargestellt ist, zeigt zudem eine veränderte Lokalisation dieser in Hinblick auf die APP TMD. An dieser Position findet der initiale Schnitt der γ -Sekretase statt, wodurch die Ausrichtung der Strukturen hier von besonderem Interesse ist. Es wird angenommen,

dass je nach Ausrichtungswinkel der Strukturen im katalytischen Zentrum die Möglichkeit einer Enzym-Substrat-Interaktion beeinflusst werden kann, worauf in Kapitel 6.2.2.6 näher eingegangen wird. Die fehlenden Datenpunkte sind auf Überlagerungen im anisotropen Spektrum zurückzuführen. Zusammengefasst ergibt der Vergleich der experimentellen RDCs mit den Strukturbündeln eine Tendenz hingehend zu einer geraden α -Helix, die jedoch eine Form von Flexibilität aufweist, welche möglicherweise im Vergleich zum WT erhöht ist.

6.2.2.3 G38L TMD

Die G38L Mutante wurde, wie auch G38P, innerhalb der Forschergruppe FOR 2290 entworfen, wodurch eine Stabilisierung der Helix ausgehend des Austausches vom Glycin gegen das Leucin erwartet wurde. Wie sich herausstellte, wird G38L von PSH schlechter geschnitten als G38P und der WT, wobei die Proteolyse durch die humane γ -Sekretase im Gegensatz zu G38P leicht erhöht ist (Vergleich Kapitel 4.1.5).

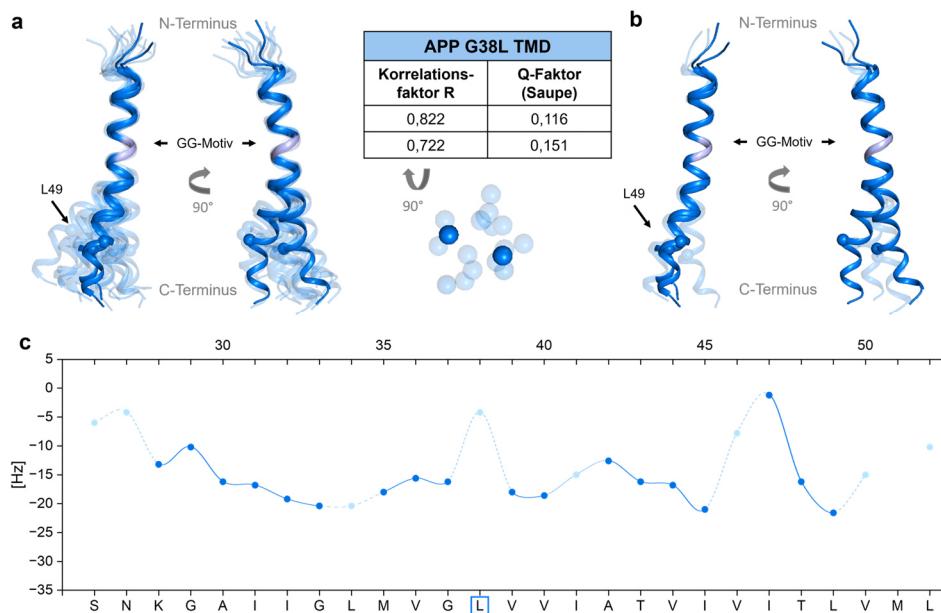


Abbildung 6.14 Auswertung der residualen Restkopplung der APP G38L TMD. **(a)** Gegenüberstellung der Strukturbündel (PDB: 6YHI, transparent, Überlagerung auf I31-I41) gegen die beiden besten Strukturen (blau) ausgehend von PALES. Die Qualitätsfaktoren der beiden besten Strukturen sind aufgelistet sowie eine Ansicht von unten auf die Strukturbündel; dargestellt sind die L49 C α als Kugeln. Die beiden Strukturen mit der höchsten Übereinstimmung sind farblich hervorgehoben. **(b)** Gegenüberstellung der beiden besten (blau) und der beiden schlechtesten (transparent) Strukturen ausgehend des Vergleichs der experimentellen und generierten RDCs durch PALES. **(c)** Die RDCs in Hz sind für die einzelnen Aminosäurereste der APP G38L TMD als interpoliertes Punkt-Liniendiagramm dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen gemessene aber aufgrund von zu hohen Unsicherheiten nicht in den Berechnungen verwendete RDCs dar.

Die Strukturbündel des G38L in TFE-d₂/H₂O zeigten wie bei G38P eine veränderte Ausrichtung im Vergleich zum WT, wobei der Biegewinkel am Di-Glycin-Motiv deutlich reduziert ist.^[36] Somit wurde auch hier eine gebogene Struktur angenommen. Die Daten aus den RDCs der G38L Mutante (PDB: 6YHI) ergeben wiederum eine ähnlich gerade

Struktur wie bei G38P, welche in **Abbildung 6.14 (a)** zu sehen ist. Bei einer Drehung um 90° wird allerdings sichtbar, dass die beiden Strukturen mit den höchsten Korrelationsfaktoren leicht voneinander weg neigen. Dies wurde für den WT und G38P nicht beobachtet. Folglich unterscheidet sich der bevorzugte Biegewinkel der Strukturen und die initiale Schnittstelle L49 ($C\alpha$) liegt nicht deckungsgleich vor. Die Korrelationsfaktoren liegen bei 0,822 (schwächer gebogene Struktur) und 0,722 (stärker gebogene Struktur), wodurch nur eine bedingte Genauigkeit in der Übereinstimmung zwischen den gemessenen und berechneten RDCs angenommen werden kann. Durch den Abgleich der Strukturen mittels *PALES* lassen sich zusammengefasst zwei strukturelle Varianten identifizieren, die sich durch eine leicht veränderte Helix-Ausrichtung beziehungsweise Rotation dieser auszeichnen.

Die dipolare Welle der RDCs zeigt einen ähnlichen Verlauf wie bei G38P. Allerdings manifestiert sich am N-Terminus von A30 bis G37 ein noch geringerer sinusförmiger Verlauf. Unter Berücksichtigung der nicht verwendeten RDCs zeigt sich an der Position der Mutation (G38L) eine Sinusform, welche eine veränderte Ausrichtung der Moleküle zur Folge haben könnte. Aufgrund von Überlagerungen konnte allerdings der Wert von L38 nicht in die Strukturberechnung mit einbezogen werden, ebenso wie L34, I41, V46 und V40-L52. Zusammengefasst scheint sich auch für die G38L Mutante eine bevorzugt gerade Konformation im PEG-Gel aufgrund der Flexibilität des Proteins zu ergeben. Allerdings besteht ausgehend der dipolaren Welle die Annahme, dass die Beweglichkeit im Gegensatz zu G38P leicht herabgesetzt ist.

6.2.2.4 V44M TMD

V44M stellt eine FAD-Mutante dar, welche in den Proteolyse-Assays mit PSH eine reduzierte Umsetzung zum APP WT aufwies. In Zusammenhang mit der humanen γ -Sekretase zeigte sich eine Verschiebung des initialen Schnittes auf T48, sowie ebenfalls eine Herabsetzung der AICD-Produktion (Vergleiche Kapitel 4.1.5).

Die besten Übereinstimmungen in den Strukturbündeln des V44M (PDB: 6YHP, orange) und den ermittelten RDCs sind in **Abbildung 6.15 (a)** dargestellt. Die Strukturbündel zeigen eine insgesamt starke C-terminale Auffächerung, wobei der Biegewinkel des Di-Glycin-Motivs zum WT reduziert ist.^[36] Aufgrund dessen wurden für die Ergebnisse ausgehend der RDCs eine geradere Struktur im Vergleich zu APP erwartet. Die von *PALES* herrührenden beiden besten Strukturen neigen allerdings C-terminal von den restlichen TMDs weg und weisen folglich eine Biegung der TMD auf. Dies konnte bei den G38-Mutanten bisher nicht beobachtet werden. Somit stellt sich die Frage, ob V44M eine geringere Flexibilität der TMD aufzeigt und folglich eine starrere, aber leicht gebogene Struktur besitzt. Dabei könnte das Alignmentmedium diese bevorzugte Konformation stabilisieren. Im Gegensatz zu den Strukturen mit den höchsten Korrelationsfaktoren zeigen die beiden schlechtesten Strukturen in **Abbildung 6.15 (b)**

geradere Helices. Die Korrelationsfaktoren weisen dabei mit 0,821 und 0,800 eine gute Übereinstimmung auf. Allerdings ist der gemessene Q-Faktor der zweiten Struktur mit 0,290 stärker erhöht, wodurch die Genauigkeit dieser stark herabgesetzt wird. Die berechneten und experimentellen RDCs stimmen dabei ebenfalls weniger gut überein (Anhang **Abbildung A. 24**).

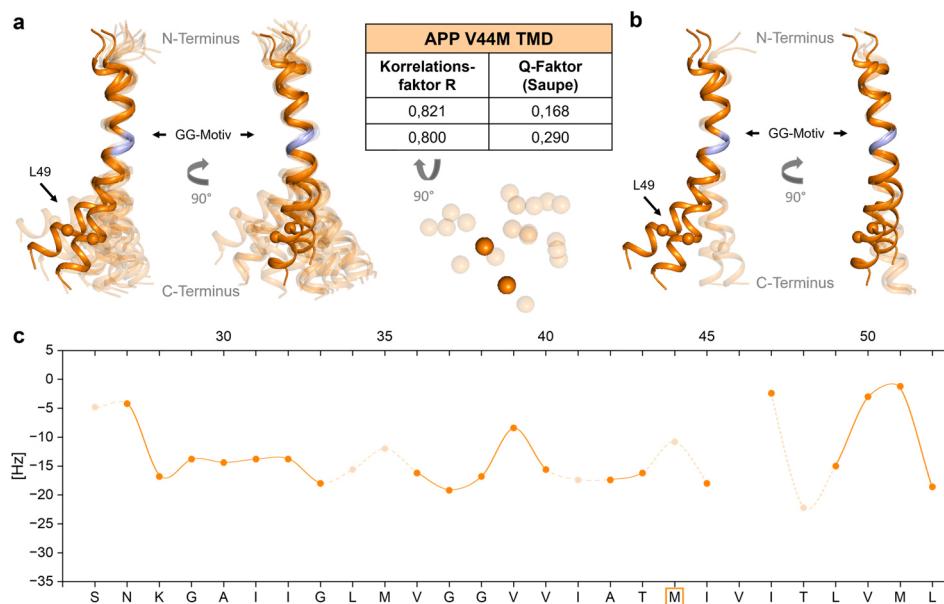


Abbildung 6.15 Auswertung der residualen Restkopplung der APP V44M TMD. **(a)** Gegenüberstellung der Strukturbündel (PDB: 6YHP, transparent, Überlagerung auf I31-I41) gegen die beiden besten Strukturen (orange) ausgehend von PALES. Die Qualitätsfaktoren der beiden besten Strukturen sind aufgelistet sowie eine Ansicht von unten auf die Strukturbündel; dargestellt sind die L49 C α als Kugeln. Die beiden Strukturen mit der höchsten Übereinstimmung sind farblich hervorgehoben. **(b)** Gegenüberstellung der beiden besten (orange) und der beiden schlechtesten (transparent) Strukturen ausgehend des Vergleichs der experimentellen und generierten RDCs durch PALES. **(c)** Die RDCs in Hz sind für die einzelnen Aminosäurereste der APP V44M TMD als interpoliertes Punkt-Liniendiagramm dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen gemessene aber aufgrund von zu hohen Unsicherheiten nicht in den Berechnungen verwendete RDCs dar.

Die experimentellen RDCs weisen eine reduzierte N-terminale Ausrichtung auf (**Abbildung 6.15 (c)**). Bezuglich des Di-Glycin-Motivs lässt sich eine Abweichung hinsichtlich des Ausrichtungswinkels feststellen, da die RDCs von V44M stärker sinusförmige Amplituden zeigen. Dies kann ebenfalls an der Mutationsposition festgestellt werden. Folglich kann für V44M eine stärker helikale Struktur angenommen werden, welche den C-Terminus zu stabilisieren scheint. Allerdings kann eine reduzierte Sinuskurve zwischen V40 und T43 verzeichnet werden und für I41 und M44 (wie auch L34, M35 und T48) konnten aufgrund von Überlagerungen keine RDCs bestimmt werden. Die Ansicht auf die Position der initialen Schnittstelle L49 verdeutlicht zudem die veränderte Neigung zum APP WT, welches möglicherweise Einfluss auf die reduzierte AICD-Produktion haben könnte. Zusammengefasst zeigen die beiden besten Strukturen mit den höchsten Korrelationsfaktoren ausgehend der RDCs bislang die stärkste

Neigung der APP-Substrate, weshalb hier auf eine weniger flexible TMD geschlossen wird.

6.2.2.5 I45T TMD

I45T ist wie V44M ebenfalls eine FAD-Mutante, welche in den Proteolyse-Assays neben G38P von PSH am besten umgesetzt wurde. Bei der Proteolyse durch die humane γ -Sekretase erhöhte sich das A β 42/A β 40 Verhältnis und es wurde eine deutlich verminderte AICD-Produktion beobachtet (Vergleiche Kapitel 4.1.5).

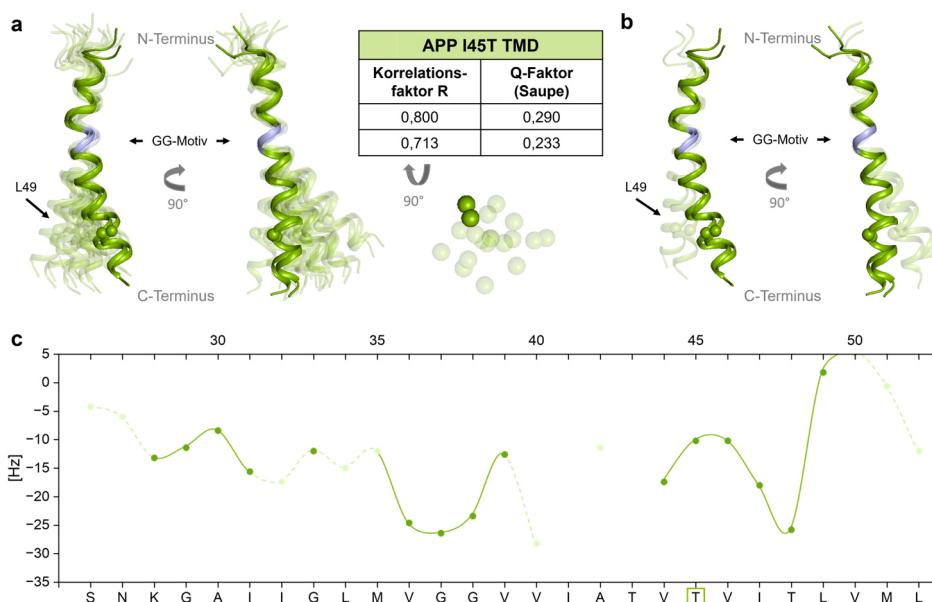


Abbildung 6.16 Auswertung der residualen Restkopplung der APP I45T TMD. **(a)** Gegenüberstellung der Strukturbündel (PDB: 6YHX, transparent, Überlagerung auf I31-I41) gegen die beiden besten Strukturen (grün) ausgehend von PALES. Die Qualitätsfaktoren der beiden besten Strukturen sind aufgelistet sowie eine Ansicht von unten auf die Strukturbündel; dargestellt sind die L49 C α als Kugeln. Die beiden Strukturen mit der höchsten Übereinstimmung sind farblich hervorgehoben. **(b)** Gegenüberstellung der beiden besten (grün) und der beiden schlechtesten (transparent) Strukturen ausgehend des Vergleichs der experimentellen und generierten RDCs durch PALES. **(c)** Die RDCs in Hz sind für die einzelnen Aminosäurereste der APP I45T TMD als interpoliertes Punkt-Liniendiagramm dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen gemessene aber aufgrund von zu hohen Unsicherheiten nicht in den Berechnungen verwendete RDCs dar.

Die Strukturbündel des I45T zeigen einen verminderten Biegewinkel des Di-Glycin-Motivs, sowie eine starke C-terminale Auffächerung.^[36] Die Auswertungen der RDCs für die I45T Mutante ergaben zwei beste Strukturübereinstimmungen mit helikalen, leicht gebogenen Strukturen. In **Abbildung 6.16 (a)** sind die Strukturen mit den höchsten Korrelationsfaktoren im Strukturbündel farblich hervorgehoben (PDB: 6YHX). Auffällig ist hierbei, dass die Neigung entgegengesetzt zu V44M verläuft. Es besteht die Annahme, dass I45T ebenso wie V44M starrer ist, weshalb die Moleküle im PEG-Gel nicht vollständig gestreckt werden konnten und somit die Biegung erhalten blieb. Die initiale Schnittstelle L49 (C α) neigt sich zudem um etwa 90° entgegen jener des WT. Die

Übereinstimmungen der berechneten mit den experimentell generierten RDCs zeigen Korrelationsfaktoren von 0,800 und 0,713. Durch die Abnahme der Qualitätsfaktoren ist die Sicherheit der Daten herabgesetzt. Auch die experimentellen und berechneten RDCs zeigen große Abweichungen (Anhang **Abbildung A. 24**).

Wie bereits bei V44M beobachtet, zeigt die dipolare Welle der RDCs eine verlängerte Sinuskurve an Position M35-V40. Die Auslenkung der Amplitude ist dabei allerdings niedriger. Zwischen V40 und A42 fehlen Informationen aufgrund von Überlagerungen in diesem Bereich des Spektrums. An der Position der eingeführten Mutation könnte sich eine reduzierte Ausrichtung der I45T Struktur beziehungsweise ein veränderter Ausrichtungswinkel bedingt durch die stark abweichenden RDC-Werte im Vergleich zu den anderen Substraten ergeben (**Abbildung 6.16 (c)**). Allerdings fehlen in diesem Bereich zu viele Datenpunkte, um eine abschließende Aussage darüber treffen zu können. I41 und T43 konnten nicht im Spektrum zugeordnet werden. Zusammengefasst wird vermutet, dass I45T wie auch V44M eine etwas starrere TMD im Vergleich zum APP WT aufweist, weshalb dieses stärker ausgerichtet wird und durch das PEG-Gel eine schwach gebogene Struktur beibehält.

6.2.2.6 Strukturvergleich sowie hypothetische Interaktion mit Präsenilin

Die APP Mutanten zeigen zusammengefasst unterschiedliche bevorzugte Konformationen sowohl in TFE-d₂/H₂O^[36] als auch im gestreckten PEG-Gel. **Abbildung 6.17 (a)** verdeutlicht die Unterschiede ausgehend der experimentell ermittelten RDCs. Die dipolaren Wellen der Substrate weisen sehr unterschiedliche Muster auf. Der WT könnte anhand des Di-Glycin-Motivs eine stärkere Ausrichtung aufweisen, da hier erhöhte RDC-Werte und folglich eine Sinuskurve mit hoher Amplitude postuliert sind (gestrichelte Linie, I41). G38P und G38L scheinen einen recht mobilen N-Terminus aufzuweisen. V44M sowie I45T zeigen hingegen veränderte, stärkere Ausrichtungen im Bereich des Di-Glycin-Motivs. Die Strukturen mit den besten Korrelationsfaktoren ausgehend der RDCs unterscheiden sich vor allem zwischen den Peptiden APP WT (sowie G38-Mutanten) mit den Mutanten V44M und I45T, welche jeweils in die entgegengesetzte Richtung des WT neigen **Abbildung 6.17 (b)**. Aufgrund dessen besteht die Annahme, dass die veränderten Ausrichtungen der Strukturen einen Einfluss auf die Schneideeffizienzen der Proteasen besitzen könnten. Der WT, G38P und G38L werden als recht flexibel betrachtet, wohingegen V44M und I45T eine etwas undynamischere Konformation zeigen könnten. Allerdings muss beachtet werden, dass die Proteine unterschiedlich stark in den PEG-Gelen gestreckt wurden (Vergleich **Tabelle A. 7 - Tabelle A. 11**). Dies könnte einen zusätzlichen Einfluss auf die Ausrichtung der Moleküle im Alignmentmedium haben sowie zu möglichen Wechselwirkungen zwischen dem Gel und den Peptiden führen, worauf in den Analysen keine Rücksicht genommen wurde.

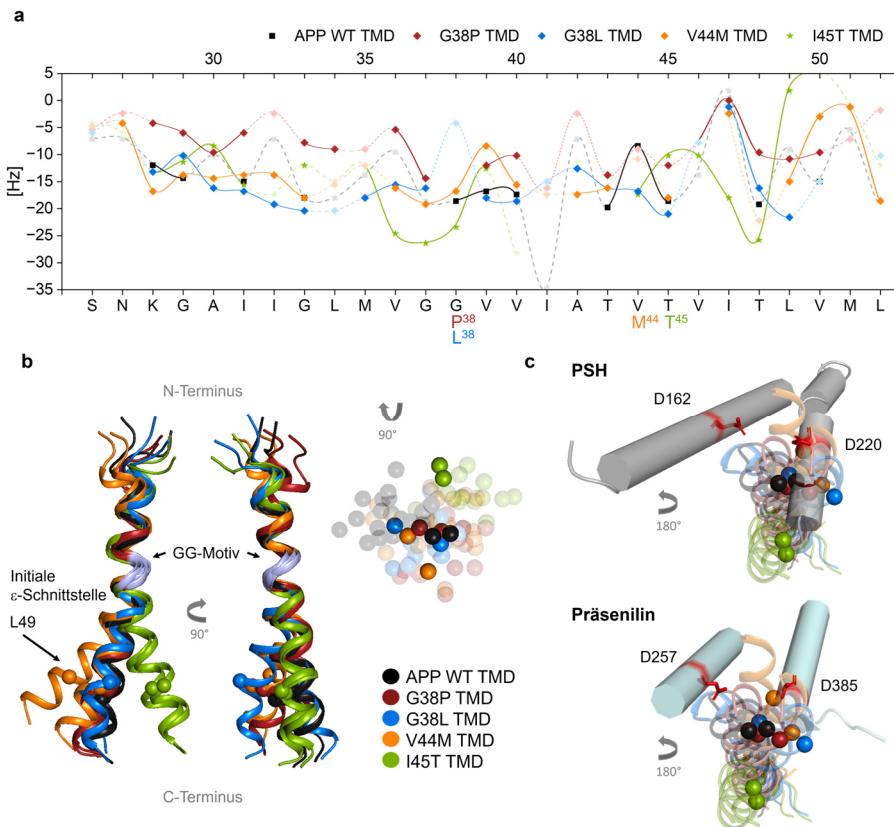


Abbildung 6.17 Zusammengefasste Darstellung der besten Strukturen der APP TMD sowie Mutanten. **(a)** Überlagerung der gemessenen RDCs für den APP WT und dessen Mutanten. **(b)** Überlagerung (I31-I41) der besten Strukturen (PDB: WT 6YHF, G38L 6YHI, G38P 6YHO, V44M 6YHP, I45T 6YHX) ausgehend der ermittelten RDCs. Die initiale Schnittstelle L49 ($\text{C}\alpha$) ist als Kugel dargestellt und verdeutlicht die unterschiedlichen Ausrichtungen dieser je nach Protein. **(c)** Vereinfachte modellhafte Darstellung der hypothetischen Einlagerung in das katalytische Zentrum von PSH (PDB: 4HYG) und humanem Präsenilin (PDB: 6IYC). Die APP-Strukturen wurden dabei auf die in den PSH/Präsenilin-Strukturen vorhandene APP-Domäne superpositioniert (I31-I41).

Die Mutanten wurden in den hier gezeigten Proteolyse-Assays von PSH unterschiedlich gut umgesetzt und auch die humane γ -Sekretase prozessiert diese in verschiedenem Ausmaß (Vergleich Kapitel 4.1.5). **Tabelle 6.1** zeigt eine schematische Gegenüberstellung der Schneideeffizienzen von PSH (aus den hier erfassten Proteolysen) und humaner γ -Sekretase (Literatur^[51, 63, 64]), in Bezug auf den APP/C99 WT. Vor allem der Unterschied in den Prozessierungen von G38P und I45T stechen dabei hervor. Somit stellt sich erneut die Frage, ob die strukturelle Gegebenheit eines Substrates Einfluss auf den Schneidemechanismus hat.

X. Guo et al.^[259] konnten zuletzt dank Kryo-Elektronenmikroskopie-Strukturen (PDB 8X54/3/2) beweisen, dass nach jedem erfolgten Tripeptid-Schnitt durch die γ -Sekretase die Substrate eine axiale Bewegung ausführen und somit um eine Helix-Windung tiefer in das katalytische Zentrum vordringen. Mutationen können dabei die Wasserstoffbrückenbindungen der α -Helix des N-Terminus beeinträchtigen, wodurch sich eine Destabilisierung der Substrat Bindung zeigt. Der Austausch einer großen

hydrophoben Seitenkette gegen eine kleinere kann zu einer reduzierten Enzym-Substrat-Interaktion führen. Durch den Austausch einer kleinen Aminosäureseitenkette gegen eine sperrigere kann es hingegen im katalytischen Zentrum zu sterischen Hinderungen kommen (Bsp. V44M und G38L). Dadurch ändert sich abhängig von den einzelnen Mutationen das A β 42/A β 40 Verhältnis.

Tabelle 6.1 Verhältnis an produziertem AICD des APP/C99 WT und dessen Mutanten durch PSH und humarer γ -Sekretase. Proteolytische Effizienzen: +++ sehr gut, ++ gut, + ok, +/- mäßig, - schlecht, -- sehr schlecht.

	C99 WT	G38P	G38L	V44M	I45T
PSH	++	+++	-	+-	++
γ -Sekretase	+++	--	-	+	-

Fraglich ist, warum die γ -Sekretase und ihr nahe Homolog PSH MCMJR1 eine solche Diskrepanz in den Interaktionen mit den Substraten aufweisen. Aufgrund der leicht veränderten Winkel der TMD6 und 7 von PSH und des Präsenilin der γ -Sekretase könnten die unterschiedlichen Präferenzen in der Proteolyse zustande kommen. Zur hypothetischen Visualisierung wurden die Substrate auf die in den Kryo-EM Strukturen vorhandene APP TMD I31-I41 superpositioniert (**Abbildung 6.17 (c)**). Für PSH wurde das modifizierte Modell von L. Feilen et al.^[86] ausgehend der PDB-Struktur 4HYG gewählt und für Präsenilin die Kryo-EM Struktur der γ -Sekretase (PDB: 6IYC). Die gewählte Darstellung verdeutlicht nochmals die unterschiedlichen Ausrichtungen der Helices sowie der initialen Schnittstellen von APP und dessen Mutanten. Die Zugänglichkeit der katalytischen Aspartate ist nach dem hier gezeigten schematischen Modell für die Proteine unterschiedlich gut.

Folglich könnten nicht nur die unterschiedlichen Flexibilitäten der Strukturen einen Einfluss auf die Enzym-Substrat-Interaktion haben, sondern auch die Positionierung der Schnittstellen innerhalb des Komplexes. Da es sich hierbei allerdings um eine modellhafte Darstellung handelt, müssten in nachfolgenden Untersuchungen experimentelle Daten, wie Kryo-EM Strukturen oder MD-Simulationen erhoben werden um diese Hypothese zu kräftigen. Die Enzyme zeigen ebenfalls durch ihre beweglichen Loops und der Ausbildung des β -Faltblattes ein hohes Maß an Flexibilität, welche maßgeblich für die Substrat-Interaktionen sind. Doch wie sich aus den Messungen in TFE-d₂/H₂O und dem gestreckten PEG-Gel zeigte, weisen die Proteine unterschiedliche strukturelle Präferenzen je nach Umgebung auf. Daher wird im folgenden Kapitel der Einfluss der Substratumgebung auf dessen Konformation kurz diskutiert.

