

Charakterisierung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Maike Breiden

Aus Neuss

Juni 2014

Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Kaiser

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2014

Teile dieser Arbeit sind in folgender Veröffentlichung enthalten:

Tiaden, A. N., M. Breiden, A. Mirsaidi, F. A. Weber, G. Bahrenberg, S. Glanz, P. Cinelli, M. Ehrmann and P. J. Richards, 2012: Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein. *Stem Cells*, **30**, 2271-2282.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungsverzeichnis.....	12
1. Einleitung	14
1.1. Proteinqualitätskontrolle	14
1.2. Proteasen	16
1.3. HTRA Proteasen	17
1.4. Humane HTRA Proteasen.....	19
1.5. Calpain Proteasen.....	23
1.5.1. Struktur, Aktivierung und Inhibierung der klassischen Calpaine 1 und 2	23
1.5.2. Die Funktionen der klassischen Calpaine 1 und 2	25
1.6. Zielsetzung	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Material	29
2.1.1. Nährmedien und Antibiotika.....	29
2.1.2. Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	29
2.1.3. Vektoren und Plasmide	30
2.1.4. Oligonukleotide.....	32
2.1.5. Antikörper	33
2.1.6. Proteine	35
2.1.7. Protein- und Nukleinsäurestandards	35
2.1.8. Komplettsysteme.....	36
2.1.9. Chemikalien	36
2.1.10. Verbrauchsmaterialien	36
2.1.11. Geräte.....	37
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.1. Polymerase Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.2. Oligomutagenese.....	39
2.2.3. Restriktionsverdau und Ligation.....	39
2.2.4. Kultivierung von <i>E. coli</i> und Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	40
2.2.5. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	40
2.2.6. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	41

2.2.7.	Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i>	41
2.2.8.	Isolierung von RNA	41
2.2.9.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	41
2.2.10.	cDNA Synthese	41
2.2.11.	Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)	42
2.3.	Proteinbiochemische Methoden	43
2.3.1.	Allgemeine Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	43
2.3.2.	Präparativer Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	44
2.3.3.	Reinigung von Calpain 2 aus <i>E. coli</i>	44
2.3.4.	Reinigung von HTRA1 aus Rosetta 2 (DE3)	46
2.3.5.	Reinigung von Tau Proteinen aus Rosetta 2 (DE3)	48
2.3.6.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	50
2.3.7.	SDS-PAGE	50
2.3.8.	Coomassie-Blau Färbung	51
2.3.9.	Silberfärbung	51
2.3.10.	Western Blot und Immundetektion	52
2.3.11.	Proteolyse von pNA gekoppelten Peptiden zur Aktivitätsbestimmung	54
2.3.12.	Proteolyse von AMC gekoppelten Peptiden zur Aktivitätsbestimmung	54
2.3.13.	Proteolyse von Tau zur Aktivitätsbestimmung	55
2.3.14.	<i>In vitro</i> Pulldown-Assay über magnetische <i>Beads</i>	56
2.3.15.	Analytische Größenausschlusschromatographie	56
2.3.16.	Heparin-induzierte Fibrillenbildung von Tau	57
2.3.17.	Acetonfällung	57
2.3.18.	AFM	57
2.3.19.	Massenspektrometrie	58
2.3.20.	Transmissionselektronenmikroskopie	59
2.3.21.	MALS-SEC	59
2.4.	Zellbiologische Methoden	60
2.4.1.	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	60
2.4.2.	Auftauen und Passagieren von eukaryontischen Zelllinien	60
2.4.3.	Herstellung von cytoplasmatischen Proteinlysaten	61
2.4.4.	Kryokonservierung eukaryontischer Zelllinien	61
2.4.5.	Transfektion von eukaryontischen Zellen mit dem Lonza Transfektionsreagenz	62

2.4.6. Immunfluoreszenzfärbungen.....	62
2.4.7. Konfokale Lasermikroskopie	63
3. Ergebnisse	64
3.1. Etablierung der Reinigung von rekombinantem Calpain 2.....	64
3.2. Reinigung von rekombinantem humanem HTRA1	71
3.3. Reinigung von rekombinantem humanem Tau Protein.....	76
3.4. Analyse der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 mittels <i>in vitro</i> Pulldown-Assay	78
3.5. Untersuchungen des HTRA1-Calpain 2 Komplexes	80
3.5.1. Analyse der Interaktion HTRA1 und Calpain 2 mit Hilfe von analytischer Größenausschlusschromatographie.....	80
3.5.2. Analyse der molekularen Masse des HTRA1-Calpain 2 Komplexes mit Hilfe von MALS-SEC	87
3.5.3. Untersuchung der Struktur des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes mittels Transmissionselektronenmikroskopie.....	89
3.6. Charakterisierung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 mittels Aktivitätsassays	90
3.6.1. pNA Aktivitätsassays	90
3.6.2. Proteolyse von löslichem Tau	92
3.6.3. Proteolyse von fibrillärem Tau.....	97
3.7. <i>In vivo</i> Untersuchungen zur Interaktion von HTRA1 und Calpain 2.....	102
3.7.1. qRT-PCR und Western Blot Analyse der verwendeten Zelllinien	102
3.7.2. Analyse der zellulären Lokalisation von HTRA1 und Calpain 2	105
3.7.3. Untersuchung der Kolokalisation von HTRA1 und Calpain 2 <i>in vivo</i>	107
4. Diskussion	109
4.1. HTRA1 und Calpain 2 zeigen gegensätzliche Auswirkungen in neurodegenerativen Erkrankungen	109
4.2. HTRA1 und Calpain 2 zeigen eine Interaktion <i>in vitro</i>	110
4.3. HTRA1 und Calpain 2 bilden einen Proteasenkomples <i>in vitro</i>	111
4.3.1. Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex lässt sich mittels analytischer Größenausschlusschromatographie nachweisen	111
4.3.2. Die PDZ-Domäne von HTRA1 ist essentiell für die Bildung des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes	112

4.3.3. Der Proteasenkomples aus HTRA1 und Calpain 2 hat eine molekulare Masse von 535 kDa und ist stabil.....	112
4.3.4. Eine Kolokalisation von HTRA1 und Calpain 2 ist <i>in vivo</i> möglich.....	115
4.4. Calpain 2 aktiviert HTRA1	116
4.4.1. Die Proteolyse von pNA-gekoppelten Peptiden wird deutlich beschleunigt....	116
4.4.2. Vorinkubation von Calpain 2 und HTRA1 beschleunigen die Proteolyse von Tau	117
4.4.3. Tau Fibrillen werden vom HTRA1 – Calpain 2 Komplex schneller proteolysiert	118
4.5. Eine mögliche physiologische Rolle für den HTRA1 – Calpain 2 Komplex	120
5. Ausblick	122
6. Zusammenfassung.....	124
6.1. Zusammenfassung.....	124
6.2. Summary	126
7. Literatur	128
8. Anhang	145
9. Danksagung.....	158
10. Eidesstattliche Erklärung.....	160
11. Lebenslauf.....	161

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.3.1: Domänenorganisation der HTRA Proteasen	17
Abb. 1.4.1: Funktionen von HTRA1	21
Abb. 1.5.1: Domänenorganisation von Calpain 1 und 2 und ihre Aktivierung.....	24
Abb. 3.1.1: SDS-PAGE Analyse der Expression von Calpain 2 in <i>E. coli</i> BL21.....	64
Abb. 3.1.2: Elutionsprofil Ni-NTA Calpain 2 Reinigung	65
Abb. 3.1.3: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse der Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	66
Abb. 3.1.4: Elutionsprofil der Calpain 2 Größenausschlusschromatographie	67
Abb. 3.1.5: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse der Größenausschlusschromatographie von Calpain 2	67
Abb. 3.1.6: Silberfärbung und Western Blot von gereinigtem Calpain 2	68
Abb. 3.1.7: MALS-SEC von gereinigtem Calpain 2.....	69
Abb. 3.1.8: Calpain 2 Aktivität in Abhängigkeit der Calciumkonzentration.....	70
Abb. 3.1.9: Calpain 2 Aktivität nach Lagerung bei 4°C	70
Abb. 3.2.1: Expression von HTRA1	71
Abb. 3.2.2: Affinitätschromatographische Reinigung von HTRA1.....	72
Abb. 3.2.3: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse der Affinitätschromatographie von HTRA1	72
Abb. 3.2.4: Größenausschlusschromatographie von HTRA1	73
Abb. 3.2.5: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrilamid-Gel der Größenausschlusschromatographie.....	74
Abb. 3.2.6: SDS-PAGE Analyse von HTRA1: Western Blot und Silberfärbung	74
Abb. 3.2.7: MALS-SEC Analyse von gereinigtem HTRA1	75
Abb. 3.2.8: Pufferscreen pNA Assay HTRA1	76
Abb. 3.3.1: Expression und Reinigung von Tau 4R.....	77
Abb. 3.3.2: Expression und Reinigung von Tau F3	78
Abb. 3.4.1: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse des HTRA1-Calpain 2 Pulldown- Assays.....	79
Abb. 3.4.2: Western Blot Analyse des HTRA1-Calpain 2 Pulldown-Assays.....	79
Abb. 3.4.3: Strep-Tactin Kontrollen von Calpain 2-His ₆ und HTRA1-StrepII.....	80
Abb. 3.5.1: Analytische Größenausschlusschromatographie in SEC Hepes Puffer	81
Abb. 3.5.2: Silber gefärbte SDS-PAGE Analyse der analytischen Größenausschlusschromatographie	82

Abb. 3.5.3: Western Blot Analyse der Komplexfraktion.....	83
Abb. 3.5.4: Test verschiedener Pufferbedingungen in der analytischen Größenausschlusschromatographie.....	84
Abb. 3.5.5: Silber gefärbte SDS-PAGE Analyse des Puffertests.....	84
Abb. 3.5.6: Analytische Größenausschlusschromatographie in Bicin.....	85
Abb. 3.5.7: Silber gefärbte SDS-PAGE der analytischen Größenausschlusschromatographie in Bicin.....	86
Abb. 3.5.8: Western Blot Analyse der Komplexfraktion zur Bestimmung der Stöchiometrie	87
Abb. 3.5.9: MALS-SEC Analyse des HTRA1-Calpain 2 Komplexes.....	88
Abb. 3.5.10: Größenausschlusschromatographie für TEM Aufnahmen.....	89
Abb. 3.5.11: TEM Aufnahmen des HTRA1-Calpain 2 Komplexes.....	90
Abb. 3.6.1: pNA-Aktivitätsassays HTRA1 mit Calpain 2.....	91
Abb. 3.6.2: AMC-Aktivitätsassay Calpain 2 mit HTRA1.....	92
Abb. 3.6.3: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 zusammen mit inaktivem Calpain 2 (CA).....	93
Abb. 3.6.4: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 Δ PDZ zusammen mit inaktivem Calpain 2 (CA).....	94
Abb. 3.6.5: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 zusammen mit aktivem Calpain 2	95
Abb. 3.6.6: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 Δ PDZ zusammen mit aktivem Calpain 2.....	96
Abb. 3.6.7: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Bildung von Tau Fibrillen durch Zugabe von Heparin.....	98
Abb. 3.6.8: ThT Fluoreszenz der Bildung von Tau Fibrillen durch Zugabe von Heparin.....	98
Abb. 3.6.9: AFM Aufnahmen der Tau Fibrillen.....	99
Abb. 3.6.10: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des Tau 4R Fibrillen Verdaus.....	100
Abb. 3.6.11: Vergleich der Anzahl der Schnittstellen von HTRA1, Calpain 2 und dem HTRA1 – Calpain 2 Komplex in Tau Fibrillen.....	101
Abb. 3.7.1: qRT-PCR von SH-SY5Y parental, SH-SY5Y_HTRA1OE und HeLa.....	103
Abb. 3.7.2: qRT-PCR der stabil HTRA1 überexprimierenden SH-SY5Y Klone.....	104
Abb. 3.7.3: Western Blot Analyse der Expression von HTRA1 und Calpain 2.....	104
Abb. 3.7.4: Immunfluoreszenzfärbung SH-SY5Y mit HTRA1 und Calpain 2 Antikörpern.	105
Abb. 3.7.5: Immunfluoreszenzfärbung von HTRA1 und α -Tubulin in SH-SY5Y_HTRA1OE	106

Abb. 3.7.6: Kolokalisation von HTRA1 und Calpain 2 in Immunfluoreszenzfärbungen.....	107
Abb. 4.1.1: Position des C-Terminus von Calpain 2.....	110
Abb. 4.3.1: Modell eines möglichen HTRA1 – Calpain 2 Komplexes.....	114
Abb. 4.3.2: Modell eines möglichen HTRA1 – Calpain 2 Komplexes mit Längenangaben in nm.....	115
Abb. 4.4.1: Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 aktiviert HTRA1	118

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Antibiotika	29
Tab. 2.2: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	30
Tab. 2.3: Eukaryontische Zelllinien	30
Tab. 2.4: Vektoren.....	30
Tab. 2.5: Plasmide.....	30
Tab. 2.6: Oligonukleotide.....	32
Tab. 2.7: Primärantikörper	33
Tab. 2.8: Sekundärantikörper	34
Tab. 2.9: Enzyme und Peptide	35
Tab. 2.10: Protein- und Nukleinsäurestandards	35
Tab. 2.11: Komplettsysteme.....	36
Tab. 2.12: Polyacrylamid–Gele für die SDS-PAGE.....	51
Tab. 2.13: Primärantikörper Western Blot.....	54
Tab. 2.14: Zellkultur Medien	60
Tab. 2.15: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.....	63
Tab. 3.1: Getestete Puffer für den pNA Assay von HTRA1	75
Tab. 3.2: Pufferbedingungen für die analytische Größenausschlusschromatographie	83
Tab. 3.3: Pearsons und Manders Koeffizienten der Kollokalisierung von HTRA1 und Calpain 2	108
Tab. 4.1: Aktivierung von HTRA1 durch Calpain 2.....	119
Tab. 8.1: Massenspektrometrische Analyse der Proteolyseprodukte von Tau 4R.....	145
Tab. 8.2: Massenspektrometrische Analyse der Proteolyseprodukte von Tau F3	155

Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren werden entsprechend der IUPAC-Nomenklatur im Ein- oder Dreibuchstabencode angegeben.

%	Prozent
°C	Grad Celcius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer'sche Erkrankung (<i>alzheimer's disease</i>)
AFM	<i>Atomic force microscope</i> (Rasterkraftmikroskop)
AICD	<i>amyloid precursor intracellular domain</i>
AMC	Amido-4-Methylcoumarin
AP	Alkalische Phosphatase
APP	<i>β-amyloid precursor protein</i>
Aβ	Amyloid β-Protein
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
C2L	<i>C2 like domain</i>
CamIIα	Calcium/Calmodulin Kinase Iia
CAPN1	Calpain 1
CAPN2	Calpain 2
CAPNS1	<i>Calpain small subunit 1</i>
Cdk5	<i>Cyclin dependent kinase 5</i>
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CysPc	<i>Calpain like protease domain</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Erk1/2	<i>Extracellular regulated kinase 1/2</i>
FA	Formaldehyd
FCS	Fötales Kälberserum
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HAX1	<i>HCLS1-associated XI protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horse-radish peroxidase</i>)
HTRA	<i>high temperature requirement A</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
KI	<i>Kazal protease inhibitor</i>
M	Mol
MALS-SEC	<i>Multi-angle light scattering with size exclusion chromatography</i>
mg	Milligramm
mM	Millimolar
MMP	Magermilchpulver
NaCl	Natriumchlorid
NFT	Neurofibrilläre Bündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitrolessigsäure
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NZA	NZ-Amin
OD	Optische Dichte
PARL	<i>presenilin-associated rhomboid-like protease</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	PDS95/SAP90, Discs large, Zonula occludentes-1
PEF	<i>penta-EF-hand</i>
PKC	Protein Kinase C
pNA	para-Nitroanilin
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR (<i>quantitative real time PCR</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide electrophoresis</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>Size exclusion chromatography</i>)
SS	Signalsequenz
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl Leu-Leu-Val-Tyr-7 Amido-4-Methylcoumarin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCS2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor-β</i>
ThT	Thioflavin T
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

Abkürzungsverzeichnis

v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1. Einleitung

1.1. Proteinqualitätskontrolle

Proteine sind die wichtigsten Bestandteile einer Vielfalt von biologischen Prozessen wie beispielweise Transport, Katalyse spezifischer Reaktionen oder Membranfusion (Berg *et al.*, 2012). Im Cytosol eukaryontischer Zellen herrscht eine Proteinkonzentration von 50 bis 300 mg/ml (Asherie, 2004, Finka & Goloubinoff, 2013). Um zu gewährleisten, dass diese Proteine nicht aggregieren und somit zu einem Absterben der Zelle führen, gibt es zahlreiche Kontrollmechanismen bestehend aus Chaperonen und Proteasen. Eine erste Kontrolle der korrekten Proteinfaltung setzt bereits bei der Translation der mRNA am Ribosom ein (Bartlett & Radford, 2009). Mit Hilfe von zahlreichen zusätzlichen Proteinen, die der Qualitätskontrolle am Ribosom dienen, wird lediglich eine von 10.000 Aminosäuren fehlerhaft in die Polypeptidkette eingebaut (Zaher & Green, 2009). Mutationen, die dazu führen, dass vermehrt falsche Aminosäuren eingebaut werden, resultieren beispielsweise in neurodegenerativen Erkrankungen (Chu *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2006). Chaperone können an hydrophobe Bereiche von Proteinen, die sich in einem partiell- oder ungefaltetem Zustand befinden, binden und so deren Faltung erleichtern (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Chaperone helfen Proteine co- oder posttranslational zu falten und so den energetisch günstigeren Zustand der Aggregation zu verhindern (Amm *et al.*, 2014). Zusätzlich sind beispielsweise Chaperone der Familie Hsp70 dazu in der Lage schon gebildete Aggregate mit Hilfe ihrer Co-Chaperone aufzulösen (Doyle *et al.*, 2013).

Ein weiterer Punkt in der Proteinqualitätskontrolle ist der regulatorische Abbau. Proteine weisen in der Zelle eine sehr unterschiedliche Halbwertszeit auf. Beispielsweise besitzt Kollagen eine Halbwertszeit von mehreren Jahren bis Jahrzehnten (Verzijl *et al.*, 2000), dagegen wird das Protein HIF-1 α nach wenigen Minuten durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Salceda & Caro, 1997). Um diese Protein-Homöostase aufrecht zu erhalten sind zusätzlich zum Chaperonsystem verschiedene Proteindegradationssysteme notwendig. Die wichtigsten Systeme zur Entfernung von Proteinen sind das Ubiquitin-Proteasom-System und die lysosomale Proteolyse (Amm *et al.*, 2014). Im Ubiquitin-Proteasom-System wird das abzubauen Protein durch Ubiquitin, einem Polypeptid aus 76 Aminosäuren, mit Hilfe von drei Enzymen markiert. Dabei wird Ubiquitin zunächst unter ATP Verbrauch durch das ubiquitinaktivierende Enzym E1 aktiviert, an das ubiquitinkonjugierende Enzym E2 gebunden und schließlich mittels der Ubiquitin-Protein-Ligase E3 an das Zielprotein gebunden. Ein Protein, das mit einem oder einer Kette aus

Ubiquitin markiert worden ist, kann durch das Proteasom erkannt und abgebaut werden (Wolf & Hilt, 2004). Intrazelluläre Proteine, die über das Lysosom entfernt werden sollen, werden zunächst durch verschiedene Autophagiesysteme und extrazelluläre Proteine über Endocytose in die Lysosomen aufgenommen (Appelqvist *et al.*, 2013). Lysosomen sind Zellorganellen, die im Inneren einen sauren pH Wert aufweisen (pH 4,5 – 5) und über 60 verschiedene Proteasen zur Degradation der aufgenommenen Proteine enthalten (Bainton, 1981, Ohkuma & Poole, 1978, Coffey & De Duve, 1968). Die Endprodukte des lysosomalen Abbaus der Proteine werden mittels Diffusion oder aktivem Transport über die Lysosomenmembran wieder der Proteinbiosynthese zur Verfügung gestellt (Lloyd, 1996).

Beispiele für eine Erkrankungen in denen die Proteinqualitätskontrolle fehlgefaltete Proteine unzureichend entfernt, sind neurodegenerative Erkrankungen, die eine erhöhte Konzentration von Proteinaggregaten aufweisen (Caughey & Lansbury, 2003). Diese Proteinaggregate sind oft ubiquitiniliert und mit Chaperonen assoziiert, was darauf schließen lässt, dass die Aggregate durch die Proteinqualitätskontrolle entfernt werden sollten, dieser Prozess allerdings ausgeblieben ist (Hol & Scheper, 2008). Ein Beispiel für eine neurodegenerative Erkrankung, die mit Proteinaggregaten einhergeht, ist die Alzheimer'sche Erkrankung (AD, *alzheimer's disease*). AD äußert sich durch fortschreitende Demenz aufgrund des Verlusts von Neuronen. Das Absterben der Neuronen wird zum einen durch neurofibrilläre Bündel (NFT, *neurofibrillary tangles*), die aus dem Mikrotubuli assoziierten Protein Tau bestehen, verursacht. Zum anderen spielen senile Plaques, bestehend aus Aggregaten von Amyloid β (A β), eine Rolle (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986, Selkoe, 1989). Gehirnbereiche, die von AD betroffen sind, zeigen eine niedrige Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems, was darauf hindeutet, dass die Proteinqualitätskontrolle beeinträchtigt ist (Keller *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Chaperone mit NFTs und senilen Plaques assoziiert sind (Hamos *et al.*, 1991, Wilhelmus *et al.*, 2006a, Wilhelmus *et al.*, 2006c). Beispielsweise konnte für das Chaperon HspB8 nachgewiesen werden, dass es die Aggregation von A β verhindern kann (Wilhelmus *et al.*, 2006b). Aus diesem Grund ist die Untersuchung von Chaperonen oder Proteasen, die eine Aggregation von Tau bzw. A β beeinflussen können und die schon entstandene Aggregate proteolytisch abbauen können, von großem Interesse.

1.2. Proteasen

Ein wichtiger Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle sind Proteasen, Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren können und so die Proteinhomöostase der Zelle regulieren. Proteasen können beispielsweise Signalkaskaden in der Apoptose modulieren und nach Sekretion die extrazelluläre Matrix beeinflussen (Berg *et al.*, 2012, Degterev *et al.*, 2003, Shi, 2002, Patil & Walter, 2001, Tiaden *et al.*, 2012). Proteasen werden anhand ihrer katalytischen Zentren in aktuell neun Klassen unterteilt (Barrett *et al.*, 2001). Die proteolytische Spezifität wird durch die zelluläre Lokalisation von Protease und Substrat, der Struktur des aktiven Zentrums, durch Adapterproteine oder durch die Zugänglichkeit der Schnittstelle im Substrat reguliert (Gottesman, 2003). Adapterproteine können das Substrat binden und an die Protease übergeben. Die Zugänglichkeit der Schnittstelle im Proteinsubstrat wirkt bei der Proteinqualitätskontrolle entscheidend. Liegt das Protein in einem korrekt gefaltetem Zustand vor so ist diese Schnittstelle nicht zugänglich. Bei Fehlfaltung oder nicht vorhandener Faltung des Proteins ist die Protease in der Lage an die Schnittstelle zu binden (Ehrmann & Clausen, 2004). Die Struktur des aktiven Zentrums beeinflusst die Substratspezifität, indem beispielsweise nur ungefaltete Proteine zum aktiven Zentrum des Proteasoms oder der *Escherichia coli* (*E. coli*) Protease DegP gelangen können (Larsen & Finley, 1997, Clausen *et al.*, 2002). Zusätzlich zur Substratspezifität werden Proteasen über Aktivierung und Inaktivierung reguliert. Dabei werden die meisten Proteasen als Zymogen synthetisiert und erst nach proteolytischer Abspaltung eines Propeptids aktiviert. Ein Beispiel für diese Zymogenaktivierung ist die Serinprotease Trypsin (Lazure, 2002). Die Cysteinproteasen Calpain 1 und 2 werden nicht durch proteolytische Spaltung aktiviert, sondern lassen sich durch erhöhte Calciumkonzentration (μM bzw. mM) aktivieren. Worauf sie eine Konformationsänderung durchlaufen, durch welche das aktive Zentrum gebildet wird. Calpain 1 und 2 lassen sich schließlich durch den endogenen Inhibitor Calpastatin reversibel inaktivieren (Moldoveanu *et al.*, 2002, Hanna *et al.*, 2008). Proteasen, die an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind, sind beispielsweise die HTRA Serinproteasen. Ein charakteristisches Mitglied der HTRA Proteasen ist DegS, das im Periplasma von *E. coli* durch die C-Termini ungefalteter Außenmembranproteine aktiviert wird (Clausen *et al.*, 2011). Die Aktivierung von DegS führt über den σ^E -Signalweg zur Transkription von Proteinqualitätskontrollgenen.

Die Proteasedomäne hat eine Chymotrypsin-ähnliche Struktur und besteht aus zwei rechtwinklig angeordneten sechssträngigen β -Faltblattdomänen. Das aktive Zentrum liegt zwischen diesen beiden β -Faltblattdomänen und wird aus Schleifen zwischen den β -Faltblättern, sogenannten Loops, gebildet (Clausen *et al.*, 2002). Die C-terminalen PDZ Domänen der HTRA Proteasen interagieren mit der Proteasedomäne über einen Loop L3, auch als Sensor Loop bezeichnet. Im Homotrimer kann dieser Sensor Loop beispielsweise nach Bindung eines Substrats mit Loops benachbarter Proteasedomänen interagieren und so zu einer aktiven HTRA Protease führen. Diese allosterische Aktivierung ist reversibel. Für DegS wurde gezeigt, dass alle drei aktiven Zentren bei der Proteolyse eines Substrats miteinander interagieren (Hasenbein *et al.*, 2010).

Aufgrund der hohen Homologie zwischen den HTRA Proteasen von Pro- und Eukaryonten wird vermutet, dass HTRA Gene durch horizontalen Gentransfer, ausgehend von Prokaryonten, in Eukaryonten eingebracht wurden (Koonin & Aravind, 2002). Ein entgegengesetzter Gentransfer ist ebenfalls möglich (Clausen *et al.*, 2002). Die meisten HTRA Proteasen sind in der extrazellulären Matrix von Eukaryonten lokalisiert und sind auch in deren Zellorganellen zu finden. Außerdem lassen diese sich im Periplasma gram-negativer Bakterien und dem extrazellulären Raum von gram-positiven Bakterien finden (Clausen *et al.*, 2011). Die Funktionen der HTRA Proteasen sind hauptsächlich die der Proteinqualitätskontrolle.

In *E. coli* lassen sich drei Mitglieder von HTRA Proteasen unterscheiden: DegP, DegS und DegQ. Alle drei befinden sich im Periplasma und sind relevant in der Proteinqualitätskontrolle (Alba *et al.*, 2002, Clausen *et al.*, 2011). Die *E. coli* HTRA Protease DegP ist das erste beschriebene ATP-unabhängige Mitglied der Proteinqualitätskontrolle, das charakterisiert wurde. Neben seiner Rolle in der Proteinqualitätskontrolle zeigt DegP zusätzlich Eigenschaften von Chaperonen (Krojer *et al.*, 2002, Krojer *et al.*, 2008). Es besteht aus einer Protease und zwei PDZ-Domänen (Abb. 1.3.1). DegP ist essentiell unter Stressbedingungen, um das Fortbestehen der Zelle zu sichern (Lipinska *et al.*, 1988) und liegt als Homohexamer vor, das mittels Aktivierung zu höheren Oligomeren reagieren kann (Clausen *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 1999, Krojer *et al.*, 2002, Meltzer *et al.*, 2008). Dabei ergab sich, dass die Aktivierung von DegP durch Bindung von Substraten erfolgt (Krojer *et al.*, 2008, Jiang *et al.*, 2008, Shen *et al.*, 2009). Fehlgefaltete Proteine werden durch die PDZ1 Domäne von DegP gebunden. Diese Bindung löst eine Konformationsänderung aus, die dazu führt, dass das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich ist und nun proteolytisch verdaut werden kann (Kim *et al.*, 2011). DegP zeigt zusätzlich zur Proteasefunktion auch die

Eigenschaften eines Chaperons, da es auch im proteolytisch inaktiven Zustand essentiell ist. Es konnte gezeigt werden, dass DegP unter Stressbedingungen eine essentielle Chaperonfunktion ausübt, da eine Überexpression von inaktivem DegP_{S210A}, indem dem das Serin im aktiven Zentrum gegen ein Alanin mittels Oligomutagenese ausgetauscht wurde, die Temperatursensibilität komplementieren kann (Spiess *et al.*, 1999).