6.2.3 Literaturvergleich der dipolaren Restkopplungen des APP WT mit bekannten Strukturdaten

Die Transmembrandomäne von APP wurde in der Literatur bereits vielfach auf ihre strukturellen Gegebenheiten untersucht. Dabei stellte sich die Frage, inwiefern sich die TMD in den unterschiedlichsten Umgebungen verhält und ob dies Rückschlüsse auf den Schneidemechanismus der γ -Sekretase ermöglichen kann. Molekulardynamische Simulationen von T. Lemmin et al. konnten bereits zeigen, dass die Biegung sowie der Knick der APP-Strukturen stark von der Membran-Umgebung abhängen.^[307] In **Abbildung 6.18** wird ein kurzer Überblick von drei Strukturen aufgeführt, welche mittels NOE-Kontakten in unterschiedlichen Umgebungen ermittelt wurden. Im Rahmen dessen erfolgt ein Vergleich mit den hier verwendeten APP Strukturen unter Einbeziehung der RDCs. Dabei wurden die experimentellen RDC-Daten der APP TMD auf Literatur bekannte Strukturdaten übertragen. Die erhaltenen Korrelationsfaktoren und Q-Faktoren sind der untenstehenden Tabelle zu entnehmen.

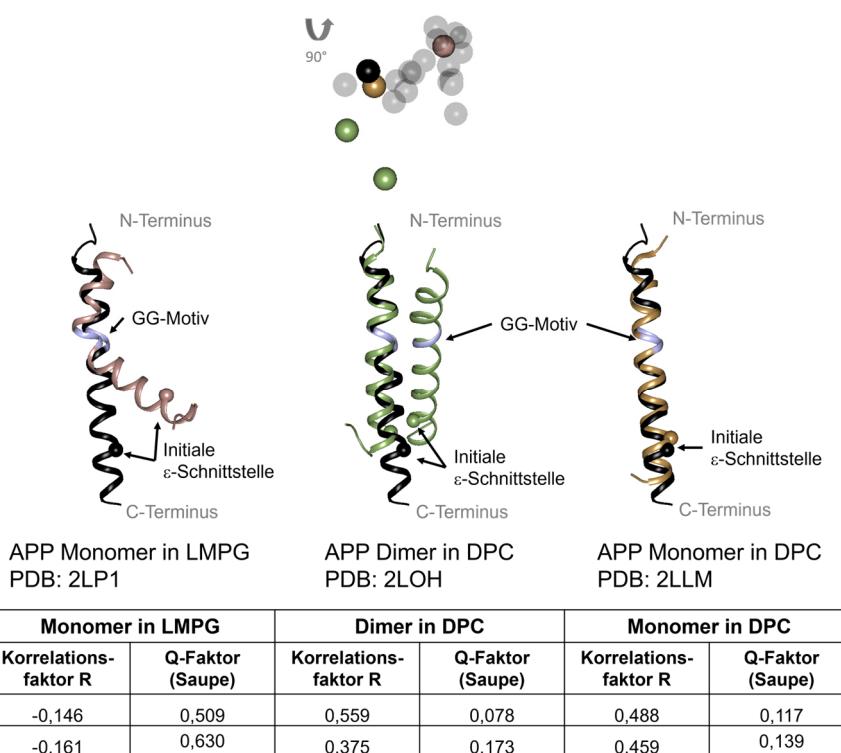


Abbildung 6.18 Struktureller Vergleich von APP in unterschiedlichen Umgebungen (Überlagerung I31-I41). In schwarz jeweils die beste Struktur laut RDCs der APP TMD (PDB: 6YHF) im gestreckten Polymergel. Links: Vergleich der RDCs mit APP Monomer in LMPG (PDB: 2LP1). Mitte: Vergleich der RDCs mit APP Dimer in DPC (PDB: 2LOH). Rechts: Vergleich der RDCs mit APP Monomer in DPC (PDB: 2LLM). Die Faktoren wurden ausgehen der experimentellen Daten des APP TMD Monomers generiert. Die initiale Schnittstelle L49 C α ist als Kugel dargestellt.

Die in dieser Arbeit verwendeten APP TMD Strukturen (PDB: 6YHF) zeigen im PEG-Gel eine gerade Struktur und keinen Knick des Di-Glycin-Motivs, so wie es für APP in DPC

beobachtet werden konnte. Dadurch wurde eine gewisse Flexibilität für APP angenommen, weshalb sich dieses leicht an die Umgebungen und den einwirkenden äußeren Druck anpassen kann. Somit kann angenommen werden, dass die ermittelten, aufgefächerten Strukturbündel aus TFE-d₂ reale Momentaufnahmen der möglichen Konformationen widerspiegeln.

Die Arbeitsgruppe um C. Sanders zeigte die Ausformung einer geknickten, helikalen Struktur in LMPG-Mizellen^[37], wobei das Di-Glycin-Motiv hierfür der auslösende Faktor zu sein scheint. Durch die starke Biegung der Struktur liegt die initiale Schnittstelle L49 (C α Kugeldarstellung) weit entfernt von den Strukturen im gestreckten Polymergel. C. Sanders et al. postulieren, dass aufgrund der Lokalisation des N-Loops sowie der N-Helix die Möglichkeit besteht, dass die APP TMD eine Lipid-Bindestelle aufweist. Dies konnten sie durch Cholesterol Titrationen bestätigen, wobei die Menge an eingesetztem Cholesterol im Rahmen der Plasma- und Organellmembranen von Säugetieren liegt. Des Weiteren vermuten sie, dass das G29XXXG33 Motiv auf der Außenseite der gebogenen TMD liegt, wodurch mittels Van-der-Waals-Wechselwirkungen Interaktionen mit Cholesterol oder einer weniger bevorzugten Dimerisierung stattfinden könnte, welche die gekrümmte Struktur in LMPG erklären würde. Die Berechnungen mit den hier generierten RDCs ergaben negative Korrelationsfaktoren, wodurch keinerlei Übereinstimmung in den Strukturen berechnet werden konnte.

Die Arbeitsgruppe um A. S. Arseniev hingegen konnte in DPC-Mizellen sowohl eine monomere^[308] als auch eine dimere Struktur^[233] bestimmen. Diese zeigen keine Biegungen am Di-Glycin-Motiv, wodurch die initialen Schnittstellen nahe zusammen liegen. Die Dimerisierung des APP könnte aufgrund von TMD-Helix-Helix-Interaktionen entstehen, wobei die Formierung durch ein höheres Peptid/Detergens-Verhältnis gefördert wurde. Das linkshändige parallele Dimer wird dabei durch das Motiv I31xxxM35xxG38xxxA42xxI45xxxL49xxL52 initiiert und durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Seitenketten stabilisiert. Dadurch wird die Flexibilität des Proteins verringert, und es wird vermutet, dass die dimere Form die Schneideeffizienz verringern kann. Die monomere Struktur der APP TMD in DPC wird durch ein Peptid/Detergens Verhältnis von 1:70 begünstigt. Dabei unterteilt sich die α -Helix in zwei Bereiche: K16-D23 und G29-L49, wobei diese durch einen flexiblen Loop V24-K28 verbunden sind. DPC scheint folglich wie das PEG-Gel die flexible APP TMD in eine bestimmte Konformation zu bringen. Die ermittelten Korrelationsfaktoren weisen allerdings nur eine geringe Übereinstimmung auf, wobei diese im Vergleich zu LMPG deutlich erhöht ist.

Die beiden aufgeführten monomeren Strukturen der APP TMD wurden zuletzt durch Verwendung eines Servers in unterschiedliche Umgebungen eingebettet, um die mögliche Ausrichtung der Helices visualisieren zu können. Der für die Rechnungen genutzte **PPM**-Server (engl. *Positioning of Proteins in Membranes*) verwendet dabei aus

NOE-Kontakte generierte PDB-Strukturbündel und berechnet die durchschnittliche optimale räumliche Ausrichtung dieser Bündel durch Minimierung der freien Energien für den Transfer in der gewählten Umgebung.^[309] Dabei werden vor der Rechnung die Anzahl an Membranen definiert, sowie die Art der Membran und die Topologie des N-Terminus der einzubettenden Struktur. Dabei zeigen sich veränderte Ausrichtungen des N-Terminus der beiden APP Strukturen und eine unterschiedliche Einlagerung des C-Terminus, sowohl in DPC- als auch in DMPC-Umgebung (**Abbildung 6.19**). Die energieminiimierte TFE-d₂-Struktur ausgehend vom PDB 6YHF Bündel neigt sich recht stark in der DMPC- wie auch in der DPC-Umgebung. Dahingegen scheint die energieminiimierte Struktur des APP Monomers des PDB 2LLM Bündels gestreckter zu sein. Hierbei ist anzumerken, dass am N-Terminus des 2LLM zusätzlich die Aminosäuren G13-V25 vorhanden sind (entspricht C99), welche allerdings aus den Membranen als flexible Domäne herausragen und somit nicht die Einlagerung der TMD stören.

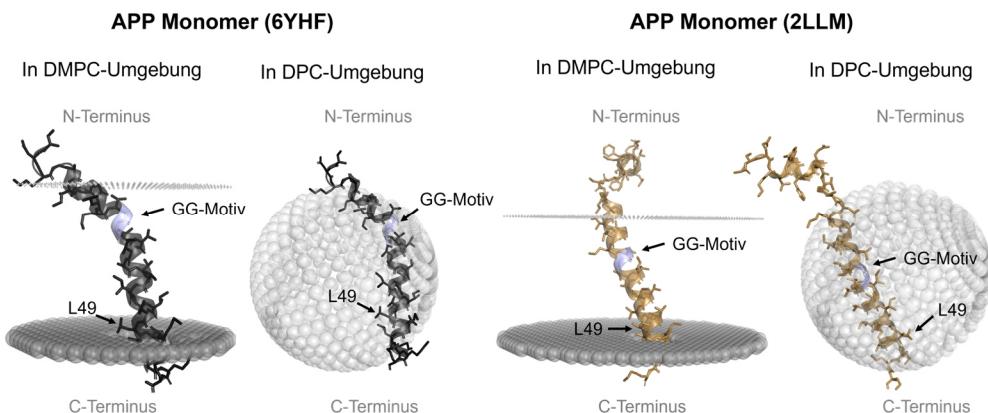


Abbildung 6.19 Vergleich von bekannten APP Strukturen in unterschiedlichen Umgebungen, berechnet mit PPM-Server.^[309] Links: APP TMD Strukturen (S26-K55) erhalten aus TFE-d₂/H₂O-Umgebung (6YHF), eingebettet in DMPC- sowie DPC-Umgebung. Rechts: APP TMD Strukturen (G13-K55) erhalten aus DPC-Umgebung (2LLM), eingebettet in DMPC- sowie DPC-Umgebung.

Die dabei beobachtete Variabilität in der Ausrichtung der TMD in unterschiedlichen Medien, sowie die Tatsache, dass APP monomere als auch dimere Strukturen annehmen kann, bestätigt abermals die Vermutung, dass die APP-Struktur sehr variabel ist. Das gewählte Membranmimikry zeigt dabei einen großen Einfluss auf die Konformation des Proteins. Die Ergebnisse zusammen betrachtet zeigen ein hohes Maß an Flexibilität des γ -Sekretase Substrates, welches schlussendlich als ein Hauptkriterium für eine erfolgreiche Proteolyse durch die γ -Sekretase angenommen werden kann.

7 Fazit und Ausblick der Strukturuntersuchungen

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich übergreifend mit der Strukturaufklärung von γ -Sekretase Substraten sowie eines Nicht-Substrates. Dabei zeigten sich unterschiedliche strukturelle Gegebenheiten der einzelnen Proteine wie ein flexibles Motiv, die Ausbildung eines β -Stranges sowie eines C-terminalen basischen Ankers. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass keines der Motive als exklusives Selektionskriterium betrachtet werden kann. Das nahe Homolog APLP2 des vielfach untersuchten Substrates APP weist ähnliche Motive zu APP auf, wie einen basischen Anker und eine flexible Domäne. Fn14 wiederum zeigt eine große Variabilität der TMD in den Strukturrechnungen mit stabilen helikalen Bereichen in der TMD-Mitte. ErbB4 besitzt einen langen basischen Anker am C-Terminus der Sequenz, welcher eine hohe Variabilität zeigte. Das Nicht-Substrat ITGB1 weist dahingegen eine lange, stabile Helix auf und besitzt weder eine flexible Domäne noch ein β -Strang-Motiv.

Eine abschließende Beurteilung und Klassifizierung in der Auswahl der γ -Sekretase Substrate ist bislang nicht eindeutig möglich. Nichtsdestotrotz konnte hier gezeigt werden, dass das Vorhandensein von einem oder mehreren Motiven die Interaktion mit den katalytischen Aspartaten der γ -Sekretase begünstigen, wobei die Flexibilität eine übergeordnete Rolle spielt. Für eine spezifischere Validierung sind Proteolyse-Assays und ein direkter Vergleich einer Vielzahl an unterschiedlichen Substraten und bekannten Nicht-Substraten in Zukunft unerlässlich. Die Einführung von Fluor-markierten Aminosäuren an dem Enzym sowie den Substraten und anschließende Messungen mittels Flüssig- sowie Festkörper-NMR könnten zudem detailliertere Aufschlüsse über den Schneidemechanismus geben, wie bereits in Kapitel 5 erwähnt wurde. Dadurch könnten Rückschlüsse auf die genauen Lokalisationen der Interaktionen zwischen Enzym und Substrat durch die selektive Markierung einzelner Aminosäurereste gewonnen werden. Dies ermöglicht den effizienten Vergleich von einer Vielzahl an Substraten.

Die Messungen der dipolaren Restkopplungen von APP und den Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L bestätigten die bereits von Dr. Mara Silber postulierten Strukturänderungen und die damit einhergehende mögliche Flexibilität der TMD bei Einführung einer Punktmutation. Dies könnte die veränderte beziehungsweise verminderte Prozessierung durch die γ -Sekretase sowie von PSH in den Western Blot Analysen erklären (Vergleiche Kapitel 4). APP und die G38-Mutanten weisen ein hohes Maß an Flexibilität auf wohingegen V44M und I45T eine Verringerung dieser zeigten. Die Ausrichtungen der initialen Schnittstellen könnten zudem je nach Peptid verändert sein, wodurch eine Einlagerung in das katalytische Zentrum erschwert werden würde.

Um allerdings genauere Einblicke in den Mechanismus der Erkennung und Prozessierung durch die γ -Sekretase zu erlangen, müssen weitere experimentelle Daten erhoben werden. Unter anderem sollte es hier eine Ausweitung der Membran-Mimetika hin zu Bizellen oder Nanodiscs geben, um eine realitätsnähere Umgebung zu gestalten. Die Messungen von dipolaren Restkopplungen an weiteren Substraten könnten zusätzliche strukturelle Informationen liefern. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Messungen der RDCs für die Proteine aufgrund von Linienverbreiterungen und möglichen Interaktionen mit dem Alignmentmedium erschwert waren. Infolgedessen wäre eine Optimierung der gestreckten PEG-Gele oder das Verwenden anderer Alignmentmedien denkbar.

Die Erforschung der Substrate der γ -Sekretase ist noch nicht abgeschlossen und wird in Zukunft ein wichtiger Aspekt in der Grundlagenforschung bleiben. Insbesondere im Hinblick auf die weitere Entwicklung von Therapeutika ist ein vertieftes Verständnis der γ -Sekretase und ihrer Substrate von großem Nutzen.

Literaturverzeichnis

- [1] Wolfe, M. S., "Intramembrane Proteolysis". *Chem. Rev.*, (2009), 109, pp. 1599-1612.
- [2] Müller-Esterl, W., "Biochemie", 3. Aufl. 2018 ed., Springer, ISBN: 978-3-662-54850-9, Berlin, Heidelberg, (2018).
- [3] López-Otín, C., Bond, J. S., "Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease**". *J. Biol. Chem.*, (2008), 283, pp. 30433-30437.
- [4] Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J., "MEROPS: the peptidase database". *Nucleic Acids Res.*, (2004), 32, pp. D160-164.
- [5] Stank, A., Kokh, D. B., Fuller, J. C., Wade, R. C., "Protein Binding Pocket Dynamics". *Accounts of Chemical Research*, (2016), 49, pp. 809-815.
- [6] Carter, P., Wells, J. A., "Dissecting the catalytic triad of a serine protease". *Nature*, (1988), 332, pp. 564-568.
- [7] Hedstrom, L., "Serine Protease Mechanism and Specificity". *Chem. Rev.*, (2002), 102, pp. 4501-4524.
- [8] Coates, L., Tuan, H.-F., Tomanicek, S., Kovalevsky, A., Mustyakimov, M., Erskine, P., Cooper, J., "The Catalytic Mechanism of an Aspartic Proteinase Explored with Neutron and X-ray Diffraction". *J. Am. Chem. Soc.*, (2008), 130, pp. 7235-7237.
- [9] Klein, T., Eckhard, U., Dufour, A., Solis, N., Overall, C. M., "Proteolytic Cleavage—Mechanisms, Function, and “Omic” Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification". *Chem. Rev.*, (2018), 118, pp. 1137-1168.
- [10] Wolfe, M. S., De Los Angeles, J., Miller, D. D., Xia, W., Selkoe, D. J., "Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease". *Biochem.*, (1999), 38, pp. 11223-11230.
- [11] Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., Goldstein, J. L., "Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs". *Mol. Cell*, (1997), 1, pp. 47-57.
- [12] Freeman, M., "Rhomboid proteases and their biological functions". *Annu. Rev. Genet.*, (2008), 42, pp. 191-210.
- [13] Sun, L., Li, X., Shi, Y., "Structural biology of intramembrane proteases: mechanistic insights from rhomboid and S2P to γ -secretase". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (2016), 37, pp. 97-107.
- [14] Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., Goldstein, J. L., "Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans". *Cell*, (2000), 100, pp. 391-398.
- [15] Langosch, D., Steiner, H., "Substrate processing in intramembrane proteolysis by γ -secretase - the role of protein dynamics". *Biol. Chem.*, (2017), 398, pp. 441-453.
- [16] Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J., "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity". *Nature*, (1999), 398, pp. 513-517.
- [17] Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, L., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., "Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease". *Nat. Med.*, (1996), 2, pp. 864-870.
- [18] Wolfe, M. S., Kopan, R., "Intramembrane proteolysis: theme and variations". *Science*, (2004), 305, pp. 1119-1123.

- [19] Johnson, D. S., Li, Y. M., Pettersson, M., St George-Hyslop, P. H., "Structural and Chemical Biology of Presenilin Complexes". *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, (2017), 7.
- [20] Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., Haass, C., "Reconstitution of gamma-secretase activity". *Nat. Cell Biol.*, (2003), 5, pp. 486-488.
- [21] Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2003), 100, pp. 6382-6387.
- [22] Hong, C.-S., Koo, E. H., "Isolation and characterization of Drosophila presenilin homolog". *NeuroReport*, (1997), 8, pp. 665-668.
- [23] Wolfe, M. S., "Toward the structure of presenilin/γ-secretase and presenilin homologs". *Biochim. Biophys. Acta.*, (2013), 1828, pp. 2886-2897.
- [24] Ratovitski, T., Slunt, H. H., Thinakaran, G., Price, D. L., Sisodia, S. S., Borchelt, D. R., "Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin". *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, pp. 24536-24541.
- [25] Podlisny, M. B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E. H., Seubert, P., St George-Hyslop, P., Teplow, D. B., Selkoe, D. J., "Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue". *Neurobiol. Dis.*, (1997), 3, pp. 325-337.
- [26] Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R., Sisodia, S. S., "Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors". *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, pp. 28415-28422.
- [27] Hur, J.-Y., "γ-Secretase in Alzheimer's disease". *Exp. Mol. Med.*, (2022), 54, pp. 433-446.
- [28] Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Gu, Y., Selkoe, D. J., Wolfe, M. S., "Nicastrin functions to sterically hinder γ-secretase-substrate interactions driven by substrate transmembrane domain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2016), 113, pp. E509-518.
- [29] Kaether, C., Haass, C., Steiner, H., "Assembly, trafficking and function of gamma-secretase". *J. Neurodegener. Dis.*, (2006), 3, pp. 275-283.
- [30] Bai, X.-C., Yan, C., Yang, G., Lu, P., Ma, D., Sun, L., Zhou, R., Scheres, S. H. W., Shi, Y., "An atomic structure of human γ-secretase". *Nature*, (2015), 525, pp. 212–217.
- [31] Hur, J.-Y., "γ-Secretase in Alzheimer's disease". *Exp. Mol. Med.*, (2022), 54, pp. 433-446.
- [32] Lazarov, V. K., Fraering, P. C., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., Li, H., "Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2006), 103, pp. 6889-6894.
- [33] Wolfe, M. S., "Structure and Function of the γ-Secretase Complex". *Biochem.*, (2019), 58, pp. 2953–2966.
- [34] Fukumori, A., Steiner, H., "Substrate recruitment of γ-secretase and mechanism of clinical presenilin mutations revealed by photoaffinity mapping". *Embo J.*, (2016), 35, pp. 1628–1643.
- [35] Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., Selkoe, D. J., "Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements". *PLoS Biol.*, (2008), 6, pp. e257.
- [36] Silber, M., Hitzenberger, M., Zacharias, M., Muhle-Goll, C., "Altered Hinge Conformations in APP Transmembrane Helix Mutants May Affect Enzyme-Substrate Interactions of γ-Secretase". *ACS Chem. Neurosci.*, (2020), 11, pp. 4426-4433.

- [37] Barrett, P. J., Song, Y., van Horn, W. D., Hustedt, E. J., Schafer, J. M., Hadziselimovic, A., Beel, A. J., Sanders, C. R., "The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol". *Science*, (2012), 336, pp. 1168–1171.
- [38] Langosch, D., Scharnagl, C., Steiner, H., Lemberg, M. K., "Understanding intramembrane proteolysis: from protein dynamics to reaction kinetics". *Trends Biochem. Sci.*, (2015), 40, pp. 318-327.
- [39] Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B., "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor". *Nature*, (1987), 325, pp. 733-736.
- [40] Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., Kopan, R., "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain". *Nature*, (1998), 393, pp. 382-386.
- [41] Müller, U. C., Zheng, H., "Physiological functions of APP family proteins". *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, (2012), 2, pp. a006288.
- [42] Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., Wong, P. C., "in Neurosci. J.", Vol. 29, 41 ed., (2009), pp. 12787-12794.
- [43] Lichtenhaller, S. F., "Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential". *J. Neurochem.*, (2011), 116, pp. 10-21.
- [44] Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F., "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1999), 96, pp. 3922-3927.
- [45] Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., Black, R. A., "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor". *J. Biol. Chem.*, (1998), 273, pp. 27765-27767.
- [46] Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., Ishiura, S., "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein". *Biochem. J.*, (1999), 343 Pt 2, pp. 371-375.
- [47] Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE". *Science*, (1999), 286, pp. 735-741.
- [48] Steiner, H., Fukumori, A., Tagami, S., Okochi, M., "Making the final cut: pathogenic amyloid- β peptide generation by γ -secretase". *Cell Stress*, (2018), 2, pp. 292-310.
- [49] Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y., Wang, C., "Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease". *Front. Mol. Neurosci.*, (2020), 13.
- [50] Fukumori, A., Feilen, L. P., Steiner, H., "Substrate recruitment by γ -secretase". *Semin. Cell Dev. Biol.*, (2020), 105, pp. 54–63.
- [51] Devkota, S., Williams, T. D., Wolfe, M. S., "Familial Alzheimer's disease mutations in amyloid protein precursor alter proteolysis by γ -secretase to increase amyloid β -peptides of ≥ 45 residues". *J. Biol. Chem.*, (2021), 296, pp. 100281.
- [52] Alzforum, <https://www.alzforum.org> abgerufen am 25.07.2024.
- [53] Bird, T. D., "in GeneReviews(®)" (Eds.: M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, A. Amemiya), *University of Washington, Seattle Copyright © 1993-2024, Seattle (WA)*, (1993).
- [54] Hamosh., D. A., Johns Hopkins University, <https://omim.org>, abgerufen am 14.04.2024.

- [55] Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Warter, J. M., Brice, A., Campion, D., Frébourg, T., Checler, F., "Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1999), 96, pp. 4119-4124.
- [56] Xu, T. H., Yan, Y., Kang, Y., Jiang, Y., Melcher, K., Xu, H. E., "Alzheimer's disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to γ -secretase cleavage and the A β 42/A β 40 ratio". *Cell Discov.*, (2016), 2, pp. 16026.
- [57] Chen, W., Gamache, E., Rosenman, D. J., Xie, J., Lopez, M. M., Li, Y. M., Wang, C., "Familial Alzheimer's mutations within APPTM increase A β 42 production by enhancing accessibility of ϵ -cleavage site". *Nat. Commun.*, (2014), 5, pp. 3037.
- [58] Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., Wilfong, J., Serneels, L., Karraan, E., Gijsen, H., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Broersen, K., De Strooper, B., "The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease". *Embo J.*, (2012), 31, pp. 2261-2274.
- [59] Devkota, S., Zhou, R., Nagarajan, V., Maesako, M., Do, H., Noorani, A., Overmeyer, C., Bhattacharai, S., Douglas, J. T., Saraf, A., Miao, Y., Ackley, B. D., Shi, Y., Wolfe, M. S., "Familial Alzheimer mutations stabilize synaptotoxic γ -secretase-substrate complexes". *Cell Rep.*, (2024), 43, pp. 113761.
- [60] Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Seghers, M. C., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., "The amyloid-beta forming tripeptide cleavage mechanism of γ -secretase". *eLife*, (2016), 5.
- [61] Terreni L, F. S., Franceschi M, Forloni G, "Novel pathogenic mutation in an Italian patient with familial Alzheimer's disease detected in APP gene". *Neurobiol. Aging.*, (2002), 23 (1S), pp. 319.
- [62] Götz, A., Högel, P., Silber, M., Chaitoglou, I., Luy, B., Muhle-Goll, C., Scharnagl, C., Langosch, D., "Increased H-Bond Stability Relates to Altered ϵ -Cleavage Efficiency and A β Levels in the I45T Familial Alzheimer's Disease Mutant of APP". *Sci. Rep.*, (2019), 9, pp. 5321.
- [63] Devkota, S., Zhou, R., Nagarajan, V., Maesako, M., Do, H., Noorani, A., Overmeyer, C., Bhattacharai, S., Douglas, J. T., Saraf, A., Miao, Y., Ackley, B. D., Shi, Y., Wolfe, M. S., "Familial Alzheimer mutations stabilize synaptotoxic γ -secretase-substrate complexes". *Cell Rep.*, (2024), 43, pp. 113761.
- [64] Götz, A., Mylonas, N., Högel, P., Silber, M., Heinel, H., Menig, S., Vogel, A., Feyrer, H., Huster, D., Luy, B., Langosch, D., Scharnagl, C., Muhle-Goll, C., Kamp, F., Steiner, H., "Modulating Hinge Flexibility in the APP Transmembrane Domain Alters γ -Secretase Cleavage". *Biophys. J.*, (2019), 116, pp. 2103-2120.
- [65] Silber, M., Ph.D. thesis, (*Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*), (2021).
- [66] Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., Artavanis-Tsakonas, S., "Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane". *Cell*, (1997), 90, pp. 281-291.
- [67] Amsen, D., Helbig, C., Backer, R. A., "Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered". *Trends Immunol.*, (2015), 36, pp. 802-814.
- [68] Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., Tanzi, R. E., "Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor". *Nat. Genet.*, (1993), 5, pp. 95-100.
- [69] Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., Solomon, F., "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1992), 89, pp. 10758-10762.