DegS dient im Periplasma von *E. coli* als Stresssensor, indem es über die σ^E -Signalkaskade die Transkription von Proteinqualitätskontrollgenen wie *degP* auslöst. (Sohn *et al.*, 2007, Hasenbein *et al.*, 2010). DegS besitzt eine Transmembrandomäne durch die es in der inneren Membran verankert ist und liegt als Homotrimer vor. Über die PDZ-Domäne von DegS werden C-Termini von Außenmembranproteinen gebunden, falls diese ungefaltet im Periplasma vorliegen. Durch diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung wodurch das aktive Zentrum zugänglich gemacht wird (Wilken *et al.*, 2004). Die Bindung aktiviert DegS und löst die Proteolyse von RseA durch DegS aus. RseA, auch als anti- σ Faktor bezeichnet, ist ein negativer Regulator des σ^E -Signalweges, dessen Proteolyse schließlich zur Freisetzung von σ^E im Cytoplasma führt.

DegQ ist sehr homolog zu DegP und verbindet ebenfalls eine Chaperon und Protease-Funktionen in einem Protein (Kolmar *et al.*, 1996). In einigen Prokaryonten wird lediglich ein DegQ Homolog und kein DegP exprimiert. In diesen Fällen übernimmt das DegQ Homolog wahrscheinlich die Aufgaben von DegP (Onder *et al.*, 2008).

1.4. Humane HTRA Proteasen

Zu den humanen HTRA1 Proteasen gehören HTRA1 bis 4. Von diesen sind HTRA1 und 2 die am besten untersuchten humanen Mitglieder. Alle besitzen eine Protease- und eine PDZ-Domäne. Ihr N-Terminus ist dagegen variabel (Abb. 1.3.1) beispielsweise besitzt HTRA2 eine N-terminale Membrandomäne. HTRA1, 3 und 4 besitzen am N-Terminus eine Signalsequenz, eine IGF Bindedomäne (*Insulin growth factor*) und eine Kazal Protease Inhibitor Domäne.

HTRA1 wurde zuerst als ein herabreguliertes Gen in SV40-transformierten Fibroblasten (Zumbrunn & Trueb, 1996) und als stark exprimiertes Gen in Knorpelproben von Osteoarthritis-Patienten entdeckt (Hu *et al.*, 1998). HTRA1 zeigt zwei unterschiedliche zelluläre Lokalisationen. Durch die Signalsequenz wird HTRA1 in die extrazelluläre Matrix sekretiert, jedoch wurde HTRA1 auch intrazellulär im Cytoplasma nachgewiesen, wo es meist mit Mikrotubuli kolokalisiert vorliegt. Extrazelluläre Substrate sind beispielweise Kollagen Typ III und Fibronectin oder Bestandteile von Knorpel, wie z.B. Aggrecan (Murwantoko *et*

al., 2004, Grau *et al.*, 2006, Tsuchiya *et al.*, 2005) (Abb. 1.4.1 links oben). Die hohe Expression von HTRA1 in arthritischen Geweben und die entsprechenden Substrate in der extrazellulären Matrix weisen auf eine Funktion von HTRA1 bei Osteoarthritis-Erkrankungen hin (Grau *et al.*, 2006). Des Weiteren ist HTRA1 dazu in der Lage APP (*β*-amyloid precursor protein) Fragmente, unter anderem auch das mit der Alzheimer'schen Krankheit (AD, *alzheimer's disease*) assoziierte Aβ Peptid, zu proteolysieren (Abb. 1.4.1 rechts oben). Eine Inhibierung von HTRA1 führt zu einer Akkumulation von Aβ im Überstand von Astrozyten, darüber hinaus zeigt HTRA1 eine Kolokalisation mit amyloiden Ablagerungen in Patientenproben (Grau *et al.*, 2005). Der Anteil von HTRA1 im Cytosol liegt hier in Astrozyten bei 13 %. Ein weiteres Substrat von HTRA1 ist beispielsweise Tau, welches HTRA1 auch in seiner intrazellulären Funktion mit AD in Verbindung bringt. HTRA1 kann das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau und dessen Aggregate *in vitro* proteolysieren und zeigt *in vivo* eine erhöhte Expression und Aktivität bei gesteigerten Tau Konzentrationen (Tennstaedt *et al.*, 2012) (Abb. 1.4.1 links unten). Zusätzlich kann HTRA1 z.B. Tuberin (TCS2, *tuberous sclerosis 2*) proteolysieren, was zur Aktivierung von mTOR und im weiteren Verlauf zur Initiation der Translation von Zielgenen führt (Campioni *et al.*, 2010) (Abb. 1.4.1 mittig unten). Tuberin bildet zusammen mit Hamartin (TCS1, *tuberous sclerosis 1*) den TCS Komplex, der die Serin-Threonin Kinase mTOR inhibieren kann. Die Proteolyse von Tuberin durch HTRA1 führt über die Aktivierung von mTOR zu einer Phosphorylierung von p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase 1*) und 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) und damit zur Initiation der Translation. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Tuberin oder Hamartin zur Überaktivierung von mTOR und damit zu einem Fortschreiten des Zellzyklus sowie zur Bildung von Tumoren führen können (Inoki *et al.*, 2003).

Des Weiteren scheint HTRA1 eine Tumorsuppressorfunktion zu übernehmen, da HTRA1 in einigen Krebsarten epigenetisch herab reguliert ist und eine Überexpression von HTRA1 die Proliferation und das Tumorwachstum *in vivo* und *in vitro* verringert (Chien *et al.*, 2009b, Chien *et al.*, 2009a, Chien *et al.*, 2006). Eine Übersicht einiger HTRA1 Funktionen in der extrazellulären Matrix sowie im Cytosol ist in Abb. 1.4.1 dargestellt.

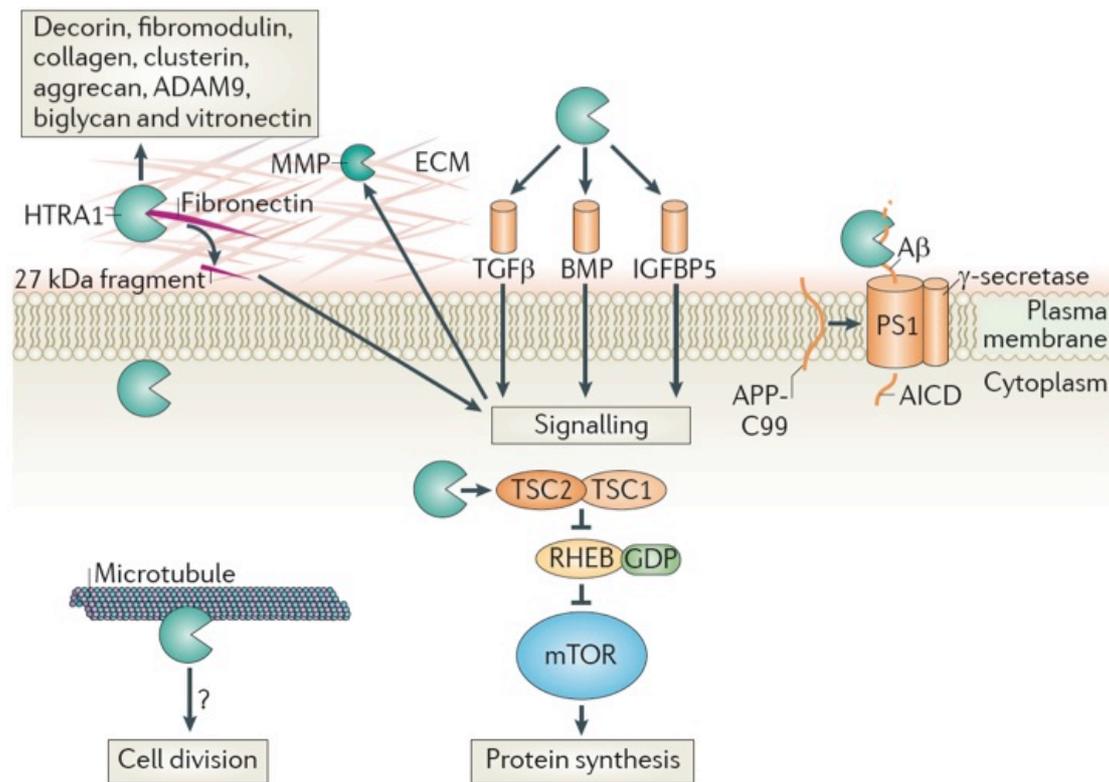


Abb. 1.4.1: Funktionen von HTRA1

Übersicht der HTRA1 Funktionen (Clausen *et al.*, 2011). In der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) kann HTRA1 die Zellproliferation mittels Proteolyse von TGFβ (*transforming growth factor-β*), BMP (*bone morphogenic protein*), Proteinen der TGF Familie und IGFBP (*insulin growth factor binding protein*) modulieren. Des Weiteren kann HTRA1 zahlreiche andere Substrate in der ECM proteolysieren (Decorin, Fibromodulin, Kollagen, Clusterin, Aggrecan, ADAM9, Biglykan, Vitronectin und Fibronectin). Ein Proteolyseprodukt von Fibronectin (27 kDa Fragment) kann intrazelluläre Signalwege aktivieren, die zur Expression von Matrix-Metalloproteasen führen, welche wiederum ECM modellieren können. Extrazellulär kann HTRA1 außerdem mit PS1 (Presenilin 1) interagieren und das Proteolyseprodukt Aβ des Verdaus des C99 Fragment von APP (*β-amyloid precursor protein*), durch die γ-Secretase, spalten. Bei der Proteolyse von C99 entsteht intrazellulär das Fragment AICD (*amyloid precursor intracellular domain*). HTRA1 kann durch Proteolyse von TCS1 (Tuberin) des TSC1/2 Komplexes (*tuberous sclerosis protein*) die Proteinsynthese beeinflussen. Der TCS1/2 Komplex inhibiert ohne HTRA1 RHEB (*ras homolog enriched in brain*), gebunden an GDP (Guanosindiphosphat), was wiederum mTOR (*mammalian target of rapamycin*) inhibiert.

HTRA1 bildet stabile Homotrimere. Im Gegensatz zu DegP und DegS ist die PDZ-Domäne für die Aktivierung von HTRA1 nicht notwendig (Truebestein *et al.*, 2011). Hier interagiert der Sensor Loop L3 nicht mit der PDZ-Domäne, sondern direkt mit dem Substrat und sorgt so für eine Aktivierung von HTRA1. HTRA1 wird demnach nicht wie die anderen HTRA Proteasen notwendigerweise allosterisch aktiviert, sondern direkt durch Substratbindung. Diese Aktivierung wird als induzierte Anpassung, *induced fit*, bezeichnet. Die aktive Konformation von HTRA1 konnte mittels Röntgenkristallstrukturanalyse auch ohne ein gebundenes Substrat beobachtet werden (Eigenbrot *et al.*, 2012). Wahrscheinlich

besteht ein Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Zustand von HTRA1, der aktive Zustand wird durch Bindung eines Substrats stabilisiert. Die genaue Rolle der PDZ-Domäne von HTRA1 ist nicht bekannt. Die PDZ-Domäne von HTRA1 gehört zur Klasse 2e und zeigt eine Spezifität für die Bindung von vier benachbarten hydrophoben Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin oder Methionin) (Tonikian *et al.*, 2008).

HTRA2, auch als omi bezeichnet, wurde zuerst im endoplasmatischen Retikulum entdeckt (Faccio *et al.*, 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass HTRA2 in der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle eine wichtige Rolle spielt. Lokalisiert ist HTRA2 im Intermembranraum und ist mit der N-terminalen Membrandomäne an der Innenmembran der Mitochondrien verankert (Vande Walle *et al.*, 2008, Winklhofer & Haass, 2010). Eine Proteolyse des N-Terminus während der Apoptose führt dazu, dass HTRA2 in das Cytoplasma gelangen kann. Hier kann HTRA2 Proteine proteolysieren, welche die Apoptose unterdrücken können, wie beispielsweise XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Suzuki *et al.*, 2001). Durch die Interaktion mit HAX1 (*HCLS1-associated XI protein*) ist HTRA2 direkt in die Proteinqualitätskontrolle der Mitochondrien involviert (Fadeel & Grzybowska, 2009, Cilenti *et al.*, 2004). Die Proteolyse von HAX1 führt zur Autophagie sowie zu einem Anstieg der Proteolyse von α -Synuclein, dem charakteristischen Proteinaggregat in der Parkinson Erkrankung, so dass HTRA2 auch an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist (Li *et al.*, 2010). HAX1 vermittelt wiederum die Proteolyse des HTRA2 Membranankers durch PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protease*) (Chao *et al.*, 2008). HTRA2 wird wie auch seine bakteriellen Homologe DegP und DegS unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert (Gray *et al.*, 2000). Dazu zählt unter anderem auch eine erhöhte Expression von HTRA2 durch den p53 Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen der Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur initiiert (Jin *et al.*, 2003). Des Weiteren ist HTRA2 dazu in der Lage APP (*β -amyloid precursor protein*) zu proteolysieren und ist damit auch in der Alzheimer'schen Krankheit von Bedeutung (Huttunen *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2006). HTRA2 bildet stabile Homotrimere im aktiven wie auch im inaktiven Zustand, wobei die PDZ-Domäne das aktive Zentrum im inaktiven Zustand blockiert (Li *et al.*, 2002). Wahrscheinlich wird erst durch Bindung des Substrats an die PDZ-Domäne der Zugang zum aktiven Zentrum frei (Hansen & Hilgenfeld, 2013).

HTRA3 und HTRA4 sind zum jetzigen Zeitpunkt kaum untersucht worden. HTRA3 ist wie HTRA1 dazu in der Lage Teile der extrazellulären Matrix zu proteolysieren (Tocharus *et al.*, 2004) und die Expression von HTRA3 in einigen Krebsarten erniedrigt (Bowden *et al.*, 2010, Bowden *et al.*, 2006). Zu HTRA4 sind bisher keine Funktionen bekannt.

1.5. Calpain Proteasen

Calpaine sind Calcium-abhängige, Papain ähnliche Cysteinproteasen, die zum Klan CA und zur Familie C02 gehören. Sie sind ebenfalls in der Proteinqualitätskontrolle relevant und in zahlreiche Erkrankungen mit Proteinfehlfaltungen involviert (Vosler *et al.*, 2008). Sie wurden zuerst im Gehirn von Ratten und im Skelettmuskel entdeckt (Guroff, 1964, Huston & Krebs, 1968). Calpaine sind hochkonservierte Proteasen, die in zahlreichen Pro- und Eukaryonten vorkommen aber nicht in Archaea zu finden sind (Ono & Sorimachi, 2012, Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Eine Gemeinsamkeit aller Calpaine ist die charakteristische Protease-Domäne, CysPc (*Calpain like protease domain*) genannt (Croall & DeMartino, 1991, Goll *et al.*, 2003, Suzuki *et al.*, 2004). Von humanen Calpainen wurden bisher 15 Homologe gefunden, von diesen werden sechs Calpaine gewebespezifisch exprimiert. Die klassischen Calpaine 1 und 2 bilden zusammen mit der kleinen Untereinheit CAPNS1 (*Calpain small subunit 1*) ein Heterodimer und werden ubiquitär exprimiert. CAPNS1, auch Calpain 4 genannt, besitzt keine CysPc Domäne und gehört daher eigentlich nicht direkt zu den Calpainen. Die Deletion von Calpain 2 ist in Mäusen letal, die Zellen sterben noch vor dem Blastozystenstadium (Dutt *et al.*, 2006). Ein *Knock-out* von Calpain 1 zeigt keinen deutlichen Phänotyp, lediglich eine Beeinträchtigung der Thrombozyten. Es ist anzunehmen, dass Calpain 2 teilweise die Funktionen von Calpain 1 übernehmen kann (Azam *et al.*, 2001). Die Deletion der kleinen Untereinheit CAPNS1 führt zu embryonaler Letalität, hat jedoch in Zellkulturversuchen keinen Einfluss gezeigt (Zimmerman *et al.*, 2000, Arthur *et al.*, 2000). Die gewebespezifischen Calpaine sind Calpain 3, auch p94 genannt, im Muskel, Calpain 6 in der Plazenta, Calpain 8 und 9, auch nCL-2 und -4 genannt, im gastrointestinalen Bereich, Calpain 11 im Testikel und schließlich Calpain 12 in Haarfollikeln (Sorimachi *et al.*, 1989, Dear & Boehm, 1999, Dear *et al.*, 1997, Dear *et al.*, 2000, Sorimachi *et al.*, 1993). Zu Calpain 14 gibt es bisher noch keine Daten im Hinblick auf Expression oder Funktion.

1.5.1. Struktur, Aktivierung und Inhibierung der klassischen Calpaine 1 und 2

Calpain 1 und 2 sind Cysteinproteasen, die durch erhöhte Calciumkonzentrationen aktiviert werden. Sie bestehen aus einer CysPc (*Calpain like protease domain*), einer C2L (*C2-like* Domäne) und einer PEF Domäne (*penta-EF-hand*) und haben ein Molekulargewicht von je ca. 80 kDa (Abb. 1.5.1 A). Beide bilden ein Heterodimer mit CAPNS1 (*Calpain small subunit 1*), der kleinen Calpain Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa (Campbell & Davies, 2012). CAPNS1 besteht aus einer Glycin-reichen Domäne und ebenfalls

aus einer PEF Domäne. Die Bindung der Heterodimere wird über eine der fünf *EF-hand* Domänen vermittelt (Imajoh *et al.*, 1987, Hosfield *et al.*, 1999).

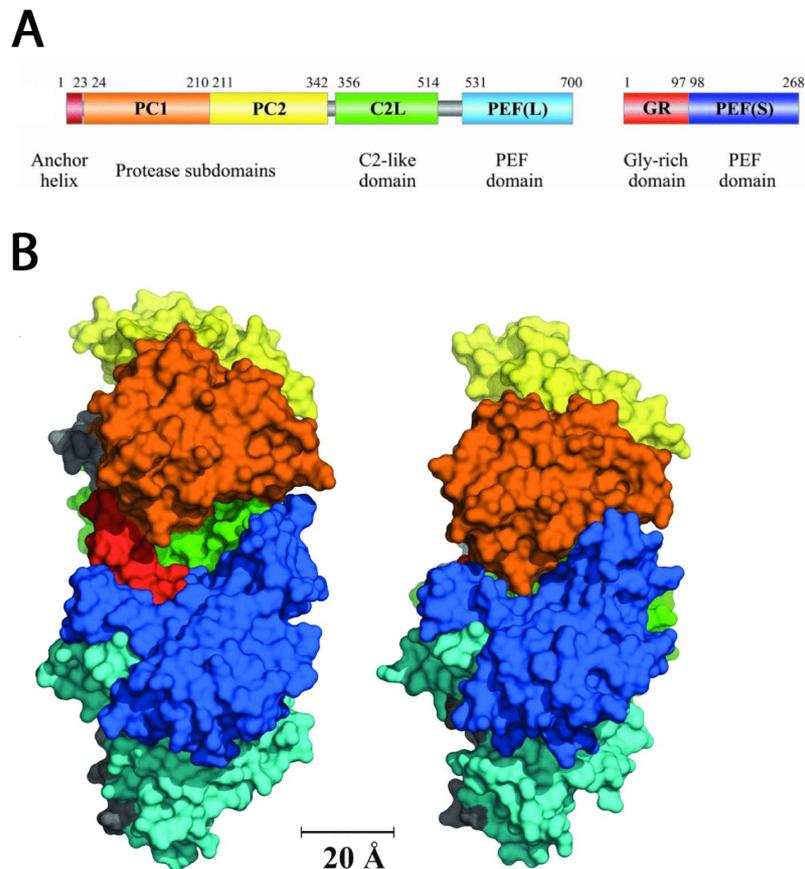


Abb. 1.5.1: Domänenorganisation von Calpain 1 und 2 und ihre Aktivierung

Modifiziert aus (Campbell & Davies, 2012). **A:** Domänenorganisation von Calpain 1 und 2. Die große Untereinheit besteht aus einem N-terminalen Anker (rot, *Anchor helix*) und einer zweigeteilten Proteasedomäne PC1 und PC2 (orange und gelb, *Protease subdomains*). C-terminale der Proteasedomäne folgt eine C2L Domäne (grün, *C2-like domain*) und eine PEF(L) Domäne (hellblau, *Penta-EF-hand large subunit, PEF domain*). Die kleine Untereinheit besteht aus einer Glycin-reichen Domäne GR (rot, *Gly-rich domain*) und ebenfalls einer PEF(S) Domäne (dunkelblau, *PEF domain*). **B:** Röntgenkristallstruktur von Calpain 2, ohne die GR Domäne der kleinen Untereinheit. Die Farbgebung entspricht der aus A. Links ist Calpain 2 im inaktiven, rechts im aktiven Zustand dargestellt. Die Aktivierung durch Bindung von Calcium Ionen führt zu einer Rotation der PEF Domänen der großen und kleinen Untereinheit in Richtung der Protease-Domäne.

Der einzige endogene Inhibitor von Calpain 1 und 2 ist Calpastatin (Dayton *et al.*, 1976, Kiss *et al.*, 2008). Calpastatin besteht aus vier inhibierenden Domänen, die jeweils ein Calpain mit unterschiedlicher Effizienz inhibieren können (Maki *et al.*, 1987). Calpastatin besitzt ein Molekulargewicht von 70 kDa, besteht aus einer N-terminalen sogenannten L Domäne und vier inhibierenden Domänen, die jeweils in vier Unterdomänen A bis C aufgeteilt sind. Von diesen Unterdomänen zeigt nur B eine inhibierende Wirkung (Betts & Anagli, 2004, Betts *et al.*, 2003). Ein *Knock-out* von Calpastatin zeigt lediglich unter

Stressbedingungen Auswirkungen, dieser endogene Inhibitor scheint daher nur notwendig zu sein, wenn eine Überaktivierung von Calpain verhindert werden soll (Takano *et al.*, 2005, Higuchi *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2008).

Erst durch eine erhöhte Calciumkonzentration können die Calpaine ihre aktive Konformation einnehmen. Die Calciumkonzentrationen, die zur Aktivierung von Calpain 1 und 2 erforderlich sind, liegen im μM – bzw. mM – Bereich und sind damit sehr viel höher als die nM Calciumkonzentrationen im Cytosol (Campbell & Davies, 2012). In calciumfreien Röntgenkristallstrukturanalysen von Calpain 2 sind die Aminosäuren des aktiven Zentrums, Cystein, Histidin und Asparagin, nicht in einer aktiven Konformation positioniert (Strobl *et al.*, 2000, Hosfield *et al.*, 1999). Vier der fünf *EF-hand* Domänen können je zwei Calciumionen binden. Zusätzlich werden in der Protease-Domäne zwei weitere Calciumionen gebunden (Moldoveanu *et al.*, 2002). Kokristallisation von calciumgebundenem Calpain 2 zusammen mit Calpastatin verdeutlicht die Konformationsänderungen, die zur Aktivierung von Calpain notwendig sind (Moldoveanu *et al.*, 2008, Hanna *et al.*, 2008). Erst bei Bindung der Calcium Ionen an den EF Domänen sowie der Proteasedomäne kommt es zur Rotation der PEF Domäne in Richtung der Proteasedomäne und somit zur Bildung des aktiven Zentrums (Abb. 1.5.1 B). Es wurde angenommen, dass die extrem hohen benötigten Calciumkonzentration zur Aktivierung durch eine Autoproteolyse oder Dissoziation der Untereinheiten erniedrigt werden können (Li *et al.*, 2004, Nakagawa *et al.*, 2001). Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass Calpaine nur in unmittelbarer Nähe der Calciumeinströme in das Cytosol transient aktiviert werden und schon nach kurzer Zeit wieder in den inaktiven Zustand übergehen (Campbell & Davies, 2012). Dafür spricht ebenfalls, dass der *Knock-out* von Calpastatin keinen großen Effekt unter normalen physiologischen Bedingungen zeigt und deshalb eine dauerhafte Aktivierung der Calpaine unwahrscheinlich ist (Takano *et al.*, 2005).

1.5.2. Die Funktionen der klassischen Calpaine 1 und 2

Calpaine unterscheiden sich von den typischen zellulären proteolytischen Systemen, wie dem Proteasom, Autophagie oder Caspasen. Sie proteolysieren ihre Substrate nicht komplett, sondern modulieren sie. Calpaine erkennen ihre Substrate im Gegensatz zu den anderen Systemen ohne bestimmte Marker, wie z.B. Ubiquitin für das Proteasom oder kurze Erkennungssequenzen für Caspasen (Ono & Sorimachi, 2012). Die klassischen Calpaine sind in zahlreiche zelluläre Funktionen involviert und werden durch erhöhte Calciumkonzentrationen aktiviert. Grundsätzlich sind die Funktionen von Calpain 1 und 2 selten zu differenzieren. Calpain 1 und 2 sind beispielsweise in der Zellmigration involviert,

indem sie Integrine und Cadherine proteolysieren können (Franco & Huttenlocher, 2005, Lebart & Benyamin, 2006). Durch Inhibierung von Calpain 1 und 2 verringert sich die Migration von verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten (Rock *et al.*, 2000, Glading *et al.*, 2000). Des Weiteren sind Calpaine an der Apoptose beteiligt und regulieren diese sowohl positiv als auch negativ. So sind sie beispielsweise in der Lage p53 zu proteolysieren und so die p53 vermittelte Apoptose zu verhindern (Gonen *et al.*, 1997, Kubbutat & Vousden, 1997, Woo *et al.*, 2012). Andererseits können Calpaine Apoptose induzieren, indem sie Caspase 7, 9, 10 und 12 proteolysieren (Gafni *et al.*, 2009, Chua *et al.*, 2000). Die Expression der Calpaine ist in einigen Tumoren hoch reguliert und durch ihre Verbindung zur Zellmigration und Apoptose wird vor allem der Inhibierung von Calpainen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Krebs zugesprochen (Storr *et al.*, 2011). Calpaine sind häufig an Krankheitsbildern beteiligt, sobald diese mit einem extremen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zusammenhängen. Die Calciumhomöostase wird in zahlreichen Situationen so verändert, dass es zu einer Überaktivierung von Calpainen kommen kann, beispielsweise in neurodegenerativen Erkrankungen, Muskeldystrophie, Retinopathien oder grauem Star (Bertipaglia & Carafoli, 2007, Biswas *et al.*, 2005, Paquet-Durand *et al.*, 2007, Marambaud *et al.*, 2009). Üblicherweise werden Calpaine nur für kurze Zeit in der Nähe des Calciumeinstroms ins Cytosol aktiviert. Die lokale Calciumkonzentration, die zur Aktivierung von Calpainen benötigt wird, sinkt durch Diffusion und die Entfernung von Calcium durch Calcium Pumpen (Brini & Carafoli, 2009). Ein Anstieg der Calciumkonzentration in der Nähe des Calciumeinstroms in das Cytosol führt zu einer Überaktivierung von Calpainen. Diese Überaktivierung führt beispielsweise zur Nekrose der betreffenden Zelle (McCall, 2010). Der Einsatz von Calpaininhibitoren in Tiermodellen konnte die Beeinträchtigung durch Calpaine mildern, was die Suche nach neuen und spezifischeren Calpain Inhibitoren vorantreibt (Donkor, 2011, Carragher, 2006, Colak *et al.*, 2009, Das *et al.*, 2013).

Ein Beispiel für die Rolle von Calpain in neurodegenerativen Erkrankungen ist die Alzheimer'sche Erkrankung (AD, *alzheimer's disease*) (Vosler *et al.*, 2008). AD ist durch intrazelluläre Aggregate, sogenannten neurofibrillären Bündeln (NFT, *neurofibrillary tangles*), aus dem Mikrotubuli assoziiertem Protein Tau sowie durch extrazelluläre senile Plaques, die aus Aggregaten von Amyloid β ($A\beta$) bestehen, charakterisiert (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986, Selkoe, 1989). Erhöhte Konzentrationen von Calpain konnten in senilen Plaques und NFTs von Patientenproben nachgewiesen werden (Saito *et al.*, 1993). Steigende Konzentrationen von $A\beta$ außerhalb der Zellen führen zu einer Aktivierung von N-Methyl-D-

Aspartat (NMDA) Rezeptoren und damit zu einem Einstrom von Calcium in das Cytosol (Song *et al.*, 2008, Carrillo-Mora *et al.*, 2010). Durch diese erhöhte Calciumkonzentration kommt es zu einer Aktivierung von Calpain und damit beispielsweise zur Calpain vermittelten Apoptose oder Hyperphosphorylierung von Tau. Intrazelluläre Hyperphosphorylierung und darauf folgende Aggregation von Tau zu NFTs ist ein weiterer Bestandteil der Pathophysiologie von AD (Delobel *et al.*, 2003, Zheng *et al.*, 2005). Diese Hyperphosphorylierung findet mit Hilfe von verschiedenen Kinasen, wie beispielsweise Erk1/2 (*Extracellular regulated kinase 1/2*), PKC (Protein Kinase C), CamII α (Calcium/Calmodulin Kinase II α) und GSK3 (Glykogen Synthase Kinase 3), statt. Diese Kinasen können durch Calpain aktiviert werden (Veeranna *et al.*, 2004, Kishimoto *et al.*, 1989, Yoshimura *et al.*, 1996, Goni-Oliver *et al.*, 2007, Feng *et al.*, 2013). Außerdem kann Calpain durch Proteolyse von p35 zu p25 die Kinase Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5), welche bei AD Patienten in erhöhten Konzentrationen vorliegt, stärker aktivieren und so zu einer weiteren Hyperphosphorylierung von Tau führen (Tsai *et al.*, 1994, Jamsa *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2013, Patrick *et al.*, 1999). Nicht nur durch Hyperphosphorylierung, sondern auch durch Proteolyse begünstigt Calpain die Aggregation von Tau zu NTFs. Dabei entsteht ein zur Aggregation neigendes toxisches Tau Fragment, als 17 kDa Fragment bezeichnet (Park & Ferreira, 2005), dessen Toxizität jedoch fraglich ist (Garg *et al.*, 2011). Calpain ist auch in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen involviert und führt durch seine Aktivierung meist zu einer Vermehrung von Aggregaten und damit zur Nekrose der betreffenden Zellen, wie beispielsweise durch Proteolyse von α -Synuclein in der Parkinson oder durch Proteolyse von Huntingtin in der Huntington Erkrankung (Mishizen-Eberz *et al.*, 2005, Gafni *et al.*, 2004).

1.6. Zielsetzung

Vor Beginn dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin in Berlin ein sogenannter C-Terminus Screen durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner von HTRA1 zu identifizieren. Dieser Screen wurde nach einer speziell für die Interaktion von PDZ-Domänen modifizierten Methode etabliert (Boisguerin *et al.*, 2007). Für diese Untersuchung wurden C-Termini des humanen Proteoms, insgesamt 6223 Peptide, auf einer Membran immobilisiert und die Bindung von HTRA1 detektiert. Calpain 2 wurden dabei unter den ersten 200 potentiellen Bindungspartnern gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich speziell auf diese beiden Proteasen fokussiert, da diese im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen

stehen. Ein Nachweis der Protein-Protein-Interaktion könnte neue grundlegende Rückschlüsse über die molekularen Mechanismen von neurodegenerativen Erkrankungen bringen. Beide Proteasen zeigen erhöhte Konzentrationen in NFTs von Patientenproben der Alzheimer'schen Krankheit (Tennstaedt *et al.*, 2012, Saito *et al.*, 1993). Steigende Calpain 2 Konzentration und Aktivität gehen meist mit der Apoptose oder Nekrose der betreffenden Zellen einher (Vosler *et al.*, 2008). Eine erhöhte Expression von HTRA1 führt dagegen zu einer geringeren Akkumulation von aggregiertem Tau (Tennstaedt *et al.*, 2012). Ein Mechanismus durch den mittels Interaktion beider Proteasen HTRA1 aktiviert oder Calpain 2 inaktiviert wird, wäre ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien von neurodegenerativen Erkrankungen.

Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung der möglichen Protein-Protein-Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 und deren Einfluss auf die Aktivität beider Proteasen. Im ersten Schritt müssen hierfür ein geeignetes Expressionssystem und -bedingungen für Calpain 2 etabliert und beide Proteine gereinigt werden. Die Interaktion und deren Einfluss auf die Aktivitäten beider Proteasen soll dann mittels verschiedenster biochemischer Methoden, wie beispielsweise analytischer Größenausschlusschromatographie sowie pNA Aktivitätsassays, charakterisiert werden. Neben den *in vitro* Untersuchungen sollen auch *in vivo* Analysen der Bindungspartner HTRA1 und Calpain 2 in Zellkulturen durchgeführt werden. Hierfür sollen sowohl Untersuchungen mittels qRT-PCR als auch *in vivo* Imaging Methoden genutzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Nährmedien und Antibiotika

Alle *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme wurden in NZA Medium kultiviert oder auf NZA Platten ausgestrichen.

	<u>NZA Medium</u>		<u>NZA Platten</u>
NZ-Amine	10 g	NZA Medium	
Hefeextrakt	5 g	Bacto-Agar	15 g
NaCl	10 g	ad 1 l H ₂ O	
ad 1 l H ₂ O			

Je nach verwendetem Vektor oder Plasmid wurde dem Medium Antibiotikum zugegeben. Die verwendeten Antibiotika sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration [µg/ml]</u>
Ampicillin	200
Chloramphenicol	30
Kanamycin	100
Spectinomycin	50

Alle verwendeten eukaryontischen Zelllinien wurden in *Dublecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) gehalten. Die Zellkulturmedien und Zusätze stammen von der Firma Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA. Folgende Zusätze wurden verwendet:

Ham's F12 Nutrient Mixture

Fötale Kälberserum (*Fetal cow serum*, FCS)

Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml PenicillinG, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat)

Trypsin/EDTA

2.1.2. Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

Zur Klonierung sowie zur Expression wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet (Tab. 2.2).

2. Material und Methoden

Tab. 2.2: Verwendete *E. coli* Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
Rosetta 2	<i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1 pRARE (Cm^R)</i>	(Studier & Moffatt, 1986)

Die verwendeten eukaryontischen Zelllinien stammen alle aus *Homo sapiens* und sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Spezifikation
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
SH-SY5Y	Neuroblastomzellen

2.1.3. Vektoren und Plasmide

Folgende Vektoren wurden für Klonierungen verwendet (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Vektoren

Vektor	Herkunft
pET21d	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
pET28a	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
pCDFDuet-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
pcDNA3.1	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

Für die Expression wurden die Plasmide, die in Tab. 2.5 aufgelistet sind, verwendet.

Tab. 2.5: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
p21Kh	pCDFDuet-1 mit einer N-terminal verkürzten Version der kleinen humanen Untereinheit CAPNS1 (Aminosäuren 92 – 268 = 21Kh)	diese Arbeit

2. Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
p23Kh	pCDFDuet-1 mit einer N-terminal verkürzten Version der kleinen humanen Untereinheit CAPNS1 (Aminosäuren 67 – 268 = 23Kh)	diese Arbeit
p80KSC	pET28 mit Calpain 2 aus <i>rattus norvegicus</i> , Oligomutagenese von Cystein 719 zu Serin, N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
p80KStrep	pET28s mit Calpain 2 aus <i>rattus norvegicus</i> , N-terminaler StrepII-Tag	diese Arbeit
pACpET24-21K	pACpET24 mit der kleinen Untereinheit CAPNS1 aus <i>Rattus norvegicus</i> (21K)	Peter L. Davies, Queen's University, Kingston, Ontario, Kanada
pET24d-80K	pET24d mit der Calpain 2 aus <i>Rattus norvegicus</i> (80K), C-terminaler His-Tag	Peter L. Davies, Queen's University, Kingston, Ontario, Kanada
pET28CAPN2	pET28a mit der cDNA humanem Calpain 2, N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pET28CAPN2CA	Inaktives Calpain 2, Oligomutagenese von pET28CAPN2 Austausch Cystein 128 gegen Alanin	diese Arbeit
pET2880K	pET28a mit Calpain 2 aus <i>rattus norvegicus</i> , N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pNStrepII_HTRA1dmac	pET21d mit HTRA1 Δ mac (Aminosäuren 158 – 480) Insert, N-terminaler StrepII-Tag	frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe
pNStrepII_HTRA1Prot	pET21d mit HTRA1 Δ mac Δ PDZ (Aminosäuren 158 – 375) Insert, N-terminaler StrepII-Tag	frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe
pNStrepII_SA_HTRA1dmac	pET21d mit HTRA1 Δ macSA (Aminosäuren 158 – 480) Insert, N-terminaler StrepII-Tag, Oligomutagenese Serin 328 zu Alanin	diese Arbeit
pNStrepII_SA_HTRA1Prot	pET21d mit HTRA1 Δ mac Δ PDZSA (Aminosäuren 158 – 375) Insert, N-terminaler StrepII-Tag, Oligomutagenese Serin 328 zu Alanin	diese Arbeit
pDONR221-CAPN2	pDONR221 mit der cDNA der großen Untereinheit Calpain 2	FLEXgene, Boston, Massachusetts, USA
pcDNA-HTRA1	pcDNA3.1 mit HTRA1 als Insert	Jeremy Chien, Mayo Clinic, Rochester,

2. Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
		Minnesota, USA
pPETHTRA1Helix1	pET21d mit HTRA1 Δ mac Insert, C-terminaler His-Tag	frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe
pSP01_4Rwt	pET3d mit Tau 4R als Insert (MAPT, Isoform 2, 2N4R)	frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe
pSP02_F3dK280	pET3d mit der verkürzten Form Tau F3 als Insert (entspricht Aminosäuren 258 – 360 von Tau 4R, Δ K280)	frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe

2.1.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*, qRT-PCR), für PCR Reaktionen für die Klonierungen sowie für die durchgeführten Oligomutagenesen sind in Tab. 2.6 aufgelistet.

Tab. 2.6: Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')	qRT-PCR / PCR / Oligomutagenese
CAPN2-right-rtqPCR	CGGATCTTGAACCTGAGGGTT	qRT-PCR
CAPN2-left-rtqPCR	CACCACACTCTACGAAGGCA	
HTRA1-right-rtqPCR	gcaactcagacatggactacatc	
HTRA1-left-rtqPCR	gtgtaattccaatcaacttcaccg	
HtrA1_S328A_NgoMIV_f	caactatggaaacgccggcgcccgtagtaaacctgg	pNStrepII_SA_HTRA1 Δ mac / Prot
HtrA1_S328A_NgoMIV_r	ccaggttactaacggcgccggcggttccatagttg	
C2CAf	CAAGGAGCTCTAGGTGACGCCTGG	pET28CAPN2CA
	CTGCTGGCAGCCATTG	
C2Car	CAATGGCTGCCAGCAGCCAGGCGT	
	CACCTAGAGCTCCTTG	
p28C2 for	GCTTGGCCGCGATGCCCGCCATGC	pET28CAPN2
	TAGCCATATGGCTG	
p28C2 rev	TCTGTTTCTCAGTACTTTAGGCTAG	
	CATGACTGGTG	
pCAPN2HisFN	CAGCCATATGGCTAGCATGGCTGG	pET2880K
	CATCGCGATG	
pCAPN2HisRN	CACCAGTCATGCTAGCTCATAGGA	
	CTGAAAAACTCAGCCACG	
80KSCPsiIfor	CTTATCTCGTGGCTGTGTTTTTCAG	p80KSC
	TCTTATAAGCTAGCATGACTG	
80KSCPsiIrev	CAGTCATGCTAGCTTATAAGACTG	
	AAAAACACAGCCACGAGATAAG	

2. Material und Methoden

Name	Sequenz (5' - 3')	qRT-PCR / PCR / Oligomutagenese
Calpain1FOR	CCGCAGTTTGAAAAAAGCAGCGG CCTGGT	p80KStrep
pET28FOR	TGATTTCGAGCACCACC	
pET28REV	TTTTTCAAACCTGCGGATGGCTCCA GCTGCTGCCCATGGT	
Insert rev C2	GTGCTCGAGAAATCATAGGACTG	
CAPNS1f	ATGTTCTGGTTAACTCGTTCT	CAPNS1 aus cDNA
CAPNS1r	CAGGAATACATAGTCAGCTGC	
23Khf	AGATCTCAATTGGATATCATGAGC GCCATCAGCGAGGC	p23Kh
21Khf	AGATCTCAATTGGATATCATGCAT TACTCCAACATTGAGG	p21Kh
CAPNS1Vr	GCGTGGCCGCGCATATCTCAGGA ATACATAGTCAGCTGCAG	p23Kh/p21Kh

2.1.5. Antikörper

Im Verlauf der Dissertation wurden die in Tab. 2.7 beschriebenen Primärantikörper verwendet.

Tab. 2.7: Primärantikörper

Antikörper gegen	Wirtsorganismus	Herkunft
Penta-His	Maus	Qiagen, Hilden, Deutschland (#34660)
StrepII Tag	Maus	Qiagen, Hilden, Deutschland (#34850)
CAPN1	Maus	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA (#3082)
HTRA1	Kaninchen	diese Arbeitsgruppe
Spectrin	Maus	Chemicon, Temecula, Kalifornien, USA (#1622)
CAPNS1	Maus	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA (#3083)
CAPN2	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK (#2539)
CAPN2	Maus	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA (#C268)
alpha-Tubulin	Ratte	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA (#T5168)
Tau	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK (#64193)
Tau	Maus	IBL, Hamburg, Deutschland (#10237)

Zur Detektion der Primärantikörper wurden die in Tab. 2.8 aufgeführten Sekundärantikörper verwendet.

2. Material und Methoden

Tab. 2.8: Sekundärantikörper

Antikörper gegen	Konjugat	Wirtsorganismus	Herkunft
Maus IgG	Alkaline Phosphatase (AP)	Ziege	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA (#1418)
Kaninchen IgG	Alkaline Phosphatase (AP)	Ziege	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA (#D0487)
Maus IgG	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i> , HRP)	Schaf	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK (#NXA931)
Kaninchen IgG	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i> , HRP), konformations-spezifisch	Maus	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA (#5127)
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 633	Ziege	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA (#A21071)
Ratte IgG	Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA (#A11007)
Maus IgG	Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA (#A11032)
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA (#A11012)
Maus IgG	Alexa Fluor 633	Ziege	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488	Esel	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA (#A21206)
Maus IgG	Alexa Fluor 488	Esel	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA (#A11001)

2. Material und Methoden

2.1.6. Proteine

Die verwendeten Enzyme, Proteine und Peptide sind in Tab. 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9: Enzyme und Peptide

Enzym / Protein / Peptid	Hersteller
β -Casein	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Calpain 1	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNaseI	Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
Phusion High Fidelity Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Suc-LLVY-AMC	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
VFNTLPMMGKASPV-pNA	(DegS pNA) zur Verfügung gestellt von AG Kaiser Universität Duisburg-Essen

2.1.7. Protein- und Nukleinsäurestandards

Die Protein- und Nukleinsäurestandards, die in dieser Dissertation verwendet wurden, sind in Tab. 2.10 dargestellt.

Tab. 2.10: Protein- und Nukleinsäurestandards

Standard	Hersteller
Quick-Lead 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
HiMark Prestained HMW Standard	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
peqGold Protein Marker	PEGLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
FPLC Gelfiltration LMW&HMW Standard	Bio-Rad, München, Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.8. Komplettsysteme

Die genutzten Komplettsysteme sind Tab. 2.11 aufgelistet.

Tab. 2.11: Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
ECL Chemolumineszenz-Kit (West Pico und Femto)	Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NucleoSpin RNA II	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
QIAprep Miniprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
qPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza, Basel, Schweiz
Verso cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Roti-Nanoquant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech Laboratories, Mountain-View, Kalifornien, USA
SilverQuest Silver Staining Kit	Novex Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.9. Chemikalien

Die für Puffer und Lösungen benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), und Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA) bezogen. Für die Puffer und Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (vollentsalztes Wasser mit nachgeschaltetem *water purification system* EPA Esta. 41237-MA-1, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) verwendet.

2.1.10. Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm ECL	Amersham, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Assay Platten 96 well (Transparent, Schwarz mit transparentem Boden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Cryo Tube Vials	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2. Material und Methoden

Deckgläser 13 mm Durchmesser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Millipore Duapore PVDF Membrane Filters	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Dialysemembran ZelluTrans T1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CA Membranfilter	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydroxyapatite Bio-Gel HAT	Bio-Rad, München, Deutschland
Laborsäule XK 16/20	Amersham, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Ni-NTA Fast flow	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ni-NTA Magnetic Beads	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ni-TED 2000	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
NuPAGE Novex Midi Gel	Novex Life Technologies, Carlsbad, USA
Zellkultur Schalen und Multiwell Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
PVDF Membran	Amersham, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
SFCA bottle top filters 500 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Strep Tactin Superflow	Iba Lifesciences, Göttingen, Deutschland
Strep-Tactin Magnetic Beads	Qiagen, Hilden, Deutschland
Superdex200 10/300	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Superdex200 26/60 prep grade	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Superdex200 5/150 GL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Vivaspin (20 ml, 2 ml und 0,5 ml Volumen mit 3 – 100 kDa Größenausschluss)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Zellulosemembran Whatman	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK

2.1.11. Geräte

Absaugpumpe Typ N811KM.18 KNF	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Rasterkraftmikroskop MultiMode 8	Bruker, Billerica, Massachusetts, USA
Autoklav	BeliMed, Mühlheim am Inn, Österreich
Brechungsindex Detektor Optilab rEX	Whyatt Technology, Dernbach, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HEPA Class 100	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DNA-Gelelektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
EM Gitternetz G2400C	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Flüssigchromatographie Easy-nLC 1000	Thermo, Schwerte, Deutschland
FPLC, BioLogic Duo Flow	Bio-Rad, München, Deutschland
FPLC Äkta Expolrer	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
French Press	Thermo, Schwerte, Deutschland
Geldokumentation	Intas, Göttingen, Deutschland
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, UK
HPLC 1260	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
HPLC Säule Bio SEC-5 300 Å,	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

2. Material und Methoden

7,8 x 300 mm	
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
Konfokales-Mikroskop (TCS-SP5)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtstredetektor miniDAWM TREOS	Whyatt Technology, Dernbach, Deutschland
Magnetenrührer RH basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Massenspektrometer Orbitrap Elite 1000	Thermo, Schwerte, Deutschland
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Rotor Gene RG-3000	Corbett Life Science, Qiagen, Hilden, Deutschland
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
PCR Cycler TPersonal	Biometra, Göttingen, Deutschland
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Spektrometer Genios Pro	Tecan. Crailsheim, Deutschland
Spektrometer Smart Spec Plus	Bio-Rad, München, Deutschland
Spektrometer Spectramax M5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop JEOL JEM-1400 120 kV	Jeol, München, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima Max-XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Waagen	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Western Blot Apparaturen	Bio-Rad, München, Deutschland

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerase Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR (polymerase Kettenreaktion, *Polymerase chain reaction*) wurde für die Amplifikation von DNA im Zuge der DNA-Klonierung genutzt. Diese wurde mit Hilfe des *Biometra T Personal Cycler* durchgeführt. Das Protokoll der PCR wurde entsprechend den Herstellerangaben von New England Biolabs zur *Phusion High Fidelity* Polymerase durchgeführt. Die entstandenen PCR Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8 – 1 % Agarose (w/v) in TAE Puffer) kontrolliert und für weitere Klonierungsschritte mit Hilfe von Komplettsystemen (2.1.8) aufgearbeitet. Als Laufpuffer wird 1 x TAE Puffer verwendet und DNA Proben wurden für den Auftrag mit 6 x Probenpuffer versetzt.

2. Material und Methoden

<u>50 x TAE Puffer</u>		<u>6 x Probenpuffer</u>	
Tris pH 8	2,42 g	Glycerol	30 ml
Acetat	57,1 ml	EDTA 0,5 M	30 ml
EDTA 0,5 M	100 ml	Bromphenolblau	30 mg
ad 1 l H ₂ O		ad 100 ml H ₂ O	

2.2.2. Oligomutagenese

Mit Hilfe der Oligomutagenese wurden spezifische Mutationen mittels PCR in ein Gen eingefügt. Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotide generiert, die einen gezielten Basenaustausch ermöglichen (2.1.4). Zusätzlich wurden Basen so ausgetauscht, dass eine neue Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen entstand, um so die erfolgreiche Mutation schnell überprüfen zu können. Für die Oligomutagenese wurde die *Pfu Ultra* Polymerase von Stratagene verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Ein Verdau der Ausgangs-DNA erfolgt durch die Restriktionsendonuklease *DpnI*, die ausschließlich das methylierte Edukt proteolyseiert. Die Proteolyse wurde über eine Dauer von 16 Stunden bei 37°C durchgeführt. Der Erfolg der Oligomutagenese ließ sich über Agarose-Gelelektrophorese überprüfen. Anschließend wurde das PCR Produkt für die chemische Transformation von chemisch kompetenten Bakterien (*E. coli* DH5 α , 2.1.2) verwendet.

2.2.3. Restriktionsverdau und Ligation

Im Anschluss an eine PCR wurde das Produkt aufgereinigt und für die weitere Klonierung mittels Restriktionsendonukleasen verdaut. Ebenso wurde mit dem Zielvektor verfahren und beide Verdauprodukte wurden mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen verdauten die DNA so dass überhängende Ende (*sticky ends*) verbleiben. Diese *sticky ends* ließen sich zu einem DNA Strang ligieren. Für die Ligation wurde die *Rapid* Ligase der Firma Roche verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Wurde das Komplettsystem In-Fusion HD Cloning Kit (2.1.8) genutzt, wurde nur der Zielvektor mittels Restriktionsendonukleasen verdaut und eine In-Fusion Reaktion anstelle der Ligation durchgeführt.

Des Weiteren wurden Restriktionsendonukleasen zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durch PCR und anschließende Ligation bzw. Oligomutagenese einsetzen. Zu diesem Zweck wurde die DNA nach Herstellerangaben verdaut und über eine Agarose-Gelelektrophorese der Erfolg des Verdaus überprüft. Anschließend wurden die neu klonierten Plasmide von der Firma GATC (Köln) sequenziert.

2.2.4. Kultivierung von *E. coli* und Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Mit einer Impföse wurde mit einer einzelnen *E. coli* Kolonie NZA-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft. Für die Isolierung von DNA aus *E. coli* wurde für kleinere Mengen eine 5 ml Kultur über Nacht bei 37°C angezogen. Wurden größere DNA Mengen benötigt, wurden 200 ml bzw. 400 ml NZA-Medium, je nach Kopienanzahl der Plasmide, genutzt. Vorkulturen für die Überproduktion rekombinanter Proteine wurden mit frisch transformierten Zellen angeimpft, da sonst die Expressionseffizienz des Zielgens reduziert wurde.

Die Zelldichte von *E. coli* Flüssigkulturen wurde über die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt, da hier die Absorption der verwendeten Nährmedien am geringsten ist. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einer Zellzahl von 5×10^8 Zellen pro ml (Miller, 1972).

2.2.5. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde die Rubidiumchlorid Methode verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde NZA Medium, beispielsweise 50 ml, mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C angezogen und anschließend ca. 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Die *E. coli* Kultur wurde bei 3000xg für 15 Minuten bei 4°C geerntet. Das so entstandene Zellpellet wurde vorsichtig in einem Drittel des Kulturvolumens eiskalter RF1 Lösung resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die resuspendierten *E. coli* für 15 Minuten bei 3500xg und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 1/12,5 Anteil des Kulturvolumens sehr vorsichtig in RF2 resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis konnten die jetzt chemisch kompetenten *E. coli* aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

	<u>RF1 Lösung</u>		<u>RF2 Lösung</u>
RbCl	100 mM	Mops pH 6,8	10 mM
MnCl ₂	50 mM	RbCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	75 mM
KAc pH 5,8	30 mM	Glycerin	15 % (w/v)
Glycerin	15 % (w/v)		

2.2.6. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Je 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* wurden für die Transformation mit DNA vermischt. Dazu konnten Ligationsansätze (2.2.3), PCR Produkte von Oligomutagenesen (2.2.2) oder isolierte Plasmid DNA (2.2.7) verwendet werden. Das Gemisch wurde 10 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für eine Minute. Nach zwei Minuten Inkubation auf Eis wurden 900 µl NZA Medium zugegeben und die transformierten *E. coli* im Thermoblock bei 37°C für mindestens eine Stunde bei 300 rpm zur phänotypischen Expression geschüttelt. Danach wurden die *E. coli* entweder auf einer NZA Agar Platte ausgestrichen oder in NZA Medium für eine Flüssigkultur gegeben.

2.2.7. Isolierung von DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde mit den entsprechenden Komplettsystemen von Qiagen (2.1.8) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.8. Isolierung von RNA

Die RNA wurde aus eukaryontischen Zelllinien mit Hilfe des Komplettsystems NucleoSpin RNA II Kit (2.1.8) isoliert. Für weitere Arbeitsschritte wurde die Konzentration der isolierten RNA bestimmt (2.2.9), anschließend bei -80°C gelagert und möglichst schnell die cDNA Synthese durchgeführt (2.2.10), da RNA instabil ist.

2.2.9. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die Referenz ist das jeweilige Lösungsmittel der DNA bzw. RNA. Ein Maß für die Reinheit der DNA oder RNA ist der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Lag dieser Quotient im Fall von DNA bei 1,8 oder im für RNA bei 2,0 ist die Probe als sauber anzusehen.

2.2.10. cDNA Synthese

Die isolierte RNA (2.2.8) wurde mit Hilfe des Komplettsystems Verso cDNA Kit (2.1.8) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt und OligodT

Primer genutzt. Als Kontrolle wurde eine cDNA Synthese ohne Reverse Transkriptase durchgeführt.

2.2.11. Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)

Die Untersuchung der Genexpression auf Ebene der mRNA ließ sich mittels quantitativer Echtzeit PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) durchführen. Zu diesem Zweck wurde zuvor die RNA isoliert (2.2.8) und in cDNA umgeschrieben (2.2.10). Mit Hilfe der qRT-PCR ließen sich auch geringe Unterschiede in der Transkription verschiedener Gene feststellen (Pfaffl *et al.*, 2004, Pfaffl *et al.*, 2002). Das hier genutzte Komplettsystem basiert auf dem Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green in die kleine Furche der neu synthetisierten DNA (2.1.8). Die Oligonukleotide, die für diese PCR Reaktion zu nutzen sind, wurden so designt, dass das Oligonukleotid Intron-übergreifend liegt. So sollte verhindert werden, dass möglicherweise vorhandene genomische DNA als Edukt genutzt wurde. Des Weiteren sollten die Oligonukleotide eine Länge von 19 bis 21 Basen haben, eine Schmelztemperatur von 58 bis 60°C und einen GC Gehalt von 40 bis 60 %. Der amplifizierte Bereich sollte eine Länge von 90 bis 200 Basen haben und generell möglichst weit am 3' Ende des Gens liegen, um so sicher zu stellen, dass auch eine komplett transkribierte mRNA betrachtet wird. Für neu entworfene Oligonukleotide musste die spezifische Primereffizienz bestimmt werden, da die Effizienz der Oligonukleotide, auch *Primer* genannt, entscheidend für die Sensitivität der qRT-PCR ist. Dafür wurde ein Gemisch aus cDNA genutzt und verschiedene Verdünnungen (0,2 bis 100 ng) in die qRT-PCR eingesetzt. Mit Hilfe des zum qRT-PCR Cyclers gehörenden Rotor Gene Programms ließen sich so die Primereffizienzen berechnen, die für die Auswertungen benötigt wurden. Dazu wurden der dekadische Logarithmus der cDNA Mengen auf der Abzisse sowie die resultierenden C(T) Werte auf der Ordinate aufgetragen und die Steigung *m* ermittelt. Die Primereffizienz *E* ließ sich nun wie folgt berechnen:

$$E = 10^{(-\frac{1}{m})}$$

Spezifische Oligonukleotide zeigten eine Primereffizienz von mindestens 1,8. Als Basis zur Quantifizierung der qRT-PCR wurde die Methode nach Pfaffl verwendet. Hier wird die Expression des untersuchten Gens in Relation (*R*) zu einem Referenzgen betrachtet. Referenzgene sind so genannte *House-keeping* Gene, die eine konstant hohe Expression in verschiedenen Zelllinien zeigen.

$$R = \frac{(E \text{ Zielgen})^{\Delta C(T)_{Ziel (Kontrolle-Probe)}}}{(E \text{ Referenzgen})^{\Delta C(T)_{Ref (Kontrolle-Probe)}}$$

E Zielgen und E Referenzgen stehen für die Primereffizienzen für das betreffende Transkript. Die C(T) Werte wurden mit Hilfe des Programms Rotor Gene bestimmt. Der C(T) Wert bezeichnet dabei den Zyklus der PCR ab der eine bestimmte Probe einen Schwellenwert der Fluoreszenz erreicht hat. Dafür wurde zuvor die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert und der Schwellenwert der Fluoreszenz auf 0,025 festgelegt. Mit Hilfe des Referenzgens ließ sich unabhängig von der eingesetzten cDNA Menge eine Aussage darüber treffen, wie hoch die Expression des Zielgens ist. Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase verwendet. Für Calpain 2 ergab sich die Primereffizienz von 1,95. Für HTRA1 wurde die Primereffizienz 1,88 und für das Referenzgen GAPDH 1,98 genutzt.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Allgemeine Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Produktion größerer Mengen rekombinanter Proteine wurde in dieser Arbeit die heterologe Expression von humanen Genen in *E. coli* genutzt. Zu diesem Zweck wurde das Zielgen in einen gewünschten Vektor kloniert, die *E. coli* mit dem entstandenen Plasmid transformiert und die Expression durch verschiedene Induktoren gestartet. Im Verlauf dieser Arbeit wurden Vektoren mit einem T7 Promotor und *lac*-Operon genutzt. Die Expression des Zielgens wird hier durch das nicht von *E. coli* abbaubare Laktose Derivat Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert. Die Expression erfolgt unter einem T7 Promotor mittels T7 Polymerase, die durch den DE3 Phagen in das Genom des *E. coli* Stamms integriert wurde.