- [70] Needham, B. E., Wlodek, M. E., Ciccotosto, G. D., Fam, B. C., Masters, C. L., Proietto, J., Andrikopoulos, S., Cappai, R., "Identification of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP) and its homologue APLP2 as essential modulators of glucose and insulin homeostasis and growth". *J. Pathol.*, (2008), 215, pp. 155-163.
- [71] Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., Müller, U., "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members". *Embo J.*, (2004), 23, pp. 4106-4115.
- [72] Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., Beyreuther, K., "The Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein Gene Family Members APLP-1 and APLP-2 Involves α -, β -, γ -, and ϵ -Like Cleavages". *J. Biol. Chem.*, (2004), 279, pp. 18146-18156.
- [73] Winkles, J. A., "The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting". *Nat. Rev. Drug Discov.*, (2008), 7, pp. 411–425.
- [74] Burkly, L. C., Michaelson, J. S., Hahm, K., Jakubowski, A., Zheng, T. S., "TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease". *Cytokine*, (2007), 40, pp. 1–16.
- [75] Güner, G., Aßfalg, M., Zhao, K., Dreyer, T., Lahiri, S., Lo, Y., Slivinschi, B. I., Imhof, A., Jocher, G., Strohm, L., Behrends, C., Langosch, D., Bronger, H., Nimsky, C., Bartsch, J. W., Riddell, S. R., Steiner, H., Lichtenthaler, S. F., "Proteolytically generated soluble Tweak Receptor Fn14 is a blood biomarker for γ -secretase activity". *EMBO Mol. Med.*, (2022), 14, pp. e16084.
- [76] Yarden, Y., Sliwkowski, M. X., "Untangling the ErbB signalling network". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, (2001), 2, pp. 127-137.
- [77] Burden, S., Yarden, Y., "Neuregulins and Their Receptors: A Versatile Signaling Module in Organogenesis and Oncogenesis". *Neuron*, (1997), 18, pp. 847-855.
- [78] Huang, H., "Proteolytic Cleavage of Receptor Tyrosine Kinases". *Biomol.*, (2021), 11.
- [79] Stützer, I., Selevsek, N., Esterházy, D., Schmidt, A., Aebersold, R., Stoffel, M., "Systematic proteomic analysis identifies β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic β -cells". *J. Biol. Chem.*, (2013), 288, pp. 10536-10547.
- [80] Su, C., Mo, J., Dong, S., Liao, Z., Zhang, B., Zhu, P., "Integrin β -1 in disorders and cancers: molecular mechanisms and therapeutic targets". *Cell Commun. Signal.*, (2024), 22, pp. 71.
- [81] Hynes, R. O., "Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion". *Cell*, (1992), 69, pp. 11-25.
- [82] Güner, G., Lichtenthaler, S. F., "The substrate repertoire of γ -secretase/presenilin". *Semin. Cell Biol.*, (2020), 105, pp. 27–42.
- [83] Li, X., Dang, S., Yan, C., Gong, X., Wang, J., Shi, Y., "Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease". *Nature*, (2013), 493, pp. 56–61.
- [84] Torres-Arancibia, C., Ross, C. M., Chavez, J., Assur, Z., Dolios, G., Mancia, F., Ubarretxena-Belandia, I., "Identification of an archaeal presenilin-like intramembrane protease". *PLoS One*, (2010), 5.
- [85] Li, Y., Bohm, C., Dodd, R., Chen, F., Qamar, S., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P. H., "Structural biology of presenilin 1 complexes". *Mol. Neurodegener.*, (2014), 9, pp. 59.
- [86] Feilen, L. P., Chen, S.-Y., Fukumori, A., Feederle, R., Zacharias, M., Steiner, H., "Active site geometry stabilization of a presenilin homolog by the lipid bilayer promotes intramembrane proteolysis". *eLife*, (2022), 11.

- [87] Dang, S., Wu, S., Wang, J., Li, H., Huang, M., He, W., Li, Y.-M., Wong, C. C. L., Shi, Y., "Cleavage of amyloid precursor protein by an archaeal presenilin homologue PSH". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2015), 112, pp. 3344–3349.
- [88] Sobhanifar, S., Schneider, B., Löhr, F., Gottstein, D., Ikeya, T., Mlynarczyk, K., Pulawski, W., Ghoshdastider, U., Kolinski, M., Filipek, S., Güntert, P., Bernhard, F., Dötsch, V., "Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2010), 107, pp. 9644-9649.
- [89] Clemente, N., Abdine, A., Ubarretxena-Belandia, I., Wang, C., "Coupled Transmembrane Substrate Docking and Helical Unwinding in Intramembrane Proteolysis of Amyloid Precursor Protein". *Sci. Rep.*, (2018), 8, pp. 12411.
- [90] Rabi, I. I., Zacharias, J. R., Millman, S., Kusch, P., "A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment". *Phys. Rev.*, (1938), 53, pp. 318-318.
- [91] Bloch, F., "Nuclear Induction". *Phys. Rev.*, (1946), 70, pp. 460-474.
- [92] Bloch, F., Hansen, W. W., Packard, M., "Nuclear Induction". *Phys. Rev.*, (1946), 69, pp. 127-127.
- [93] Purcell, E. M., Torrey, H. C., Pound, R. V., "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid". *Phys. Rev.*, (1946), 69, pp. 37-38.
- [94] Giunta, C. J., Mainz, V. V., "in Pioneers of Magnetic Resonance", Vol. 1349, *American Chemical Society*, (2020), pp. 3-20.
- [95] Ernst, R. R., Anderson, W. A., "Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance". *Rev. Sci. Instrum.*, (1966), 37, pp. 93-102.
- [96] Ernst, R. R., <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1991/summary/>, abgerufen am 10.03.2024. .
- [97] Wüthrich, K., <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/summary/>, abgerufen am 10.03.2024.
- [98] Atkins, P. W., de Paula, J., "Kurzlehrbuch Physikalische Chemie", Vol. 4, (2008).
- [99] Friebolin, H., Thiele, C. M., "Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung", 5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. ed., Wiley-VCH, ISBN: 978-3527-3492-6, Weinheim, (2013).
- [100] Keeler, J., "Understanding NMR Spectroscopy", 2nd ed. ed., John Wiley & Sons, ISBN: 978-047-07-4608-0, Hoboken, (2011).
- [101] Jens Kurreck, J. E., Friedrich Lottspeich, "Bioanalytik 4. Auflage", Vol. 4. Auflage, Springer, ISBN: 978-3-662-61706-9, (2021).
- [102] Zeeman, P., "Über einen Einfluss der Magnetisierung auf die Natur des von einer Substanz emittierten Lichtes". *Verhandlung der Physikalischen Gesellschaft zu Berlin*, (1896), pp. S.127.
- [103] Higman, D. V., <https://protein-nmr.org.uk/solution-nmr/spectrum-descriptions/h-h-noesy/>, abgerufen am 12.03.2024.
- [104] Anglister, J., Srivastava, G., Naider, F., "Detection of intermolecular NOE interactions in large protein complexes". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, (2016), 97, pp. 40-56.
- [105] Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R., Bax, A., "Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins". *J. Magn. Reson.* (1969), (1990), 89, pp. 496-514.
- [106] Harris, R. K., Becker, E. D., Cabral de Menezes, S. M., Goodfellow, R., Granger, P., "NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts: IUPAC Recommendations 2001". *Concept Magn. Reson.*, (2002), 22, pp. 458-483.
- [107] Bax, A., Ikura, M., "An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ¹⁵N backbone amide resonances with the alpha-carbon of the preceding residue in uniformly ¹⁵N/¹³C enriched proteins". *J. Biomol. NMR*, (1991), 1, pp. 99-104.

- [108] Grzesiek, S., Bax, A., "An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins". *J. Magn. Reson.* (1969), (1992), 99, pp. 201-207.
- [109] Grzesiek, S., Bax, A., "Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR". *J. Am. Chem. Soc.*, (1992), 114, pp. 6291-6293.
- [110] Proctor, W. G., Yu, F. C., "The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound". *Phys. Rev.*, (1950), 77, pp. 717-717.
- [111] Trainor, K., Palumbo, J. A., MacKenzie, D. W. S., Meiering, E. M., "Temperature dependence of NMR chemical shifts: Tracking and statistical analysis". *Protein Sci.*, (2020), 29, pp. 306-314.
- [112] Artikis, E., Brooks, C. L., 3rd, "Modeling pH-Dependent NMR Chemical Shift Perturbations in Peptides". *Biophys. J.*, (2019), 117, pp. 258-268.
- [113] Matsuo, T., Yoshida, T., Higuchi, O., "Studies of the Solvent Effects on the Chemical Shifts in NMR Spectroscopy. IV. Methoxyl Proton Signals of Methoxybenzenes in the Benzene Solutions". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (2006), 40, pp. 2526-2529.
- [114] Wishart, D. S., "Interpreting protein chemical shift data". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, (2011), 58, pp. 62-87.
- [115] Wishart, D. S., Sykes, B. D., Richards, F. M., "The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy". *Biochem.*, (1992), 31, pp. 1647-1651.
- [116] Williamson, M. P., "Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, (2013), 73, pp. 1-16.
- [117] Williamson, M. P., "in Modern Magnetic Resonance" (Ed.: G. A. Webb), *Springer International Publishing*, Cham, (2018), pp. 995-1012.
- [118] Kummerlöwe, G., Luy, B., "in Annu. Rep. NMR Spectrosc.", Vol. 68 (Ed.: G. A. Webb), *Academic Press*, (2009), pp. 193-232.
- [119] Kramer, F., Deshmukh, M. V., Kessler, H., Glaser, S. J., "Residual dipolar coupling constants: An elementary derivation of key equations". *Inc. Concepts Magn. Reson. Part A*, (2004), 21A, pp. 10-21.
- [120] Li, G. W., Liu, H., Qiu, F., Wang, X. J., Lei, X. X., "Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Natural Products". *Nat. Prod. Bioprospect.*, (2018), 8, pp. 279-295.
- [121] Gil, R. R., "Constitutional, Configurational, and Conformational Analysis of Small Organic Molecules on the Basis of NMR Residual Dipolar Couplings". *Angew. Chem., Int. Ed.*, (2011), 50, pp. 7222-7224.
- [122] Saupe, A., Englert, G., "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules". *Phys. Rev. Lett.*, (1963), 11, pp. 462-464.
- [123] Hansen, M. R., Mueller, L., Pardi, A., "Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions". *Nat. Struct. Biol.*, (1998), 5, pp. 1065-1074.
- [124] Clore, G. M., Starich, M. R., Gronenborn, A. M., "Measurement of Residual Dipolar Couplings of Macromolecules Aligned in the Nematic Phase of a Colloidal Suspension of Rod-Shaped Viruses". *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), 120, pp. 10571-10572.
- [125] Canlas, C. G., Ma, D., Tang, P., Xu, Y., "Residual dipolar coupling measurements of transmembrane proteins using aligned low-q bicelles and high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy". *J. Am. Chem. Soc.*, (2008), 130, pp. 13294-13300.
- [126] Prosser, R. S., Hwang, J. S., Vold, R. R., "Magnetically aligned phospholipid bilayers with positive ordering: a new model membrane system". *Biophys. J.*, (1998), 74, pp. 2405-2418.

- [127] Sanders, C. R., 2nd, Prestegard, J. H., "Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO". *Biophys. J.*, (1990), 58, pp. 447-460.
- [128] Luy, B., Kobzar, K., Kessler, H., "An Easy and Scalable Method for the Partial Alignment of Organic Molecules for Measuring Residual Dipolar Couplings". *Angew. Chem., Int. Ed.*, (2004), 43, pp. 1092-1094.
- [129] Gloger, T., Ph.D. thesis, (*Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*), (2020).
- [130] Li, G.-W., Liu, H., Qiu, F., Wang, X.-J., Lei, X.-X., "Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Natural Products". *Natural Products and Bioprospecting*, (2018), 8, pp. 279-295.
- [131] Zweckstetter, M., "NMR: prediction of molecular alignment from structure using the PALES software". *Nat. Protoc.*, (2008), 3, pp. 679-690.
- [132] Kummerlowe, G., Schmitt, S., Luy, B., "Cross-Fitting of Residual Dipolar Couplings". *Open Spectrosc J.*, (2010), 4, pp. 16-27.
- [133] Cornilescu, G., Marquardt, J. L., Ottiger, M., Bax, A., "Validation of Protein Structure from Anisotropic Carbonyl Chemical Shifts in a Dilute Liquid Crystalline Phase". *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), 120, pp. 6836-6837.
- [134] Xu, Y., Havenith, M., "Perspective: Watching low-frequency vibrations of water in biomolecular recognition by THz spectroscopy". *J. Chem. Phys.*, (2015), 143.
- [135] Henzler-Wildman, K. A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S. J., Karplus, M., Kern, D., "A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis". *Nature*, (2007), 450, pp. 913-916.
- [136] Kleckner, I. R., Foster, M. P., "An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics". *Biochim. Biophys. Acta.*, (2011), 1814, pp. 942-968.
- [137] Fisette, O., Lagüe, P., Gagné, S., Morin, S., "Synergistic Applications of MD and NMR for the Study of Biological Systems". *J. Biomed. Biotechnol.*, (2012), 2012, pp. 254208.
- [138] Khago, D., Fucci, I. J., Byrd, R. A., "The Role of Conformational Dynamics in the Recognition and Regulation of Ubiquitination". *Molecules*, (2020), 25.
- [139] Persson, F., Halle, B., "How amide hydrogens exchange in native proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2015), 112, pp. 10383-10388.
- [140] Dempsey, C. E., "Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, (2001), 39, pp. 135-170.
- [141] Englander, S. W., Sosnick, T. R., Englander, J. J., Mayne, L., "Mechanisms and uses of hydrogen exchange". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (1996), 6, pp. 18-23.
- [142] Konermann, L., Vahidi, S., Sowole, M. A., "Mass Spectrometry Methods for Studying Structure and Dynamics of Biological Macromolecules". *Analytical Chemistry*, (2014), 86, pp. 213-232.
- [143] Wüthrich, K., "NMR of proteins and nucleic acids", *Wiley*, New York, (1991).
- [144] Herrmann, T., Güntert, P., Wüthrich, K., "Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA". *J. Mol. Biol.*, (2002), 319, pp. 209-227.
- [145] Montelione, G. T., Zheng, D., Huang, Y. J., Gunsalus, K. C., Szyperski, T., "Protein NMR spectroscopy in structural genomics". *Nat. Struct. Biol.*, (2000), 7 Suppl, pp. 982-985.
- [146] Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Mallia, T. E., Nilges, M., "ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation". *Bioinformatics*, (2007), 23, pp. 381-382.
- [147] Nilges, M., "Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities". *J. Mol. Biol.*, (1995), 245, pp. 645-660.

- [148] Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., Laue, E. D., "The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline". *Proteins*, (2005), 59, pp. 687-696.
- [149] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., Bax, A., "TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts". *J. Biomol. NMR*, (2009), 44, pp. 213-223.
- [150] Rolf, J., Rosenthal, K., Lütz, S., "Application of Cell-Free Protein Synthesis for Faster Biocatalyst Development". *Catalysts*, (2019), 9, pp. 190.
- [151] Matthaei, J. H., Nirenberg, M. W., "Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1961), 47, pp. 1580-1588.
- [152] Orth, J. H. C., Schorch, B., Boundy, S., Ffrench-Constant, R., Kubick, S., Aktories, K., "Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*". *Toxicon*, (2011), 57, pp. 199-207.
- [153] Smith, M. T., Varner, C. T., Bush, D. B., Bundy, B. C., "The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis". *Biotechnol. Prog.*, (2012), 28, pp. 549-555.
- [154] Xu, Z., Chen, H., Yin, X., Xu, N., Cen, P., "High-level expression of soluble human beta-defensin-2 fused with green fluorescent protein in *Escherichia coli* cell-free system". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (2005), 127, pp. 53-62.
- [155] Kigawa, T., Muto, Y., Yokoyama, S., "Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis". *J. Biomol. NMR*, (1995), 6, pp. 129-134.
- [156] Garenne, D., Haines, M. C., Romantseva, E. F., Freemont, P., Strychalski, E. A., Noireaux, V., "Cell-free gene expression". *Nat. Rev. Methods Primers.*, (2021), 1, pp. 1-18.
- [157] Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., Bernhard, F., "Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems". *Nat. Protoc.*, (2007), 2, pp. 2945-2957.
- [158] Schwarz, D., Dötsch, V., Bernhard, F., "Production of membrane proteins using cell-free expression systems". *Proteomics*, (2008), 8, pp. 3933-3946.
- [159] Schwarz, D., Daley, D., Beckhaus, T., Dötsch, V., Bernhard, F., "Cell-free expression profiling of *E. coli* inner membrane proteins". *Proteomics*, (2010), 10, pp. 1762-1779.
- [160] Roberts, B. E., Paterson, B. M., "Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1973), 70, pp. 2330-2334.
- [161] Takai, K., Endo, Y., "The cell-free protein synthesis system from wheat germ". *Methods Mol. Biol.*, (2010), 607, pp. 23-30.
- [162] Findeis, M. A., Whitesides, G. M., "Protein synthesis in cell-free reticulocyte lysates on multi-hour incubation". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (1987), 15, pp. 169-189.
- [163] Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., "A cell-free protein synthesis system from insect cells". *Methods Mol. Biol.*, (2010), 607, pp. 31-42.
- [164] Sun, Z. Z., Yeung, E., Hayes, C. A., Noireaux, V., Murray, R. M., "Linear DNA for Rapid Prototyping of Synthetic Biological Circuits in an *Escherichia coli* Based TX-TL Cell-Free System". *ACS Synth. Biol.*, (2014), 3, pp. 387-397.
- [165] Calhoun, K. A., Swartz, J. R., "Energy systems for ATP regeneration in cell-free protein synthesis reactions". *Methods Mol. Biol.*, (2007), 375, pp. 3-17.
- [166] Vernon, W. B., "The role of magnesium in nucleic-acid and protein metabolism". *Magnesium*, (1988), 7, pp. 234-248.

- [167] Gstraunthaler, G., Lindl, T., "Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen", Vol. 8.Auflage, Springer, ISBN: 978-3-662-62605-4, (2021).
- [168] Kai, L., Dötsch, V., Kaldenhoff, R., Bernhard, F., "Artificial environments for the co-translational stabilization of cell-free expressed proteins". *PLoS One*, (2013), 8, pp. e56637.
- [169] Cai, Q., Hanson, J. A., Steiner, A. R., Tran, C., Masikat, M. R., Chen, R., Zawada, J. F., Sato, A. K., Hallam, T. J., Yin, G., "A simplified and robust protocol for immunoglobulin expression in Escherichia coli cell-free protein synthesis systems". *Biotechnol. Prog.*, (2015), 31, pp. 823-831.
- [170] Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., Kubick, S., "Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems". *ChemBioChem*, (2015), 16, pp. 2420-2431.
- [171] Dondapati, S. K., Stech, M., Zemella, A., Kubick, S., "Cell-Free Protein Synthesis: A Promising Option for Future Drug Development". *BioDrugs*, (2020), 34, pp. 327–348.
- [172] Biyani, M., "Cell-Free Protein Synthesis", IntechOpen, ISBN: 978-953-51-0803-0, Rijeka, (2012).
- [173] Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., Yokoyama, S., "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins". *FEBS Lett.*, (1999), 442, pp. 15-19.
- [174] Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., Alakhov, Y. B., "A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield". *Science*, (1988), 242, pp. 1162-1164.
- [175] Junge, F., Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dötsch, V., Bernhard, F., "Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins". *Nat. Biotechnol.*, (2011), 28, pp. 262–271.
- [176] Rosenblum, G., Cooperman, B. S., "Engine out of the chassis: cell-free protein synthesis and its uses". *FEBS Lett.*, (2014), 588, pp. 261-268.
- [177] Hein, C., Henrich, E., Orbán, E., Dötsch, V., Bernhard, F., "Hydrophobic supplements in cell-free systems: Designing artificial environments for membrane proteins". *Eng. Life Sci.*, (2014), 14, pp. 365–379.
- [178] Bernhard, F., Tozawa, Y., "Cell free expression making a mark". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (2013), 23, pp. 374–380.
- [179] Klammt, C., Schwarz, D., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., Bernhard, F., "Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein". *FEBS J.*, (2006), 273, pp. 4141-4153.
- [180] Tom, J., (Ed.: T. Networks), besucht am 17.05.2024, (June 30, 2021).
- [181] Perkampus, H.-H., "UV-VIS Spectroscopy and Its Applications", Springer Laboratory, ISBN : 978-3-642-77479-9, (1992).
- [182] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1979), 76, pp. 4350-4354.
- [183] Motsenbocker, M. A., "Sensitivity limitations encountered in enhanced horseradish peroxidase catalysed chemiluminescence". *J. Biolumin. Chemilumin.*, (1988), 2, pp. 9-16.
- [184] Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., Vattem, K., "in Methods in Enzymology", Vol. 463 (Eds.: R. R. Burgess, M. P. Deutscher), Academic Press, (2009), pp. 573-599.
- [185] Cheow, L. F., Viswanathan, R., Chin, C.-S., Jennifer, N., Jones, R. C., Guccione, E., Quake, S. R., Burkholder, W. F., "Multiplexed Analysis of Protein–Ligand Interactions by Fluorescence Anisotropy in a Microfluidic Platform". *Analytical Chemistry*, (2014), 86, pp. 9901-9908.

- [186] Perrin, F., "Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité.". *Journal de Physique et le Radium*, (1962), 7 (12), pp. 390-401.
- [187] Hall, M. D., Yasgar, A., Peryea, T., Braisted, J. C., Jadhav, A., Simeonov, A., Coussens, N. P., "Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review". *Methods Appl. Fluoresc.*, (2016), 4, pp. 022001.
- [188] Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., Smith, H. O., "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases". *Nat. Methods*, (2009), 6, pp. 343-345.
- [189] Tartoff, K. D. H., C.A., "Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones". *Bethesda Res. Lab. Focus*, (1987), 9.
- [190] Bertani, G., "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli". *J. Bacteriol.*, (1951), 62, pp. 293-300.
- [191] Schneider, B., Junge, F., Shirokov, V. A., Durst, F., Schwarz, D., Dötsch, V., Bernhard, F., "Membrane protein expression in cell-free systems". *Methods Mol. Biol.*, (2010), 601, pp. 165-186.
- [192] Pacull, E. M., Sendker, F., Bernhard, F., Scheidt, H. A., Schmidt, P., Huster, D., Krug, U., "Integration of Cell-Free Expression and Solid-State NMR to Investigate the Dynamic Properties of Different Sites of the Growth Hormone Secretagogue Receptor". *Front. Pharmacol.*, (2020), 11, pp. 562113.
- [193] Shearman, M. S., Beher, D., Clarke, E. E., Lewis, H. D., Harrison, T., Hunt, P., Nadin, A., Smith, A. L., Stevenson, G., Castro, J. L., "L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity". *Biochem.*, (2000), 39, pp. 8698-8704.
- [194] Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nat. Methods*, (2012), 9, pp. 671-675.
- [195] OriginLab Corporation, M., USA, (2023).
- [196] Werner, N. T., Högel, P., Güner, G., Stelzer, W., Wozny, M., Aßfalg, M., Lichtenthaler, S. F., Steiner, H., Langosch, D., "Cooperation of N- and C-terminal substrate transmembrane domain segments in intramembrane proteolysis by γ-secretase". *Commun. Biol.*, (2023), 6, pp. 177.
- [197] Liu, M., Mao, X.-a., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K., Lindon, J. C., "Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy". *J. Magn. Reson.*, (1998), 132, pp. 125-129.
- [198] Palmer, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E., Rance, M., "Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy". *J. Magn. Reson.*, (1969), (1991), 93, pp. 151-170.
- [199] Kay, L. E., Keifer, P., Saarinen, T., "Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity". *J. Am. Chem. Soc.*, (1992), 114, pp. 10663-10665.
- [200] Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sørensen, O. W., Griesinger, C., "A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients". *J. Biomol. NMR*, (1994), 4, pp. 301-306.
- [201] Ottiger, M., Delaglio, F., Bax, A., "Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra". *J. Magn. Reson.*, (1998), 131, pp. 373-378.
- [202] Piotto, M., Saudek, V., Sklenár, V., "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions". *J. Biomol. NMR*, (1992), 2, pp. 661-665.
- [203] Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R., Saudek, V., "Gradient-Tailored Water Suppression for ¹H-¹⁵N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity". *J. Magn. Reson., Series A*, (1993), 102, pp. 241-245.

- [204] Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., Ernst, R. R., "Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy". *J. Chem. Phys.*, (1979), 71, pp. 4546-4553.
- [205] Wagner, R., Berger, S., "Gradient-Selected NOESY-A Fourfold Reduction of the Measurement Time for the NOESY Experiment". *J. Magn. Reson. A*, (1996), 123, pp. 119-121.
- [206] Grzesiek, S., Bax, A., "Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein". *J. Magn. Reson.* (1969), (1992), 96, pp. 432-440.
- [207] Lescop, E., Schanda, P., Brutscher, B., "A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment". *J. Magn. Reson.*, (2007), 187, pp. 163-169.
- [208] Schanda, P., Van Melckebeke, H., Brutscher, B., "Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes". *J. Am. Chem. Soc.*, (2006), 128, pp. 9042-9043.
- [209] Schleucher, J., Sattler, M., Griesinger, C., "COHERENCE SELECTION BY GRADIENTS WITHOUT SIGNAL ATTENUATION - APPLICATION TO THE 3-DIMENSIONAL HNCO EXPERIMENT". *Angew. Chem., Int. Ed.*, (1993), 32(10), pp. 1489-1491.
- [210] Kay, L. E., Xu, G. Y., Yamazaki, T., "Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H₂O Saturation". *J. Magn. Reson., Series A*, (1994), 109, pp. 129-133.
- [211] Levenberg, K., "A method for the solution of certain non-linear problems in least squares". *Quart. Appl. Math.*, (1944), 2, pp. 164-168.
- [212] Marquardt, D. W., "An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters". *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, (1963), 11, pp. 431-441.
- [213] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pamnu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L., "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination". *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, (1998), 54, pp. 905-921.
- [214] Cornilescu, G., Delaglio, F., Bax, A., "Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology". *J. Biomol. NMR*, (1999), 13, pp. 289-302.
- [215] (2015).
- [216] Einhauer, A., Jungbauer, A., "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins". *J. Biochem. Biophys. Methods.*, (2001), 49, pp. 455-465.
- [217] Sadeghi, H. M., Rabbani, M., Rismani, E., Moazen, F., Khodabakhsh, F., Dormiani, K., Khazaei, Y., "Optimization of the expression of reteplase in Escherichia coli". *Res. Pharm. Sci.*, (2011), 6, pp. 87-92.
- [218] Garavito, R. M., Ferguson-Miller, S., "Detergents as Tools in Membrane Biochemistry*". *J. Biol. Chem.*, (2001), 276, pp. 32403-32406.
- [219] Rouse, Sarah L., Marcoux, J., Robinson, Carol V., Sansom, Mark S. P., "Dodecyl Maltoside Protects Membrane Proteins In Vacuo". *Biophys. J.*, (2013), 105, pp. 648-656.
- [220] Laganowsky, A., Reading, E., Hopper, J. T., Robinson, C. V., "Mass spectrometry of intact membrane protein complexes". *Nat. Protoc.*, (2013), 8, pp. 639-651.
- [221] Bayer, T. M., Werner, G.-D., Sackmann, E., "Solubilization of DMPC and DPPC vesicles by detergents below their critical micellization concentration: high-sensitivity differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy reveal two interaction sites of detergents in vesicles". *Biochim. Biophys. Acta.*, (1989), 984, pp. 214-224.
- [222] Björnerås, J., Nilsson, M., Mäler, L., "Analysing DHPC/DMPC bicelles by diffusion NMR and multivariate decomposition". *Biochim. Biophys. Acta.*, (2015), 1848, pp. 2910-2917.