Das prinzipielle Vorgehen für die Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* wird im Folgenden beschrieben. Für die Expression des Zielgens wurde zunächst eine Vorkultur mit dem Expressionsstamm, der das gewünschte Plasmid enthält, angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur, meist zwischen sechs und zwölf Liter NZA Medium, auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C oder niedrigeren Temperaturen angezogen und ab einer OD₆₀₀ von 0,5, was der exponentiellen Wachstumsphase entspricht, induziert. Für die Induktion wurden 0,1 bis 0,5 mM IPTG zugegeben. Die Expression wurde bei niedrigeren Temperaturen maximal nach Inkubation über Nacht gestoppt. Die *E. coli* Zellen wurden durch 15 Minuten Zentrifugation bei 6000xg und 4°C angereichert. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet trocken bei -80°C bis zu mehreren Monaten gelagert oder das Zellpellet wurde direkt in ca. 1/100 des Ausgangsvolumens Lysepuffer resuspendiert.

2.3.2. Präparativer Zellaufschluss von *E. coli*

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet der Expression (2.3.1) in ca. 1/100 des Ausgangsvolumens resuspendiert und DNase (10 µg/ml) zugegeben. Dazu wurde für jedes Protein, das gereinigt wurde, ein individueller Lysepuffer verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte nun mit Hilfe der French Press für mindestens zwei Durchläufe. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 30 Minuten Zentrifugation bei 50.000xg und 4°C entfernt. Der Überstand konnte zur Proteinreinigung verwendet werden.

2.3.3. Reinigung von Calpain 2 aus *E. coli*

Die Proteinreinigung von Calpain 2 Heterodimeren wurde nach Expression im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) durchgeführt. Für diese Reinigung von rekombinantem Protein wurden *E. coli* BL21 (DE3) mit jeweils einem Plasmid mit einem Gen kodierend für die große Untereinheit und einem Plasmid mit einem Gen kodierend für die kleine Untereinheit transformiert. Dabei wurden verschiedene Kombinationen der Plasmide genutzt und so Calpain 2 aus *Rattus norvegicus* sowie *Homo sapiens* gereinigt (2.1.3). Die Hauptkulturen wurden für die Expression von Calpain 2 bei 25°C inkubiert. Ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Hauptkulturen für ca. 30 Minuten auf 18°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG. Die Expression fand über Nacht bei 18°C statt. Am nächsten Tag folgte die Anreicherung der Bakterien durch Zentrifugation bei 6000xg für 15 Minuten bei 4°C. Das Zellsediment wurde in 1/100 des Ausgangsvolumen Lysepuffer His oder Strep aufgenommen, je nachdem ob es sich um das Hybridprotein mit StrepII- oder mit His₆-Tag handelte. Der Zellaufschluss erfolgte an der French Press und die Zelltrümmer wurden bei 50.000xg für 30 Minuten bei 4°C durch Zentrifugation abgetrennt. Die anschließende Proteinreinigung erfolgte zunächst über eine Affinitäts- und dann über Größenausschlusschromatographie an einer FPLC Anlage bei 4 bis 8°C.

Rekombinantes Hybridprotein Calpain 2-StrepII wurde über einen 150 ml Superloop auf eine XK 16/20 Säule, gepackt mit ca. 10 ml Strep-Tactin Superflow Material, aufgetragen, das zuvor mit zwei Säulenvolumen Lysepuffer Strep äquilibriert worden war. Der Auftrag erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min, um eine ausreichende Bindung des StrepII-Tags an das Material zu gewährleisten. Die Säule wurde anschließend mit fünf bis zehn Säulenvolumen Lysepuffer Strep (4 ml/min) gewaschen und dann das gebundene Protein mit Elutionspuffer Strep eluiert bis das UV Signal wieder ca. 0 mAU

2. Material und Methoden

erreicht hatte. Ausgewählte Fraktionen des Waschschriffs sowie der Elution wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das zu reinigende Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels 50 kDa Vivaspin 20 Konzentratoren auf ein Volumen von 2 ml konzentriert. Das Strep-Tactin Superflow Material wurde nach Benutzung nach Herstellerangaben gereinigt und mehrfach verwendet.

Das rekombinante Hybridprotein Calpain 2-His₆-Tag wurde über einen 150 ml Superloop auf eine XK 16/20 Säule, gepackt mit 15 bis 30 ml Ni-NTA Fast Flow oder Ni-TED Material, mit 1,5 ml/min aufgetragen. Das Material wurde in 20 % Ethanol (v/v in Wasser) gelagert und vor Benutzung mit zwei Säulenvolumen Wasser gewaschen und zwei Säulenvolumen Lysepuffer His äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit dem gebundenen Calpain 2 mit fünf bis zehn Säulenvolumen Lysepuffer His und dann mit fünf bis zehn Säulenvolumen Waschluffer 1 M NaCl mit 4 ml/min gewaschen. Die Elution von Calpain 2 mit His-Tag erfolgte über einen Gradienten mit Elutionspuffer His bis 250 mM Imidazol, welches das gebundene Protein von der Säule verdrängt. Der Gradient umfasst die Stufen 30, 50, 80 und 100 % Elutionspuffer His gemischt mit Lysepuffer His. Auch hier wurden ausgewählte Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.3.7) analysiert und Fraktionen, die Calpain 2 enthielten vereinigt. Das Eluat wurde auf 2 ml Volumen mittels 50 kDa Vivaspin 20 Konzentratoren konzentriert. Die Nickel Affinitätsäulen wurden anschließend nach Herstellerangaben regeneriert und mehrfach verwendet.

Mit den konzentrierten Eluaten der Affinitätschromatographie wurde nun jeweils eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, um das Protein weiter zu reinigen, vor allem von Abbauprodukten und Aggregaten. Die Größenausschlusschromatographie wurde im präparativen Maßstab mit einer Superdex200 26/60 Säule durchgeführt. Die Säule wurde in 20 % Ethanol (v/v in Wasser) gelagert und vor Benutzung mit zwei Säulenvolumen Wasser gewaschen und mit zwei Säulenvolumen SEC Puffer äquilibriert. Der Auftrag des Eluats der Affinitätschromatographien erfolgte nach Zentrifugation für mindestens fünf Minuten bei 21.000xg und 4°C über einen 2 ml Loop. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,3 ml/min über Nacht oder mit 1,5 ml /min über eine Dauer von ca. vier Stunden. Durch vorherige Kalibrierung der Säule mit einem Proteinstandard (2.1.7) ließ sich abschätzen ab welchem Volumen das zu reinigende Calpain 2 erwartet wurde. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Fraktionen, die Calpain 2 enthielten, wurden vereinigt und im 50 kDa Vivaspin 20 Konzentrator auf ca. 1 ml Endvolumen konzentriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.3.6) wurde das gereinigte Calpain 2 aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2. Material und Methoden

Als Puffer für die Affinitätschromatographie von Calpain 2 wurden entweder LEW oder Tris Puffer verwendet. Für die Größenausschlusschromatographie wurden Tris oder Hepes Puffer verwendet, bei denen der pH Wert für 4 bis 8°C eingestellt wurde.

<u>Lysepuffer Strep LEW</u>		<u>Lysepuffer Strep Tris</u>	
NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM

<u>Elutionspuffer Strep LEW</u>		<u>Elutionspuffer Strep Tris</u>	
NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Desthiobiotin	2,5 mM	Desthiobiotin	2,5 mM

<u>Lysepuffer His LEW</u>		<u>Lysepuffer His Tris</u>	
NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Imidazol	20 mM	Imidazol	20 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM

<u>Waschpuffer 1 M NaCl LEW</u>		<u>Waschpuffer 1 M NaCl Tris</u>	
NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	1 M	NaCl	1 M

<u>Elutionspuffer His LEW</u>		<u>Elutionspuffer His Tris</u>	
NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM	Imidazol	250 mM

<u>SEC Puffer Hepes</u>		<u>SEC Puffer Tris</u>	
Hepes-NaOH pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM

2.3.4. Reinigung von HTRA1 aus Rosetta 2 (DE3)

Für die heterologe Expression der HTRA1 Varianten (2.1.3) wurde der *E. coli* Stamm Rosetta 2 (DE3) verwendet, der für eine bessere Expression von HTRA1 ein Plasmid kodierend für seltene tRNA Codons besitzt. Die Proteinreinigung wurde auf der Grundlage eines zuvor in dieser Arbeitsgruppe getesteten Protokolls durchgeführt und optimiert. Sechs bis zwölf Liter NZA Medium wurden mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 28°C inkubiert. Ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression mit Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für drei Stunden oder über Nacht bei 28°C. Die Anreicherung der *E. coli* wurde durch 15 Minuten Zentrifugation mit 6000xg bei 4°C durchgeführt. Das Zellsediment wurde in 1/100 des Ausgangsvolumens Lysepuffer Tris oder

2. Material und Methoden

Strep, je nach verwendetem Hybridprotein, resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte an der French Press. Die Zelltrümmer wurden bei 50.000xg für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde HTRA1 über Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie an einer FPLC Anlage bei 4 bis 8 °C gereinigt.

Die Reinigung des rekombinanten Hybridproteins HTRA1-StrepII erfolgte über 20 bis 30 ml Strep-Tactin Superflow Material in einer XK 16/20 Säule, das zuvor mit Lysepuffer Strep äquilibriert worden war. Der Überstand des Zellaufschlusses wurde über einen 150 ml Superloop mit 1,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit fünf bis zehn Säulenvolumen Lysepuffer Strep mit 4 ml/min gewaschen. Die Elution von gebundenem HTRA1 erfolgte mit Elutionspuffer Strep. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.3.7) analysiert und die Fraktionen, in denen HTRA1 zu erkennen ist, wurden vereinigt und mit einem 30 kDa Vivaspin 20 Konzentrador auf 2 ml Volumen konzentriert.

Das rekombinante Hybridprotein HTRA1-His₆-Tag wurde über einen 150 ml Superloop mit 1,5 ml/min auf 30 bis 50 ml Ni-NTA Fast Flow oder Ni-TED Material in einer XK 16/20 Säule geladen. Das Material wurde zuvor mit zwei Säulenvolumen Wasser gewaschen und mit zwei Säulenvolumen Lysepuffer His äquilibriert. Die Säule wurde nach dem Auftrag mit fünf bis zehn Säulenvolumen Lysepuffer His und anschließend mit fünf bis zehn Säulenvolumen Waschpuffer Imidazol und Waschpuffer 1 M NaCl mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer His. Die Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert und Fraktionen, die HTRA1 enthalten wurden vereinigt. Diese Fraktionen wurden mittels eines 30 kDa Vivaspin 20 Konzentrador auf 2 ml Volumen konzentriert.

Das konzentrierte Eluat der Affinitätschromatographie wurde nun mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Die Säule Superdex200 26/60 wurde zunächst mit zwei Säulenvolumen entgastem Wasser gewaschen und dann mit zwei Säulenvolumen entgastem SEC Puffer äquilibriert. Das Eluat wurde nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 21.000xg und 4°C über einen 2 ml Loop auf die Säule geladen und mit einer Geschwindigkeit von 0,3 ml/min über Nacht oder 1,5 ml/min für die Dauer von ca. vier bis fünf Stunden aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und HTRA1 enthaltende Fraktionen vereinigt. Diese wurden mit einem 30 kDa Vivaspin 20 Konzentrador konzentriert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (2.3.6) wurde das gereinigte HTRA1 aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2. Material und Methoden

<u>Lysepuffer His</u>		<u>Lysepuffer Strep</u>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Imidazol	20 mM	NaCl	300 mM
NaCl	300 mM		

<u>Waschpuffer Imidazol</u>		<u>Elutionspuffer Strep</u>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Imidazol	30 mM	NaCl	300 mM
NaCl	300 mM	Desthiobiotin	2,5 mM

<u>Waschpuffer 1 M NaCl</u>		<u>Elutionspuffer His</u>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	1 M	NaCl	300 mM
		Imidazol	250 mM

<u>SEC Puffer</u>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

2.3.5. Reinigung von Tau Proteinen aus Rosetta 2 (DE3)

Die Expression von Tau 4R und Tau F3 (2.1.3) erfolgte in Rosetta 2 (DE3). Die Reinigungen wurden auf der Grundlage von zuvor in dieser Arbeitsgruppe getesteten Protokollen durchgeführt. Sechs bis zwölf Liter NZA Medium wurden mit einer Vorkultur, die transformierte *E.coli* mit den für Tau kodierenden Plasmiden enthielten, auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 25°C inkubiert. Ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde mit 0,5 mM IPTG die Expression induziert und bei 18°C über Nacht inkubiert. Die Anreicherung der *E. coli* erfolgte am nächsten Tag durch 15 Minuten Zentrifugation bei 6000xg und 4°C. Das Zellsediment wurde in 1/200 des Ausgangsvolumens resuspendiert und der Zellaufschluss erfolgte an der French Press. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 50.000xg und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, für eine Dauer von 20 Minuten in einem Wasserbad auf 95°C erhitzt und anschließend bei 21.000 g und 4°C für 40 Minuten zentrifugiert. Tau Proteine sollten danach löslich im Überstand vorliegen, die cytosolischen Proteine des *E. coli* Expressionsstammes sollten größtenteils unlöslich im Pellet zu finden sein. Die anschließende Proteinreinigung erfolgte an einer FPLC Anlage bei 4 bis 8°C.

Der Überstand nach dem Erhitzen im Wasserbad wurde vereinigt und mit Hilfe eines 150 ml Superloops auf ein XK16/20 Säule, gepackt mit ca. 20 ml Hydroxyapatidmaterial, aufgetragen. Die Säule wurde zuvor in vier Säulenvolumen Lysepuffer Tau äquilibriert. Der

2. Material und Methoden

Auftrag der Probe erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/min, alle weiteren Schritte mit 3 ml/min. Die Säule wurde, nachdem die Probe aufgetragen war, mit vier Säulenvolumen Lysepuffer Tau und einem Gradienten mit dem Puffer NaCl Elution über zehn Säulenvolumen gewaschen. Tau Proteine eluieren typischerweise bei hoher Konzentration des Puffers NaCl Elution. Anschließend wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen NaCl Elutionspuffer, einem Gradienten mit Phosphat Elutionspuffer über zehn Säulenvolumen und mit vier Säulenvolumen Phosphat Elutionspuffer gewaschen. Diese Reinigung über Hydroxyapatidmaterial wurde mit dem Durchfluss des Auftrags mindestens zwei Mal wiederholt, bis nur noch geringe Anteile von Tau im Durchfluss mittels SDS-PAGE Analyse zu erkennen waren. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.3.7) analysiert und Tau enthaltende Fraktionen wurden vereinigt. Diese wurden mit Hilfe eines 30 kDa Vivaspin 20 Konzentrators für Tau 4R und eines 3 kDa Vivaspin 20 Konzentrators für Tau F3 auf ein Volumen von 2 ml konzentriert.

Die weitere Reinigung der Tau Proteine erfolgte über eine Größenausschlusschromatographiesäule Superdex200 26/60 im präparativen Maßstab. Die Säule wurde zuvor mit zwei Säulenvolumen Wasser gewaschen und anschließend mit zwei Säulenvolumen SEC Hepes Tau Puffer äquilibriert. Der Auftrag der konzentrierten Eluate der Hydroxyapatidsäule erfolgte nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 21.000xg und 4°C über einen 2 ml Loop. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit einer Flussrate 0,3 ml/min über Nacht durchgeführt. Die Fraktionen wurden anschließend über eine SDS-PAGE analysiert und Tau enthaltene Fraktionen eines UV Signal *Peaks* vereinigt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch relative Abschätzung mittels SDS-PAGE über einen Vergleich mit bekannten Mengen ähnlich großer Proteine (2.3.6). Für Tau 4R wurde BSA als Vergleich benutzt und Tau F3 wurde Lysozym verwendet.

<u>Lysepuffer Tau</u>		<u>Phosphat Elution</u>	
Hepes-NaOH pH 7,6	100 mM	Hepes-NaOH pH 7,6	100 mM
KPO ₄	10 mM	K ₂ HPO ₄	476,6 mM
DTT	2 mM	KH ₂ PO ₄	23,4 mM
		DTT	2 mM
<u>NaCl Elution</u>		<u>SEC Hepes Tau</u>	
Hepes-NaOH pH 7,6	100 mM	Hepes-NaOH pH 7,6	10 mM
KPO ₄	10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM
NaCl	1 M	TCEP	2 mM
DTT	2 mM		

2.3.6. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford nach Herstellerangaben (2.1.8) (Bradford, 1976). Aufgrund der geringen Extinktionskoeffizienten von Tau und HTRA1 war eine Proteinkonzentrationsbestimmung über die Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, nicht möglich. Um die Abweichungen der Proteinkonzentrationsbestimmungen ähnlich zu halten, wurde die Konzentration aller gereinigten Proteine mit Hilfe des Roti-Nanoquant Komplettsystems bestimmt. Ebenso wurde mit Lysaten eukaryontischer Zelllinien verfahren, wobei hier auf eine entsprechende Verdünnung des Lysats zu achten ist, um den Assay nicht zu beeinflussen. Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford ist für Tau Proteine ungeeignet, da diese über wenig geladene Aminosäuren verfügen, die für diese Methode notwendig sind. Daher wurden für Tau 4R und F3 die Proteinkonzentration mittels Coomassie-Blau gefärbter (2.3.8) SDS-PAGE (2.3.7) Analyse durch Vergleich mit bekannten Mengen von BSA (für Tau 4R) und Lysozym (für Tau F3) abgeschätzt.

2.3.7. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat Gelelektrophorese (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelectrophoresis*, SDS-PAGE) erfolgte nach dem Prinzip von Laemmli (Laemmli, 1970). Im Sammelgel waren 6 % Acrylamid enthalten, die Acrylamidkonzentration im Trenngel wurde je nach zu analysierender Probe zwischen 10 und 15 % variiert. Die Proteine wurden bei konstanter Spannung von 150 bis 200 V aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau (2.3.8) oder Silberfärbung (2.3.9) gefärbt oder mittels Western Blot (2.3.10) und anschließender Immundetektion nachgewiesen.

<u>SDS-Trenngelpuffer</u>		<u>SDS-Sammelgelpuffer</u>	
Tris-HCl pH 8,8	1,5 mM	Tris-HCl pH 6,8	0,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)
<u>10 x SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer</u>		<u>5 x SDS-Probenpuffer</u>	
Tris-HCl	333 mM	Tris-HCl pH 6,8	0,3 M
SDS	1 % (w/v)	SDS	10 % (w/v)
Glycin	1,92 M	Glycerol	40 % (v/v)
		Bromphenolblau	0,4 % (w/v)

Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE wurden nach den Angaben in Tabelle 2.12 angefertigt.

2. Material und Methoden

Tab. 2.12: Polyacrylamid–Gele für die SDS-PAGE

Angaben pro Polyacrylamid–Gel mit 10, 12 oder 15 % Acrylamid im Trenngel

	10 % [ml]	12 % [ml]	15 % [ml]	Sammelgel [ml]
SDS-Trenngelpuffer	1,25			-
SDS-Sammelgelpuffer	-	-	-	1,25
Acrylamid	1,65	2	2,5	0,75
H ₂ O	2,1	1,75	1,25	3
TEMED	0,001	0,001	0,001	0,0175
APS	0,025	0,025	0,025	0,035

2.3.8. Coomassie-Blau Färbung

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine konnten mittels Coomassie-Blau Färbung angefärbt werden. Zu diesem Zweck wurde die Färbemethode nach Fairbanks genutzt (Fairbanks *et al.*, 1971). Das Gel wurde für eine Minute in Coomassie Lösung A in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gel für je eine Minute mit Coomassie Lösung B, C und D in einer Mikrowelle erhitzt. In Coomassie Lösung D wurde das Gel für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur zur vollständigen Entfärbung inkubiert.

	<u>Coomassie Lösung A</u>		<u>Coomassie Lösung B</u>
Isopropanol	25 % (v/v)	Isopropanol	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
Commassie Blau R-250	0,05 % (w/v)	Commassie Blau R-250	0,005 % (w/v)
	<u>Coomassie Lösung C</u>		<u>Coomassie Lösung D</u>
Essigsäure	10 % (v/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
Commassie Blau R-250	0,002 % (w/v)		

2.3.9. Silberfärbung

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE via NuPAGE Novex Midi Gel, Invitrogen, in Mes- oder Mops-Laufpuffer, konnten die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert werden. Diese Silberfärbung wurde entweder mit Hilfe eines Komplettsystems SilverQuest (2.1.8) durchgeführt oder nach einer modifizierten Methode nach Blum (Blum *et al.*, 1987). Für diese Methode wurde das Gel zunächst in Fixierlösung für 30 Minuten fixiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Fixierlösung wurde das Gel zwei Mal für je zehn Minuten mit 30 % Ethanol (p.a. (v/v)) und schließlich für 20 bis 60 Minuten in Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation in

2. Material und Methoden

Thiosulfatlösung für eine Minute gefolgt von drei Waschschritten mit Wasser für je 20 Sekunden. Danach wurde das Gel für 20 Minuten in Silbernitratlösung inkubiert und wieder drei Mal je 20 Sekunden mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel in eine neue Färbeschale überführt und bis zur deutlichen Färbung in Entwicklerlösung inkubiert. Gestoppt wurde die Färbung durch einmaliges kurzes waschen in Wasser und zehn Minuten Inkubation in 5 % Essigsäure (v/v). Vor der Dokumentation des Gels wurde dieses für mindestens zehn Minuten in Wasser gewaschen.

<u>Fixierlösung</u>		<u>Thiosulfatlösung</u>	
Ethanol	40 % (v/v)	Natriumthiosulfat	0,02 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)		
37 % Formaldehyd	500 µl / l		
<u>Silbernitratlösung</u>		<u>Entwicklerlösung</u>	
Silbernitrat	0,2 % (w/v)	Natriumcarbonat	3 % (w/v)
37 % Formaldehyd	750 µl / l	Natriumthiosulfat	0,0004 % (w/v)
		37 % Formaldehyd	500 µl / l
<u>MES-Laufpuffer</u>		<u>Mops-Laufpuffer</u>	
Mes pH 7,3	50 mM	Mops pH 7,7	50 mM
Tris-Base	50 mM	Tris-Base	50 mM
SDS	0,1 (w/v)	SDS	0,1 (w/v)
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM

2.3.10. Western Blot und Immundetektion

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion wurden diese von einem Gel nach SDS-PAGE (2.3.7) mit Hilfe einer *Blotting* Apparatur auf eine PVDF Membran übertragen. Zuvor wurden Gel, *Whatman* Filterpapiere und die PVDF Membran in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF Membran wurde zusätzlich noch durch eine Inkubation in 100 % Methanol für eine Minute aktiviert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte durch *Tankblot* oder *Semidry Blot*. Im Fall des *Tankblot* wurden dem Transferpuffer 20 % Methanol (v/v) zugesetzt und der Transfer bei 100 V für eine Stunde durchgeführt. Für den *Semidry Blot* wurden 10 % Methanol (v/v) im Transferpuffer benötigt. Der Transfer erfolgte hier pro Gel mit 18 V über 18 Minuten oder 70 mA über 45 Minuten. Der Erfolg des Transfers ließ sich anhand eines transferierten vorgefärbten Proteinstandards erkennen. Die PVDF Membran wurde anschließend mit 3 % BSA (w/v) bzw. 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C

2. Material und Methoden

blockiert. Welches Transfersystem und Blockierungsreagenz genutzt wurde, musste für jeden Antikörper getestet werden.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in spezifischer Verdünnung in mit 3 % BSA (w/v) bzw. 5 % Milchpulver (w/v) versetztem TBS-T. Wurden die Primärantikörper mehrfach verwendet, wurde der Antikörperlösung noch 0,05 % Natriumazid zugesetzt und diese bei 4°C gelagert. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wurde die Membran drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und schließlich mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden Meerrettichperoxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper in Verdünnungen nach Herstellerangaben genutzt. Nach dieser letzten Inkubation wurde die Membran mindestens drei Mal für fünf Minuten für Sekundärantikörper mit AP als Konjugat und mindestens drei Mal für 15 Minuten für HRP konjugierte Sekundärantikörper gewaschen. Die Entwicklung der AP Färbung erfolgte nach kurzer Inkubation der Membran in AP Puffer und anschließender Zugabe von Entwicklerlösung AP. Nach ausreichender Färbung wird diese durch waschen in Wasser gestoppt und die Membran anschließend getrocknet. Die Entwicklung der HRP Färbung erfolgt nach mindestens zehn Minuten Inkubation in TBS mit Hilfe von Komplettsystemen nach Herstellerangaben (2.1.8).

<u>Transferpuffer</u>		<u>TBS</u>	
Tris-HCl pH 8,3	15 mM	Tris-HCl pH 7,5	30 mM
Glycin	120 mM	NaCl	150 mM
SDS	0,2 % (w/v)		
<u>TBS-T</u>		<u>AP Puffer</u>	
Tris-HCl pH 7,5	30 mM	Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	150 mM	NaCl	100 mM
Tween20	0,05 % (v/v)	MgCl ₂	5 mM
<u>Entwicklerlösung AP</u>			
Tris-HCl pH 7,5	100 mM		
NaCl	100 mM		
MgCl ₂	5 mM		
NBT	3,3 g / 10 ml (in DMF gelöst)		
BCIP	1,65 g / 10 ml (in H ₂ O gelöst)		

Die verwendeten Primärantikörper und ihre Verdünnungen sind in Tab. 2.13 aufgeführt.