- [223] Sanders, C. R., 2nd, Landis, G. C., "Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies". *Biochem.*, (1995), 34, pp. 4030-4040.
- [224] Di Russo, N. V., Estrin, D. A., Martí, M. A., Roitberg, A. E., "pH-Dependent conformational changes in proteins and their effect on experimental pK(a)s: the case of Nitrophorin 4". *PLoS Comput Biol.*, (2012), 8, pp. e1002761.
- [225] Quintero-Monzon, O., Martin, M. M., Fernandez, M. A., Cappello, C. A., Krzysiak, A. J., Osenkowski, P., Wolfe, M. S., "Dissociation between the processivity and total activity of γ -secretase: implications for the mechanism of Alzheimer's disease-causing presenilin mutations". *Biochem.*, (2011), 50, pp. 9023-9035.
- [226] Kamp, F., Winkler, E., Trambauer, J., Ebke, A., Fluhrer, R., Steiner, H., "Intramembrane proteolysis of β -amyloid precursor protein by γ -secretase is an unusually slow process". *Biophys. J.*, (2015), 108, pp. 1229-1237.
- [227] Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. J., Van Riel, J. A., "Characterization of bovine kappa-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography". *Biochem. J.*, (1986), 240, pp. 87-97.
- [228] Wu, Y., Thomas, G. M., Thomsen, M., Bahri, S., Lieberman, R. L., "Lipid environment modulates processivity and kinetics of a presenilin homolog acting on multiple substrates in vitro". *J. Biol. Chem.*, (2023), 299, pp. 105401.
- [229] Naing, S.-H., Kalyoncu, S., Smalley, D. M., Kim, H., Tao, X., George, J. B., Jonke, A. P., Oliver, R. C., Urban, V. S., Torres, M. P., Lieberman, R. L., "Both positional and chemical variables control in vitro proteolytic cleavage of a presenilin ortholog". *J. Biol. Chem.*, (2018), 293, pp. 4653-4663.
- [230] Bhattarai, A., Devkota, S., Bhattarai, S., Wolfe, M. S., Miao, Y., "Mechanisms of γ -Secretase Activation and Substrate Processing". *ACS Cent. Sci.*, (2020), 6, pp. 969-983.
- [231] Winkler, E., Julius, A., Steiner, H., Langosch, D., "Homodimerization Protects the Amyloid Precursor Protein C99 Fragment from Cleavage by γ -Secretase". *Biochem.*, (2015), 54, pp. 6149-6152.
- [232] Compton, S. J., Jones, C. G., "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay". *Analytical Biochemistry*, (1985), 151, pp. 369-374.
- [233] Nadezhdin, K. D., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V., Arseniev, A. S., "Dimeric structure of transmembrane domain of amyloid precursor protein in micellar environment". *FEBS Lett.*, (2012), 586, pp. 1687-1692.
- [234] Hitzenberger, M., Zacharias, M., "Uncovering the Binding Mode of γ -Secretase Inhibitors". *ACS Chem. Neurosci.*, (2019), 10, pp. 3398-3403.
- [235] Rogé, J., Betton, J.-M., "Use of pIVEX plasmids for protein overproduction in Escherichia coli". *Microb. Cell Fact.*, (2005), 4, pp. 18.
- [236] Moser, C., Muhle-Goll, C., "Cell-free protein production of a gamma secretase homolog". *Protein Expr. Purif.*, (2024), 215, pp. 106407.
- [237] Levin, R., Löhr, F., Karakoc, B., Lichtenecker, R., Dötsch, V., Bernhard, F., "E. coli "Stablelabel" S30 lysate for optimized cell-free NMR sample preparation". *J. Biomol. NMR*, (2023), 77, pp. 131-147.
- [238] Chen, L., Wang, C., Su, J., "Understanding the Effect of Different Glucose Concentrations in the Oligotrophic Bacterium *Bacillus subtilis* BS-G1 through Transcriptomics Analysis". *Microorganisms*, (2023), 11, pp. 2401.
- [239] Foshag, D., Henrich, E., Hiller, E., Schäfer, M., Kerger, C., Burger-Kentischer, A., Diaz-Moreno, I., García-Mauriño, S. M., Dötsch, V., Rupp, S., Bernhard, F., "The E. coli S30 lysate proteome: A prototype for cell-free protein production". *Nat. Biotechnol.*, (2018), 40, pp. 245-260.

- [240] Wuu, J. J., Swartz, J. R., "High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents". *Biochim. Biophys. Acta.*, (2008), 1778, pp. 1237-1250.
- [241] Guo, X., Zhu, Y., Bai, L., Yang, D., "The Protection Role of Magnesium Ions on Coupled Transcription and Translation in Lyophilized Cell-Free System". *ACS Synth. Biol.*, (2020), 9, pp. 856-863.
- [242] Ahsan, S. K., "Metabolism of magnesium in health and disease". *J. Indian Med. Assoc.*, (1997), 95, pp. 507-510.
- [243] Grubbs, R. D., Maguire, M. E., "Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation". *Magnesium*, (1987), 6, pp. 113-127.
- [244] Jiang, N., Ding, X., Lu, Y., "Development of a robust Escherichia coli-based cell-free protein synthesis application platform". *Biochem. Eng. J.*, (2021), 165, pp. 107830.
- [245] Francis, D. M., Page, R., "Strategies to optimize protein expression in *E. coli*". *Curr. Protoc. Protein Sci.*, (2010), Chapter 5, pp. 5.24.21-25.24.29.
- [246] Lapidus, L. J., "Protein unfolding mechanisms and their effects on folding experiments". *F1000Res*, (2017), 6, pp. 1723.
- [247] Beswick, V., Guerois, R., Cordier-Ochsenbein, F., Coïc, Y.-M., Huynh-Dinh, T., Tostain, J., Noël, J.-P., Sanson, A., Neumann, J. M., "Dodecylphosphocholine micelles as a membrane-like environment: new results from NMR relaxation and paramagnetic relaxation enhancement analysis". *EBJ.*, (1998), 28, pp. 48-58.
- [248] Lauterwein, J., Bösch, C., Brown, L. R., Wüthrich, K., "Physicochemical studies of the protein-lipid interactions in melittin-containing micelles". *Biochim. Biophys. Acta.*, (1979), 556, pp. 244-264.
- [249] Kallick, D. A., Tessmer, M. R., Watts, C. R., Li, C. Y., "The Use of Dodecylphosphocholine Micelles in Solution NMR". *J. Magn. Reson., Series B*, (1995), 109, pp. 60-65.
- [250] Gorzelle, B. M., Nagy, J. K., Oxenoid, K., Lonzer, W. L., Cafiso, D. S., Sanders, C. R., "Reconstitutive Refolding of Diacylglycerol Kinase, an Integral Membrane Protein". *Biochem.*, (1999), 38, pp. 16373-16382.
- [251] Palladino, P., Rossi, F., Ragone, R., "Effective Critical Micellar Concentration of a Zwitterionic Detergent: A Fluorimetric Study on n-Dodecyl Phosphocholine". *J. Fluoresc.*, (2010), 20, pp. 191-196.
- [252] Xu, J., Sarma, A. V. S., Wei, Y., Beamer, L. J., Van Doren, S. R., "Multiple Ligand-Bound States of a Phosphohexomutase Revealed by Principal Component Analysis of NMR Peak Shifts". *Sci. Rep.*, (2017), 7, pp. 5343.
- [253] Perrin, F., Papadopoulos, N., Suelves, N., Opsomer, R., Vadukul, D. M., Vrancx, C., Smith, S. O., Vertommen, D., Kienlen-Campard, P., Constantinescu, S. N., "Dimeric Transmembrane Orientations of APP/C99 Regulate γ -Secretase Processing Line Impacting Signaling and Oligomerization". *iScience*, (2020), 23, pp. 101887.
- [254] Hendrickson, O. D., Taranova, N. A., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B., Eremin, S. A., "Fluorescence Polarization-Based Bioassays: New Horizons". *Sensors*, (2020), 20, pp. 7132.
- [255] Shaydyuk, Y. O., Bashmakova, N. V., Dmytruk, A. M., Kachkovsky, O. D., Koniev, S., Strizhak, A. V., Komarov, I. V., Belfield, K. D., Bondar, M. V., Babii, O., "Nature of Fast Relaxation Processes and Spectroscopy of a Membrane-Active Peptide Modified with Fluorescent Amino Acid Exhibiting Excited State Intramolecular Proton Transfer and Efficient Stimulated Emission". *ACS Omega*, (2021), 6, pp. 10119-10128.
- [256] Hessz, D., Bojtár, M., Mester, D., Szakács, Z., Bitter, I., Kállay, M., Kubinyi, M., "Hydrogen bonding effects on the fluorescence properties of 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone in water and water-acetone mixtures". *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, (2018), 203, pp. 96-105.

- [257] Postupalenko, V. Y., Zamotaiev, O. M., Shvadchak, V. V., Strizhak, A. V., Pivovarenko, V. G., Klymchenko, A. S., Mely, Y., "Dual-Fluorescence I-Amino Acid Reports Insertion and Orientation of Melittin Peptide in Cell Membranes". *Bioconjug. Chem.*, (2013), 24, pp. 1998-2007.
- [258] Loudet, A., Burgess, K., "BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties". *Chem. Rev.*, (2007), 107, pp. 4891-4932.
- [259] Guo, X., Li, H., Yan, C., Lei, J., Zhou, R., Shi, Y., "Molecular mechanism of substrate recognition and cleavage by human γ -secretase". *Science*, (2024), 384, pp. 1091-1095.
- [260] Tanii, H., Jiang, J., Fukumori, A., Tagami, S., Okazaki, Y., Okochi, M., Takeda, M., "Effect of valine on the efficiency and precision at S4 cleavage of the Notch-1 transmembrane domain". *J. Neurosci. Res.*, (2006), 84, pp. 918-925.
- [261] Moser, C., Guschtschin-Schmidt, N., Silber, M., Flum, J., Muhle-Goll, C., "Substrate Selection Criteria in Regulated Intramembrane Proteolysis". *ACS Chem. Neurosci.*, (2024), 15, pp. 1321-1334.
- [262] Guschtschin-Schmidt, N., Karlsruher Institute für Technologien (2023).
- [263] Cammers-Goodwin, A., Allen, T. J., Oslick, S. L., McClure, K. F., Lee, J. H., Kemp, D. S., "Mechanism of Stabilization of Helical Conformations of Polypeptides by Water Containing Trifluoroethanol". *J. Am. Chem. Soc.*, (1996), 118, pp. 3082-3090.
- [264] Matsugami, M., Yamamoto, R., Kumai, T., Tanaka, M., Umecky, T., Takamuku, T., "Hydrogen bonding in ethanol–water and trifluoroethanol–water mixtures studied by NMR and molecular dynamics simulation". *J. Mol. Liq.*, (2016), 217, pp. 3-11.
- [265] Bayer, T. A., Paliga, K., Weggen, S., Wiestler, O. D., Beyreuther, K., Multhaup, G., "Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease". *Acta neuropathologica*, (1997), 94, pp. 519-524.
- [266] Gabriele, R. M. C., Abel, E., Fox, N. C., Wray, S., Arber, C., "Knockdown of Amyloid Precursor Protein: Biological Consequences and Clinical Opportunities". *Front. Neurosci.*, (2022), 16, pp. 835645.
- [267] Yanagida, K., Maruyama, R., Tagami, S., Kudo, T., Okochi, M., Fukumori, A., "APLP2 is predominantly cleaved by β -secretase and γ -secretase in the human brain". *Psychogeriatrics*, (2023), 23, pp. 311-318.
- [268] Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., Ihara, Y., "Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch". *J. Biol. Chem.*, (2001), 276, pp. 35235-35238.
- [269] Hogl, S., Kuhn, P.-H., Colombo, A., Lichtenthaler, S. F., "Determination of the Proteolytic Cleavage Sites of the Amyloid Precursor-Like Protein 2 by the Proteases ADAM10, BACE1 and γ -Secretase". *PLoS One*, (2011), 6, pp. e21337.
- [270] Schauenburg, L., Liebsch, F., Eravci, M., Mayer, M. C., Weise, C., Multhaup, G., "APLP1 is endoproteolytically cleaved by γ -secretase without previous ectodomain shedding". *Sci. Rep.*, (2018), 8, pp. 1916.
- [271] Bernhofer, M., Dallago, C., Karl, T., Satagopam, V., Heinzinger, M., Littmann, M., Olenyi, T., Qiu, J., Schütze, K., Yachdav, G., Ashkenazy, H., Ben-Tal, N., Bromberg, Y., Goldberg, T., Kajan, L., O'Donoghue, S., Sander, C., Schafferhans, A., Schlessinger, A., Vriend, G., Mirdita, M., Gawron, P., Gu, W., Jarosz, Y., Trefois, C., Steinegger, M., Schneider, R., Rost, B., "PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years". *Nucleic Acids Res.*, (2021), 49, pp. W535-w540.
- [272] Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu,

- K., Kohli, P., Hassabis, D., "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold". *Nature*, (2021), 596, pp. 583-589.
- [273] Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L., Beyreuther, K., "Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1999), 96, pp. 3053-3058.
- [274] Aßfalg, M., Güner, G., Müller, S. A., Breimann, S., Langosch, D., Muhle-Goll, C., Frishman, D., Steiner, H., Lichtenthaler, S. F., "Cleavage efficiency of the intramembrane protease γ -secretase is reduced by the palmitoylation of a substrate's transmembrane domain". *FASEB J.*, (2024), 38, pp. e23442.
- [275] Zhou, R., Yang, G., Guo, X., Zhou, Q., Lei, J., Shi, Y., "Recognition of the amyloid precursor protein by human γ -secretase". *Science (New York, N.Y.)*, (2019), 363.
- [276] Yang, G., Zhou, R., Zhou, Q., Guo, X., Yan, C., Ke, M., Lei, J., Shi, Y., "Structural basis of Notch recognition by human γ -secretase". *Nature*, (2019), 565, pp. 192–197.
- [277] Bai, X.-c., Rajendra, E., Yang, G., Shi, Y., Scheres, S. H. W., "Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human γ -secretase". *eLife*, (2015), 4.
- [278] Lipari, G., Szabo, A., "Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity". *J. Am. Chem. Soc.*, (1982), 104, pp. 4546-4559.
- [279] LeMaster, D. M., "NMR Relaxation Order Parameter Analysis of the Dynamics of Protein Side Chains". *J. Am. Chem. Soc.*, (1999), 121, pp. 1726-1742.
- [280] Niazi, S. K., Mariam, Z., Paracha, R. Z., "Limitations of Protein Structure Prediction Algorithms in Therapeutic Protein Development". *BioMedInformatics*, (2024), 4, pp. 98-112.
- [281] Bertoline, L. M. F., Lima, A. N., Krieger, J. E., Teixeira, S. K., "Before and after AlphaFold2: An overview of protein structure prediction". *Front. Bioinform.*, (2023), 3, pp. 1120370.
- [282] Nagy, D., Ennis, K. A., Wei, R., Su, S. C., Hinckley, C. A., Gu, R.-F., Gao, B., Massol, R. H., Ehrenfels, C., Jandreski, L., Thomas, A. M., Nelson, A., Gyoneva, S., Hajós, M., Burkly, L. C., "Developmental synaptic regulator, TWEAK/Fn14 signaling, is a determinant of synaptic function in models of stroke and neurodegeneration". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2021), 118, pp. e2001679118.
- [283] Brown, S. A. N., Cheng, E., Williams, M. S., Winkles, J. A., "TWEAK-independent Fn14 self-association and NF- κ B activation is mediated by the C-terminal region of the Fn14 cytoplasmic domain". *PLoS One*, (2013), 8, pp. e65248.
- [284] Cheng, E., Armstrong, C. L., Galisteo, R., Winkles, J. A., "TWEAK/Fn14 Axis-Targeted Therapeutics: Moving Basic Science Discoveries to the Clinic". *Front. Immunol.*, (2013), 4, pp. 473.
- [285] Laurent, S. A., Hoffmann, F. S., Kuhn, P. H., Cheng, Q., Chu, Y., Schmidt-Supplian, M., Hauck, S. M., Schuh, E., Krumbholz, M., Rübsamen, H., Wanngren, J., Khademi, M., Olsson, T., Alexander, T., Hiepe, F., Pfister, H. W., Weber, F., Jenne, D., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Lichtenthaler, S. F., Meinl, E., " γ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells". *Nat. Commun.*, (2015), 6, pp. 7333.
- [286] Vevea, J. D., Kusick, G. F., Courtney, K. C., Chen, E., Watanabe, S., Chapman, E. R., "Synaptotagmin 7 is targeted to the axonal plasma membrane through γ -secretase processing to promote synaptic vesicle docking in mouse hippocampal neurons". *eLife*, (2021), 10.
- [287] Javadpour, M. M., Eilers, M., Groesbeek, M., Smith, S. O., "Helix Packing in Polytopic Membrane Proteins: Role of Glycine in Transmembrane Helix Association". *Biophys. J.*, (1999), 77, pp. 1609-1618.

- [288] Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J., Corfas, G., "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4". *J. Biol. Chem.*, (2000), 275, pp. 10379-10387.
- [289] Lucas, L. M., Dwivedi, V., Senfeld, J. I., Cullum, R. L., Mill, C. P., Piazza, J. T., Bryant, I. N., Cook, L. J., Miller, S. T., Lott, J. H. t., Kelley, C. M., Knerr, E. L., Markham, J. A., Kaufmann, D. P., Jacobi, M. A., Shen, J., Riese, D. J., 2nd, "The Yin and Yang of ERBB4: Tumor Suppressor and Oncoprotein". *Pharmacol. Rev.*, (2022), 74, pp. 18-47.
- [290] Munter, L.-M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., Multhaup, G., "GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42". *Embo J.*, (2007), 26, pp. 1702-1712.
- [291] Bocharov, E. V., Mineev, K. S., Goncharuk, M. V., Arseniev, A. S., "Structural and thermodynamic insight into the process of "weak" dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR". *Biochim. Biophys. Acta.*, (2012), 1818, pp. 2158-2170.
- [292] Jung, J., Premraj, S., Cruz, P. E., Ladd, T. B., Kwak, Y., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Golde, T. E., Ran, Y., "Independent relationship between amyloid precursor protein (APP) dimerization and γ -secretase processivity". *PLoS One*, (2014), 9, pp. e111553.
- [293] Vidal, G. A., Naresh, A., Marrero, L., Jones, F. E., "Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities". *J. Biol. Chem.*, (2005), 280, pp. 19777-19783.
- [294] Lu, Z., Mathew, S., Chen, J., Hadziselimovic, A., Palamuttam, R., Hudson, B. G., Fässler, R., Pozzi, A., Sanders, C. R., Zent, R., "Implications of the differing roles of the $\beta 1$ and $\beta 3$ transmembrane and cytoplasmic domains for integrin function". *eLife*, (2016), 5.
- [295] Andrew, R. J., Fernandez, C. G., Stanley, M., Jiang, H., Nguyen, P., Rice, R. C., Buggia-Prévot, V., De Rossi, P., Vetrivel, K. S., Lamb, R., Argemi, A., Allaert, E. S., Rathbun, E. M., Krause, S. V., Wagner, S. L., Parent, A. T., Holtzman, D. M., Thinakaran, G., "Lack of BACE1 S-palmitoylation reduces amyloid burden and mitigates memory deficits in transgenic mouse models of Alzheimer's disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2017), 114, pp. E9665-e9674.
- [296] Jansen, M., Beaumelle, B., "How palmitoylation affects trafficking and signaling of membrane receptors". *Biol. Cell.*, (2022), 114, pp. 61-72.
- [297] Yang, G., Zhou, R., Guo, X., Yan, C., Lei, J., Shi, Y., "Structural basis of γ -secretase inhibition and modulation by small molecule drugs". *Cell*, (2021), 184, pp. 521-533.e514.
- [298] Guo, X., Wang, Y., Zhou, J., Jin, C., Wang, J., Jia, B., Jing, D., Yan, C., Lei, J., Zhou, R., Shi, Y., "Molecular basis for isoform-selective inhibition of presenilin-1 by MRK-560". *Nat. Commun.*, (2022), 13, pp. 6299.
- [299] Hatami, A., Monjazeb, S., Milton, S., Glabe, C. G., "Familial Alzheimer's Disease Mutations within the Amyloid Precursor Protein Alter the Aggregation and Conformation of the Amyloid- β Peptide". *J. Biol. Chem.*, (2017), 292, pp. 3172-3185.
- [300] Sass, J., Cordier, F., Hoffmann, A., Rogowski, M., Cousin, A., Omichinski, J. G., Löwen, H., Grzesiek, S., "Purple Membrane Induced Alignment of Biological Macromolecules in the Magnetic Field". *J. Am. Chem. Soc.*, (1999), 121, pp. 2047-2055.
- [301] Chen, K., Tjandra, N., "The use of residual dipolar coupling in studying proteins by NMR". *Top Curr. Chem.*, (2012), 326, pp. 47-67.
- [302] Bibow, S., "Opportunities and Challenges of Backbone, Sidechain, and RDC Experiments to Study Membrane Protein Dynamics in a Detergent-Free Lipid Environment Using Solution State NMR". *Front. Mol. Biosci.*, (2019), 6, pp. 103.
- [303] Mesleh, M. F., Opella, S. J., "Dipolar Waves as NMR maps of helices in proteins". *J. Magn. Reson.*, (2003), 163, pp. 288-299.

- [304] Chiliveri, S. C., Louis, J. M., Ghirlando, R., Baber, J. L., Bax, A., "Tilted, Uninterrupted, Monomeric HIV-1 gp41 Transmembrane Helix from Residual Dipolar Couplings". *J. Am. Chem. Soc.*, (2018), 140, pp. 34-37.
- [305] Strickland, M., Tjandra, N., "in Modern Magnetic Resonance" (Ed.: G. A. Webb), *Springer International Publishing*, Cham, (2017), pp. 1-16.
- [306] Mascioni, A., Veglia, G., "Theoretical Analysis of Residual Dipolar Coupling Patterns in Regular Secondary Structures of Proteins". *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), 125, pp. 12520-12526.
- [307] Lemmin, T., Dimitrov, M., Fraering, P. C., Dal Peraro, M., "Perturbations of the straight transmembrane α -helical structure of the amyloid precursor protein affect its processing by γ -secretase". *J. Biol. Chem.*, (2014), 289, pp. 6763-6774.
- [308] Nadezhdin, K. D., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V., Arseniev, A. S., "Structural and dynamic study of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein". *Acta Naturae*, (2011), 3, pp. 69-76.
- [309] Lomize, A. L., Todd, S. C., Pogozheva, I. D., "Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0". *Protein Sci.*, (2022), 31, pp. 209-220.
- [310] Bús, C., Kocsis, M., Ágoston, Á., Kukovecz, Á., Kónya, Z., Sipos, P., "Application of Alcohols to Inhibit the Formation of Ca(II) Dodecyl Sulfate Precipitate in Aqueous Solutions". *Materials (Basel)*, (2024), 17.
- [311] Lal, M., Wachtel, E., Pati, S., Namboothiri, I. N. N., Patchornik, G., "His(1)-tagged DM or DDM detergent micelles are reversibly conjugated by nickel ions". *Sci. Rep.*, (2023), 13, pp. 17138.

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	engl. <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
ADR	engl. <i>Ambiguous Distance Restraints</i> , Zweideutige Abstandsbeschränkung
AICD	engl. <i>APP IntraCellular Domain</i> , APP intrazelluläre Domäne
AK	Antikörper
APLP2	engl. <i>Amyloid Beta Precursor Like Protein</i>
APP	engl. <i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARIA	engl. <i>Ambiguous Restraints for Iterative Assignment</i> , Zweideutige Beschränkung für iterative Zuordnungen
A β	Amyloid beta Peptid
BACE1	engl. <i>β-site APP-Cleaving Enzyme</i>
Bicin	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
BODIPY	5,5-Difluoro-5H-4λ5-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ylium-5-uide
bp	Basenpaare
Brij-35	Polyoxyethylen (23) laurylether
Brij-58	Polyoxyethylen (20) aurylether
Brij-78	Polyoxyethylen (20) stearylether
Brij-98	Polyoxyethylen (20) oleylether
CCPN	engl. <i>Collaborative Computing Project for NMR</i> , kollaboratives Computergestütztes Projekt für NMR
CECF	engl. <i>Continous Exchange Cell Free</i> , Kontinuierlicher Austausch zellfrei
CHAPSO	3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propansulfonat
CNS	engl. <i>Crystallography and NMR System</i> , Kristallografie- und NMR-System
CSI	engl. <i>Chemical Shift Index</i> , Chemischer Verschiebungs-Index
CSP	engl. <i>Chemical Shift Perturbation</i> , Störung der chemischen Verschiebung
ctF	C-terminales Fragment
DDM	n-Dodecyl-β-Maltosid
DHPC	Dihexanoylphosphatidylcholin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMA	(3-(2-[4-(Dimethylamino)-phenyl]-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)-L-Alanin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	1,2-Di-(9Z-Octadecenoyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DPC	Dodecylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat

Abkürzungsverzeichnis

EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB4	Erb-b2 Rezeptor Tyrosin Kinase 4
FAD	engl. <i>Familial Alzheimer Disease</i> , Familiäre Alzheimer Erkrankung
FID	engl. <i>Free Induction Decay</i> , Freier Induktionszerfall
FM	engl. <i>FeedingMix</i> , Nährösung
Fn14	engl. <i>Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
FP	Fluoreszenzpolarisation
HDX	engl. <i>Hydrogen Deuterium eXchange</i> , Wasserstoff-Deuterium Austausch
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HRP	engl. <i>HorseRadish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSQC	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
ICD	engl. <i>IntraCellular Domain</i> , Intrazelluläre Domäne
I-CLiPs	engl. <i>Intramembrane-CLeaving Proteases</i> , Intramembran spaltende Proteasen
IGEPAL	Octylphenoxypolyethoxyethanol
INEPT	engl. <i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITGB1	Integrin-β-1
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
LMPG	1-Myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-1'-rac-glycerol
MALDI-TOF	engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight</i>
MD	Molekulardynamische Simulationen
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NMR	Nuklear Magnetische Resonanzspektroskopie
NOE	Nuklear Overhauser Effekt
NOESY	engl. <i>Nuklear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
Notch	engl. <i>Neurogenic locus notch homolog protein</i>
PALES	engl. <i>Prediction of AlignmEnt from Structure</i> , Vorhersage der molekularen Ausrichtung aus der Struktur
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Daten Bank
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylglycerol
ppm	engl. <i>parts per million</i>
PSH	Präsenilin-Homolog
RDC	engl. <i>Residual Dipolar Coupling</i> , Residuale dipolare Kopplung
rekPSH	PSH rekombinant exprimiert
RM	engl. <i>ReactionMix</i> , Reaktionslösung

Abkürzungsverzeichnis

S2P	engl. <i>Site-2-Protease</i>
SCS	engl. <i>Secondary Chemical Shift</i> , sekundär chemische Verschiebungen
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNR	engl. <i>Signal-to-Noise Ratio</i> , Signal zu Rausch Verhältnis
SPP/SPPL	engl. <i>Signal Peptide Peptidase/ Peptidase-like</i>
SUV	engl. <i>Small Unilamellar Vesicles</i> , Kleine unilaminare Vesikel
TALOS+	engl. <i>Torsion Angle Likeliness Obtained from Shift and Sequence Similarity</i> , Torsionswinkel Wahrscheinlichkeit ausgehend von Verschiebung- und Sequenz-Ähnlichkeit
TB-Medium	Terrific Broth-Medium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFE	Trifluoroethanol
Thesit	Polyoxyethylen (9) laurylether
TMD	Transmembrandomäne
TOCSY	engl. <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	Octoxinol-9
TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
Tween 20	Polyoxyethylen (20) Sorbitan Monolaurat
WT	Wildtyp
zfPSH	PSH zellfrei exprimiert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Reaktionsgleichung des allgemeinen Ablaufs der Aspartat-Proteolyse.	2
Abbildung 1.2 Schematischer Aufbau der γ -Sekretase in einer Membranumgebung (PDB: 5A63).	3
Abbildung 1.3 Schematischer Prozess der Proteolyse durch die γ -Sekretase.	5
Abbildung 1.4 Veranschaulichung der nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Prozessierung vom Substrat APP durch die γ -Sekretase.	6
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Proteolyse der Transmembrandomäne (kursiv, grau hinterlegt) des APP.	8
Abbildung 1.6 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen (kursiv, farblich hinterlegt) der untersuchten γ -Sekretase Substrate.	9
Abbildung 1.7 Vergleich der Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur von Präsenilin (γ - Sekretase) in hellblau (PDB: 6IYC) mit der modifizierten Kristallstruktur von PSH ^[86] in grau (PDB: 4HYG) durch Überlagerung.	10
Abbildung 1.8 Darstellung der makroskopischen z-Magnetisierung,	15
Abbildung 1.9 Grafische Darstellung einer einfachen Pulssequenz eines zweidimensionalen NMR-Experimentes.	17
Abbildung 1.10 Schematische Darstellung des NOESY-Experiments.	18
Abbildung 1.11 HSQC-Pulssequenz für heteronukleare Korrelationen.	19
Abbildung 1.12 TOCSY-Pulssequenz	20
Abbildung 1.13 Dreidimensionale NMR-Experimente.	21
Abbildung 1.14 Modellhafte Darstellung der sekundären chemischen Verschiebung.	22
Abbildung 1.15 Ermittlung von dipolaren Restkopplungen anhand isotroper und anisotroper Proben.	24
Abbildung 1.16 Schematische Darstellung des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs,	25
Abbildung 1.17 Charakteristische NOEs der Sekundärstrukturverschiebung.	26
Abbildung 1.18 Graphische Darstellung der zellfreien Proteinexpression.	29
Abbildung 1.19 Vergleich zwischen kontinuierlichem Austausch und dem Batch- Verfahren, sowie den unterschiedlichen Expressions-Modi.	31
Abbildung 3.1 Verwendete Proteinsequenz von PSH mit His- (grün) und FLAG-Tag (rot) (Uniprot: A3CWV0) sowie den vorhandenen Mutationen (orange).	41
Abbildung 3.2 Verwendete Proteinsequenz der APP Domäne C99 mit FLAG- (rot) und His-Tag (grün) (Uniprot: P05067), sowie den entsprechenden Mutationen G38P (rot), G38L (blau), V44M (orange) und I45T (grün).	41

Abbildung 3.3 Verwendete Proteinsequenz der APP Transmembrandomäne mit His-Tag (grün) (Uniprot: P05067), sowie den entsprechenden Mutationen G38P (rot), G38L (blau), V44M (orange) und I45T (grün).	42
Abbildung 3.4 Photographische Darstellung der Reaktionscontainer zur zellfreien Proteinexpression	45
Abbildung 3.5 Schematisches Pipettierschema der zellfreien Proteinexpression	45
Abbildung 3.6 Schematisches Pipettierschema des Proteolyse-Assays am Beispiel von PSH (2 µM) und C99 (0,5 µM) mit den jeweiligen Kontrollen von PSH und C99, sowie der Zugabe des Inhibitors L-685,458.....	48
Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der Diederwinkel im Proteinrückgrat.	53
Abbildung 4.1 Bestimmung der Optischen Dichte von rekPSH in LB-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen.....	58
Abbildung 4.2 Vergleich der Expressionsmedien.	59
Abbildung 4.3 Vergleich der proteolytischen Effizienz von rekPSH in POPC und DDM sowie DMPC.	61
Abbildung 4.4 Vergleich der proteolytischen Effizienz in unterschiedlichen Puffern. ..	62
Abbildung 4.5 Veranschaulichung der rekPSH-Degradation.....	63
Abbildung 4.6 Veranschaulichung der Umsatzrate der Protopolyse mit der Zeit.	66
Abbildung 4.7 Proteolyse-Assays mit APP Fragment C99, sowie den Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L.....	67
Abbildung 4.8 Hypothetischer Vergleich des Enzym-Substrat-Komplexes	70
Abbildung 4.9 Proteolyse-Assays mit zellfrei exprimierten APP Fragment C99 sowie den Mutanten V44M, I45T, G38P und G38L.	71
Abbildung 4.10 Proteolytische Effizienz von rekPSH im Vergleich zu humaner γ-Sekretase in Hinblick auf AICD-Produktion.	73
Abbildung 4.11 Reaktionscontainer der zfPSH.	76
Abbildung 4.12 Zellfreie Proteinexpression von PSH in unterschiedlichen Zellextrakten mit anschließendem Proteolyse-Assay.....	77
Abbildung 4.13 Magnesiumscreening der zellfreien Proteinexpression von PSH.	78
Abbildung 4.14 Vergleich der proteolytischen Effizienz von zfPSH, hergestellt bei unterschiedlichen Temperaturen.	80
Abbildung 4.15 Veranschaulichung der Umsatzrate der Protopolyse mit der Zeit im Vergleich zwischen zfPSH und rekPSH.....	82
Abbildung 4.16 Proteolytische Untersuchung mittels NMR in einer DPC-Umgebung. 84	
Abbildung 4.17 Störung der chemischen Verschiebungen nach unterschiedlichen Zeitpunkten.	85

Abbildung 4.18 Auswertung des Proteolyse-Fluoreszenzpolarisations-Assays von APP TMD mit DMA als Fluorophor und rekPSH als Protease.....	90
Abbildung 6.1 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und APLP2.	100
Abbildung 6.2 Strukturanalyse des APLP2.....	102
Abbildung 6.3 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und Fn14.	105
Abbildung 6.4 Strukturanalyse des Fn14.	107
Abbildung 6.5 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und ErbB4.	108
Abbildung 6.6 Strukturanalyse des ErbB4.....	110
Abbildung 6.7 Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von APP und ITGB1.	111
Abbildung 6.8 Strukturanalyse des Nicht-Substrats ITGB1.....	112
Abbildung 6.9 Vergleich der ermittelten Strukturen bei hypothetischer Interaktion mit der γ -Sekretase Kryo-EM-Struktur (PDB 6IYC).	114
Abbildung 6.10 Zusammengefasster Sequenzvergleich der untersuchten γ -Sekretase Substrate.	115
Abbildung 6.11 Isotrope und anisotrope ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der APP TMD ausgehend einer zellfreien Proteinexpression.....	117
Abbildung 6.12 Auswertung der residualen Restkopplung der APP WT TMD.	119
Abbildung 6.13 Auswertung der residualen Restkopplung der APP G38P TMD.	121
Abbildung 6.14 Auswertung der residualen Restkopplung der APP G38L TMD.	123
Abbildung 6.15 Auswertung der residualen Restkopplung der APP V44M TMD.	125
Abbildung 6.16 Auswertung der residualen Restkopplung der APP I45T TMD.	126
Abbildung 6.17 Zusammengefasste Darstellung der besten Strukturen der APP TMD sowie Mutanten.	128
Abbildung 6.18 Struktureller Vergleich von APP in unterschiedlichen Umgebungen (Überlagerung I31-I41).	130
Abbildung 6.19 Vergleich von bekannten APP Strukturen in unterschiedlichen Umgebungen, berechnet mit PPM-Server. ^[309]	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Verwendete Oligomere für die Polymerase-Kettenreaktionen	39
Tabelle 3.2 Allgemeines Pipettierschema der Polymerase-Kettenreaktion.	40
Tabelle 3.3 Verwendete Puffersubstanzen der rekombinanten Proteinexpressionen von PSH und C99.....	43
Tabelle 3.4 Pufferkomponenten des S30-Puffers.....	44
Tabelle 3.5 Wasch- und Resuspendierungs-Puffer für die zellfrei exprimierten Proteine PSH, C99 und APP (und Mutanten).	46
Tabelle 3.6 Extinktionskoeffizienten der rekombinant und zellfrei hergestellten Proteine PSH, C99 und APP.....	47
Tabelle 3.7 Zusammensetzung der Pufferkomponenten für den Proteolyse-Assay....	47
Tabelle 3.8 Pufferkomponenten der SDS-PAGE Analyse.	49
Tabelle 3.9 Pufferkomponenten der Western Blot Analyse.....	49
Tabelle 3.10 Verwendete <i>Topspin</i> Pulsprogramme.....	50
Tabelle 3.11 Pufferkomponenten für die Proteolyse-Messung von PSH mit APP mittels NMR.....	51
Tabelle 3.12 Mengenangaben für die PEG-Gel Herstellung von 14 % Gelen.	54
Tabelle 4.1 Vergleich der katalytischen Aktivitäten aus der Literatur zwischen humaner γ -Sekretase in POPC-Vesikeln und PSH in DDM-Mizellen.....	65
Tabelle 6.1 Verhältnis an produziertem AICD des APP/C99 WT und dessen Mutanten durch PSH und humaner γ -Sekretase. Proteolytische Effizienzen: +++ sehr gut, ++ gut, + ok, +/- mäßig, - schlecht, - - sehr schlecht.....	129

Anhang

Abbildungen

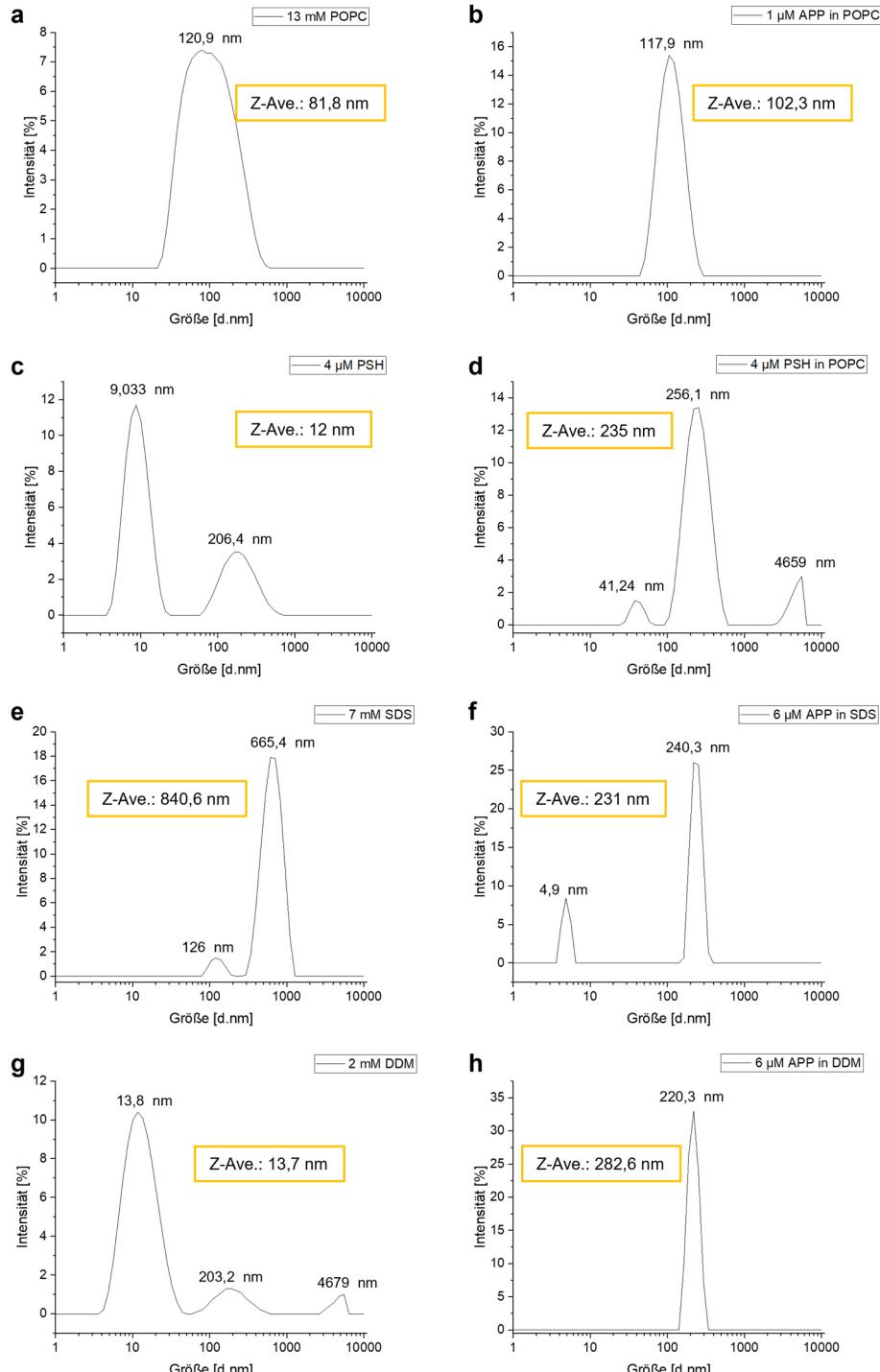


Abbildung A. 1 DLS-Messungen zeigen die mit der Intensität gewichteten mittleren hydrodynamischen Größen der Gesamtheit der Partikel von (a) 13 mM POPC mit 81,8 d.nm (b) 1 μ M APP in POPC mit 102,3 d.nm (c) 4 μ M PSH mit 12 d.nm (d) 4 μ M PSH in POPC mit 235 d.nm (e) 7 mM SDS mit 840 d.nm^[310] (SDS zeigt eine geringe Qualität der Messungen) (f) 6 μ M APP in SDS mit 231 d.nm (g) 2 mM DDM mit 13,7 d.nm^[311] (h) 6 μ M APP in DDM mit 282,6 d.nm.

Anhang

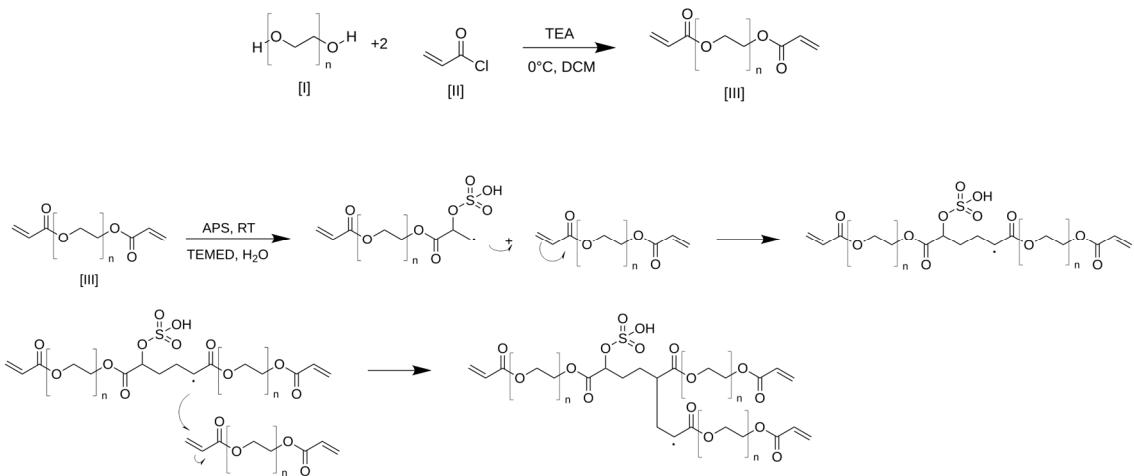


Abbildung A. 2 Herstellung des PEG-DA 35 k. Reaktionsschema der Veresterung der endständigen Hydroxylgruppe des Polyethylen glycols [I] mit Acryloylchlorid [II] in Dichlormethan (DCM) mit Triethylamin (TEA) zur Ausbildung eines biacrylierten Poly(Ethylen Oxids) (PEG-DA) [III]. Ausgehend von [III] erfolgt die Vernetzung des PEG-DA mit Ammoniumperoxydisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED).

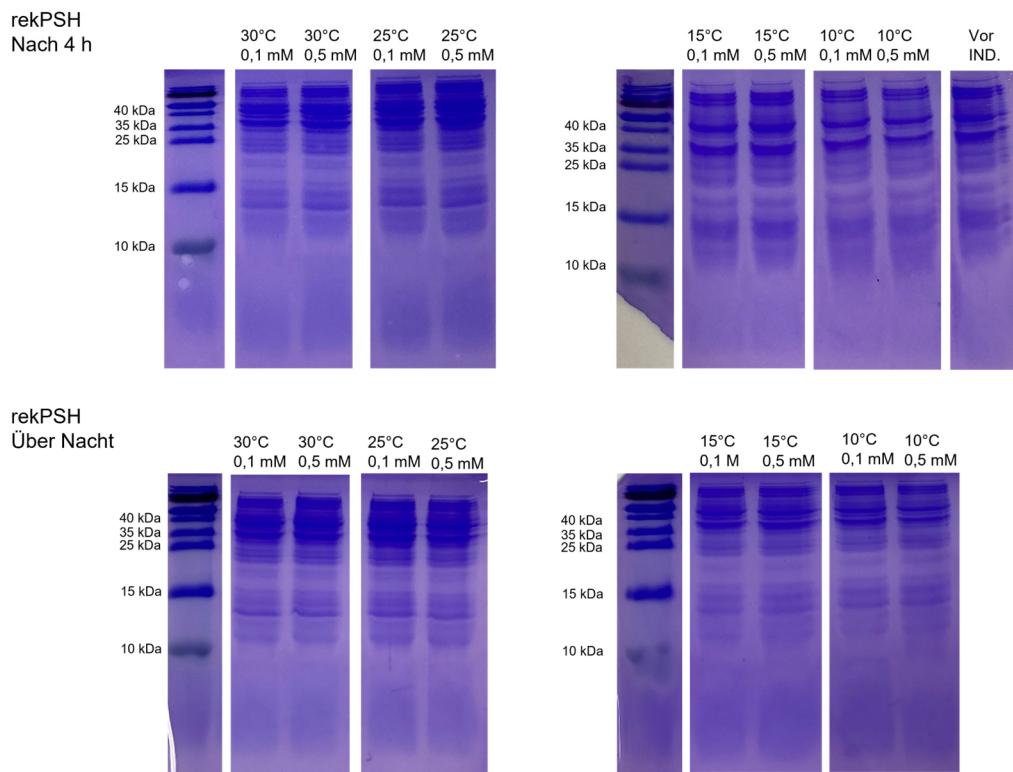


Abbildung A. 3 rekPSH Expressions-Screening; getestet wurden die Expressionstemperaturen 10°C, 15°C, 25 °C und 30 °C nach erfolgter Induktion. Dabei kamen 0,1 mM und 0,5 mM IPTG zum Einsatz. Die Bande von rekPSH wird zwischen 25 und 35 kDa erwartet.

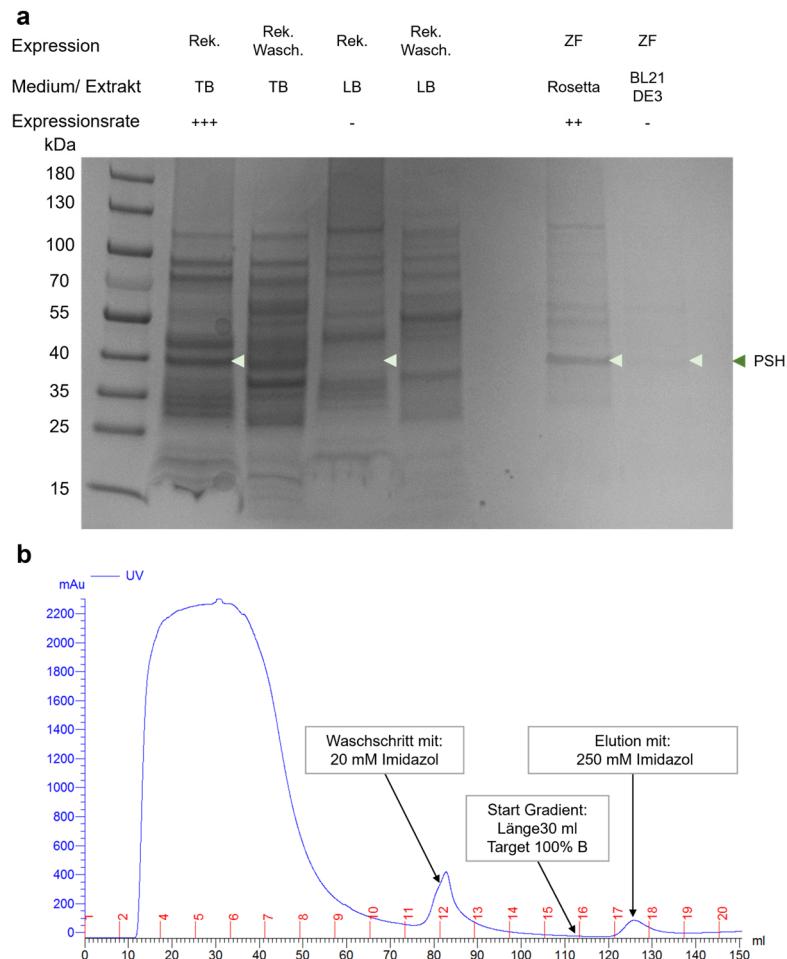


Abbildung A.4 Aufreinigung von rekPSH nach den Expressionen. **(a)** SDS-PAGE nach erfolgter Expression und anschließender Aufreinigung des rekPSH durch Affinitätschromatographie und Vergleich mit zfPSH aus Rosetta R- und BL21 DE3 R-Extrakten. Expressionsbanden sind mit einem Pfeil markiert. **(b)** Chromatogramm der rekPSH-Aufreinigung mittels His-Tag-Affinitätschromatographie. Waschschnitt mit 20 mM Imidazol zeigt Ablösen möglicherweise fehlerhaft gefalteten Proteins durch Unzugänglichkeit des N-terminalen His-Tags. Die Elution erfolgt durch 250 mM Imidazol.

Anhang

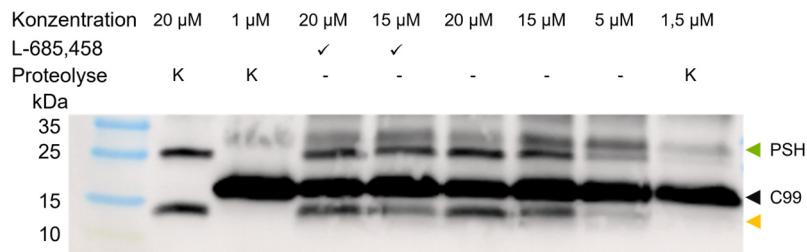


Abbildung A. 5 rekPSH-Degradation visualisiert durch einen Western Blot mit FLAG-Antikörper und unterschiedlichen rekPSH-Konzentrationen. Bande 1 zeigt die pure rekPSH mit 20 µM, Bande 2 und 8 zeigen die Kontrollen von C99 mit 1 µM und 1,5 µM. Die restlichen Banden zeigen eine vermeidliche Proteolyse mit rekPSH Konzentrationen von 5 µM – 20 µM wobei die Degradation deutlich sichtbar ist (oranger Pfeil); diese bestätigt sich durch Zugabe des Inhibitors in Bande 3 und 4. Die Degradationsbande überlagert dabei mit dem möglichen AICD-Fragment. Die Banden von PSH sind mit einem grünen und die von APP mit einem schwarzen Pfeil markiert.

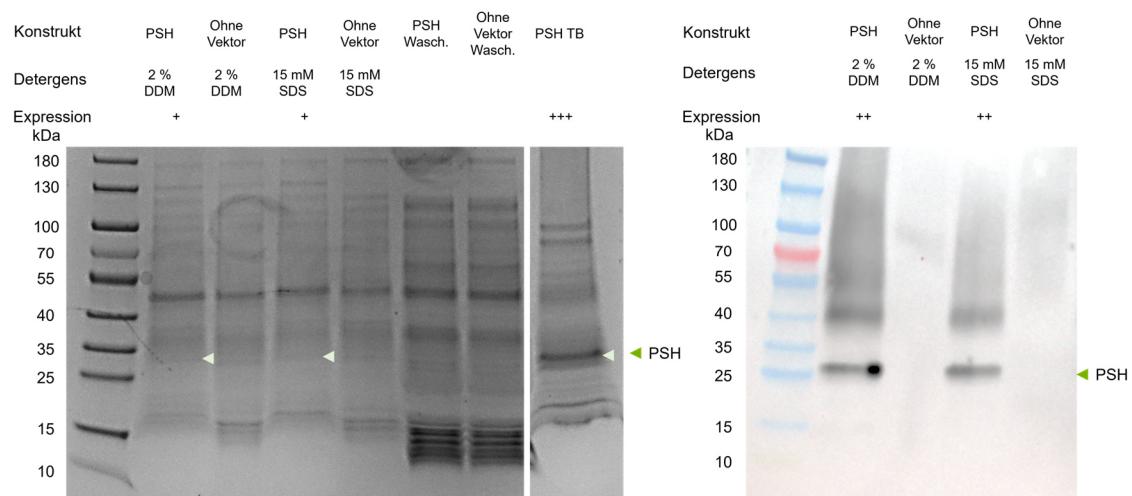


Abbildung A. 6 Leerkontrollen der zellfreien Protein Expression des zfPSH. Links ist eine SDS-PAGE nach der Expression und Resuspendierung in 2 % DDM oder 15 mM SDS sowie die entsprechenden Kontrollen ohne Verwendung des Vektors in der Expression dargestellt. Die Bande des zfPSH ist mit einem grünen Pfeil markiert. Rechts ist ein Western Blot mit FLAG-Antikörper gezeigt. Die erfolgreiche PSH-Expression und die Resuspendierung dessen ist anhand der Bande knapp über 25 kDa zu erkennen.

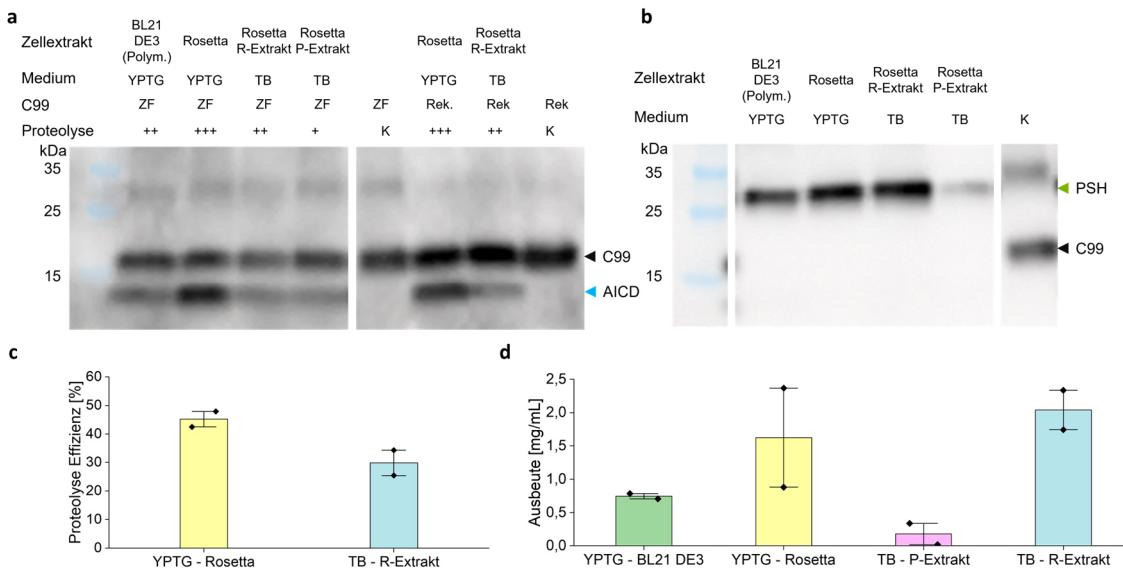


Abbildung A. 7 Vergleich der Zellextrakte für zfPSH aus unterschiedlichen Kultivierungsmedien. **(a)** Western Blot mit Anti-APP AK; Herstellung der Zellextrakte aus: **YPTG-Medium:** BL21 DE3 Zellen, welche mit IPTG induziert wurden und somit t7-RNA Polymerase gebildet haben und Rosetta Zellen; **TB-Medium:** Rosetta R- und P-Extrakte. C99 wurde sowohl rekombinant als auch zellfrei exprimiert und als Substrat getestet (gekennzeichnet durch ZF = zellfrei und Rek. = rekombinant). C99 ist mit einem schwarzen und die AICD mit einem blauen Pfeil markiert. **(b)** Western Blot mit Anti-FLAG AK; zfPSH wurden auf die identischen Konzentrationen von 2 µM eingestellt; Banden zeigen unterschiedliche Intensitäten aufgrund der Zugänglichkeit des FLAG-Tags. C99 ist mit einem schwarzen und PSH mit einem grünen Pfeil markiert. **(c)** Proteolytische Effizienz der zfPSH aus YPTG Rosettas liegt bei 45% und aus TB Rosettas R-Extrakt bei 30%. **(d)** Ausbeute von zfPSH ist für die Zellen aus YPTG Rosettas und TB Rosettas R-Extrakt vergleichbar, wobei eine Erhöhung auf durchschnittlich 2 mg/mL für TB Rosetta R-Extrakt erkennbar ist.