Tab. 2.13: Primärantikörper Western Blot

Primärantikörper	Blockierungsreagenz	Verdünnung
Penta-His-Tag	3% BSA	1:5.000
StrepII-Tag	3% BSA	1:1000
HTRA1	5% Milchpulver	1:1000
CAPNS1	3% BSA	1:5.000
CAPN2 (Cell signaling)	5% BSA	1:1.000 (Über Nacht bei 4°C)
CAPN2 (Sigma)	5% Milchpulver	1:500

2.3.11. Proteolyse von pNA gekoppelten Peptiden zur Aktivitätsbestimmung

Die proteolytische Aktivität von Proteasen ließ sich durch die Spaltung von synthetisch hergestellten Peptiden mit einer pNA Gruppe (para-Nitroanilin) bestimmen. Die Menge des freigesetzten pNA ließ sich mittels Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmen und ist ein Maß für die Aktivität der Protease. Für die Aktivitätsbestimmung von HTRA1 wurde das Peptid mit der Sequenz VFNTLPMMGKASPV-pNA genutzt. Es wurden 50 mM Peptidsubstrat und 1 µM HTRA1 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer auf 100 µl Volumen aufgefüllt (wenn nicht anders erwähnt mit 50 mM Tris-HCl pH 8), bei 37°C und 1000 rpm eine Minute vorinkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm jede Minute über einen Zeitraum von zwei Stunden bei 37°C bestimmt. Die errechnete spezifische Aktivität beruhte mindestens auf einfachen Doppelbestimmungen und für die Berechnung wurde der jeweils linear ansteigende Bereich der Messkurve verwendet. Als Formel wurde genutzt:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E_{405} \times \text{Vol}}{m \times \varepsilon \times t}$$

ΔE_{405} = Extinktionsänderung bei 405 nm im gewählten Messzeitraum

Vol = Endvolumen des Reaktionsansatzes in ml

m = Menge des eingesetzten Protein in mg

ε = Extinktionskoeffizient des pNA ($8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

t = gewählter Messzeitraum in Minuten

2.3.12. Proteolyse von AMC gekoppelten Peptiden zur Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der gereinigten Calpain 2 Heterodimere (2.3.3) wurde durch die Proteolyse des Substrats Suc-LLVY-AMC (N-Succinyl Leu-Leu-Val-Tyr-7 Amido-4-Methylcoumarin) bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung beruht dabei auf der Freisetzung des AMC und dem damit verbundenen Anstieg der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge

2. Material und Methoden

von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Aktivitätsbestimmung wird, sofern nicht anders vermerkt, bei 23°C im Reaktionspuffer AMC durchgeführt. Es wurden 1 µM Calpain 2 und 200 µM Substrat in 50 µl Volumen eingesetzt und in einer schwarzen 96-Well-Platte mit transparentem Boden vermischt, für eine Minute bei 23°C mit 1000 rpm geschüttelt und schließlich die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 90 Minuten jede Minute gemessen. Als Kontrolle wurden 2,5 mM Iodacetamid als Inhibitor von Cysteinproteasen eingesetzt.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta RFU \times f}{m \times t}$$

ΔRFU = Änderung der relativen Fluoreszenz (*relative fluorescence units*, RFU) im gewählten Messzeitraum

f = Korrekturfaktor aus Kalibrierung mit freiem AMC

m = Menge des eingesetzten Protein in mg

t = gewählter Messzeitraum in Minuten

Reaktionspuffer AMC

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	100 mM
CaCl ₂	5 mM

2.3.13. Proteolyse von Tau zur Aktivitätsbestimmung

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Aktivität von Proteasen ist die Inkubation mit Proteinsubstraten. Als Proteinsubstrate wurden im Verlauf dieser Arbeit Tau 4R und Tau F3 verwendet. Durch SDS-PAGE (2.3.7) und anschließende Coomassie-Blau (2.3.8) oder Silberfärbung (2.3.9) wurde die Proteolyse der Proteinsubstrate kontrolliert. Grundsätzlich wurde, wenn nicht anders erwähnt, ein zehnfacher molarer Überschuss des Proteinsubstrats eingesetzt. Für die Proteolyse durch HTRA1 wurde als Reaktionspuffer 50 mM Tris pH 8 gewählt und der Reaktionsansatz für zehn Minuten bis über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. In definierten Abständen wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse entnommen. Für die Proteolyse der Proteinsubstrate durch Calpain 2 wurde der Reaktionspuffer AMC (2.3.12) gewählt und der Reaktionsansatz für zwei Minuten bis über Nacht bei 23°C und 300 rpm inkubiert. In der Proteolyse von fibrillärem Tau wurde dem Puffer noch 5 mM TCEP hinzu gesetzt.

Zur Untersuchung der Interaktion von Calpain 2 und HTRA1 wurden beide Proteasen vor Zugabe des Substrats für 10 Minuten bei der verwendeten Assaytemperatur vorinkubiert. Erst nach der Vorinkubation wurde durch Zugabe des Substrats der Verdau gestartet.

2.3.14. *In vitro* Pulldown-Assay über magnetische *Beads*

Für die Untersuchung der Interaktion von Calpain 2 und HTRA1 wurden *in vitro* Pulldown Versuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde HTRA1 mit StrepII-Tag und Calpain 2 mit His-Tag sowie Strep-Tactin magnetische *Beads* verwendet. Beide Proteasen wurden in Lysepuffer Strep Tris (2.3.3) für zehn Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Bindung an die, zuvor mit Wasser und Lysepuffer Strep Tris gewaschenen, Strep-Tactin *Beads* erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die *Beads* wurden mit Hilfe eines magnetischen Ständers von der Lösung getrennt. Anschließend wurden die *Beads* vier Mal mit dem zehnfachen *Bead* Volumen Lysepuffer Strep Tris gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem halben *Bead* Volumen Elutionspuffer Strep Tris und einer Inkubation für fünf Minuten. Die Elution wurde meist drei Mal wiederholt und die verbleibenden Proteine durch fünf Minuten aufkochen bei 95°C eluiert. Anschließend konnten die Proben der einzelnen Schritte mittels SDS-PAGE (2.3.7) und Coomassie-Blau Färbung (2.3.8) oder Western Blot (2.3.10) analysiert werden.

2.3.15. Analytische Größenausschlusschromatographie

Die analytische Größenausschlusschromatographie wurde mittels einer FPLC Anlage mit einer Superdex200 5/150 GL Säule bei 4°C durchgeführt. Die Säule wurde in 20 % Ethanol (v/v) gelagert und zunächst mit zwei Säulenvolumen entgastem Wasser gewaschen und mit zwei Säulenvolumen entgastem Puffer äquilibriert. Es wurden unterschiedliche Puffer genutzt, die alle mindestens 150 mM NaCl enthielten und einen pH Wert von pH 6 bis 9 hatten. Als bester Puffer wurde 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl festgestellt. Calpain 2 und HTRA1 wurden zuvor in verschiedenen molaren Verhältnissen (30 µM bis 150 µM, Verhältnisse 3:1, 1:1 und 1:3) gemischt und bei 37°C für zehn Minuten und 300 rpm vorinkubiert. Nach Zentrifugation für mindestens fünf Minuten bei 21.000xg und 4°C wurde die Mischung über einen 25 µl Loop auf die Säule injiziert. Die Größenausschlusschromatographie wurde bei einer Flussrate von 0,15 ml/min durchgeführt und die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.3.7) und anschließender Silberfärbung (2.3.9) oder Western Blot (2.3.10) analysiert. Anhand einer zuvor durchgeführten

Kalibrierung der Säule mit einem Proteinstandard (2.1.7) ließ sich die Größe der zu beobachtenden Proteinspezies abschätzen.

2.3.16. Heparin-induzierte Fibrillenbildung von Tau

Gereinigte Tau Proteine (2.3.5) konnten durch Zugabe von Heparin fibrilläre Strukturen ausbilden (Wilson & Binder, 1997, Giasson *et al.*, 2003). Die Heparin induzierte Bildung von Tau Fibrillen wurde durch Zugabe von 50 μM Heparin zu 20 μM Tau Protein, das zuvor bei 55°C für zehn Minuten bei 800 rpm inkubiert worden war, in Tau Fibrillen Puffer gestartet. Gleichzeitig wurde 1 mM DTT frisch zugegeben, da DTT eine geringe Stabilität bei hohen Temperaturen aufweist. Die Mischung wurde für Tau 4R für 72 Stunden und für Tau F3 für 24 Stunden bei 37°C und 900 rpm inkubiert. Jede 24 Stunden wurde 1 mM DTT erneut frisch zugegeben. Die Fibrillenbildung ließ sich mittels Thioflavin T (ThT) Fluoreszenz verfolgen, da sich ThT an amyloide Strukturen anlagert. Zu diesem Zweck wurden 5 μl des Tau Ansatzes mit 45 μl ThT (12 μM in 50 mM Glycin pH 8,5) in einer schwarzen 96-Well-Platte mit transparentem Boden vermischt, für eine Minute bei 37°C mit 900 rpm geschüttelt und die Fluoreszenz mit einer Anregung bei 440 nm und einer Emission bei 480 nm gemessen.

Tau Fibrillen Puffer

Natrium Acetat pH 7,2 100 mM
DTT 2 mM

2.3.17. Acetonfällung

Die Acetonfällung von Proteinproben erfolgte durch Zugabe des sechsfachen Volumen -20°C kaltem Aceton. Die Proben wurden für mindestens zwei Stunden oder über Nacht bei einer Temperatur von -80°C inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort abgenommen und die restliche Lösung am Konzentrator bei 45°C eingedampft. Die Proben konnten anschließend für die Massenspektrometrie (2.3.19) aufgearbeitet werden.

2.3.18. AFM

Mit Hilfe des Rasterkraftmikroskop (*Atomic force microscope*, AFM) ließen sich die Tau Fibrillen visualisieren. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Chemische Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnung von etwa 4 μM Tau in PBS erstellt. Davon wurden 5 μl auf eine Mica

2. Material und Methoden

Membran gegeben und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 15 µl TAEMg Puffer zugegeben und die Probe im AFM vermessen.

TAEMg Puffer

Tris-HCl pH 8	40 mM
EDTA	2 mM
Mg(OAc) ₂	12,5 mM
Essigsäure	20 mM

2.3.19. Massenspektrometrie

Die Analyse von entstandenen Fragmenten von einigen Proteinverdauen (2.3.13) durch Calpain 2 und HTRA1 wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Chemische Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden durch Acetonfällung (2.3.17) und Aufarbeitung über C18 Material vorbereitet und mit Hilfe des Massenspektrometers Orbitrap Elite untersucht. Für die Aufarbeitung wurden die gefällten Proben in 0,1% Ameisensäure resuspendiert, durch kurze Inkubation im Ultraschallbad gelöst und mittels vortexen vermischt. C18 Material wurde in Pipettenspitzen, sogenannten *Stage Tips*, vorbereitet und durch Zugabe von je 50 µl 100 % Methanol (p.a.) aktiviert. Die Lösungen in den *Stage Tips* wurden jeweils durch Zentrifugation bei 400xg für zwei Minuten entfernt oder manuell durchgedrückt. Nach Aktivierung mit 100 % Methanol wurden die *Stage Tips* mit je 50 µl frischem STS-B und anschließend 50 µl frischem STS-A gespült. Die angesäuerte Probe wurde nun auf das C18 Material in den *Stage Tips* gegeben und durch Zentrifugation die Lösung entfernt. Das C18 Material wurde nun mit je 50 µl STS-A gewaschen und die Peptide wurden durch zweimalige Zugabe von je 50 µl STS-B eluiert (Rappsilber *et al.*, 2007). Das Eluat wurde am Eppendorf Konzentrador bei 45°C einkonzentriert und anschließend in 0,5 % Ameisensäure (v/v) resuspendiert, durch kurze Inkubation im Ultraschallbad gelöst und mittels vortexen vermischt. Die Proben wurden mittels LC/MS analysiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte an einer Easy-nLC 1000 mit einer Nanospray Flex-Ion Ionenquelle. Die Massenspektrometrische Auftrennung wurde an einer Orbitrap Elite 100 durchgeführt und mittels Proteome Discoverer und Mascot analysiert (Michalski *et al.*, 2012, Olsen *et al.*, 2005, Perkins *et al.*, 1999).

<u>STS-A</u>		<u>STS-B</u>	
Ameisensäure	0,5 % (v/v)	Acetonitril	80 % (v/v)
		Ameisensäure	0,5 % (v/v)

2.3.20. Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Proteasenkompleses aus Calpain 2 und HTRA1 wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Raunser am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt. Der Komplex wurde vor Ort generiert und an einer FPLC Anlage auf einer Superdex200 10/300 Säule von den einzelnen Proteinen getrennt (2.3.15). Die Menge der eingesetzten Proteine wurde im Vergleich zu analytischen Größenausschlusschromatographie erhöht und das injizierte Volumen lag bei 100 µl. Der Komplex wurde danach mittels Negativ-Staining Verfahren mit Uranyl-Formiat oder -Acetat angefärbt und auf einem geladenen Gitternetz immobilisiert (Ohi *et al.*, 2004, Brocker *et al.*, 2012). Zu diesem Zweck wurden 4 µl der Proteinprobe für 40 Sekunden auf einem durch Gitternetz inkubiert, dass durch Glimmentladung frisch präparierten und zuvor mit einem dünnen Kohlefilm beschichtet worden war. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem *Whatman* Filterpapier entfernt, das Gitternetz drei Mal mit einem Tropfen Wasser gewaschen und schließlich mit 0,75 % Uranyl-Formiat oder 1 % Uranyl-Acetat für zwei Minuten gefärbt. Die Färbelösung wurde wieder mittels *Whatman* Filterpapiers entfernt und das Gitternetz getrocknet. Die Dokumentation des gefärbten Komplexes wurde mit einem JEOL JEM-1400 Transmissionselektronenmikroskop, dass mit einer LaB₆ Kathode ausgestattet ist und mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV arbeitet, durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 82.553 fachen Vergrößerung mittels einer 4k x 4k CMOS Kamera mit einer Pixelgröße von 1,89 Å / Pixel.

2.3.21. MALS-SEC

Die Analyse des Proteasenkompleses aus Calpain 2 und HTRA1 über MALS-SEC (*multi-angle light scattering and size exclusion chromatography*) wurde in Kooperation mit dem Institut für Biochemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Proteine wurden über ein HPLC System getrennt (Agilent 1260 HPLC, Agilent Bio SEC-5 300 Å, 7,8 x 300 mm). Die verwendete Säule wurde zuvor mit dem HC SEC Puffer äquilibriert. Das HPLC System wurde mit einem Dreiwinkel Lichtstreuendetektor (miniDAWM TREOS, Wyatt Technology) und einem Brechungsindex Detektor (Optilab rEX, Wyatt Technology) kombiniert. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms Astra 5.3420 analysiert.

HC SEC Puffer

Bicin pH 9 50 mM

NaCl 150 mM

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Alle Arbeiten für die Kultivierung eukaryontischer Zelllinien (2.1.2) wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen und in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zusammensetzung der benutzten Medien ist in Tab. 2.14 dargestellt.

Tab. 2.14: Zellkultur Medien

Zelllinie	Medium	Zusätze	Antibiotikum
HeLa	DMEM	10 % FCS	1 % Pen/Strep
SH-SY5Y	DMEM	10 % FCS 1:1 F12	1 % Pen/Strep

2.4.2. Auftauen und Passagieren von eukaryontischen Zelllinien

Die im Stickstofftank bei ca. -196°C oder im Ultragefrierschrank bei -152°C gelagerten Zellen wurden auf Eis transportiert und möglichst schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Pro einem ml gekühlte Zellen wurde ein ml Medium zugegeben, in ein 15 ml Reaktionsgefäß umgefüllt und für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS gewaschen und wieder für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in fünf ml Medium resuspendiert und in einer Zellkulturschale mit sechs cm Durchmesser ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und wenn nötig Selektionsantibiotikum für transfizierte Zellen hinzugegeben.

Eukaryontische Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen passagiert um ein Überwachsen der Zellkulturschalen zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde das Medium aus den Zellkulturschalen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und ein fünftel des, für die Zellkulturschale üblichen, Volumens Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun in Trypsin/EDTA für fünf bis zehn Minuten im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Zellkulturschalenboden wurde am Lichtmikroskop überprüft und die Trypsin Aktivität durch fünffache Verdünnung mit Medium gestoppt. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und in eine neue Zellkulturschale in den Verdünnungen 1:5 bis 1:20 ausgesät.

2.4.3. Herstellung von cytoplasmatischen Proteinlysaten

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryontischen Zelllinien wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellyse mit kaltem Lysepuffer (RIPA Puffer oder NP-40 Puffer) und frisch zugesetztem Protease Inhibitor durch Inkubation für eine Minute auf Eis, abschaben der Zellen mit einem sterilen Zellschaber und anschließender weiterer Inkubation für 30 Minuten auf Eis oder im Kühlraum. Nach der Zellyse wurden die entstandenen Zelltrümmer durch 15 Minuten Zentrifugation bei 21.000xg und 4°C entfernt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay (2.3.6) bestimmt und das Lysat wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt im Western Blot (2.3.10) analysiert.

RIPA Puffer

Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 % (v/v)
EDTA	5 mM

NP-40 Puffer

Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 % (v/v)
Natriumdeoxycholat	0,5 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)

2.4.4. Kryokonservierung eukaryontischer Zelllinien

Typischerweise wurden 2×10^6 Zellen pro Cryogefäß mit 1 ml Fassungsvermögen eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, durch eine fünf bis zehn Minuten Inkubation mit Trypsin/EDTA im Begasungsbrutschrank vom Boden abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Für die Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Ein Tropfen der zu zählenden Zellsuspension wurde unter ein Deckglas, das auf der Neubauer-Zählkammer positioniert wurde, pipettiert. Das Zählnetz bestand aus 3 x 3 Quadraten von denen die äußeren vier ausgezählt wurden. Der Mittelwert wurde gebildet und entsprach der Zellzahl pro ml multipliziert mit 10^4 . Je Cryogefäß wurden nun 2×10^6 Zellen durch Zentrifugation bei 1100 rpm für fünf Minuten geerntet. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und wieder bei 1100 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml FCS pro Cryogefäß resuspendiert und in das Cryogefäß überführt. Im Weiteren wurde 0,5 ml FCS mit 20 % DMSO (v/v) langsam zugetropft. Die Zellen wurden anschließend in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C langsam eingefroren. Nach mindestens drei Tagen konnten die Cryogefäße in Stickstofftanks oder im Ultragefrierschrank bei -152°C gelagert werden.

2.4.5. Transfektion von eukaryontischen Zellen mit dem Lonza Transfektionsreagenz

Die Transfektion von eukaryontischen Zelllinien wurde mit dem Komplettsystem von Lonza nach Herstellerangaben durchgeführt (2.1.8). Es wurden jeweils 4 µg Plasmid DNA aus einer endotoxinfreien Plasmid Präparation eingesetzt.

Für die Herstellung der stabil HTRA1 überexprimierenden SH-SY5Y Zelllinie wurde das Komplettsystem von Lonza und das Plasmid pcDNA-HTRA1 genutzt. Den transfizierten Zellen wurde nach drei Tagen das Selektionsantibiotikum G418 (400 µg/ml) zugesetzt. Sieben Tage später wurden die Zellen so verdünnt, dass nur eine einzelne Zelle pro Vertiefung in einer 96-well Zellkulturschale vorlag, um so Einzelklone zu selektionieren. Die Zellen wurden nun über einen Zeitraum von etwa vier Monaten passagiert und selektiert bis von fünf Einzelklonen ausreichend Cryogefäße weggefroren wurden. Als Kontrolle wurde der pcDNA3.1 Vektor ohne Insert verwendet. Der Erfolg der Erstellung stabiler Zelllinien wurde mittels qRT-PCR (2.2.11) überprüft.

2.4.6. Immunfluoreszenzfärbungen

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Zellen auf Deckgläsern in 12-well Zellkulturschalen ausgesät. Von SH-SY5Y wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und von HeLa Zellen wurden nur 1×10^4 Zellen pro Vertiefung eingesetzt.

Nach zwei Tagen im Begasungsbrutschrank wurden die Zellen mit Formaldehyd (FA) oder Methanol fixiert. Für die FA Fixierung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 3,7 % Formaldehyd (v/v in PBS) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen konnten anschließend in 1 % FA im Kühlschrank bis zur Färbung gelagert werden. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für die Fixierung mit Methanol wurde den auf Eis befindlichen Zellen -20°C kaltes Methanol zugegeben und für 15 bis 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS einmal für fünf Minuten und danach dreimal für eine Minute gewaschen. Die Inkubationsschritte der Immunfluoreszenzfärbung erfolgten alle bei Raumtemperatur.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen nun mit 0,5 % Triton-X 100 (v/v in PBS) für fünf Minuten zur Permeabilisation inkubiert. Danach wurden unspezifische Bindungsmöglichkeiten der Antikörper durch 30 Minuten Inkubation mit 5 % BSA (w/v in PBS) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (Tab. 2.15) für 45 Minuten in PBS mit 2 % BSA (w/v) und 0,2 % Triton-X

100 (v/v). Die Zellen wurden im Anschluss drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und für 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper in PBS mit 2 % BSA (w/v) und 0,2 % Triton-X 100 (v/v) inkubiert. Für eine Färbung des Zellkerns wurde DAPI-Farbstoff, für eine Färbung von Aktin-Filamenten wurde Fluorophor gekoppeltes Phalloidin (0,1 mg in Methanol) dem Zweitantikörper zugesetzt. Ab der Inkubation des Zweitantikörpers wurde auf lichtgeschütztes Arbeiten geachtet. Nach mindestens drei intensiven Waschschritten mit PBS für zehn Minuten wurden die Deckgläser aus den Vertiefungen entnommen und luftblasenfrei mit einem Tropfen Prolong antifade Gold eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

Tab. 2.15: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Fixierung	Verdünnung
HTRA1	nur Methanol	1:50
CAPNS1	FA / Methanol	1:100
CAPN2 (Cell signaling)	FA / Methanol	1:25
CAPN2 (Sigma)	FA / Methanol	1:50
alpha-Tubulin	FA / Methanol	1:500
Tau (Abcam)	Methanol	1:200
Tau (IBL)	Methanol	1:200

2.4.7. Konfokale Lasermikroskopie

Die Proben der Immunfluoreszenzfärbung (2.4.6) wurden an einem konfokalen Laser-Mikroskop (Leica TCS-SP5) dokumentiert. Im Verlauf dieser Arbeit wurde Dioden- (405 nm), Argon- (488 nm), und Helium-Neon-Laser (543 nm, 594 nm oder 633 nm Emission) mit einem 63x Öl Immersionsobjektiv genutzt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder erfolgte mit ImageJ und Photoshop Elements 10. Eine mögliche Kolokalisation wurde mit Hilfe des Programms ImageJ und des Plugins JACoP ausgewertet (Bolte & Cordelieres, 2006). Eine Korrelation beider Färbungen wurde durch den *Pearsons* Koeffizient angegeben. Bei Werten zwischen 0,5 und 1 wurde von einer Kolokalisation ausgegangen. Des Weiteren wurden die *Manders* Koeffizienten M_1 und M_2 verglichen. Dabei gaben Werte über 0,5 eine Kolokalisation an (Manders *et al.*, 1992, Dunn *et al.*, 2011).

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Reinigung von rekombinantem Calpain 2

Um eine potentielle Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 zu untersuchen, wurde zunächst die cDNA der großen Untereinheit von Calpain 2 in einen Expressionsvektor kloniert (2.1.3). Da Calpain 2 als Heterodimer vorliegt, wurde ebenfalls die kleine Untereinheit des Heterodimers kloniert. Hierzu wurde als Vorlage die cDNA einer Neuroblastom Zelllinie (SHSY-5Y) verwendet und als verkürzte Form, welche die N-terminale Glycin-reiche Domäne nicht enthält, in einen Expressionsvektor kloniert. Um beide Plasmide zur parallelen Expression der Untereinheiten in einer Zelle nutzen zu können, benötigten die Vektoren kompatible Replikationsursprünge, deshalb wurden pET28 und pCDFDuet als Vektoren verwendet (2.1.3). Calpain 2 wurde als Hybridprotein Calpain 2-His₆-Tag zusammen mit der kleinen Untereinheit ohne Tag exprimiert.

Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 (DE3) gewählt und verschiedene Expressionsbedingungen getestet, von denen sich eine Expression bei 18°C über Nacht mit Induktion der Expression durch 0,4 mM IPTG als Bedingung mit maximaler Ausbeute herausstellte (2.3.3). Beispielhaft ist in Abb. 3.1.1 die Expression von Calpain 2 dargestellt.

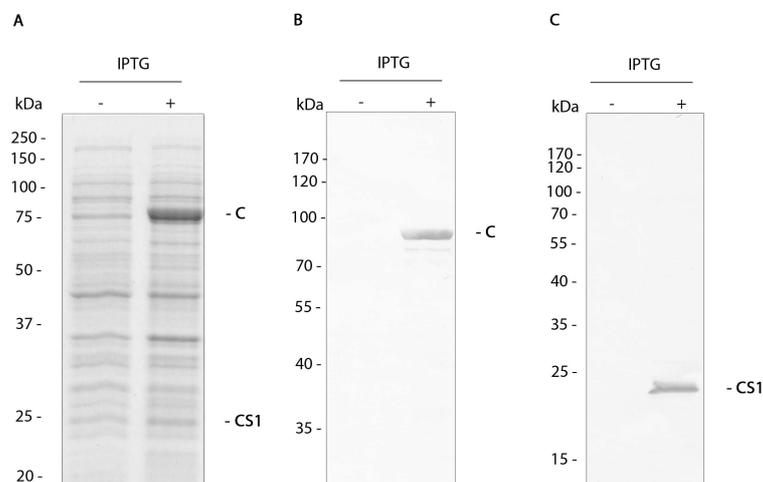


Abb. 3.1.1: SDS-PAGE Analyse der Expression von Calpain 2 in *E. coli* BL21.

Induktion der Expression von Calpain 2 (große Untereinheit bei ca. 80 kDa (C), kalkulierte Masse 82,5 kDa, kleine Untereinheit bei ca. 23 kDa (CS1), kalkulierte Masse 23,2 kDa) durch 0,4 mM IPTG, Expression über Nacht bei 18°C. **A:** Coomassie-Blau Färbung vor (-) und nach (+) Zugabe von IPTG. **B:** Western Blot Analyse der Expression von Calpain 2 (C, mit CAPN2 Antikörper) mit Auftragung wie in A. **C:** Western Blot Analyse mit Calpain kleine Untereinheit (CS1, mit CAPNS1 Antikörper, aufgetragen wurden Proben wie unter A beschrieben. Beide Western Blots wurden mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Sekundärantikörper entwickelt. Für A und B wurden 10 % und für C 12 % SDS-Polyacrilamid-Gele verwendet.

3. Ergebnisse

Die Expression der kleinen (auf der Höhe von 23 kDa, CS1) wie auch der großen Untereinheit (auf der Höhe von 80 kDa, C) von Calpain 2 ließ sich erfolgreich durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induzieren. Wie in Abbildung 3.1.1 dargestellt ist, ließ sich die Expression im Coomassie-Blau (2.3.8) gefärbtem SDS-Gel (A) erkennen und beide Untereinheiten waren mittels Western Blot Analyse (B, C) nachzuweisen (2.3.10). Im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel war die kleine Untereinheit nur sehr schwer im *E. coli* Hintergrund zu erkennen, mittels Western-Blot ließ diese sich jedoch eindeutig nachweisen.

Nach der Expression wurden die *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation angereichert und aufgeschlossen (2.3.3). Für die weitere Reinigung von Calpain 2 wurden zunächst eine Affinitätschromatographie und anschließend eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Im Verlauf dieser Dissertation wurde ebenfalls die Reinigung über Hydroxyapatidmaterial sowie mittels verschiedener Anionenaustauschermaterialien getestet, die jedoch zu keiner verbesserten Reinheit führten. Für die Affinitätschromatographie des rekombinanten Hybridproteins Calpain 2-His₆-Tag wurde Ni-NTA Fast-Flow Material verwendet. Das Elutionsprofil ist in Abb. 3.1.2 dargestellt.

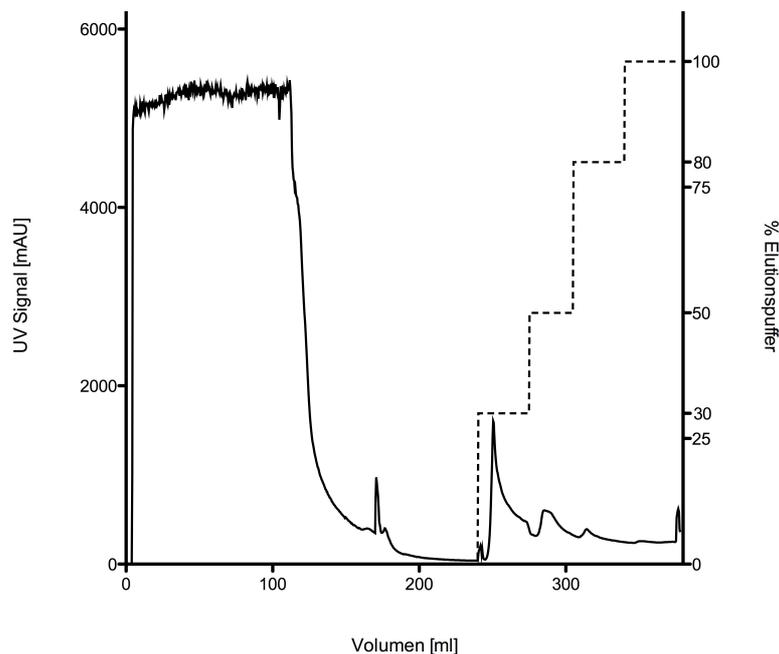


Abb. 3.1.2: Elutionsprofil Ni-NTA Calpain 2 Reinigung

Die affinitätschromatographische Reinigung von Calpain 2 wurde an einer FPLC Anlage durchgeführt. Die durchgezogene Linie entspricht dem UV Signal in mAU (linke Skalierung) und die gestrichelte Linie der Menge an Elutionspuffer in % (rechte Skalierung). Der Durchlauf entsprach den ersten 120 ml der chromatographischen Auftrennung. Mit Lysepuffer gewaschen wurde zwischen 120 und 180 ml, mit Waschpuffer 1 M NaCl zwischen 180 und 250 ml. Die stufenweise Elution wurde ab 250 ml gestartet und mit den Schritten 30, 50, 80 und 100 % Elutionspuffer durchgeführt.

3. Ergebnisse

Unspezifisch gebundene Proteine konnten durch die Waschschriffe entfernt werden. Das erhöhte UV-Signal bei etwa 180 ml entspricht Verunreinigungen, die durch hohe NaCl Konzentration entfernt werden konnten. Die Elutionsfraktionen korrespondierend zu dem UV-Signal-Maximum (*Peak*) bei 30% Elutionspuffer enthielten Calpain 2. Es konnte gezeigt werden, dass die stufenweise Elution des gebundenen Calpain 2 notwendig war, um eine Vermischung des Eluats mit unerwünschten Abbauprodukten von Calpain 2 zu vermeiden. Nach Analyse der Elutionsfraktionen (Abb. 3.1.3) wurden Calpain 2 enthaltene Proben vereinigt und konzentriert. Die unerwünschten Abbauprodukte von Calpain 2 sind auf der Höhe von etwa 40 kDa zu erkennen und verfügen über einen His₆-Tag, welches mittels Western Blot Analyse verifiziert wurde.

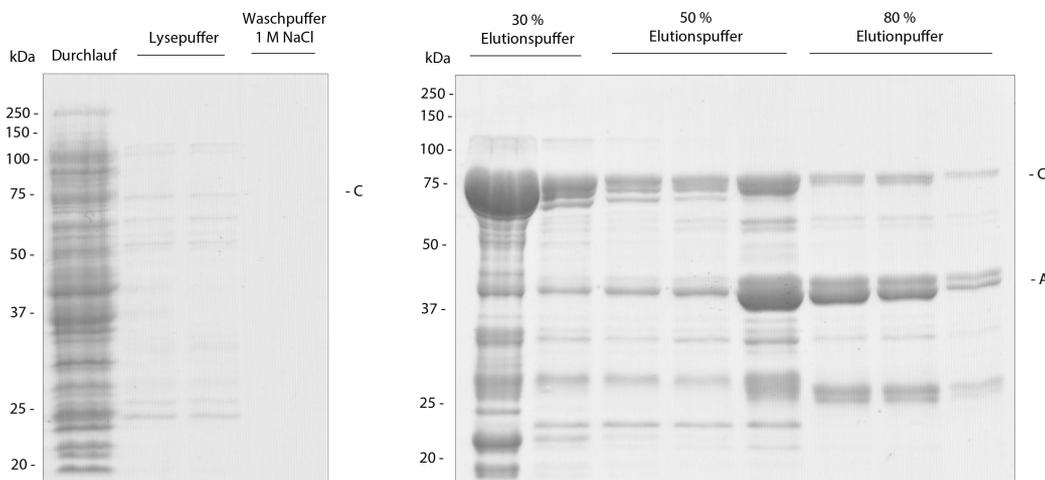


Abb. 3.1.3: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse der Ni-NTA Affinitätschromatographie
Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele der Ni-NTA Affinitätschromatographie. Das entsprechende Elutionsprofil findet sich in Abb. 3.1.2. Die große Untereinheit von Calpain 2 wird mit C gekennzeichnet, die unerwünschten Abbauprodukte mit A. Die anderen erkennbaren Banden entsprechen Verunreinigungen.

Die Elution von Calpain 2 ließ sich in den Spuren der entsprechenden Elutionsfraktionen von 30 % Elutionspuffer gut erkennen (-C). Das konzentrierte Eluat wurde über eine Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Das entsprechende Elutionsprofil ist in Abb. 3.1.4 dargestellt. *Peak* 1 bei 117 ml Elutionsvolumen entspricht dem Ausschlussvolumen der Größenausschlusschromatographiesäule. Das Elutionsvolumen von 190 ml (*Peak* 3) entspricht einer ungefähren Größe von 130 kDa und passt damit zur Größenordnung des Calpain 2 Heterodimers (103,725 kDa).

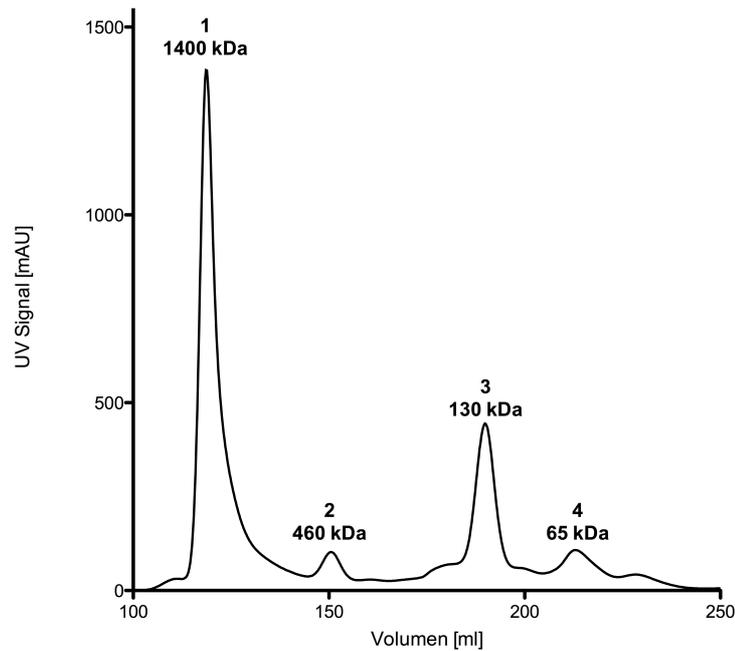


Abb. 3.1.4: Elutionsprofil der Calpain 2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie von Calpain 2 wurde an einer FPLC Anlage durchgeführt. Der *Peak* im UV Signal bei 117 ml Volumen (#1) entspricht dem Ausschlussvolumen der verwendeten Säule. Der UV Signal *Peak* bei 190 ml Volumen (#3) entspricht der, durch eine Kalibrierung mit einem Proteinstandard, kalkulierten Größe des Calpain 2 Heterodimers.

Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-Polyacrylamid-Gele der Größenausschlusschromatographie sind in Abb. 3.1.5 dargestellt.

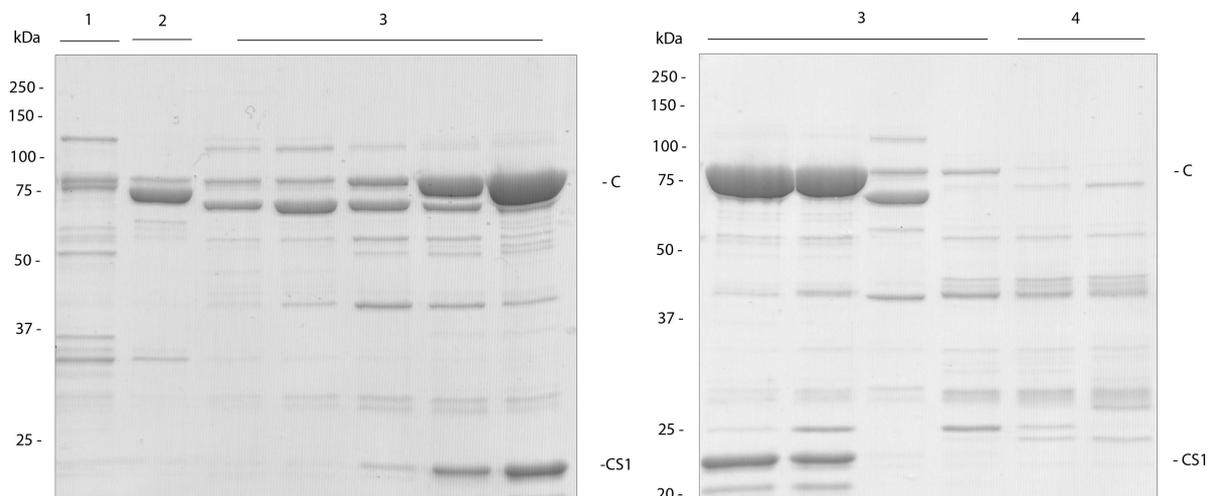


Abb. 3.1.5: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse der Größenausschlusschromatographie von Calpain 2

Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele der Größenausschlusschromatographie mit Auftragung der Fraktionen der UV Signal *Peaks*. Calpain 2 große Untereinheit wurde mit C markiert, die kleine Untereinheit mit CS1.

In den Fraktionen von *Peak 1* waren viele Verunreinigungen und nur sehr wenig Protein auf der Höhe von Calpain 2 zu erkennen. Da dieser *Peak* dem Ausschlussvolumen der Größenausschlusschromatographie Säule entsprach, wurden hier entweder sehr große Proteine über 700 kDa oder Aggregate erwartet. Da keine auffällige Bande auf der Höhe von Calpain 2 zu erkennen war, konnte davon ausgegangen werden, dass Calpain 2 stabil war und nicht aggregierte. *Peak 2* entsprach einer Größe von etwa 460 kDa und schien damit deutlich zu groß für ein Calpain 2 Heterodimer zu sein. *Peak 3* entsprach mit etwa 130 kDa bei einem Elutionsvolumen von 190 ml der Größenordnung des Calpain 2 Heterodimers. Zusätzlich ließ sich im SDS-Polyacrylamid-Gel eine deutliche Bande von der großen Untereinheit von Calpain 2 erkennen (-C). *Peak 3* bei 210 ml Elutionsvolumen entsprach einer Größe von etwa 65 kDa und schien dem Abbau (-A) zu entsprechen, der auch schon in der Ni-NTA Affinitätschromatographie zu erkennen war. Fraktionen von *Peak 3* wurden vereinigt und konzentriert. Mit Hilfe des Programms ImageJ konnte eine Reinheit von 94 % bestimmt werden (Schneider *et al.*, 2012). Das gereinigte Calpain 2 wurde nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (2.3.6) aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Reinheit des Calpain 2 wurde mittels Silber gefärbtem SDS-Polyacrylamid-Gel (2.3.9) nochmals analysiert (Abb. 3.1.6 A). Mit Hilfe der Western Blot Analyse (2.3.10, Abb. 3.1.6 B, C) konnte sowohl die kleine als auch die große Untereinheit von Calpain 2 identifiziert werden.

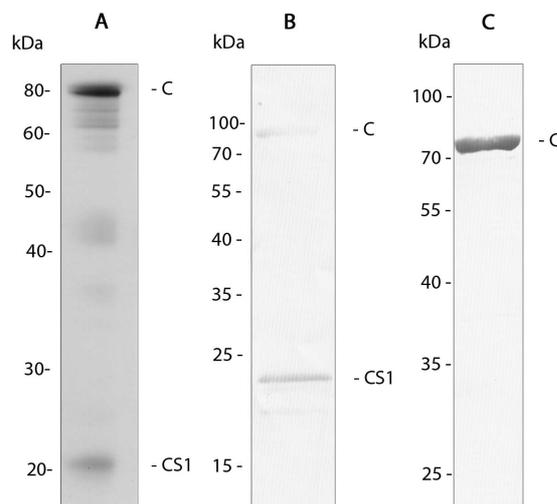


Abb. 3.1.6: Silberfärbung und Western Blot von gereinigtem Calpain 2

A: Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamid-Gels mit gereinigtem Calpain 2. Die Banden bei ca. 20 und ca. 80 kDa entsprechen der kleinen (CS1) bzw. großen Untereinheit (C) von Calpain 2. Auftrag ca. 80 ng Protein. **B:** Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen die kleine und große Untereinheit von Calpain 2, produziert in Maus. Auftrag ca. 800 ng Protein. **C:** Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen die große Untereinheit von Calpain 2, produziert in Maus (2.1.5). Auftrag

3. Ergebnisse

ca. 800 ng Protein. Die Antikörper beider Western Blot Analysen wurden mit alkalischer Phosphatase detektiert.

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biochemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde eine MALS-SEC Analyse (2.3.21) des gereinigten Calpain 2 durchgeführt, um die Reinheit und das Molekulargewicht des gereinigten Proteins zu überprüfen. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 3.1.7 dargestellt. Gereinigtes Calpain 2 zeigte einen einzelnen homogenen *Peak* mit einer Größe von $102 \pm 2,04$ kDa, was mit der errechneten Größe des Heterodimers (103,725 kDa) übereinstimmt.

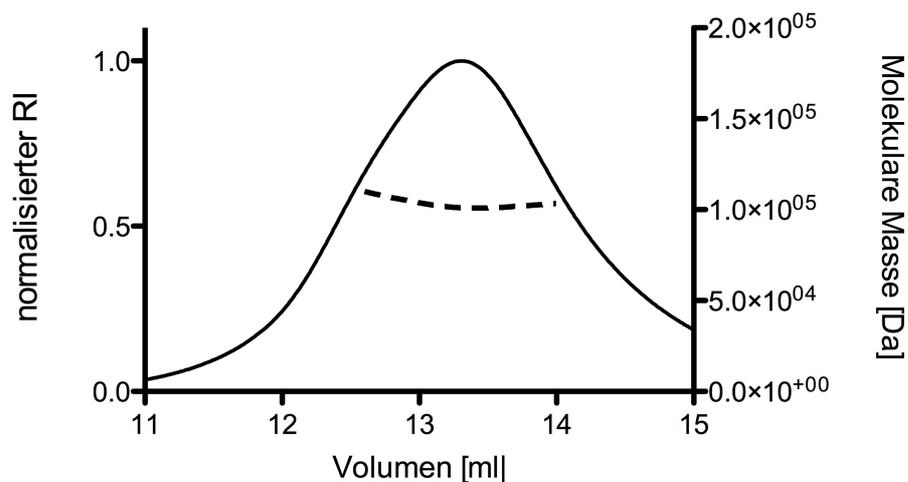


Abb. 3.1.7: MALS-SEC von gereinigtem Calpain 2

Es wurden ca. 150 μ M Calpain 2 mittels MALS-SEC analysiert. Diese Analyse ergab eine homogene Population von Proteinen der Größe $102 \pm 2,04$ kDa, was der kalkulierten Massen von 103,725 kDa von Calpain 2 als Heterodimer entspricht. Die durchgezogene Linie entspricht dem Brechungsindex RI (Skalierung links), die gestrichelte der molekularen Masse (Skalierung rechts).

Eine Überprüfung der spezifischen Aktivität von Calpain 2 wurde nach jeder Reinigung durchgeführt, um die korrekte Faltung und damit verbundene biologische Aktivität zu analysieren. Für die Aktivierung von Calpain 2 wurden verschiedene Calcium Endkonzentrationen getestet (2.3.12). Eine minimale Calciumkonzentration von 2 mM war erforderlich (Abb. 3.1.8), bei niedrigerer Konzentration konnte keine Aktivität bestimmt werden.

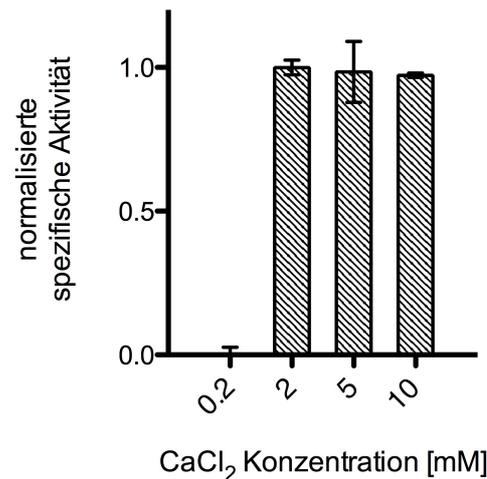


Abb. 3.1.8: Calpain 2 Aktivität in Abhängigkeit der Calciumkonzentration

Getestet wurde die Aktivität von 1 μM Calpain 2 durch die Proteolyse von 200 μM AMC gekoppeltem Peptidsubstrat in Anwesenheit von 0,1, 2, 5 und 10 mM CaCl_2 . Bei 23°C über einen Zeitraum von 90 Minuten wurde jede Minute die Fluoreszenz von freiem AMC durch Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm und Emission bei 450 nm bestimmt.

Eine Untersuchung der Stabilität von Calpain 2 bei Lagerung bei 4°C ist in Abb. 3.1.9 dargestellt. Calpain 2 zeigte eine stabile Aktivität über die Dauer von neun Tagen bei Lagerung in SEC Puffer Tris oder Hepes (2.3.3). Die Messung bei 19 Tagen ergab eine spezifische Aktivität, die um 90 % verringert war.

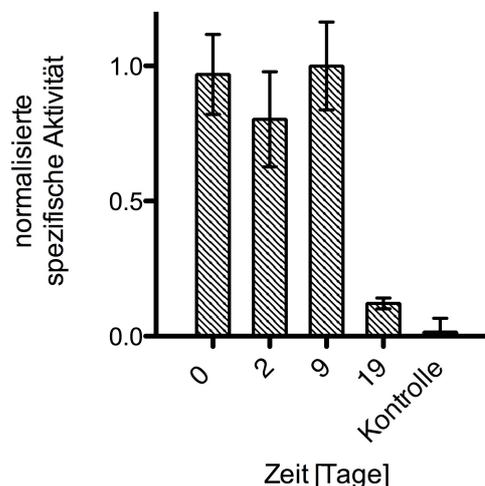


Abb. 3.1.9: Calpain 2 Aktivität nach Lagerung bei 4°C

Gereinigtes Calpain 2 wurde über eine Zeitdauer von 19 Tagen bei 4°C gelagert und nach 2, 9 und 19 Tagen die Aktivität durch die Proteolyse von AMC gekoppeltem Peptidsubstrat bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 1 μM Calpain 2 und 200 μM AMC gekoppeltes Peptidsubstrat bei 23°C für 90 Minuten inkubiert und jede Minute die Fluoreszenz von freiem AMC durch Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm und Emission bei 450 nm gemessen.

3.2. Reinigung von rekombinantem humanem HTRA1

Für die Reinigung von rekombinantem humanem HTRA1 wurden verschiedene Konstrukte mit His₆- oder StrepII-Tags genutzt (2.1.3). HTRA1 wurde nicht als komplettes Protein gereinigt, da dies aus *E. coli* nicht erfolgreich war. Stattdessen wurde eine N-terminal verkürzte Version, HTRA1 Δ mac (im weiteren Verlauf als HTRA1 bezeichnet), verwendet, welche keine mac Domäne besitzt. Für diese N-terminale Domäne wurde bisher keine Funktion gezeigt (Eigenbrot *et al.*, 2012). Außerdem wurde zuvor mittels massenspektrometrischer Analyse gezeigt, dass diese verkürzte Version von HTRA1 im Cytosol von Ovarialkarzinomzellen vorkommt (Chien *et al.*, 2006). Die Expression von HTRA1 erfolgte in Rosetta 2 (DE3) (2.1.3). Beispielhaft wird in den nächsten Abbildungen die Reinigung von der Mutante des Hybridproteins mit StrepII-Tag HTRA1 Δ mac_{S328A}-StrepII, die durch den Austausch des Serin im aktiven Zentrum gegen ein Alanin inaktiv ist, gezeigt. Die Expression von HTRA1 wurde durch 0,5 mM IPTG induziert und erfolgte in Rosetta 2 (DE3). Die *E. coli*-Zellen wurden bei 28 °C inkubiert und nach drei Stunden durch abschließende Zentrifugation angereichert (2.3.4, Abb. 3.2.1).

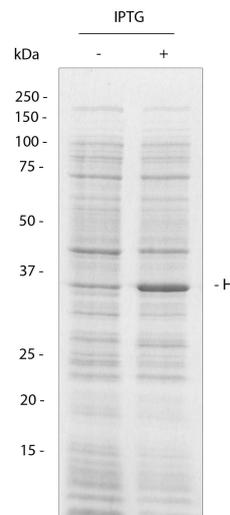


Abb. 3.2.1: Expression von HTRA1

SDS-Polyacrylamid-Gel mit Proben vor und nach der Induktion der Expression des Hybridproteins HTRA1 Δ mac_{S328A}-StrepII (bei ca. 37 kDa, kalkulierte Masse 36,65 kDa, -H) mit 0,5 mM IPTG, Expression bei 28°C für drei Stunden.

Der Überstand der aufgeschlossenen *E. coli* Zellen wurde über eine Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 3.2.2). Gebundenes HTRA1 wurde durch Desthiobiotin eluiert.

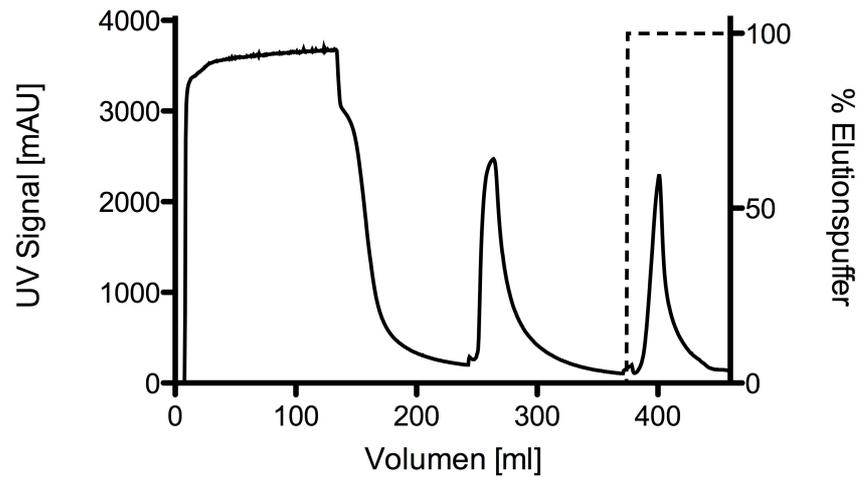


Abb. 3.2.2: Affinitätschromatographische Reinigung von HTRA1

Die affinitätschromatographische Reinigung von HTRA1 mittels Strep-Tactin Material wurde an einer FPLC Anlage durchgeführt. Die durchgezogene Linie stellt das UV Signal in mAU (linke Skalierung) und die gestrichelte Linie den Anteil an Elutionspuffer in % (rechte Skalierung) dar. Der Durchlauf entsprach den ersten 110 ml der chromatographischen Auftrennung. Mit Lysepuffer gewaschen wurde zwischen 110 und 220 ml, mit Waschpuffer 1 M NaCl zwischen 220 und 370 ml. Die Elution wurde ab 370 ml gestartet.

Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE Analyse untersucht (Abb. 3.2.3) und HTRA1 enthaltende Fraktionen wurden vereinigt. Diese wurden mit einem 10 kDa Vivaspin 20 Konzentrator auf 2 ml Endvolumen konzentriert.

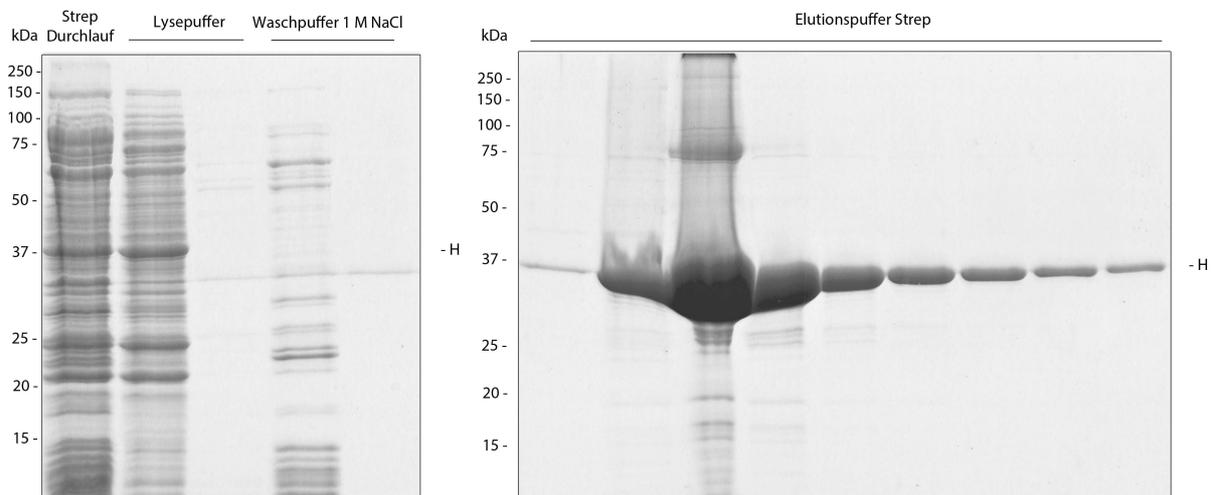


Abb. 3.2.3: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse der Affinitätschromatographie von HTRA1

Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele der Strep-Tactin Affinitätschromatographie von HTRA1 (-H). Verunreinigungen wurden durch Lysepuffer und Waschpuffer 1M NaCl größtenteils entfernt.

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Zu diesem Zweck wurde eine Superdex200 26/60 Chromatographiesäule verwendet (Abb. 3.2.4).

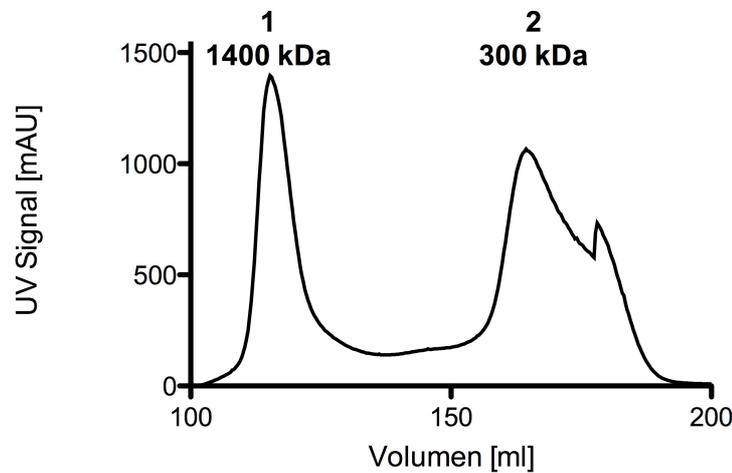


Abb. 3.2.4: Größenausschlusschromatographie von HTRA1

Die größenausschlusschromatographische Reinigung von HTRA1 wurde an einer FPLC Anlage durchgeführt. Der *Peak* im UV Signal bei 115 ml Elutionsvolumen (1) entspricht dem Ausschlussvolumen der verwendeten Säule. Der UV Signal *Peak* bei 164 ml Elutionsvolumen, (2) inklusive der Schulte bei 178 ml, entspricht in etwa der durch eine Kalibrierung mit einem Proteinstandard kalkulierten Größe des HTRA1 Trimers.

Peak 1 bei 115 ml Elutionsvolumen entsprach dem Ausschlussvolumen der Größenausschlusschromatographie-Säule. *Peak* 2 bei 164 ml Elutionsvolumen entspricht einer molekularen Masse von ca. 300 kDa. HTRA1 bildet ein Homotrimer, dessen errechnete Größe eine Masse von 108,6 kDa aufwies. Der *Peak* bei 164 ml Elutionsvolumen scheint etwa die dreifach molare Masse eines HTRA1 Trimers aufzuweisen. Aufgrund dieser Diskrepanz zur errechneten molekularen Masse wurde nach der Proteinreinigung eine Analyse mittels MALS-SEC durchgeführt (Abb. 3.2.7). Zunächst wurden die Fraktionen der Größenausschlusschromatographie mittels einer SDS-PAGE Analyse untersucht (Abb. 3.2.5) und Fraktionen, die HTRA1 enthielten, vereinigt. Im *Peak* 1 ließ sich eine Bande von HTRA1 erkennen, dies deutete darauf hin, dass ein Teil des HTRA1 nach der Affinitätschromatographie aggregiert ist. *Peak* 2 enthielt hohe Konzentrationen von HTRA1, daher wurden diese Fraktionen vereinigt und in einem 10 kDa Vivaspin 20 Konzentratorkonzentriert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das gereinigte HTRA1 aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

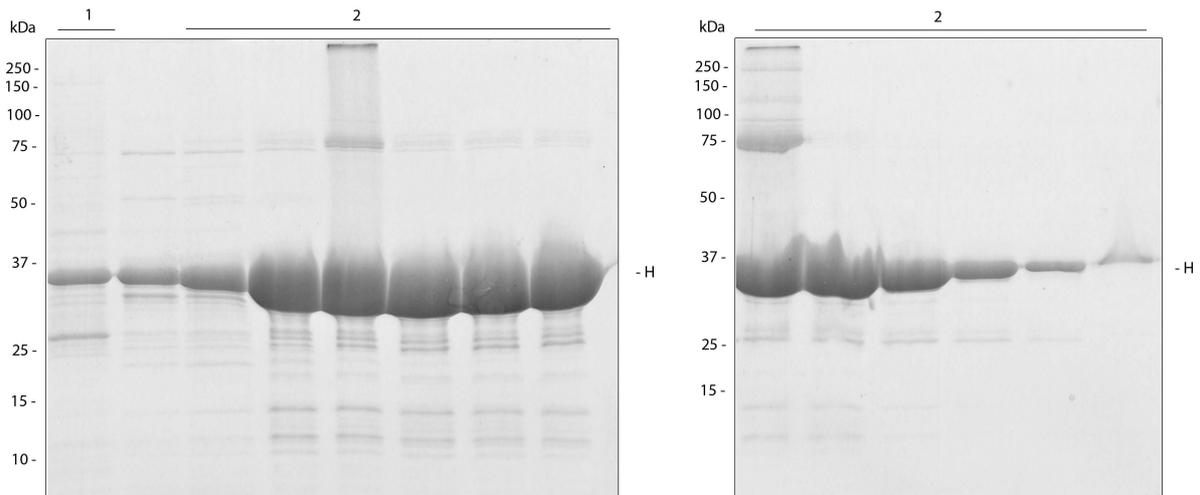


Abb. 3.2.5: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Größenausschlusschromatographie

Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele der Größenausschlusschromatographie von HTRA1 (-H) mit Auftragung der Fraktionen der *Peaks* der Größenausschlusschromatographie.