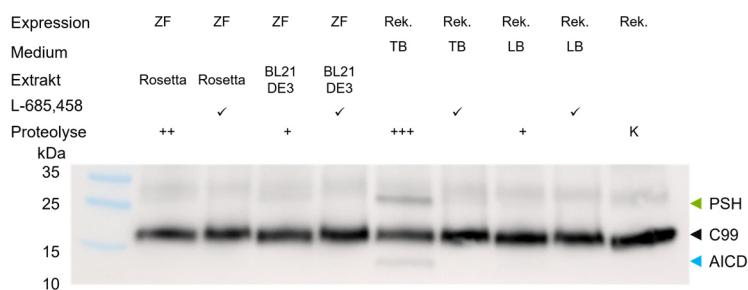


Abbildung A. 8 Western Blot Kontrolle mit FLAG-Antikörper für Proteolyse mit zfPSH aus Rosetta und BL21 DE3 R-Extrakten sowie rekPSH aus TB- und LB-Medium. Die C99 Bande ist mit einem schwarzen Pfeil markiert, das AICD mit einem blauen und PSH mit einem grünen Pfeil. Zur Kontrolle ist der Inhibitor L-685,458 für jede Proteolyse mit aufgetragen sowie eine reine C99 Probe (K).

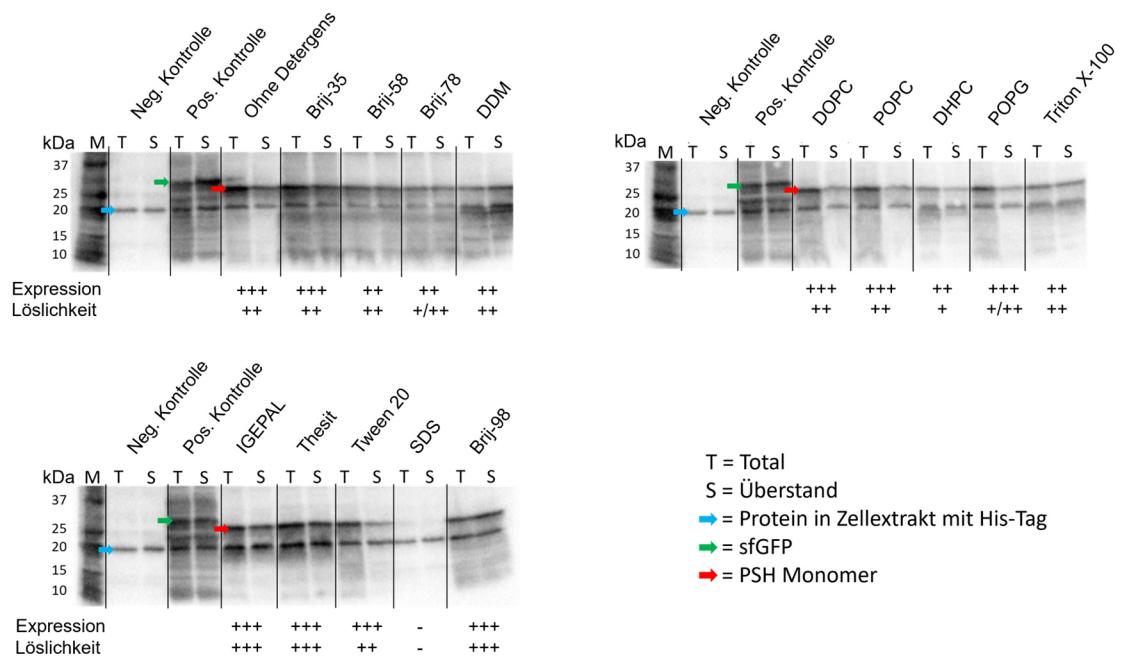


Abbildung A. 9 Western Blot Analysen mit His-AK von zellfrei exprimierten PSH in unterschiedlichen Detergenzien/Lipiden. Banden mit einem blauen Pfeil gekennzeichneten ein Protein mit einem His-Tag, welches im Zellextrakt enthalten ist. Die Positiv Kontrolle (grüner Pfeil) stellt sfGFP dar. Das Monomer von PSH ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Die Rate der Expression und Löslichkeit ist mit +++ (sehr gut), ++ (mäßig gut), + (ok), - (schlecht) gekennzeichnet. Daten zur Verfügung gestellt von B. Sc Franziska Krause.

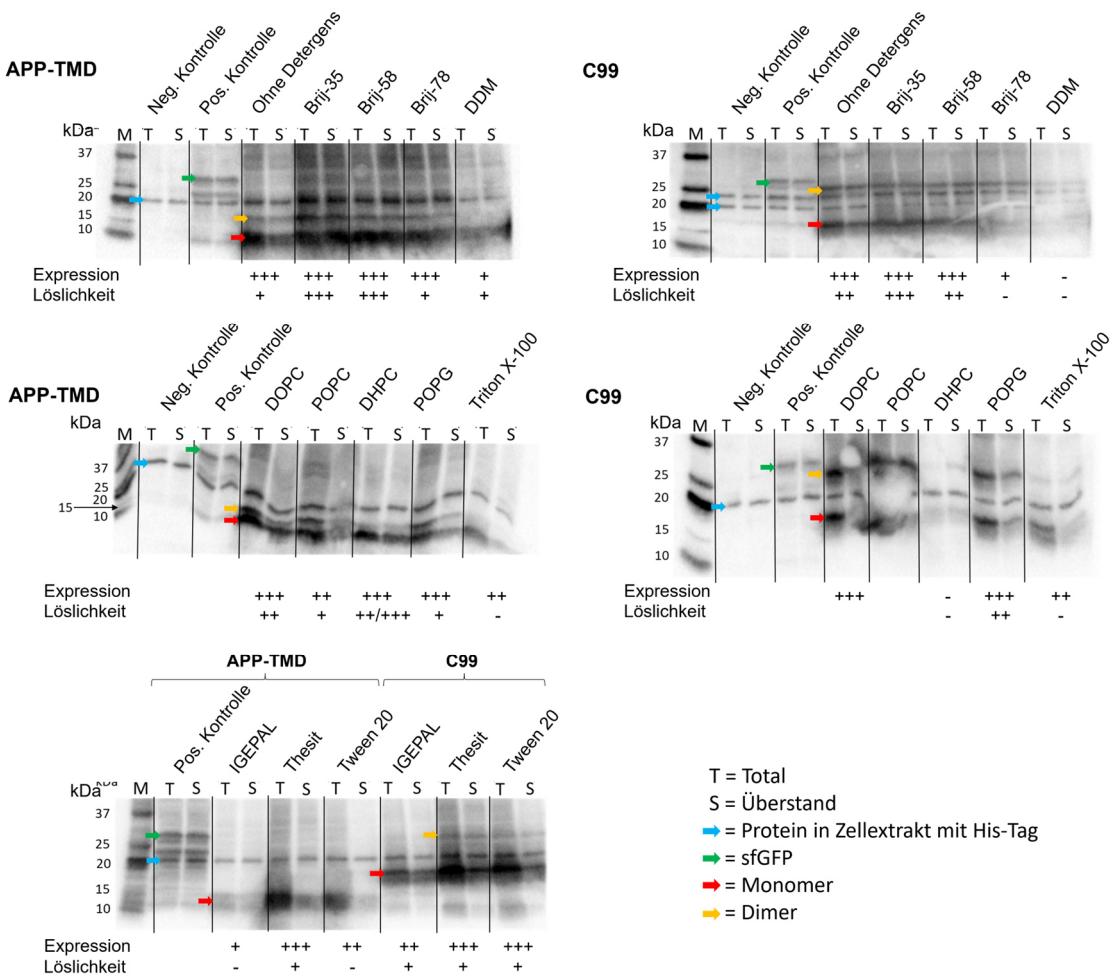


Abbildung A. 10 Western Blot Analysen mit His-AK von zellfrei exprimierten APP TMD und C99 in unterschiedlichen Detergenzien/Lipiden. Banden mit einem blauen Pfeil gekennzeichnen ein Protein mit einem His-Tag, welches im Zellektrakt enthalten ist. Die Positiv Kontrolle (grüner Pfeil) stellt sfGFP dar. Das Monomer ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet, Dimere mit einem orangenen Pfeil. Die Rate der Expression und Löslichkeit ist mit +++ (sehr gut), ++ (mäßig gut), + (ok), - (schlecht) gekennzeichnet. Daten zur Verfügung gestellt von B. Sc Franziska Krause.

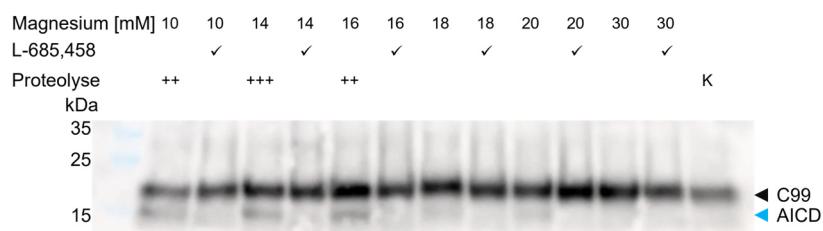


Abbildung A. 11 Western Blot Analyse mit APP-AK der C99 Proteolyse durch zfPSH mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen (10 – 30 mM). Die C99 (K) Bande ist mit einem schwarzen Pfeil markiert, das AICD mit einem blauen Pfeil. Zur Kontrolle ist der Inhibitor L-685,458 für jede Proteolyse mit aufgetragen.

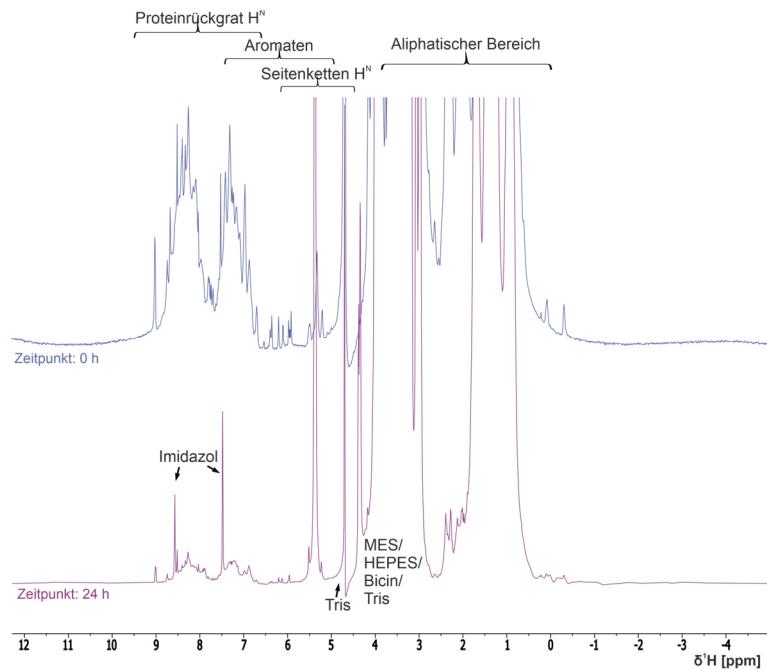


Abbildung A. 12 Überlagerung der ^1H -NMR-Spektren von APP zum Zeitpunkt Null ohne PSH-Zugabe (reine $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}$ -APP zellfreie Probe, blau) mit der Probe nach 24 h Reaktion (mit Zugabe rekPSH, lila). Es sind Veränderungen in den Intensitäten aufgrund der Konzentrationsänderung nach rekPSH-Zugabe zu erkennen. Es sind keine chemischen Verschiebungen zu sehen, welche auf eine Änderung des pH-Wertes oder sofortige Konformationsänderungen schließen könnten. Ein großer Teil des Untergrunds ist bedingt durch die Pufferkomponenten Tris, MES, HEPES und Bicin, vor allem im aliphatischen Bereich. Die Signale bei 8,5 und 7,5 können Imidazol zugeordnet werden, welches als restlicher Bestandteil der rekPSH enthalten ist.

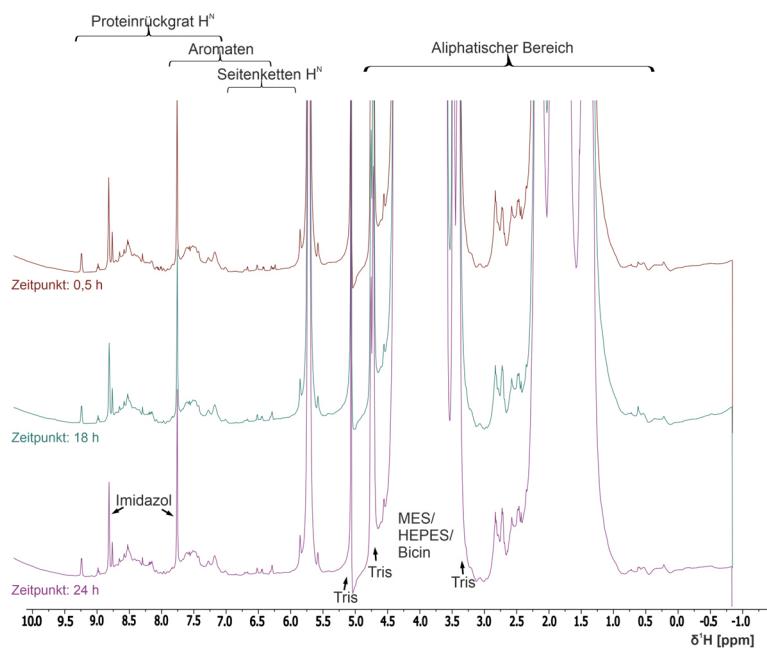


Abbildung A. 13 Überlagerung der ^1H -NMR-Spektren von APP zu den Zeitpunkten 0,5 (nach PSH-Zugabe, rot), 18 h (grün) und 24 h (lila). Es sind keine chemischen Verschiebungen zu erkennen, welche auf eine drastische Änderung im pH-Wert hindeuten könnten. Ein großer Teil des Untergrunds ist bedingt durch die Pufferkomponenten Tris, MES, HEPES und Bicin, vor allem im aliphatischen Bereich. Die Signale bei 8,5 und 7,5 können Imidazol zugeordnet werden, welches als restlicher Bestandteil der rekPSH enthalten ist.

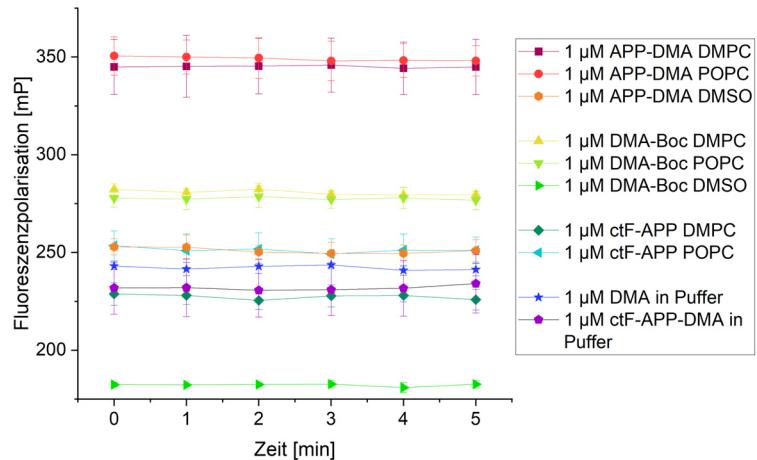


Abbildung A. 14 Fluoreszenzpolarisationsmessungen der Kontrollproben; beistehende Legende von oben nach unten: 1 μM APP-DMA in DMPC, POPC und DMSO; 1 μM DMA-Boc in DMPC, POPC und DMSO; 1 μM ctF-APP in DMPC und POPC; 1 μM pures DMA sowie 1 μM ctF-APP-DMA in Puffer.

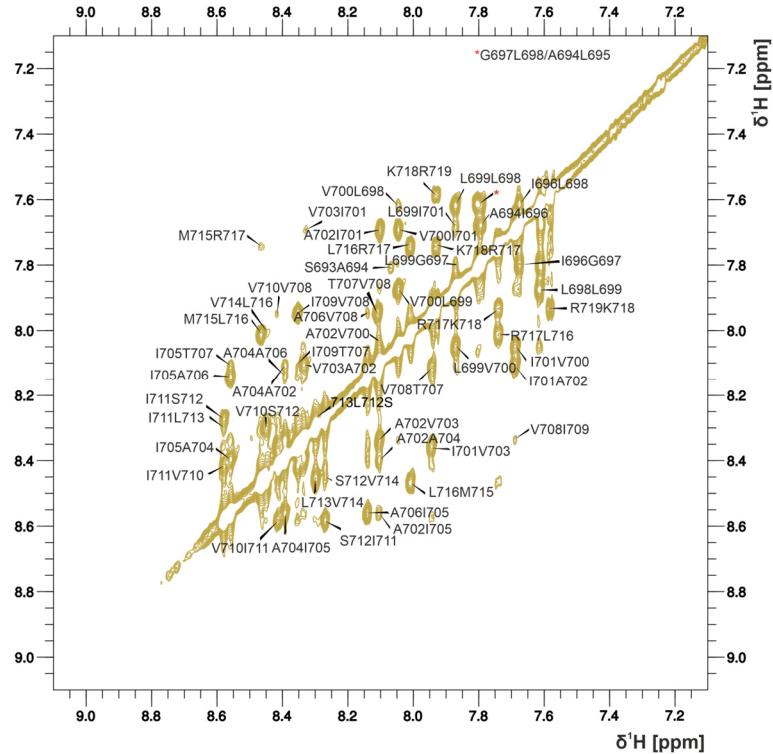


Abbildung A. 15 NH-NH-Region des APLP2 NOESY-Spektrums. Die Signale sind zumeist gut separiert. Die Signale G697/L698 und A694/L695 sind überlagert.

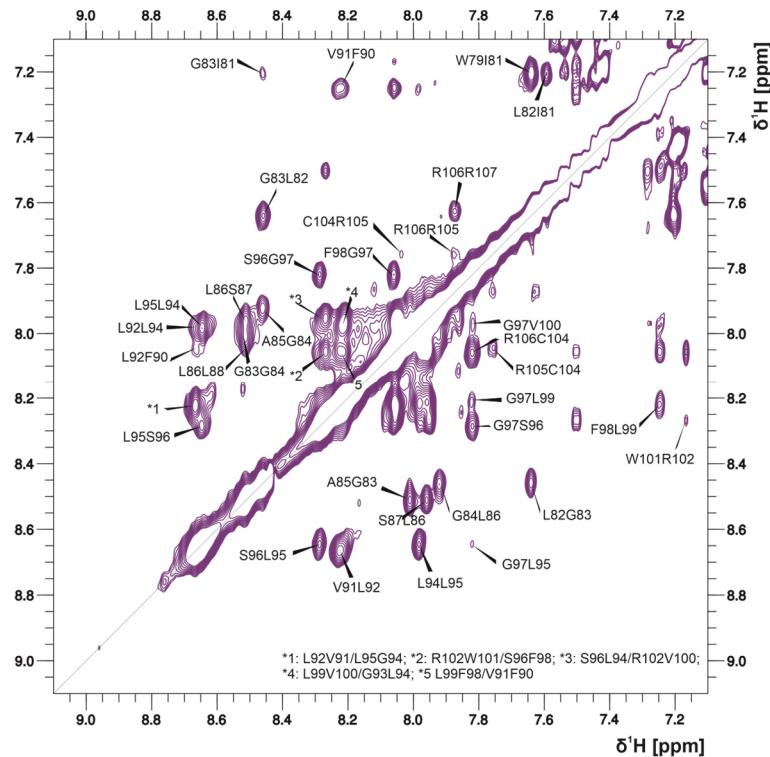


Abbildung A. 16 NH-NH-Region des Fn14 NOESY-Spektrums. Zwischen 7,7 ppm und 8,7 ppm ist ein stark überlagerter Bereich zu erkennen, wobei die Aminosäurereste nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Überlagerte Signale sind mit einem Asterisk markiert.

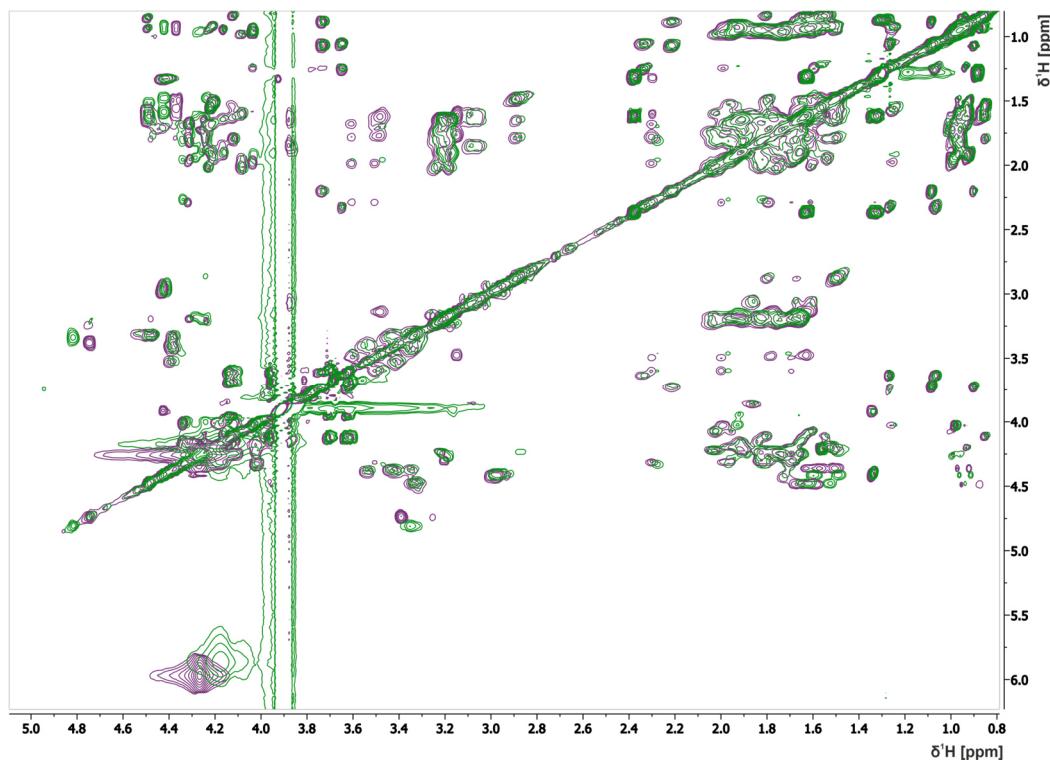


Abbildung A. 17 Qualitatives ^1H - ^1H -TOCSY-Spektrum des Fn14. Der dargestellte Ausschnitt zeigt den aliphatischen Bereich des Fn14; in lila 500 µM Probe, grün 200 µM Probe. Es sind keine eindeutigen Qualitätsänderungen bedingt durch die Konzentrationsunterschiede sichtbar, welche auf eine Dimerisierung sprechen könnten. Das Signal zwischen 3,8 ppm und 4 ppm ist TFE-d₂ zuzuordnen.

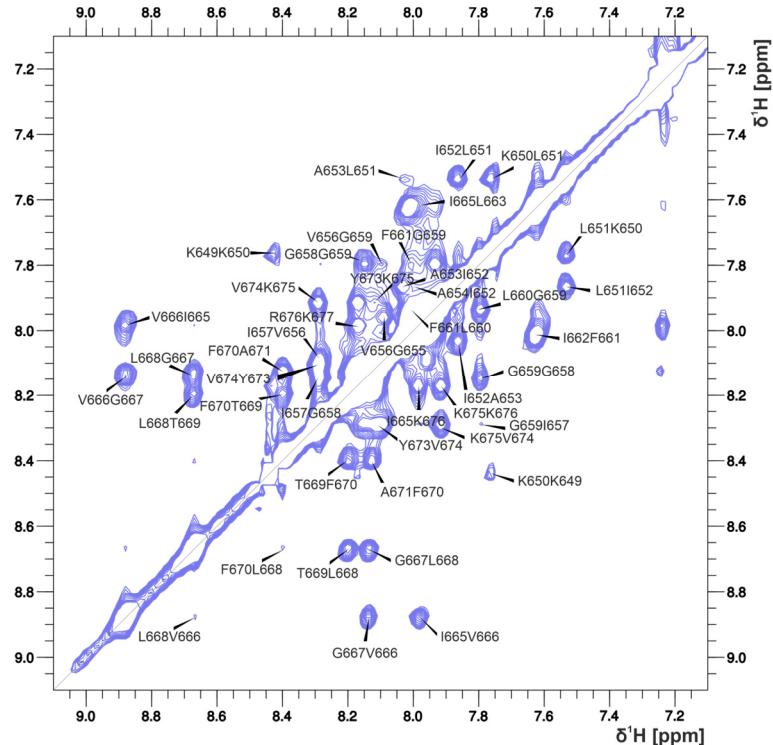


Abbildung A. 18 NH-NH-Region des ErbB4 NOESY-Spektrums. Zwischen 7,5 ppm und 8,5 ppm ist ein stark überlagerter Bereich zu erkennen, wobei die Aminosäurereste nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

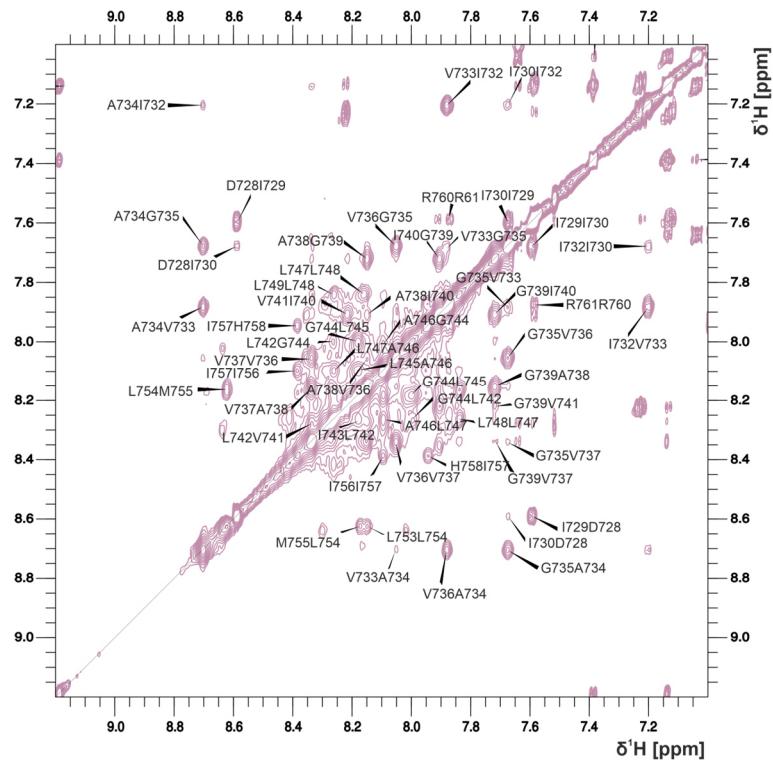


Abbildung A. 19 NH-NH-Region des ITGB1 NOESY-Spektrums zeigt zumeist gut separierte und eindeutig zuordbare Signale.

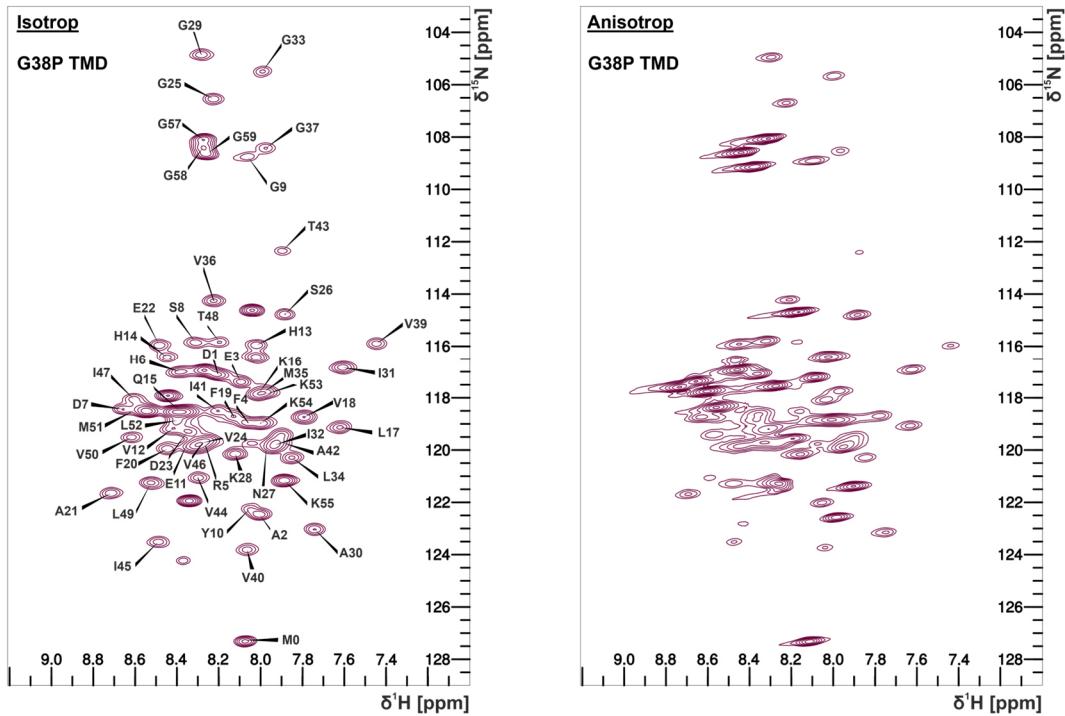


Abbildung A. 20 Isotope (^1H - ^{15}N -HSQC) und anisotrope Spektren (^1H - ^{15}N -HSQC) der G38P TMD. Das anisotrope Spektrum zeigt eine reduzierte Qualität und breite Linien.

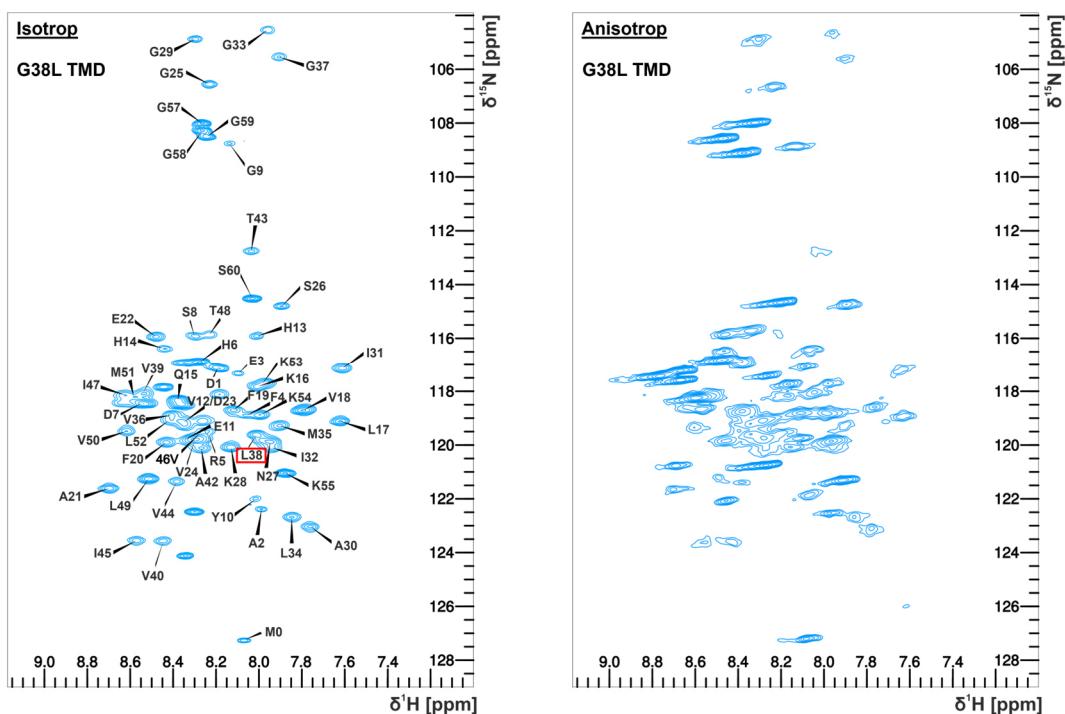


Abbildung A. 21 Isotope (^1H - ^{15}N -HSQC) und anisotrope Spektren (^1H - ^{15}N -HSQC) der G38L TMD. Die Lokalisation der mutierten Aminosäure ist rot umrandet. Das anisotrope Spektrum zeigt Linienverbreiterung.

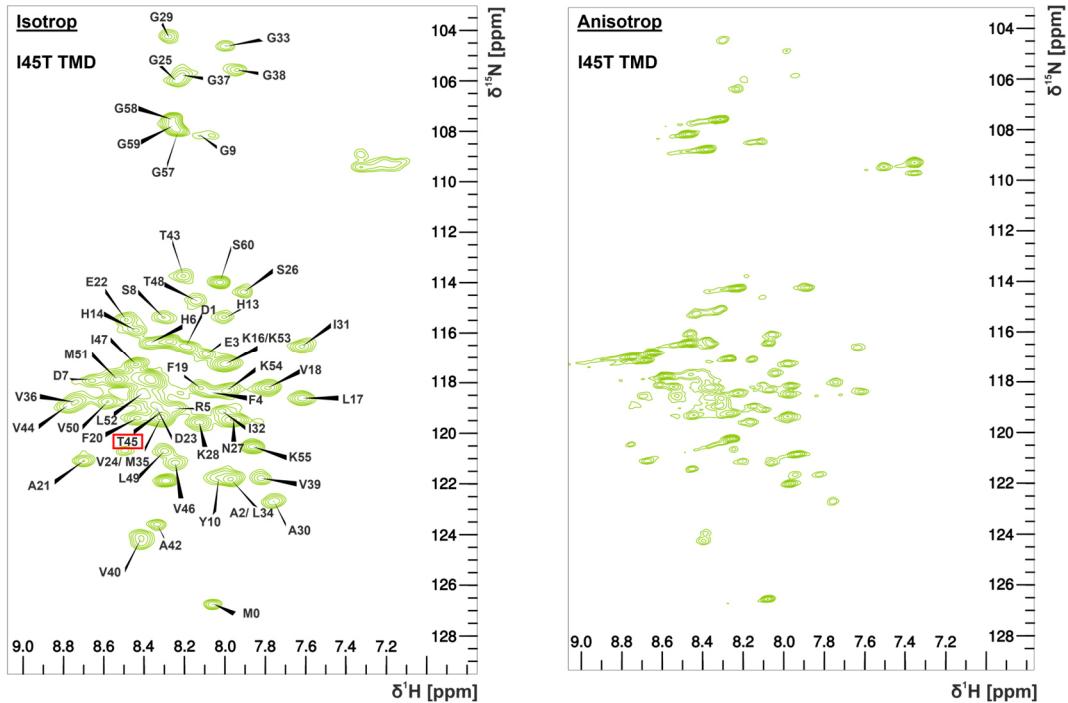


Abbildung A. 22 Isotrope (^1H - ^{15}N -HSQC) und anisotrope Spektren (^1H - ^{15}N -HSQC) der I45T TMD. Die Lokalisation der mutierten Aminosäure ist rot umrandet. Das anisotrope Spektrum zeigt vereinzelt Linienverbreiterung.

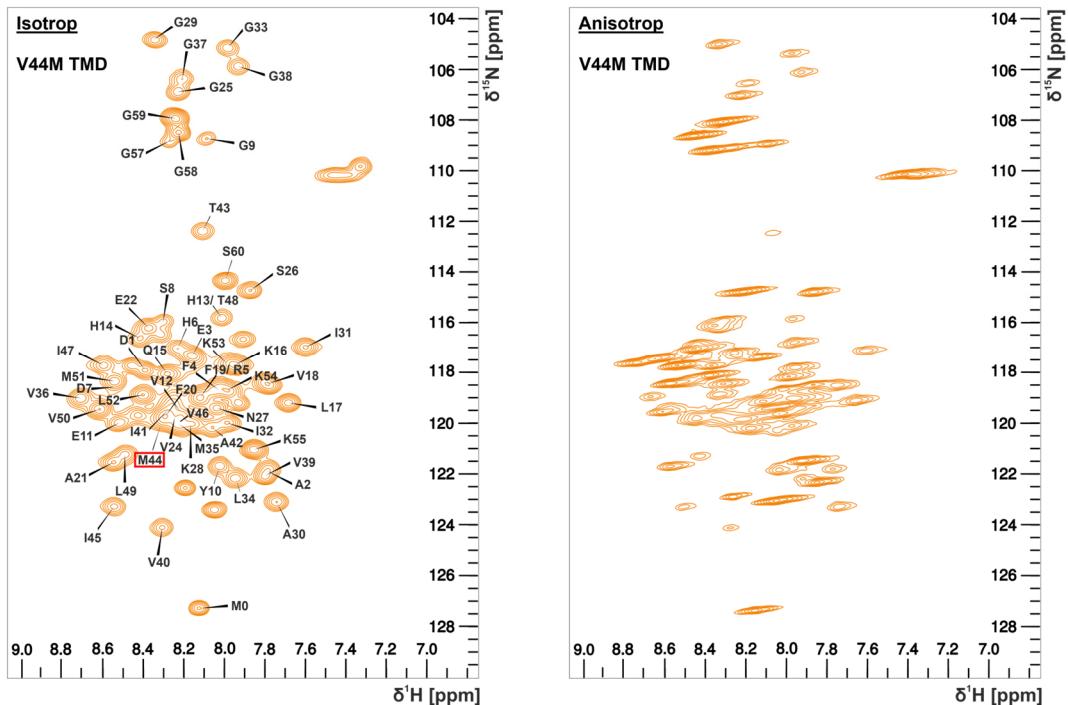


Abbildung A. 23 Isotrope (^1H - ^{15}N -HSQC) und anisotrope Spektren (^1H - ^{15}N -HSQC) der V44M TMD. Die Lokalisation der mutierten Aminosäure ist rot umrandet. Das anisotrope Spektrum zeigt Linienverbreiterung.

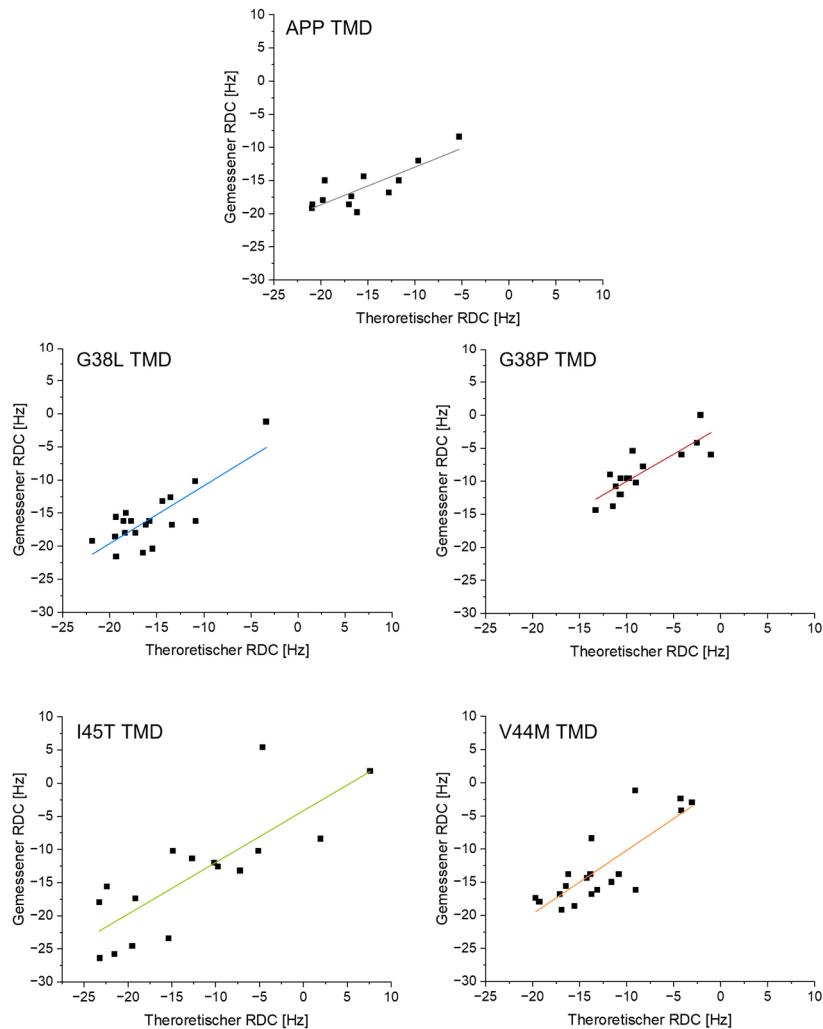


Abbildung A. 24 Auftragung von theoretisch berechneten und tatsächlich gemessenen RDCs mit linearer Geradenregression von APP (schwarz) und dessen Mutanten G38L (blau), G38P (rot), I45T (grün) und V44M (orange).

Tabellen

Tabelle A. 1 Auswertung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von APP über die Zeit. Dargestellt sind die repräsentativen Chemischen Verschiebungen in ppm, sowie die Höhen und Volumina der einzelnen Signale.

	0,5 Stunden				5 Stunden				13 Stunden				18 Stunden				24 Stunden				
	^1H [ppm]	^{15}N [ppm]	Höhe	Volumen																	
0 Met	8,50	128,26	2,11E+03	1,63E+04	8,50	128,26	1,59E+03	1,31E+04													
1 Asp																					
2 Ala	8,40	124,33	6,21E+03	4,95E+04	8,40	124,33	6,35E+03	5,12E+04	8,40	124,34	5,04E+03	3,94E+04	8,40	124,33	6,62E+03	5,37E+04	8,40	124,33	6,55E+03	5,30E+04	
3 Glu	8,33	119,36	1,25E+04	1,02E+05	8,33	119,36	1,25E+04	1,02E+05	8,34	119,36	1,10E+04	9,04E+04	8,33	119,36	1,19E+04	9,68E+04	8,34	119,38	1,21E+04	9,85E+04	
4 Phe	8,15	120,76	1,15E+04	9,53E+04	8,15	120,75	1,10E+04	9,01E+04	8,15	120,76	1,19E+04	9,77E+04	8,15	120,76	1,13E+04	9,20E+04	8,15	120,76	9,95E+03	8,07E+04	
5 Arg	8,04	122,03	7,35E+03	5,95E+04	8,03	122,03	6,63E+03	5,38E+04	8,04	122,01	7,01E+03	5,63E+04	8,04	122,05	7,52E+03	6,09E+04	8,04	122,03	7,44E+03	6,03E+04	
6 His																					
7 Asp	8,41	121,32	4,43E+03	3,95E+04																	
8 Ser	8,38	116,22	3,36E+03	2,73E+04	8,39	116,23	3,33E+03	2,81E+04	8,38	116,25	3,47E+03	2,83E+04	8,39	116,26	3,90E+03	3,23E+04	8,38	116,33	3,21E+03	2,67E+04	
9 Gly	8,53	110,41	6,47E+03	5,32E+04	8,53	110,43	8,05E+03	6,47E+04	8,53	110,43	8,14E+03	6,62E+04	8,53	110,42	6,20E+03	5,03E+04	8,54	110,42	6,12E+03	4,99E+04	
10 Tyr																					
11 Glu																					
12 Val	8,05	120,05	2,52E+04	2,14E+05	8,05	120,06	2,63E+04	2,25E+05	8,05	120,06	2,61E+04	2,21E+05	8,05	120,03	2,41E+04	2,05E+05	8,06	120,05	2,26E+04	1,93E+05	
13 His																					
14 His																					
15 Gln	8,28	118,85	1,46E+04	1,19E+05	8,28	118,86	1,47E+04	1,19E+05	8,28	118,87	1,35E+04	1,10E+05	8,28	118,87	1,26E+04	1,02E+05	8,28	118,86	1,42E+04	1,16E+05	
16 Lys																					
17 Leu	8,15	120,76	1,15E+04	9,53E+04	8,15	120,75	1,10E+04	9,01E+04	8,15	120,76	1,19E+04	9,77E+04	8,15	120,76	1,13E+04	9,20E+04	8,15	120,76	9,95E+03	8,07E+04	
18 Val	7,87	118,75	1,46E+04	1,20E+05	7,87	118,73	1,45E+04	1,20E+05	7,87	118,75	1,30E+04	1,08E+05	7,87	118,74	1,30E+04	1,08E+05	7,87	118,76	1,20E+04	9,82E+04	
19 Phe																					
20 Phe	7,98	118,62	7,96E+03	6,57E+04	7,98	118,59	8,15E+03	6,69E+04	7,98	118,64	8,30E+03	6,85E+04	7,98	118,59	8,62E+03	7,14E+04	7,99	118,61	8,34E+03	6,96E+04	
21 Ala	8,16	121,28	8,03E+04	4,52E+06	8,16	121,27	1,02E+04	8,45E+04	8,15	121,26	8,26E+03	6,91E+04	8,15	121,24	9,46E+03	7,80E+04	8,16	121,26	8,77E+03	7,37E+04	
22 Glu	8,27	117,55	1,26E+04	1,05E+05	8,26	117,56	1,15E+04	9,66E+04	8,26	117,56	1,24E+04	1,04E+05	8,26	117,54	1,03E+04	8,66E+04	8,26	117,55	1,23E+04	1,04E+05	
23 Asp	8,17	119,36	1,26E+04	1,04E+05	8,17	119,37	1,16E+04	9,55E+04	8,17	119,35	1,23E+04	1,02E+05	8,17	119,36	1,23E+04	1,01E+05	8,17	119,37	1,12E+04	9,22E+04	
24 Val																					
25 Gly	8,31	107,64	7,44E+03	6,17E+04	8,31	107,62	8,17E+03	6,80E+04	8,31	107,64	7,54E+03	6,20E+04	8,31	107,63	8,85E+03	7,35E+04	8,31	107,62	6,16E+03	5,15E+04	
26 Ser	8,00	114,43	3,87E+03	3,20E+04	8,00	114,46	4,76E+03	3,96E+04	8,00	114,45	5,82E+03	4,75E+04	8,00	114,44	4,06E+03	3,35E+04	7,99	114,48	3,81E+03	3,12E+04	
27 Asn																					

Anhang

28 Lys	8,46	121,30	9,21E+03	7,69E+04	8,46	121,28	9,66E+03	8,09E+04	8,47	121,29	8,97E+03	7,55E+04	8,45	121,34	7,42E+03	6,39E+04	8,47	121,30	7,81E+03	6,44E+04
29 Gly	8,67	106,40	5,60E+03	4,75E+04	8,67	106,44	6,20E+03	5,14E+04	8,67	106,41	5,90E+03	4,91E+04	8,67	106,43	4,97E+03	4,17E+04	8,68	106,45	6,08E+03	4,94E+04
30 Ala	8,00	122,70	7,14E+03	5,90E+04	8,00	122,71	7,82E+03	6,55E+04	8,00	122,70	6,42E+03	5,27E+04	8,00	122,70	6,66E+03	5,50E+04	8,00	122,74	7,21E+03	5,97E+04
31 Ile	7,83	116,20	5,74E+03	4,81E+04	7,83	116,20	5,21E+03	4,41E+04	7,83	116,18	5,99E+03	5,06E+04	7,83	116,16	4,58E+03	3,78E+04	7,82	116,20	5,99E+03	4,97E+04
32 Ile																				
33 Gly	8,54	106,48	4,61E+03	3,78E+04	8,54	106,46	4,29E+03	3,51E+04	8,54	106,47	5,92E+03	4,93E+04	8,53	106,50	4,53E+03	3,70E+04	8,55	106,50	4,65E+03	3,90E+04
34 Leu	8,24	120,50	1,40E+04	1,20E+05	8,24	120,51	1,42E+04	1,23E+05	8,24	120,48	1,40E+04	1,21E+05	8,24	120,44	1,22E+04	1,05E+05	8,24	120,47	1,25E+04	1,07E+05
35 Met	8,27	117,55	1,26E+04	1,05E+05	8,26	117,56	1,15E+04	9,66E+04	8,26	117,56	1,24E+04	1,04E+05	8,26	117,54	1,03E+04	8,66E+04	8,26	117,55	1,23E+04	1,04E+05
36 Val	8,66	117,66	6,63E+03	5,71E+04	8,61	117,65	6,92E+03	5,94E+04	8,60	117,56	5,61E+03	4,73E+04	8,61	117,56	6,57E+03	5,53E+04	8,60	117,60	6,67E+03	5,61E+04
37 Gly	8,77	106,09	4,67E+03	3,88E+04	8,77	106,14	4,24E+03	3,48E+04	8,79	106,13	3,34E+03	2,88E+04	8,78	106,16	3,34E+03	2,73E+04	8,77	106,08	4,23E+03	3,60E+04
38 Gly	8,77	108,22	4,78E+03	4,01E+04	8,77	108,25	3,60E+03	2,94E+04	8,78	108,25	5,18E+03	4,24E+04	8,78	108,23	3,07E+03	2,43E+04	8,78	108,22	3,93E+03	3,30E+04
39 Val	8,24	120,50	1,40E+04	1,20E+05	8,24	120,51	1,42E+04	1,23E+05	8,24	120,48	1,40E+04	1,21E+05	8,24	120,44	1,22E+04	1,05E+05	8,24	120,47	1,25E+04	1,07E+05
40 Val	8,54	122,29	6,92E+03	5,84E+04	8,54	122,28	5,42E+03	4,46E+04	8,54	122,23	6,32E+03	5,21E+04	8,54	122,29	6,07E+03	5,07E+04	8,54	122,27	4,77E+03	4,00E+04
41 Ile	8,48	118,85	7,94E+03	6,90E+04	8,48	118,88	7,91E+03	6,66E+04	8,47	118,83	8,35E+03	7,28E+04	8,47	118,86	7,56E+03	6,53E+04	8,48	118,63	7,10E+03	6,13E+04
42 Ala	8,59	120,48	8,72E+03	7,19E+04	8,60	120,47	7,22E+03	6,06E+04	8,59	120,46	8,11E+03	6,80E+04	8,60	120,46	8,27E+03	6,88E+04	8,59	120,45	5,49E+03	4,53E+04
43 Thr	8,17	113,97	6,26E+03	5,15E+04	8,18	113,96	5,00E+03	4,21E+04	8,18	113,96	6,08E+03	5,03E+04	8,17	113,91	6,28E+03	5,20E+04	8,18	113,92	4,34E+03	3,52E+04
44 Val																				
45 Ile	8,44	121,86	2,11E+04	1,74E+05	8,43	121,86	2,15E+04	1,76E+05	8,43	121,86	2,07E+04	1,70E+05	8,44	121,86	2,09E+04	1,73E+05	8,44	121,86	1,97E+04	1,62E+05
46 Val	8,48	118,85	7,94E+03	6,90E+04	8,48	118,88	7,91E+03	6,66E+04	8,47	118,83	8,35E+03	7,28E+04	8,47	118,86	7,56E+03	6,53E+04	8,48	118,63	7,10E+03	6,13E+04
47 Ile	8,66	117,66	6,63E+03	5,71E+04	8,61	117,65	6,92E+03	5,94E+04	8,60	117,56	5,61E+03	4,73E+04	8,61	117,56	6,57E+03	5,53E+04	8,60	117,60	6,67E+03	5,61E+04
48 Thr	8,18	116,59	6,06E+03	5,10E+04	8,18	116,56	3,15E+03	2,52E+04	8,18	116,56	6,15E+03	5,10E+04	8,17	116,58	2,42E+03	1,98E+04	8,18	116,60	3,64E+03	2,98E+04
49 Leu	8,34	119,85	6,27E+03	5,26E+04	8,34	119,80	5,93E+03	4,97E+04	8,34	119,83	5,77E+03	4,84E+04	8,34	119,85	5,14E+03	4,32E+04	8,33	119,86	4,30E+03	3,56E+04
50 Val	8,39	117,50	8,21E+03	7,08E+04	8,39	117,56	7,06E+03	6,01E+04	8,40	117,50	8,21E+03	7,06E+04	8,38	117,48	9,34E+03	8,06E+04	8,39	117,45	7,90E+03	6,80E+04
51 Met	8,47	117,43	2,19E+03	1,99E+04	8,47	117,67	2,67E+03	2,18E+04												
52 Leu																				
53 Lys	7,83	117,76	8,93E+03	7,42E+04	7,83	117,78	9,43E+03	7,76E+04	7,83	117,79	9,91E+03	8,25E+04	7,82	117,79	8,84E+03	7,36E+04	7,83	117,79	9,91E+03	8,24E+04
54 Lys	8,05	119,04	1,14E+04	9,43E+04	8,05	119,03	1,15E+04	9,68E+04	8,05	119,04	1,20E+04	9,90E+04	8,05	119,04	1,15E+04	9,58E+04	8,05	119,05	1,14E+04	9,47E+04
55 Lys	8,22	122,11	1,04E+04	8,62E+04	8,22	122,09	9,92E+03	8,13E+04	8,22	122,11	7,98E+03	6,58E+04	8,22	122,10	1,02E+04	8,41E+04	8,22	122,09	9,63E+03	7,90E+04
56 Pro																				
57 Gly	8,54	109,29	2,90E+03	2,38E+04	8,55	109,28	3,54E+03	2,87E+04					8,54	109,29	8,03E+02	6,31E+03	8,54	109,35	2,74E+03	2,22E+04
58 Gly	8,39	108,65	4,79E+02	5,45E+03	8,38	108,74	1,97E+03	1,60E+04					8,39	108,65	7,43E+02	6,46E+03	8,35	108,59	2,95E+03	2,47E+04

Tabelle A. 2 Chemische Verschiebungstabelle des APLP2 ausgehend von ^1H - ^1H -NOESY-, ^1H - ^1H -TOCSY- und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren.

Nummer	Rest	^1H [ppm]	$^1\text{H}\alpha$ [ppm]	$^1\text{H}\beta$ [ppm]	$^{13}\text{C}\alpha$ [ppm]	$^{13}\text{C}\beta$ [ppm]
689	Ser	-	4,62	3,92/ 4,07	-	63,62
690	Leu	-	-	1,73/ 1,52	-	41,33
691	Ser	-	-		-	-
692	Ser	-	-		-	-
693	Ser	8,07	4,34	3,94/ 3,93	59,64	62,26
694	Ala	7,81	4,24	1,51	53,69	17,46
695	Leu	7,61	4,26	1,69/ 1,92	56,94	41,26
696	Ile	7,68	3,89	1,95	63,42	37,13
697	Gly	7,80	3,83/3,83		46,35	-
698	Leu	7,61	4,22	2,12/ 1,77	56,72	41,34
699	Leu	7,87	4,18	1,79/ 1,90	57,34	41,09
700	Val	8,05	3,66	2,26	66,03	30,97
701	Ile	7,69	3,84	2,03	63,95	37,24
702	Ala	8,10	4,07	1,60	55,15	16,83
703	Val	8,33	3,73	2,23	65,57	31,13
704	Ala	8,39	4,11	1,61	55,48	16,69
705	Ile	8,56	3,73	1,95	64,49	37,22
706	Ala	8,14	4,04	1,56	54,97	16,91
707	Thr	8,11	3,88	4,53	66,90	68,41
708	Val	7,94	3,67	2,37	66,35	30,85
709	Ile	8,35	3,64	2,13	65,54	36,83
710	Val	8,41	3,64	2,27	67,35	30,97
711	Ile	8,58	3,72	1,99	64,76	36,91
712	Ser	8,27	4,26	4,17	59,98	62,26
713	Leu	8,30	4,18	2,12/ 1,51	57,34	41,35
714	Val	8,45	3,72	2,35	65,90	31,20
715	Met	8,46	4,32	2,11/ 2,33	57,19	31,45
716	Leu	8,01	4,28	1,65/ 1,96	55,96	41,66
717	Arg	7,74	4,28	1,98/ 1,98	56,11	29,51
718	Lys	7,93	4,32	1,97/ 1,87	56,00	31,84
719	Arg	7,58	4,24	1,77/ 1,91	56,44	31,12

Anhang

Tabelle A. 3 Chemische Verschiebungstabelle des Fn14 ausgehend von ^1H - ^1H -NOESY-, ^1H - ^1H -TOCSY- und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren.