Die Reinheit des gereinigten HTRA1 wurde mittels Silber gefärbtem SDS-Polyacrylamid-Gel (2.3.9) sowie Western Blot (2.3.10) mit Antikörpern gegen HTRA1 überprüft (Abb. 3.1.1). Im Silber gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel ist eine deutliche Bande von HTRA1 zu erkennen. Die Bande direkt unterhalb von HTRA1 stellte sich nach Western-Blot Analyse als Proteolyseprodukt von HTRA1 heraus. In diesem Fall wurde die inaktive Mutante von HTRA1 gereinigt, es handelt sich folglich nicht um Autoproteolyseprodukte von HTRA1. Die Reinheit von HTRA1 wurde mit Hilfe von ImageJ als 95 % rein errechnet.

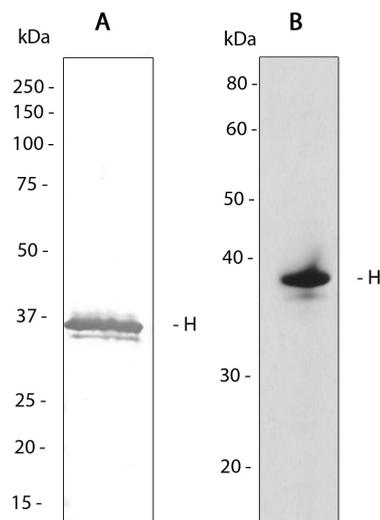


Abb. 3.2.6: SDS-PAGE Analyse von HTRA1: Western Blot und Silberfärbung

Überprüfung der Reinheit von gereinigtem HTRA1 (-H) **A:** Western Blot mit HTRA1 Antikörper, Immundetektion durch alkalische Phosphatase. **B:** Silber gefärbtes SDS-Gel von gereinigtem HTRA1

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biochemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde eine MALS-SEC Analyse (2.3.21) von gereinigtem HTRA1 Δ mac_{S328A}StrepII durchgeführt. Die MALS-SEC Analyse ist in Abb. 3.2.7 dargestellt. Das Elutionsprofil zeigte einen einzelnen homogenen *Peak* mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von $117 \pm 0,2$ kDa, welches mit dem kalkulierten Molekulargewicht eines HTRA1 Trimers mit 108,6 kDa übereinstimmt.

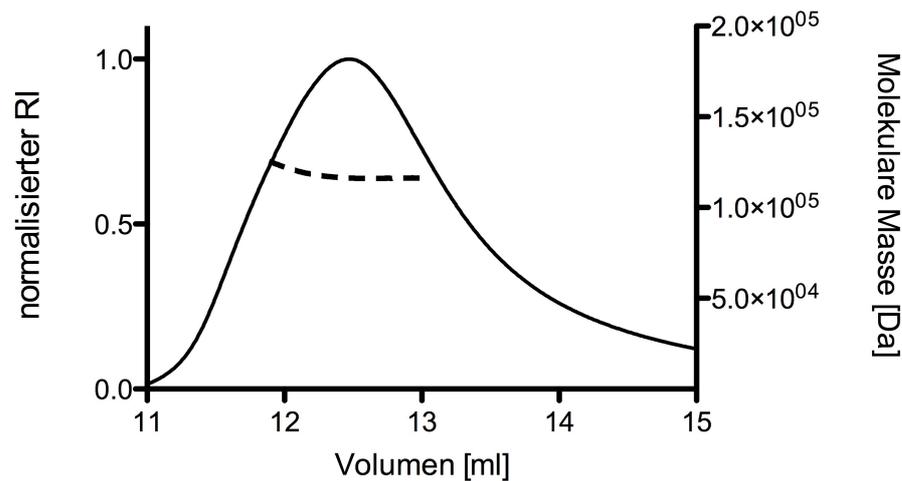


Abb. 3.2.7: MALS-SEC Analyse von gereinigtem HTRA1

Die MALS-SEC Analyse von ca. 150 μ M HTRA1 Δ mac_{S328A}StrepII ergab eine homogene Population von Proteinen der Größe $117 \pm 0,2$ kDa, was der kalkulierten Massen von 108,6 kDa von HTRA1 Δ mac_{S328A}StrepII als Trimer entspricht. Die durchgezogene Linie entspricht dem Brechungsindex RI (linke Skalierung), die gestrichelte der molekularen Masse (rechte Skalierung).

Zur Überprüfung der korrekten Proteinfaltung wurde bei der Reinigung von aktivem HTRA1 ein Aktivitätstest mit einem peptidischen pNA-Substrat (VFNTLPMMGKASPV-pNA) (2.3.11) durchgeführt. Um gute Bedingungen für zukünftige Aktivitätstests zu identifizieren, wurden verschiedene Puffer (Tab. 3.1) getestet.

Tab. 3.1: Getestete Puffer für den pNA Assay von HTRA1

Die Puffersubstanzen wurden in Konzentrationen von 50 und 500 mM eingesetzt sowie mit und ohne Zusatz von 150 mM NaCl getestet.

Puffersubstanz	pH Werte
Mops	7, 7,5, 8
NaH ₂ PO ₄	7, 7,5, 8
Hepes	7, 7,5, 8
Tricin	7,5, 8
Tris	7,5, 8
Bicin	7,5, 8

3. Ergebnisse

Die spezifischen Aktivitäten von HTRA1 wurden auf den Maximalwert normiert und sind in Abb. 3.2.8 dargestellt.

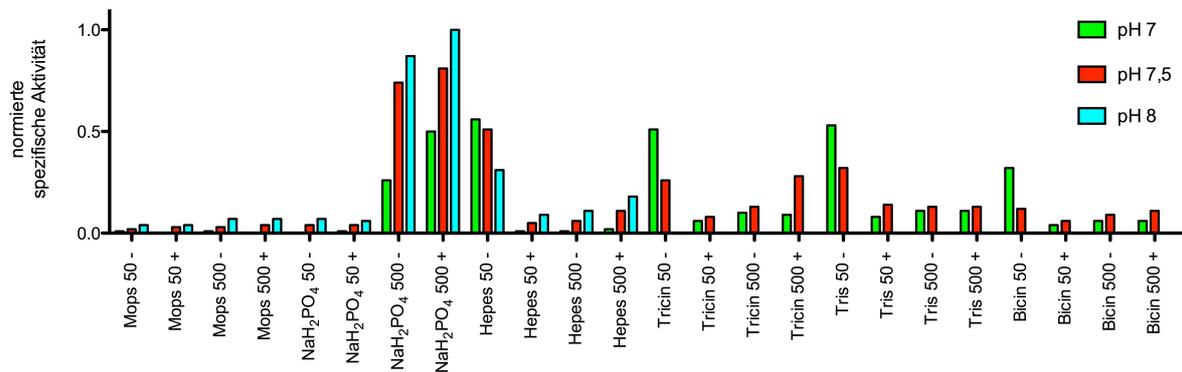


Abb. 3.2.8: Pufferscreen pNA Assay HTRA1

In grün sind die normierten spezifischen Aktivitäten bei pH 7, in rot bei pH 7,5 und in blau bei pH 8 dargestellt. Auf der Abszisse sind die Puffersubstanzen in einer Konzentration von 50 mM (50) oder in 500 mM (500) mit (+) oder ohne (-) 150 mM NaCl aufgetragen. Der Aktivitätstest wurde bei 37°C über einen Zeitraum von 2 Stunden durchgeführt. HTRA1 wurde in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt und das pNA-Peptid Substrat 500 μ M. Die zur Normierung genutzte spezifische Aktivität entsprach 86,09 nmol/(mg*min).

Die höchste HTRA1 Aktivität wurde in 500 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 8.0 gemessen. Für Assays in denen eine Aktivierung von HTRA1 untersucht werden soll, eignet sich dagegen 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Bei einem pH Wert < 6.0 war HTRA1 nicht stabil und präzipitiert.

3.3. Reinigung von rekombinantem humanem Tau Protein

Rekombinantes humanes Tau Protein wurde im Verlauf dieser Dissertation als Substrat für HTRA1 sowie Calpain 2 verwendet. Es wurden zwei verschiedene verkürzte Versionen von Tau gereinigt (2.1.3). Tau 4R entspricht der Isoform aus 441 Aminosäuren und enthält vier *Repeat* sowie die *self-assembly* Regionen. Tau F3 entspricht den Aminosäuren 258 – 360 von Tau 4R ohne den Lysinrest K280 und daher lediglich aus drei *Repeat* sowie der *self-assembly* Regionen besteht. Die Induktion der Expression von Tau 4R erfolgte durch 0,1 mM IPTG bei 18°C über Nacht (Abb. 3.3.1, A). Für die Proteinreinigung aus *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden die aufgeschlossenen *E.coli*-Zellen zunächst auf 95°C erhitzt, wobei Tau 4R löslich blieb. Anschließend erfolgt eine weitere Reinigung mit Hilfe einer FPLC Anlage über Hydroxyapatidmaterial sowie Größenausschlusschromatographie (2.3.5).

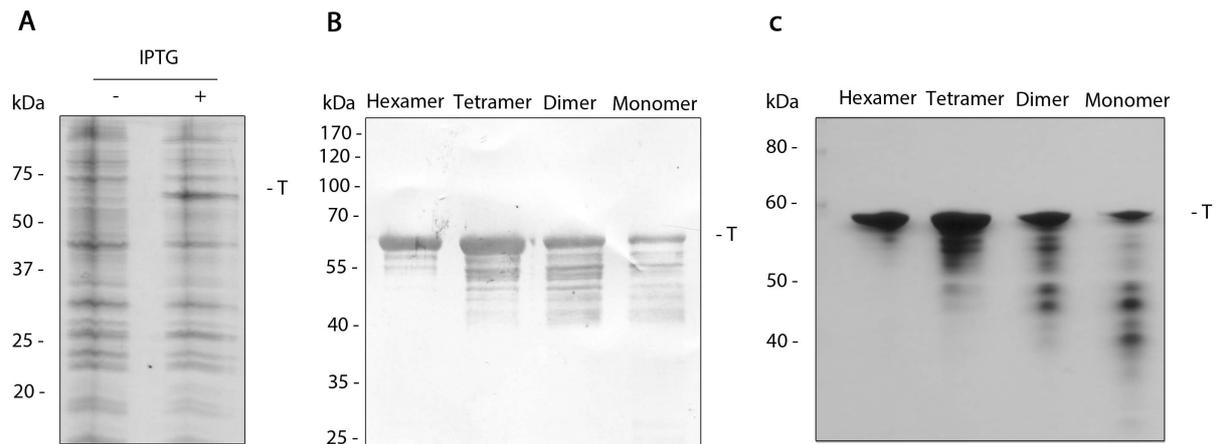


Abb. 3.3.1: Expression und Reinigung von Tau 4R

A: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von Zellextrakten vor und nach Induktion der Expression von Tau 4R (- T, bei etwa 60 kDa, kalkulierte Masse 45,849 kDa) **B:** Western Blot Analyse von gereinigtem Tau 4R, Tau Antikörper (Abcam), Immundetektion durch alkalische Phosphatase. **C:** Silber gefärbtes SDS-Gel von gereinigtem Tau 4R. Bei den Banden unterhalb der 60 kDa Bande handelte es sich um Proteolyseprodukte von Tau 4R.

Das ungewöhnliche Migrationsverhalten von Tau 4R, das die Proteinbande bei einem höheren Molekulargewicht als erwartet zeigt, ist bekannt. Der N-Terminale Bereich von Tau enthält sehr viele Proline, die zu einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE Analyse führen (Mukrasch *et al.*, 2009, Steiner *et al.*, 1990). In der Größenausschlusschromatographie ließen sich mehrere *Peaks* erkennen und anhand ihres Elutionsvolumens verschiedenen oligomeren Formen von Tau zuordnen. Die Fraktionen der *Peaks* der Größenausschlusschromatographie wurden vereinigt, konzentriert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.3.6) aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Reinheit von Tau 4R wurde mittels Silberfärbung und Western Blot überprüft (Abb. 3.3.1 B, C). Dabei zeigten das Hexamer und das Tetramer von Tau durch Auswertung mit Hilfe von ImageJ die höchste Reinheit von 99 %. Dimer und Monomer zeigten eine unzureichende Reinheit von unter 90 %. Die Banden unterhalb der prominenten Tau 4R Bande erwiesen sich als Proteolyseprodukte, da diese auch im Western Blot zu erkennen waren.

Die Proteinreinigung von Tau F3 erfolgte analog zu Tau 4R. Die Induktion der Expression erfolgte ebenfalls mit 0,1 mM IPTG (Abb. 3.3.2 A). Nach Hitzedenaturierung, Proteinreinigung über Hydroxapatidmaterial und mittels Größenausschlusschromatographie ließ sich eine Reinheit von 99 % erzielen (Kalkulation mittels ImageJ). Tau F3 lag ausschließlich als monomere Proteinspezies vor (Abb. 3.3.2 B, C).

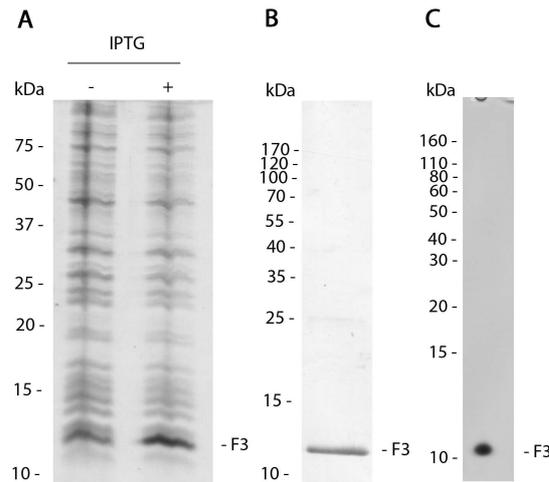


Abb. 3.3.2: Expression und Reinigung von Tau F3

A: Commassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von Zellextrakten vor und nach Induktion der Expression von Tau F3 (- F3, 11 kDa) **B:** Western Blot Analyse von gereinigtem Tau F3, Tau Antikörper (Abcam), Immundetektion durch alkalische Phosphatase. **C:** Silber gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von gereinigtem Tau F3.

3.4. Analyse der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 mittels *in vitro* Pulldown-Assay

Die initiale Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 wurde mittels *in vitro* Pulldown-Assay durchgeführt (2.3.14). Zu diesem Zweck wurde StrepII-Tag markiertes HTRA1 und His₆-Tag markiertes Calpain 2 verwendet. Der *in vitro* Pulldown-Assay wurde mit Hilfe von Strep-Tactin gekoppelte magnetische Kügelchen (*Beads*) durchgeführt.

Für die Untersuchung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 mittels *in vitro* Pulldown-Assays wurden 50 μ M HTRA1 und 150 μ M Calpain 2 in einem Volumen von 25 μ l Lysepuffer Strep Tris für 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die vorinkubierte Probe zu *Beads* gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vier Waschschritte mit dem zehnfachen *Bead*-Volumen gefolgt von einer Elution mit dem halben *Bead*-Volumen wurden durchgeführt. In der Elution konnten Calpain 2 und HTRA1 im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel detektiert werden (Abb. 3.4.1).

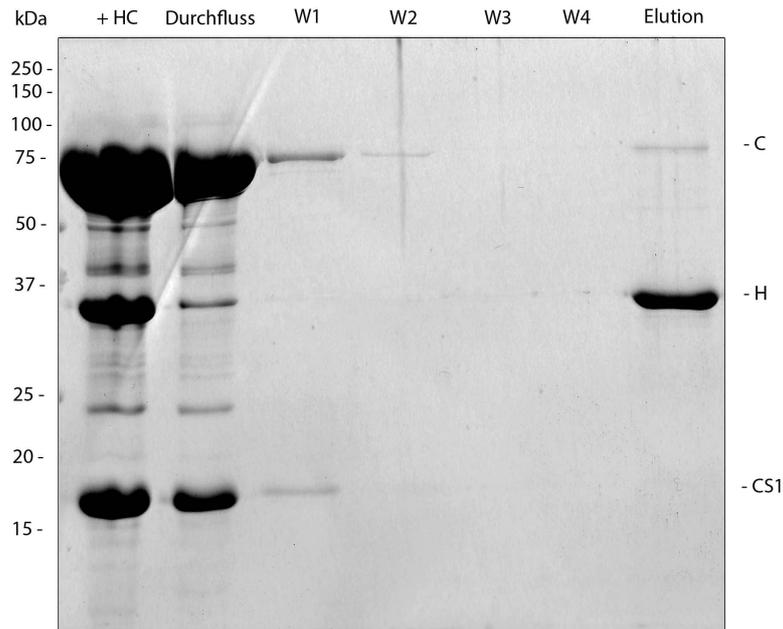


Abb. 3.4.1: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE Analyse des HTRA1-Calpain 2 Pulldown-Assays

Coelution von Calpain 2 und HTRA1 von Strep-Tactin Material. Es wurden 50 μM HTRA1 (-H) und 150 μM Calpain 2 (große Untereinheit -C, kleine Untereinheit -CS1) in 25 μl Lysepuffer Strep Tris vorinkubiert, zu 50 μl *Beads* gegeben (+HC) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In W1 bis W4 wurde jeweils mit dem zehnfachen Volumen (500 μl) Lysepuffer Strep Tris gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem halben Volumen (25 μl) Elutionspuffer Strep Tris nach fünf minütiger Inkubation.

Das Vorhandensein von HTRA1 und Calpain 2 in den Fraktionen des Pulldown-Assays wurde mittels Western Blot Analyse überprüft (2.3.10). Calpain 2 und HTRA1 konnten in den Fraktionen des Auftrags, Durchflusses, ersten Waschschriffs und der Elution nachgewiesen werden (Abb. 3.4.2).

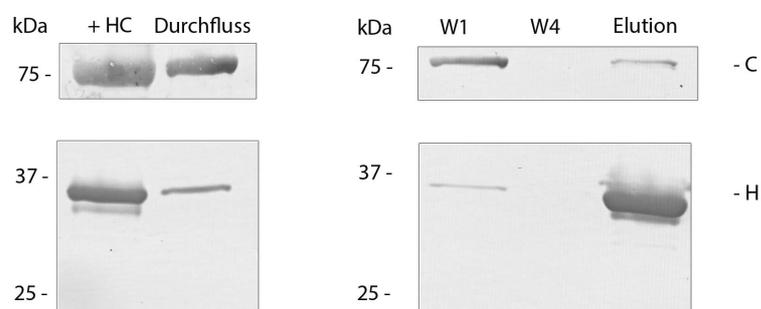


Abb. 3.4.2: Western Blot Analyse des HTRA1-Calpain 2 Pulldown-Assays

Im oberen Abschnitt wurde im Western Blot der Primärantikörper gegen Calpain 2 aus Maus (Sigma) und im unteren Abschnitt der Antikörper gegen HTRA1 aus Kaninchen verwendet. Immundetektion mit alkalischer Phosphatase.

Die Kontrolle zeigte, dass Calpain 2 wie erwartet nicht an das Strep-Tactin Material gebunden hatte und sich somit vollständig im Durchfluss befand (Abb. 3.4.3 A). Die Bindung von HTRA1 an das Strep-Tactin Material erfolgte durch 30 minütige Inkubation (Abb. 3.4.3 B). Kalkulationen mittels ImageJ zeigten, dass ca. 10 % des zugegebenen HTRA1 nicht an das Strep-Tactin Material gebunden haben. Calpain 2, das in der Elution des Pulldown-Assays zu finden ist, sollte nur durch Bindung an HTRA1 eluiert werden können. Ungebundenes Calpain 2 wurde durch mehrere Waschschrte von den Strep-Tactin *Beads* entfernt.

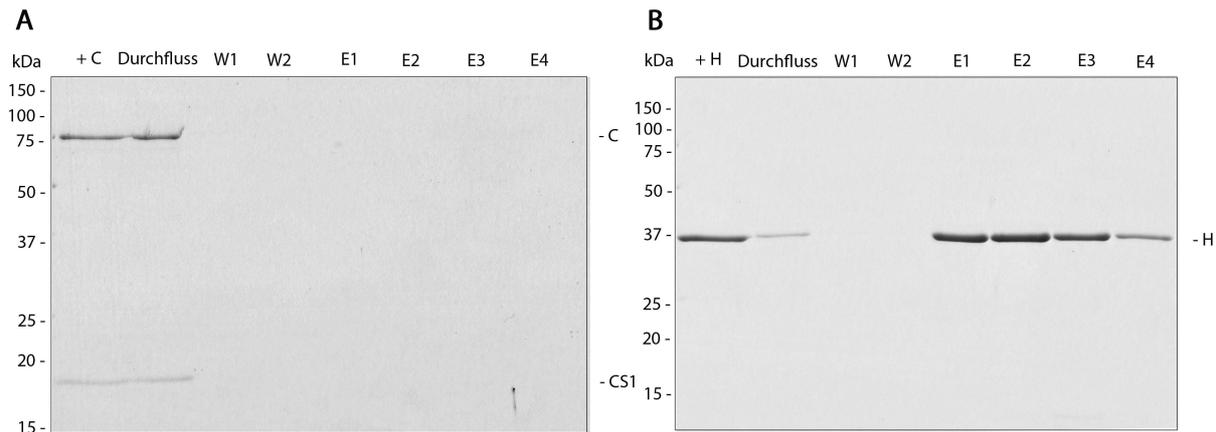


Abb. 3.4.3: Strep-Tactin Kontrollen von Calpain 2-His₆ und HTRA1-StrepII

A: Calpain 2 (große Untereinheit –C, kleine Untereinheit –CS1) bindet nicht an das Strep-Tactin Material. 20 µg Calpain 2 (+C) wurden mit 50 µl *Beads* für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In W1 und W2 wurde jeweils mit dem zehnfachen Volumen (500 µl) Lysepuffer Strep Tris gewaschen. Die Elution erfolgte vier Mal (E1-4) hintereinander mit je dem halben Volumen (25 µl) Elutionspuffer Strep Tris nach fünf Minuten Inkubation. **B:** HTRA1 (-H) zeigte eine gute Bindung an das Strep-Tactin Material. Im Durchfluss befinden sich nur ca. 10 % der zugegebenen HTRA1 Menge. 20 µg HTRA1 (+H) wurden zu 50 µl Strep-Tactin *Beads* gegeben und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur abgenommen. Der Ablauf erfolgte analog zu A.

3.5. Untersuchungen des HTRA1-Calpain 2 Komplexes

3.5.1. Analyse der Interaktion HTRA1 und Calpain 2 mit Hilfe von analytischer Größenausschlusschromatographie

Um unabhängige experimentelle Evidenzen für die Ausbildung von heterooligomeren HTRA1 – Calpain 2 Komplexen zu generieren, wurde die Methode der analytischen Größenausschlusschromatographie eingesetzt (2.3.15). Mit Hilfe dieser Methode ließen sich Proteine anhand ihrer Größe separieren und so Oligomerisierungszustände beobachten. Für die analytische Größenausschlusschromatographie wurde zunächst der SEC Hepes Puffer (2.3.3) von Calpain 2 verwendet. Nach Vorinkubation beider Proteasen für zehn Minuten bei

37°C und anschließender Größenausschlusschromatographie konnte ein neuer *Peak* (roter Pfeil) im Chromatogramm detektiert werden (Abb. 3.5.1).

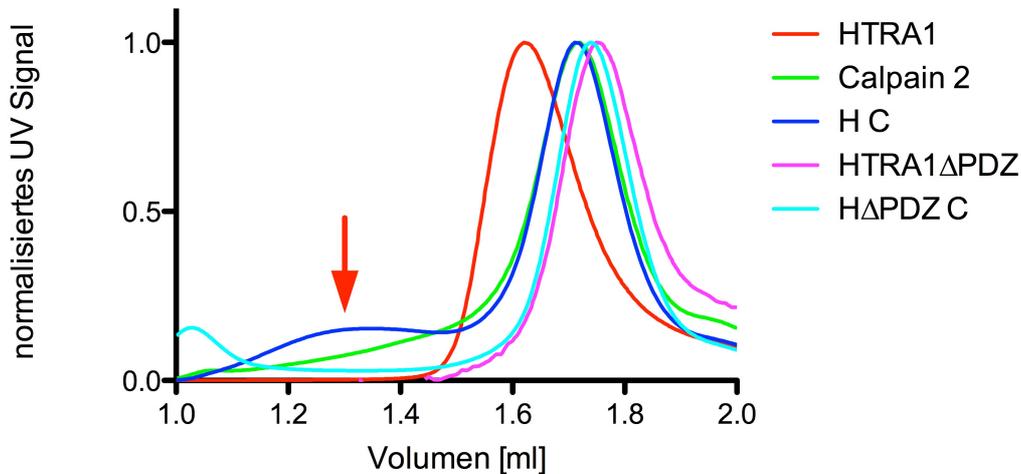


Abb. 3.5.1: Analytische Größenausschlusschromatographie in SEC Hepes Puffer

Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. In rot wurden die HTRA1 Kontrolle (HTRA1, 200 μ M), in grün die Calpain 2 Kontrolle (Calpain 2, 20 μ M) und in magenta die HTRA1 Δ PDZ Kontrolle (HTRA1 Δ PDZ, 60 μ M) dargestellt. In den Kontrollen wurde kein *Peak* bei ca. 1,3 ml Volumen detektiert. HTRA1 und Calpain 2 wurden zuvor im Verhältnis 1:3 vorinkubiert (H C, blau, 20 : 60 μ M) wodurch ein neuer *Peak* bei ca. 1,3 ml Volumen detektiert werden konnte (roter Pfeil). Vorinkubation von HTRA1 Δ PDZ und Calpain 2 (H Δ PDZ C, 1:3, hellblau, 20 ; 60 μ M) lieferte keinen neuen *Peak* bei 1,3 ml Volumen.

Nach der Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 entstand eine neue Proteinpopulation bei 1,3 ml Elutionsvolumen, die sich in ihrem Molekulargewicht deutlich von den einzelnen Proteinen unterscheidet. HTRA1 als Trimer wurde bei etwa 1,6 ml und Calpain 2 als Heterodimer bei 1,7 ml Elutionsvolumen detektiert. Die Konzentrationen von HTRA1 und HTRA1 Δ PDZ wurden in der Kontrolle auf die maximal verfügbare Konzentration erhöht (HTRA1 200 μ M, HTRA1 Δ PDZ 60 μ M) um ein UV Signal erkennen zu können. Das UV Signal war bei niedrigeren Konzentrationen gering, da sowohl HTRA1 als auch HTRA1 Δ PDZ kein Tryptophan besitzen, welches die höchste UV Absorption der proteinogenen Aminosäuren zeigt. Die Calpain 2 Konzentration konnte hingegen auf 20 μ M gesenkt werden, da das UV Signal auch von geringen Calpain 2 Konzentrationen deutlich war.

Aufgrund einer zuvor durchgeführten Kalibrierung der Chromatographiesäule mit einem Proteinstandard (2.1.7) konnte das Molekulargewicht der neuen Proteinpopulation abgeschätzt werden. Der Komplex aus beiden Proteasen sollte eine Größe zwischen 400 und 600 kDa haben. Die Bestimmung war recht ungenau, da die Auftrennung der verwendeten Chromatographiesäule mit Zunahme des Molekulargewichts ungenauer wird. Auch die

3. Ergebnisse

Verwendung von anderen Materialien der Größenausschlusschromatographiesäulen, wie Superose 6 und Superdex 75 konnte die Bestimmung des Molekulargewichts nicht verbessern.