Nummer	Rest	^1H [ppm]	$^1\text{H}\alpha$ [ppm]	$^1\text{H}\beta$ [ppm]	$^{13}\text{C}\alpha$ [ppm]	$^{13}\text{C}\beta$ [ppm]
76	Arg	-	-	1,57/ 1,73	-	32,99
77	Leu	-	4,32	1,65/ 1,90	54,57	41,17
78	Leu	7,58	4,45	1,60	54,03	41,21
79	Trp	7,59	4,70	3,35	58,89	27,49
80	Pro	-	4,27	1,75/ 2,26	64,98	30,36
81	Ile	7,20	4,00	1,95	62,41	37,54
82	Leu	7,64	4,23	1,69	56,93	41,55
83	Gly	8,46	3,64/3,74		46,04	
84	Gly	7,92	3,89		46,15	
85	Ala	8,01	4,18	1,52	54,52	16,95
86	Leu	8,51	4,13	1,87	57,45	41,43
87	Ser	7,96	4,30	3,99	61,61	62,41
88	Leu	8,05	4,22	1,65/ 1,93	57,51	41,18
89	Thr	7,98	3,89	4,37	66,32	68,39
90	Phe	8,05	4,35	3,38/ 3,29	60,67	38,43
91	Val	8,23	3,61	2,30	66,63	31,31
92	Leu	8,67	4,17	1,51/ 1,92	57,49	40,95
93	Gly	8,22	3,76/3,90		46,00	
94	Leu	7,98	4,09	1,77/ 1,61	57,37	41,47
95	Leu	8,65	4,18	1,87/ 1,67	57,34	41,45
96	Ser	8,29	3,99/4,22	4,08/ 3,99	61,38	62,43
97	Gly	7,82	3,89/3,94		46,18	
98	Phe	8,05	4,45	3,38/ 3,29	60,22	38,43
99	Leu	8,21	4,04	1,96	57,40	41,20
100	Val	7,96	3,70	2,17	65,83	31,38
101	Trp	8,05	4,36	3,36/ 3,49	59,80	28,18
102	Arg	8,27	3,81	1,82	57,74	29,09
103	Arg	7,95	4,21	1,99	57,14	29,60
104	Cys	8,05	4,38	2,94	59,79	26,78
105	Arg	7,75	4,22	1,74/ 1,63	55,53	29,55
106	Arg	7,87	4,28	1,80/ 1,92	55,75	29,81
107	Arg	7,62	4,22	1,71/ 1,88	56,52	31,17

Tabelle A. 4 Chemische Verschiebungstabelle ErbB4 des ausgehend von ^1H - ^1H -NOESY-, ^1H - ^1H -TOCSY- und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren.

Nummer	Rest	^1H [ppm]	$^1\text{H}\alpha$ [ppm]	$^1\text{H}\beta$ [ppm]	$^{13}\text{C}\alpha$ [ppm]	$^{13}\text{C}\beta$ [ppm]
649	Lys	8,43	4,11	1,88	56,31	32,63
650	Lys	7,77	4,08	1,88	59,08	32,10
651	Leu	7,53	4,18	1,66/ 1,89	57,39	41,71
652	Ile	7,86	3,83	1,95	64,26	37,95
653	Ala	8,04	4,06	1,50	55,17	17,43
654	Ala	8,00	4,09	1,51	54,82	17,49
655	Gly	7,96	3,89/3,92		46,29	-
656	Val	8,09	3,87	2,25	65,86	32,03
657	Ile	8,29	3,88	1,94	64,82	37,79
658	Gly	8,15	3,98/3,95		46,35	-
659	Gly	7,79	3,90/3,96		46,52	-
660	Leu	7,93	4,23	1,67/ 1,83	57,54	41,69
661	Phe	8,01	4,31	3,25/ 3,23	60,79	38,58
662	Ile	7,62	3,78	2,04	64,01	37,47
663	Leu	7,62	4,04	2,01/ 1,63	58,16	41,38
664	Val	8,01	3,69	2,27	66,51	31,53
665	Ile	7,98	3,80	2,01	64,44	37,12
666	Val	8,88	3,61	2,19	67,40	31,44
667	Gly	8,14	3,97/3,92		47,31	-
668	Leu	8,67	4,28	1,67/ 1,90	57,91	42,20
669	Thr	8,20	3,93	4,42	66,90	68,88
670	Phe	8,40	4,37	3,26/ 3,26	61,43	38,91
671	Ala	8,13	4,02	1,62	55,42	17,58
672	Val	8,17	3,62	2,21	66,42	31,78
673	Tyr	8,11	4,13	3,15/ 2,22	61,63	38,16
674	Val	8,29	3,51	2,02	65,98	31,56
675	Lys	7,91	4,05	1,96	58,34	32,10
676	Lys	8,17	4,13	1,86	58,64	32,11
677	Lys	7,99	4,11	1,68/ 1,74	56,31	32,15

Anhang

Tabelle A. 5 Chemische Verschiebungstabelle des ITGB1 ausgehend von ^1H - ^1H -NOESY-, ^1H - ^1H -TOCSY- und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren.

Nummer	Rest	^1H [ppm]	$^1\text{H}\alpha$ [ppm]	$^1\text{H}\beta$ [ppm]	$^{13}\text{C}\alpha$ [ppm]	$^{13}\text{C}\beta$ [ppm]
727	Pro	-	4,40	2,30/ 2,04	63,49	30,79
728	Asp	8,59	4,45	2,69/ 2,69	54,25	38,84
729	Ile	7,59	4,42	2,08	60,72	38,65
730	Ile	7,67	3,97	2,13	64,87	35,04
731	Pro	-	4,29	2,33/ 1,81	65,06	30,42
732	Ile	7,20	3,90	2,16	63,34	37,34
733	Val	7,88	3,66	2,17	66,13	31,33
734	Ala	8,70	4,06	1,45	54,62	16,98
735	Gly	7,68	3,94/3,94		45,93	
736	Val	8,05	3,82	2,38	65,74	31,21
737	Val	8,34	3,66	2,16	65,80	31,05
738	Ala	8,15	4,06	1,52	54,62	16,89
739	Gly	7,72	3,88/3,94		46,37	
740	Ile	7,90	3,85	2,16	64,30	37,34
741	Val	8,22	3,70	2,27	65,86	31,09
742	Leu	8,27	4,17	1,98/ 1,65	57,71	41,14
743	Ile	8,18	3,89	2,02	64,06	37,11
744	Gly	8,00	3,93/3,82		46,66	
745	Leu	8,18	4,26	1,73/ 1,89	57,16	41,33
746	Ala	8,10	4,11	1,59	54,98	16,64
747	Leu	8,26	4,12	1,42	57,33	40,91
748	Leu	7,84	4,29	1,95/ 1,87	57,51	41,43
749	Leu	8,16	4,18	1,78/ 1,96	57,69	40,96
750	Ile	8,34	3,81	2,04	64,53	37,32
751	Trp	8,34	4,37	3,47/ 3,56	60,29	28,00
752	Lys	8,27	3,82	2,01/ 2,10	59,25	31,47
753	Leu	8,15	4,14	1,88/ 1,42	57,67	40,93
754	Leu	8,62	4,08	1,37/ 2,03	57,64	40,87
755	Met	8,17	4,17	1,93/ 2,16	57,71	31,57
756	Ile	8,10	3,82	2,15	64,53	37,60
757	Ile	8,39	3,77	1,87	64,00	37,73
758	His	7,94	4,42	3,37/ 3,09	58,09	28,57
759	Asp	7,95	4,67	2,80/ 2,88	54,29	40,34
760	Arg	7,87	4,39	1,84/ 1,94	55,22	29,63
761	Arg	7,59	4,22	1,91/ 1,76	56,56	30,95

Tabelle A. 6 Statistik der berechneten Strukturen von APLP2, ErbB4, Fn14 und ITGB1. Ausgehend von einem Ensemble der 40 besten Strukturen mit den niedrigsten Energien, ausgehend von 400 berechneten Strukturen.

	APLP2	ErbB4	Fn14	ITGB1
Gesamtanzahl verwendeter Abstandsinformationen	374	331	300	462
eindeutige NOEs	312	292	273	462
Intraresidual	123	106	86	156
Sequentiell ($ i-j =1$)	90	90	98	130
Medium ($1 < i-j < 4$)	18	26	16	50
Lang ($ i-j \geq 4$)	0	0	0	0
Mehrdeutige NOEs	62	39	27	0
Torsionswinkel-Beschränkungen	50	54	56	101
<hr/>				
Statistik für die Strukturberechnung				
RMSD der Bindungen [Å]	0,001 +/- 0,00005	0,001 +/- 0,00007	0,001 +/- 0,00008	0,002 +/- 0,0001
RMSD der Bindungswinkel [°]	0,275 +/- 0,005	0,282 +/- 0,005	0,325 +/- 0,008	0,329 +/- 0,011
RMSD von unzulässigen Torsionen [°]	0,149 +/- 0,01	0,147 +/- 0,01	0,15 +/- 0,01	0,196 +/- 0,019
<hr/>				
Finale Energien [kcal mol⁻¹]				
E_{total}	-986,80 +/- 30,58	-990,99 +/- 30,52	-962,36 +/- 32,23	-1231,09 +/- 19,72
$E_{\text{Bindungen}}$	0,45 +/- 0,05	0,66 +/- 0,07	0,88 +/- 0,11	1,68 +/- 0,32
E_{Winkel}	10,45 +/- 0,36	11,91 +/- 0,54	16,30 +/- 0,84	17,4796 +/- 0,10
$E_{\text{Unzulässig}}$	0,75 +/- 0,16	0,97 +/- 0,24	1,04 +/- 0,20	1,46 +/- 0,21
E_{Dieder}	137,78 +/- 1,41	125,60 +/- 1,84	140,24 +/- 2,81	157,951 +/- 2,39
E_{VDW}	-234,65 +/- 2,71	-238,75 +/- 3,73	-257,97 +/- 3,62	-297,35 +/- 3,10
E_{NOE}	-901,59 +/- 30,45	-891,38 +/- 30,73	-862,85 +/- 32,45	-1112,31 +/- 19,44
<hr/>				
Koordinatengenauigkeit [Å]				
RMSD Rückgrat aller Reste	2,63 +/- 0,74	1,32 +/- 0,42	2,76 +/- 0,90	1,74 +/- 0,76
RMSD aller schweren Atome aller Reste	3,31 +/- 0,75	1,89 +/- 0,46	3,70 +/- 1,04	2,26 +/- 0,76
RMSD des Rückgrats der geordneten Reste	1,13 +/- 0,50	1,06 +/- 0,34	2,24 +/- 0,78	1,55 +/- 0,70
RMSD aller schweren Atome der geordneten Reste	1,37 +/- 0,46	1,46 +/- 0,39	2,90 +/- 0,88	1,87 +/- 0,69

Anhang

Tabelle A. 7 Chemische Verschiebungstabelle des APP WT ausgehend vom ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP (isotrop) und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektrum (anisotrop) sowie Daten des gequollenen Gels mit Streckfaktor.

	Isotope Spektren				Anisotope Spektren			
	Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]		Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]	
	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N
26 Ser	7,91	114,07	7,91	115,60	7,92	114,17	7,92	115,58
27 Asn	7,96	119,14	7,96	120,69	7,99	119,28	7,99	120,71
28 Lys	8,14	119,36	8,14	120,88	8,19	119,60	8,19	120,92
29 Gly	8,31	104,03	8,3	105,59	8,32	104,28	8,32	105,60
30 Ala	7,77	122,43	7,77	123,96	7,78	122,64	7,78	124,00
31 Ile	7,63	116,28	7,63	117,81	7,66	116,54	7,66	117,82
32 Ile	7,96	119,14	7,96	120,69	7,99	119,28	7,99	120,71
33 Gly	8,01	104,39	8,01	105,95	8,02	104,72	8,02	105,98
34 Leu	7,96	121,41	7,96	122,94	7,97	121,62	7,97	122,85
35 Met	8,31	119,02	8,30	120,55	8,29	119,16	8,29	120,46
36 Val	8,71	118,21	8,71	119,75	8,71	118,23	8,71	119,61
37 Gly	8,21	105,56	8,21	107,15	8,22	105,83	8,22	107,11
38 Gly	7,94	105,08	7,94	106,64	7,95	105,42	7,95	106,67
39 Val	7,78	121,03	7,78	122,57	7,79	121,20	7,79	122,46
40 Val	8,27	122,86	8,27	124,4	8,28	123,06	8,28	124,31
41 Ile	8,24	117,79	8,24	119,33	8,23	118,30	8,23	119,26
42 Ala	7,96	119,14	7,96	120,69	7,99	119,28	7,99	120,71
43 Thr	7,99	111,73	7,99	113,26	7,99	112,03	7,99	113,23
44 Val	8,33	120,46	8,33	121,97	8,33	120,52	8,33	121,89
45 Ile	8,54	122,73	8,54	124,26	8,54	122,95	8,54	124,17
46 Val	8,31	119,02	8,30	120,55	8,29	119,16	8,29	120,46
47 Ile	8,62	117,36	8,62	118,90	8,62	117,19	8,62	118,76
48 Thr	8,22	115,08	8,22	116,61	8,22	115,34	8,22	116,55
49 Leu	8,54	120,52	8,54	122,06	8,53	120,61	8,53	122,00
50 Val	8,62	118,72	8,62	120,25	8,62	118,83	8,62	120,11
51 Met	8,58	117,59	8,58	119,14	8,57	117,51	8,57	118,97
52 Leu	8,41	118,20	8,41	119,71	8,40	118,39	8,40	119,59

14 % Gel:			
	Masse [mg]	Länge [cm]	Durchmesser [cm]
Gel nach Polymerisation	125,25	2,03	0,25
nach trocknen	19,03	1,13	0,16
nach quellen	496,00	3,05	0,42
in Tube		4,71	

gestreckt um 1,66 cm → Faktor 1,54

Anhang

Tabelle A. 8 Chemische Verschiebungstabelle der G38P Mutante ausgehend vom ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP (isotrop) und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektrum (anisotrop) sowie Daten des gequollenen Gels mit Streckfaktor.

	Isotrope Spektren				Anisotrope Spektren			
	Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]		Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]	
	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N
26 Ser	7,89	114,01	7,89	115,55	7,89	114,07	7,89	115,52
27 Asn	7,94	119,06	7,94	120,60	7,96	119,11	7,96	120,61
28 Lys	8,12	119,38	8,12	120,92	8,16	119,42	8,16	120,89
29 Gly	8,28	104,08	8,28	105,63	8,29	104,22	8,29	105,67
30 Ala	7,74	122,26	7,74	123,80	7,75	122,45	7,75	123,83
31 Ile	7,61	116,07	7,61	117,60	7,62	116,20	7,62	117,63
32 Ile	7,94	119,06	7,94	120,60	7,96	119,11	7,96	120,61
33 Gly	7,99	104,72	7,99	106,27	8,01	104,94	8,00	106,36
34 Leu	7,85	119,50	7,85	121,05	7,85	119,58	7,85	120,98
35 Met	8,00	117,07	8,00	118,60	8,02	117,20	8,02	118,58
36 Val	8,22	113,49	8,22	115,01	8,21	113,50	8,21	114,93
37 Gly	7,98	107,64	7,98	109,19	7,97	107,90	7,97	109,21
38 Pro								
39 Val	7,45	115,12	7,45	116,63	7,45	115,31	7,45	116,62
40 Val	8,07	123,04	8,06	124,57	8,05	123,05	8,05	124,41
41 Ile	8,20	117,74	8,20	119,25	8,17	117,96	8,17	119,20
42 Ala	7,94	119,06	7,94	120,60	7,96	119,11	7,96	120,61
43 Thr	7,90	111,58	7,90	113,12	7,88	111,76	7,88	113,07
44 Val	8,30	120,28	8,30	121,82	8,29	120,36	8,29	121,75
45 Ile	8,49	122,73	8,49	124,29	8,48	122,84	8,48	124,20
46 Val	8,30	119,03	8,30	120,58	8,27	119,02	8,27	120,44
47 Ile	8,61	117,30	8,61	118,84	8,61	116,97	8,61	118,51
48 Thr	8,20	115,06	8,20	116,60	8,18	115,14	8,18	116,52
49 Leu	8,53	120,46	8,53	122,02	8,48	120,59	8,48	121,97
50 Val	8,62	118,74	8,62	120,28	8,59	118,72	8,59	120,10
51 Met	8,58	117,56	8,58	119,13	8,56	117,42	8,56	118,87
52 Leu	8,40	118,18	8,40	119,64	8,37	118,14	8,37	119,57

14 % Gel:			
	Masse [mg]	Länge [cm]	Durchmesser [cm]
Gel nach Polymerisation	126,47	2,14	0,23
nach trocknen	19,42	1,12	0,15
nach quellen	478,60	2,92	0,34
in Tube		4,63	

gestreckt um 1,71 cm → Faktor 1,59

Anhang

Tabelle A. 9 Chemische Verschiebungstabelle der G38L Mutante ausgehend vom ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP (isotrop) und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektrum (anisotrop) sowie Daten des gequollenen Gels mit Streckfaktor.

	Isotope Spektren				Anisotope Spektren			
	Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]		Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]	
	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N
26 Ser	7,88	113,99	7,88	115,53	7,87	114,00	7,87	115,44
27 Asn	7,99	118,88	7,99	120,45	8,02	118,94	8,02	120,44
28 Lys	8,14	119,28	8,14	120,83	8,17	119,53	8,17	120,86
29 Gly	8,32	104,12	8,32	105,67	8,33	104,34	8,33	105,72
30 Ala	7,75	122,21	7,75	123,77	7,76	122,48	7,76	123,77
31 Ile	7,60	116,34	7,60	117,87	7,62	116,61	7,62	117,86
32 Ile	7,94	119,32	7,94	120,86	7,95	119,58	7,95	120,80
33 Gly	7,95	103,75	7,95	105,31	7,95	104,12	7,95	105,34
34 Leu	7,84	121,89	7,84	123,45	7,83	122,08	7,83	123,30
35 Met	8,18	117,33	8,18	118,88	8,18	117,53	8,18	118,78
36 Val	8,53	117,31	8,53	118,85	8,52	117,52	8,52	118,80
37 Gly	7,91	104,78	7,91	106,34	7,89	105,03	7,90	106,32
38 Leu	7,99	118,94	7,99	120,51	8,02	118,94	8,02	120,44
39 Val	7,90	118,47	7,90	120,03	7,89	118,64	7,89	119,90
40 Val	8,44	122,79	8,44	124,34	8,43	122,95	8,43	124,19
41 Ile	8,28	118,38	8,28	119,88	8,23	118,53	8,23	119,78
42 Ala	8,26	119,35	8,26	120,90	8,26	119,53	8,26	120,87
43 Thr	8,03	111,99	8,03	113,52	8,02	112,20	8,02	113,46
44 Val	8,38	120,57	8,38	122,10	8,35	120,74	8,35	121,99
45 Ile	8,57	122,76	8,57	124,32	8,54	122,97	8,54	124,18
46 Val	8,26	118,97	8,27	120,51	8,24	118,96	8,24	120,37
47 Ile	8,62	117,39	8,62	118,93	8,59	117,62	8,59	119,14
48 Thr	8,22	115,08	8,23	116,61	8,20	115,20	8,20	116,46
49 Leu	8,52	120,48	8,52	122,04	8,47	120,72	8,47	121,92
50 Val	8,62	118,73	8,62	120,26	8,59	118,76	8,59	120,04
51 Met	8,58	117,60	8,57	119,14				
52 Leu	8,41	118,13	8,41	119,68	8,37	118,05	8,37	119,43

14 % Gel:			
	Masse [mg]	Länge [cm]	Durchmesser [cm]
Gel nach Polymerisation	114,03	1,78	0,27
nach trocknen	16,67	0,97	0,15
nach quellen	479,00	2,70	0,40
in Tube		4,33	

gestreckt um 1,63 cm → Faktor 1,60

Anhang

Tabelle A. 10 Chemische Verschiebungstabelle der I45T Mutante ausgehend ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP (isotrop) und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektrum (anisotrop) sowie Daten des gequollenen Gels mit Streckfaktor.

	Isotrope Spektren				Anisotrope Spektren			
	Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]		Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]	
	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N
26 Ser	7,9	114,08	7,9	115,61	7,89	113,98	7,89	115,44
27 Asn	7,94	119,14	7,95	120,69	7,99	119,17	7,99	120,62
28 Lys	8,13	119,28	8,13	120,82	8,17	119,48	8,17	120,8
29 Gly	8,28	103,95	8,29	105,51	8,31	104,15	8,31	105,52
30 Ala	7,76	122,38	7,76	123,93	7,76	122,52	7,76	123,93
31 Ile	7,62	116,23	7,62	117,76	7,63	116,49	7,63	117,76
32 Ile	8,02	118,83	8,02	120,36	7,99	119,38	7,99	120,62
33 Gly	7,99	104,3	7,99	105,87	7,98	104,55	7,99	105,92
34 Leu	7,98	121,56	7,98	123,09	7,95	121,61	7,95	122,89
35 Met	8,32	119,05	8,32	120,62	8,27	119,08	8,27	120,45
36 Val	8,74	118,43	8,74	119,99	8,71	118,58	8,71	119,73
37 Gly	8,21	105,4	8,21	107,02	8,21	105,85	8,21	107,03
38 Gly	7,94	105,25	7,94	106,83	7,94	105,68	7,94	106,87
39 Val	7,82	121,47	7,82	123,03	7,81	121,47	7,82	122,82
40 Val	8,41	123,91	8,41	125,46	8,4	124,42	8,4	125,5
41 Ile								
42 Ala	8,34	123,31	8,34	124,85	8,39	123,83	8,39	125,18
43 Thr	8,21	113,45	8,21	114,99			8,18	114,86
44 Val	8,78	118,65	8,78	120,22	8,75	118,82	8,75	120,1
45 Thr	8,32	118,75	8,32	120,29	8,32	118,79	8,32	120,16
46 Val	8,24	120,88	8,24	122,42	8,2	120,95	8,2	122,32
47 Ile	8,45	117,04	8,45	118,56	8,48	117,61	8,48	118,83
48 Thr	8,14	114,42	8,14	115,96	8,11	114,67	8,11	115,78
49 Leu	8,3	120,44	8,3	121,96	8,26	120,11	8,26	121,66
50 Val	8,58	118,44	8,58	119,99	8,55	117,94	8,55	119,58
51 Met	8,54	117,63	8,54	119,15	8,6	117,53	8,6	119,04
52 Leu	8,41	118,06	8,41	119,65	8,37	118,03	8,37	119,42

14 % Gel:			
	Masse [mg]	Länge [cm]	Durchmesser [cm]
Gel nach Polymerisation	118,55	2,12	0,25
nach trocknen	20,63	1,23	0,15
nach quellen	605,00	3,44	0,42
in Tube		5,73	

gestreckt um 2,29 cm → Faktor 1,67

Anhang

Tabelle A. 11 Chemische Verschiebungstabelle der V44M Mutante ausgehend vom ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP (isotrop) und ^1H - ^{15}N -HSQC-IPAP-Spektrum (anisotrop) sowie Daten des gequollenen Gels mit Streckfaktor.

	Isotope Spektren				Anisotope Spektren			
	Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]		Addiert [ppm]		Subtrahiert [ppm]	
	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N
26 Ser	7,87	113,97	7,87	115,5	7,88	114,03	7,88	115,48
27 Asn	8,03	118,63	8,03	120,17	8,05	118,85	8,05	120,32
28 Lys	8,15	119,25	8,15	120,79	8,18	119,52	8,18	120,78
29 Gly	8,34	104,05	8,34	105,61	8,34	104,31	8,34	105,64
30 Ala	7,74	122,31	7,74	123,87	7,75	122,55	7,75	123,87
31 Ile	7,6	116,21	7,6	117,74	7,62	116,42	7,62	117,72
32 Ile	7,98	119,21	7,98	120,74	7,99	119,41	7,99	120,71
33 Gly	7,98	104,36	7,98	105,92	7,99	104,69	7,99	105,95
34 Leu	7,95	121,38	7,95	122,93	7,93	121,51	7,93	122,8
35 Met	8,23	119,27	8,23	120,84	8,22	119,12	8,22	120,49
36 Val	8,71	118,24	8,71	119,78	8,68	118,27	8,68	119,54
37 Gly	8,21	105,58	8,21	107,14	8,2	105,9	8,2	107,14
38 Gly	7,93	105,09	7,93	106,65	7,93	105,43	7,94	106,71
39 Val	7,8	121,31	7,8	122,91	7,86	121,54	7,86	123
40 Val	8,31	123,33	8,31	124,87	8,28	123,42	8,28	124,7
41 Ile	8,28	118,65	8,28	120,28	8,28	118,92	8,28	120,26
42 Ala	8,06	119,41	8,06	120,95	8,06	119,57	8,06	120,82
43 Thr	8,11	111,64	8,11	113,14	8,08	111,84	8,08	113,07
44 Met	8,3	119,16	8,3	120,68	8,29	119,18	8,29	120,52
45 Ile	8,54	122,47	8,54	124,04	8,52	122,59	8,52	123,86
46 Val								
47 Ile	8,6	116,94	8,6	118,48	8,55	116,92	8,55	118,42
48 Thr	8,01	115,07	8,01	116,59	7,98	115,29	7,98	116,44
49 Leu	8,49	120,44	8,49	121,99	8,45	120,58	8,45	121,88
50 Val	8,62	118,68	8,62	120,22	8,62	118,76	8,62	120,25
51 Met	8,54	117,58	8,54	119,13	8,58	117,63	8,58	119,16
52 Leu	8,4	118,11	8,4	119,65	8,34	118,22	8,34	119,45

14 % Gel:

	Masse [mg]	Länge [cm]	Durchmesser [cm]
Gel nach Polymerisation	113,00	1,74	0,26
nach trocknen	16,71	0,95	0,16
nach quellen	471,50	2,60	0,37
in Tube		4,48	

gestreckt um 1,88 cm → Faktor 1,72

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei PD Dr. Claudia Muhle-Goll sowie Prof. Dr. Burkhard Luy für die langjährige Unterstützung meiner Forschung. Dabei gilt PD Dr. Claudia Muhle-Goll mein besonderer Dank für die Hilfestellungen und Ratschläge während meiner Zeit am IBG-4.

Der gesamten Forschergruppe FOR 2290 Danke ich für die herzliche Aufnahme sowie für die schönen Konferenzen und wunderbare Gespräche.

Mein Dank geht weiterhin an das IBG-1, insbesondere an Prof. Dr. Christof Niemeyer, Dr. Kersten Rabe sowie Julian Hertel, für die Nutzung der Labore und die großen Hilfestellungen bei jeglichen Problemen.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Sergiy Afonin für die Unterstützung bei der Fluoreszenzpolarisation sowie der Massenspektroskopischen Untersuchung und den netten Gesprächen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem gesamten IBG-4 Team bedanken, welches für viele schöne Erinnerungen und unterhaltsame Mittagspausen gesorgt hat. Bedanken möchte ich mich hierbei insbesondere bei Dr. Mara Silber, welche mich während meiner Bachelor- und Masterarbeit tatkräftig unterstützt und gefördert hat sowie bei Dr. Hannah Soergel, welche mich unter anderem einiges in Sachen Kochen gelehrt hat. Auch gilt mein Dank Fabian Hoffmann, welcher mich zuletzt in einem Büro ertragen musste. Franziska Krause, Julia Flum sowie Yannik Woordes danke ich für die weitreichende Unterstützung im Labor und viele schöne Gespräche.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, Barbara und Ralf Moser, welche immer an mich geglaubt und mir den Rücken gestärkt haben, in allen noch so schweren Lebenssituationen. Ihr wart und seid mein Fels in der Brandung. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei meinem Lebensgefährten bedanken, welcher immer für mich da ist, wie anstrengend und nervenaufreibend das auch sein mag.