Fractionen der *Peaks* wurden mittels SDS-PAGE (2.3.7) analysiert und durch Silberfärbung (2.3.9) visualisiert. HTRA1 war lediglich in den Fractionen ab 1,62 ml Elutionsvolumen zu erkennen (Abb. 3.5.2, A), wobei das *Peak*-Maximum von HTRA1 bei 1,62 ml Elutionsvolumen lag. Der Calpain 2 *Peak* zeigte ein Maximum bei 1,72 ml Elutionsvolumen. In dieser Fraction ließ sich die maximale Menge von Calpain 2 erkennen (Abb. 3.5.2 B). Lediglich nach Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 konnten beide Proteine in den Fractionen entsprechend des Elutionsvolumens des neuen *Peaks* detektiert werden (Abb. 3.5.2, C). Vorinkubation mit einer Mutante von HTRA1 ohne PDZ-Domäne (HTRA1 Δ PDZ) und Calpain 2 führte nicht dazu, dass Proteine im Bereich höherer Molekulargewichte detektiert werden können (Abb. 3.5.2 D). Eine Bestimmung der Stöchiometrie des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes ist mittels Silber gefärbtem SDS-Polyacrylamid-Gel nicht möglich, da diese Färbung nicht quantifizierbar ist.

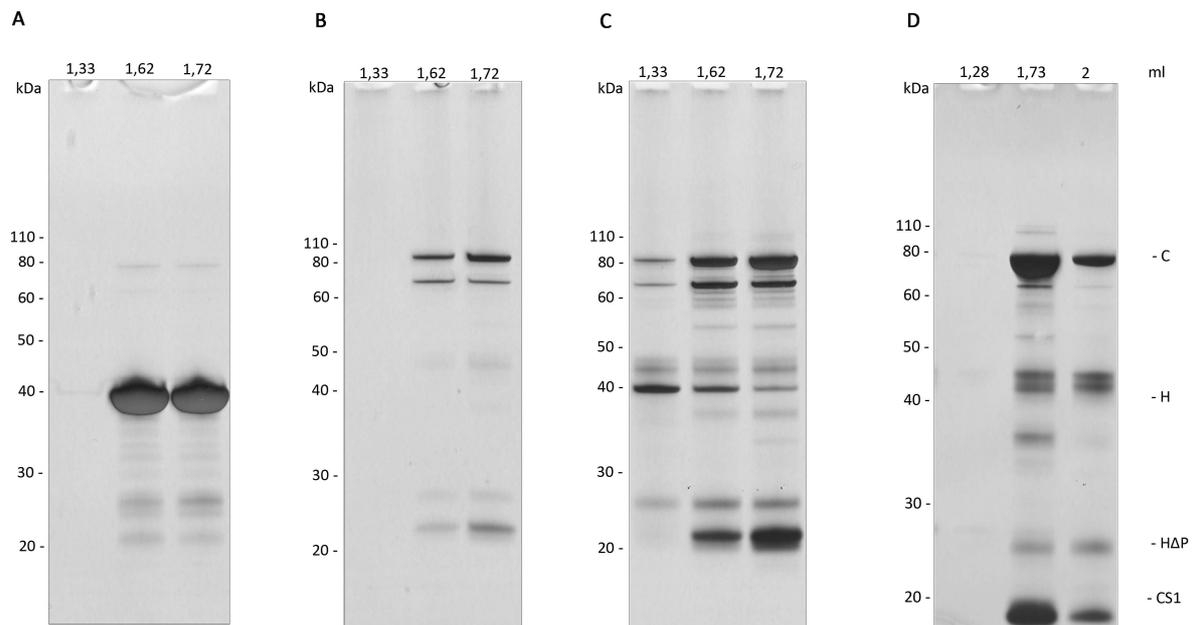


Abb. 3.5.2: Silber gefärbte SDS-PAGE Analyse der analytischen Größenausschlusschromatographie

Aufgetragen wurden ausgewählte Elutionsfractionen der Größenausschlusschromatographie, die bei dem angegebenen Elutionsvolumen gesammelt wurden. HTRA1 –H; Calpain 2 große Untereinheit –C, HTRA1 Δ PDZ -H Δ P, Calpain kleine Untereinheit –CS1. **A:** Kontrolllauf mit HTRA1 (200 μ M). **B:** Kontrolllauf mit Calpain 2 (20 μ M). **C:** HTRA1 (20 μ M) und Calpain 2 (60 μ M) nach Vorinkubation. **D:** HTRA1 Δ PDZ (20 μ M) und Calpain 2 (60 μ M) nach Vorinkubation.

Calpain 2 mit der großen und kleinen Untereinheit sowie HTRA1 konnten mittels Western Blot Analyse in der Fraktion des neuen *Peaks* nachgewiesen werden (Abb. 3.5.3).

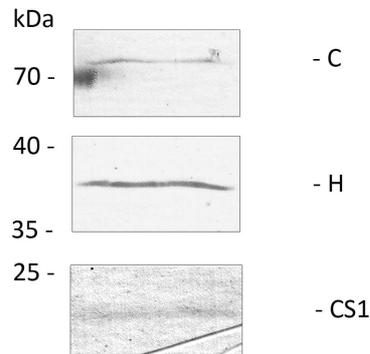


Abb. 3.5.3: Western Blot Analyse der Komplexfraktion

Im oberen Abschnitt wurde im Western Blot der Primärantikörper gegen Calpain 2 aus Maus (Sigma) und im mittleren Abschnitt der Antikörper gegen HTRA1 aus Kaninchen verwendet. Im unteren Abschnitt wurde der Antikörper gegen die kleine Untereinheit von Calpain 2 aus Maus genutzt. Immundetektion erfolgte mit alkalischer Phosphatase. HTRA1 –H; Calpain 2 große Untereinheit –C, Calpain kleine Untereinheit –CS1.

Um Bedingungen zu finden, die eine stabilere Assemblierung des Komplexes aus Calpain 2 und HTRA1 erlauben, wurden verschiedene Puffer getestet (Tab. 3.2). Bei pH Werten unter 6,5 sind beide Proteasen instabil und nicht löslich.

Tab. 3.2: Pufferbedingungen für die analytische Größenausschlusschromatographie

Alle Puffersubstanzen wurden in einer Konzentration von 50 mM verwendet mit Zugabe von 150 mM NaCl. Die pH Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt. Im Fall von Tris erhöhen sich die pH Werte bei 8°C um jeweils 0,44.

Puffersubstanz	pH Wert
Mes	6,5
NaH ₂ PO ₄	7
Hepes	7
Mops	7,5
Tris	8 und 8,5
Bicin	9

Die Vorinkubation beider Proteasen wurde in den genannten Puffern ausgeführt, die Größenausschlusschromatographie wurde in allen Fällen in SEC Puffer Hepes durchgeführt. Der Komplex aus Calpain 2 und HTRA1 zeigte eine höhere Stabilität und bessere Assemblierung mit steigendem pH Wert (Abb. 3.5.4). In 50 mM Tris pH 8,5, 150 mM NaCl lässt sich bereits ein deutlich höherer *Peak* erkennen. Der Komplex schien vor allem bei Vorinkubation in 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl stabil zu sein.

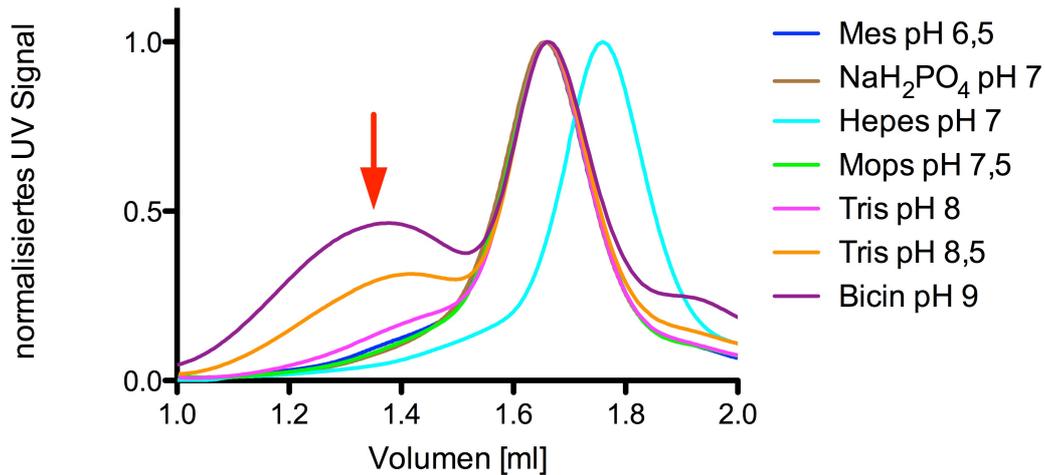


Abb. 3.5.4: Test verschiedener Pufferbedingungen in der analytischen Größenausschlusschromatographie

Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie nach Vorinkubation von HTRA1 (100 µM) und Calpain 2 (100 µM) in unterschiedlichen Puffern (blau = Mes, braun = NaH₂PO₄, hellblau = Hepes, grün = Mops, magenta = Tris pH 8, orange = Tris pH 8,5, lila = Bicin). Die Chromatographiesäule wurde in SEC Puffer Hepes äquilibriert. Die Proben wurden nach Zentrifugation auf die Chromatographiesäule (Superdex200 5/150 GL) injiziert. Der *Peak* des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes wurde durch einen roten Pfeil markiert.

Im korrespondierenden Silber gefärbten SDS-Gel war zu erkennen, dass mit steigendem pH Wert mehr HTRA1 und Calpain 2 in der Probe vom Elutionsvolumen (1,38 ml) des Komplexes zu sehen ist (Abb. 3.5.5). Der *Peak* bei 1,66 ml bzw. 1,76 ml Elutionsvolumen entsprach der Größe der einzelnen, nicht im Komplex vorliegenden Proteine.

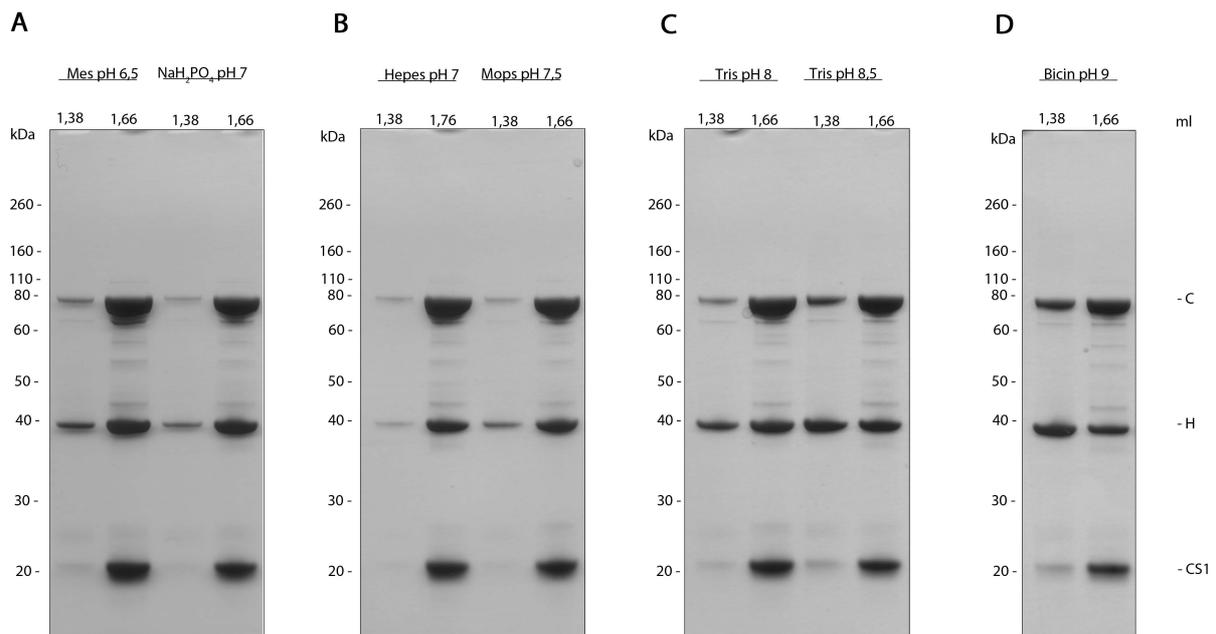


Abb. 3.5.5: Silber gefärbte SDS-PAGE Analyse des Puffertests

3. Ergebnisse

Angaben der Spuren erfolgten in ml Elutionsvolumen. **A:** Größenausschlusschromatographie nach Vorinkubation in 50 mM Mes pH 6,5, 150 mM NaCl und 50 mM NaH₂PO₄ pH 7, 150 mM NaCl. **B:** Auftrag der Fraktionen nach Vorinkubation in 50 mM Hepes pH 7, 150 mM NaCl und 50 mM Mops pH 7,5, 150 mM NaCl. **C:** Größenausschlusschromatographie nach Vorinkubation in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl und 50 mM Tris pH 8,5, 150 mM NaCl. **D:** Auftrag der Fraktionen nach Vorinkubation in 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl

Bicin pH 9 wurde als geeignete Puffersubstanz ausgewählt und die Vorinkubation sowie die Größenausschlusschromatographie wurden für weitere Versuche in diesem Puffer durchgeführt (Abb. 3.5.6). In Abb. 3.5.6 wurden zusätzlich die Kontrollen der einzelnen Proteine wiederholt.

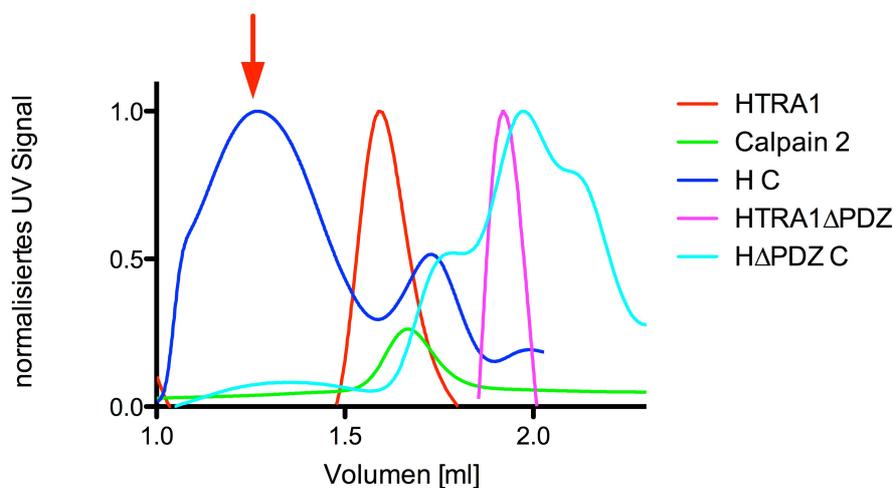


Abb. 3.5.6: Analytische Größenausschlusschromatographie in Bicin

Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie in 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl. In rot wurden die HTRA1 Kontrolle (HTRA1), in grün die Calpain 2 Kontrolle (Calpain 2) und in magenta die HTRA1ΔPDZ Kontrolle (HTRA1ΔPDZ) dargestellt. In den Kontrollen wurde kein *Peak* bei ca. 1,3 ml Volumen detektiert. HTRA1 und Calpain 2 wurden im Verhältnis 1:1 zu je 70 μM vorinkubiert (H C, blau) und im Anschluss ein neuer *Peak* bei ca. 1,3 ml Volumen detektiert (roter Pfeil). Vorinkubation von HTRA1ΔPDZ und Calpain 2 (HΔPDZ C, 1:1, je 70 μM, hellblau) lieferte keinen neuen *Peak* bei 1,3 ml Volumen. Die Proben wurden nach Zentrifugation auf die Chromatographiesäule (Superdex200 5/150 GL) injiziert.

Wurde die Chromatographiesäule ebenfalls in der Puffersubstanz äquilibriert, so konnte eine zusätzliche Verbesserung der Auftrennung des Komplexes erzielt werden. Der *Peak* der einzelnen Proteine bei ca. 1,7 ml war nur noch halb so groß wie der Komplex-*Peak* und beide waren deutlich voneinander zu trennen. Die einzelnen Proteine zeigten nur einen *Peak* bei ca. 1,6 ml für HTRA1 und ca. 1,65 ml für Calpain 2. Eine Vorinkubation von Calpain 2 mit HTRA1ΔPDZ führte auch in diesem Puffer zu keiner Komplexbildung.

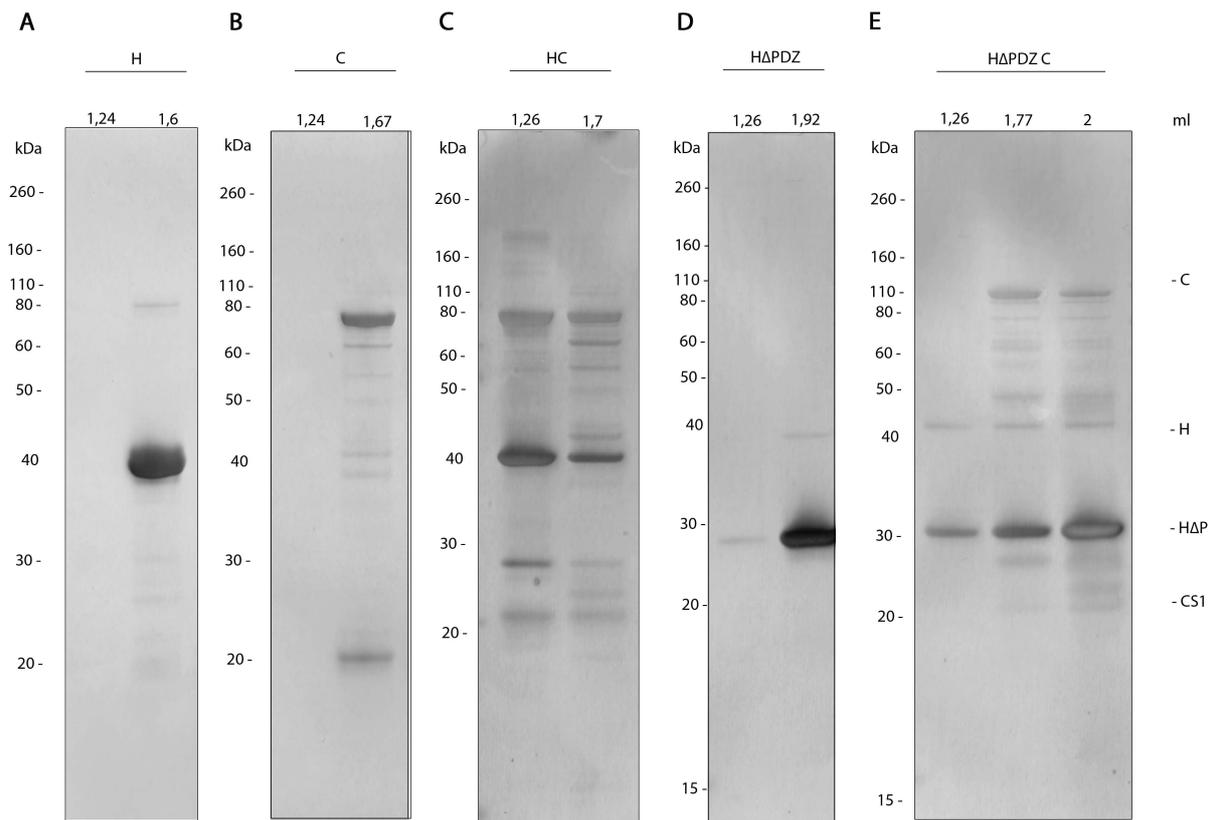


Abb. 3.5.7: Silber gefärbte SDS-PAGE der analytischen Größenausschlusschromatographie in Bicin

Angaben der Spuren erfolgten in ml Elutionsvolumen. **A:** Kontrolllauf mit HTRA1 (70 μ M). **B:** Kontrolllauf mit Calpain 2 (70 μ M). **C:** HTRA1 (70 μ M) und Calpain 2 (70 μ M) nach Vorinkubation. **D:** HTRA1 Δ PDZ (70 μ M) Kontrolllauf. **E:** HTRA1 Δ PDZ (70 μ M) und Calpain 2 (70 μ M) nach Vorinkubation.

Die Kontrolle mittels SDS-PAGE Analyse (Abb. 3.5.7) bestätigte die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie. So waren Calpain 2 und HTRA1 in den Kontrollen nicht im Elutionsvolumen des Komplex-*Peaks* zu sehen (Abb. 3.5.7 A, B). Nach Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 lag der größte Anteil der Proteine im Komplex-*Peak* vor (Abb. 3.5.7 C). HTRA1 Δ PDZ allein zeigte eine schwache Bande im Komplex-*Peak*, die auch in den Proben nach Vorinkubation mit Calpain 2 zu erkennen war (Abb. 3.5.7 D, E).

Die Fraktion des neuen *Peaks* wurde mittels Western Blot auf das Vorhandensein von Calpain 2 und HTRA1 untersucht (Abb. 3.5.8 HC). Des Weiteren wurden bekannte Calpain 2 und HTRA1 Mengenverhältnisse eingesetzt um so durch Vergleich mit der *Peak*-Fraktion ein Verhältnis beider Proteasen bestimmen zu können (Abb. 3.5.8).

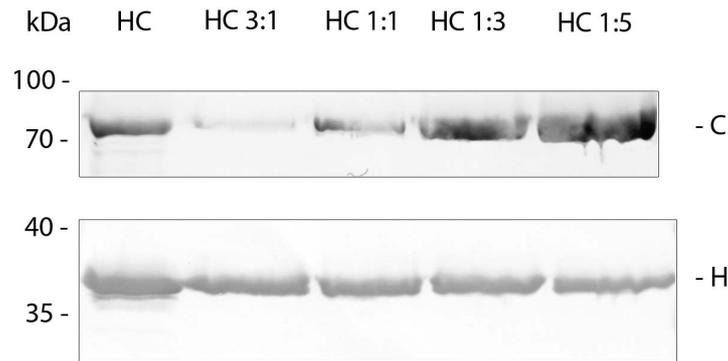


Abb. 3.5.8: Western Blot Analyse der Komplexfraktion zur Bestimmung der Stöchiometrie

Western Blot Analyse der HTRA1-Calpain 2 Komplexfraktion und Vergleich mit bekannten Mengenverhältnissen von HTRA1 und Calpain 2. Im oberen Abschnitt wurde im Western Blot der Primärantikörper gegen Calpain 2 aus Maus (Sigma) und im unteren Abschnitt der Antikörper gegen HTRA1 aus Kaninchen verwendet. Immundetektion erfolgte mit alkalischer Phosphatase. Die Auswertung mittels ImageJ ergab folgende Verteilung: HC 42,42 % Calpain 2 und 57,32 % HTRA1; HC 3:1 10,55 % Calpain 2 und 89,45 % HTRA1; HC 1:1 39,08 % Calpain 2 und 60,92 % HTRA1; HC 1:3 63,72 % Calpain 2 und 36,28 % HTRA1; HC 1:5 77,71 % Calpain 2 und 22,29 % HTRA1

Vergleichbare Mengenverhältnisse konnten mit einem Verhältnis von HTRA1:Calpain 2 in einer Stöchiometrie von 1:1 ermittelt werden. Die Auswertung mit Hilfe von ImageJ ergab für die Fraktion des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes eine Verteilung von 42,42 % Calpain 2 und 57,32 % HTRA1. Ein eingesetztes Verhältnis von 1:1 ergab eine Verteilung von 39,08 % Calpain 2 und 60,92 % HTRA1. Diese Stöchiometrie kann als wahrscheinlich betrachtet werden, da HTRA1 in allen Größenausschlusschromatographien einen stabilen Trimer bildet. Jeder Trimer könnte drei Calpain 2 Heterodimere binden. In Versuchen, in denen verschiedene HTRA1 – Calpain 2 Verhältnisse für die analytische Größenausschlusschromatographie getestet wurden, zeigte sich, dass sich der Komplex am besten bei gleichen Verhältnis oder einem Überschuss von Calpain 2 bildet. Ein Überschuss von HTRA1 ließ das UV Signal des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes im Vergleich deutlich geringer ausfallen. Die besten Ergebnisse konnten mit gleichen HTRA1 und Calpain 2 Konzentrationen erzielt werden (je 70 oder 100 μ M).

3.5.2. Analyse der molekularen Masse des HTRA1-Calpain 2 Komplexes mit Hilfe von MALS-SEC

Da die verwendete Größenausschlusschromatographiesäule im hohen molekularen Bereich keine gute Auftrennung zeigte, wurde die genaue Größe des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes mit Hilfe von MALS-SEC analysiert (2.3.21). Mittels dieser Methode wurde durch einen Lichtstreu-Detektor im Anschluss an eine Größenausschlusschromatographie die

3. Ergebnisse

Partikelgröße bestimmt. Mit Hilfe eines Brechungsindex (RI) Detektors, welcher spezifisch für Proteine ist, ließ sich die Konzentration der Partikel bestimmen. Für die MALS-SEC Analyse wurden HTRA1 und Calpain 2 einzeln über eine Größenausschlusschromatographie von möglichen Aggregaten vorgereinigt, da diese Analysemethode extrem sensitiv ist. Nach anschließender Vorinkubation beider vorgereinigter Proteasen in 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl ließ sich ein Komplex-Peak mit homogener Massenverteilung detektieren (Abb. 3.5.9 A).

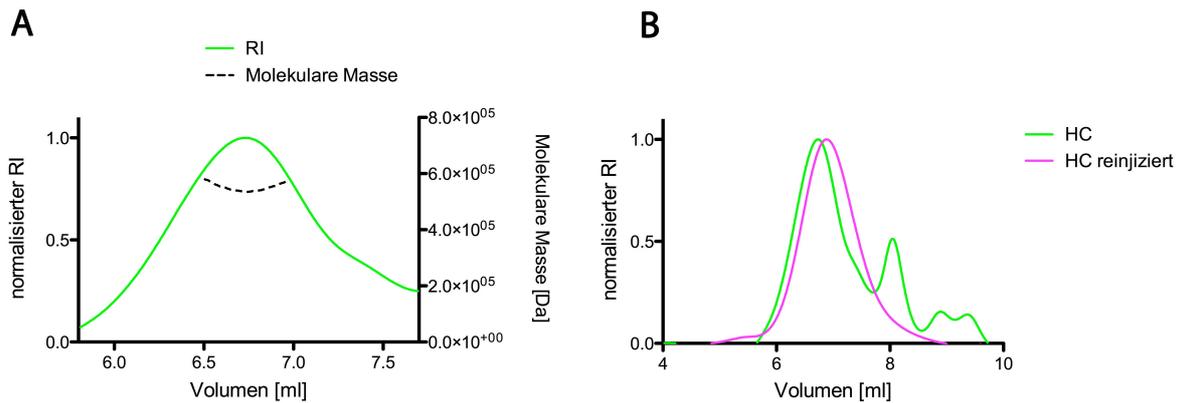


Abb. 3.5.9: MALS-SEC Analyse des HTRA1-Calpain 2 Komplexes

A: MALS-SEC Analyse des Komplex-Peaks ergab eine homogene Population von Proteinen der Größe $535 \pm 0,5$ kDa, die gestrichelte Linie entspricht der molekularen Masse. **B:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von vorinkubiertem HTRA1 (100 μ M) und Calpain 2 (100 μ M) in 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl (grün). Fraktionen des Komplex-Peaks wurden vereinigt und nochmals injiziert (magenta).

Es konnte eine homogene Proteinpopulation von $535 \pm 0,5$ kDa detektiert werden. Die Reinjektion der vereinigten Fraktionen des Komplex-Peaks zeigte, dass der Komplex stabil war und nicht in die einzelnen Proteine zerfiel (Abb. 3.5.9 B). Mit Hilfe der experimentell bestimmten Größe des Komplexes von $535 \pm 0,5$ kDa und der zuvor abgeschätzten Stöchiometrie laut Western Blot Analyse von etwa 1:1 (Abb. 3.5.8) ließen sich theoretische Kalkulationen über die Zusammensetzung des Komplexes aufstellen. Es handelte sich wahrscheinlich um ein HTRA1 Trimer (ca. 109 kDa) und vier Calpain 2 Heterodimere (je ca. 104 kDa). Diese Summe bildet einen Wert von 525 kDa, welcher eine potenzielle Lösung für die bestimmte Masse von $535 \pm 0,5$ kDa bildet.

3.5.3. Untersuchung der Struktur des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die Struktur des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes wurde zudem mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht (2.3.20). Zu diesem Zweck wurde eine Größenausschlusschromatographie über eine Superdex200 10/300 Chromatographiesäule durchgeführt (Abb. 3.5.10). Um Aggregate in den Proben für das TEM zu vermeiden, wurden die einzelnen Proteine vor ihrer gemeinsamen Vorinkubation über eine Größenausschlusschromatographie von möglichen Aggregaten gereinigt. Für eine bessere Homogenität der Proben wurden Teile des Komplex-*Peaks*, der nach Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 entstand, vereinigt und wieder auf die Chromatographiesäule injiziert.

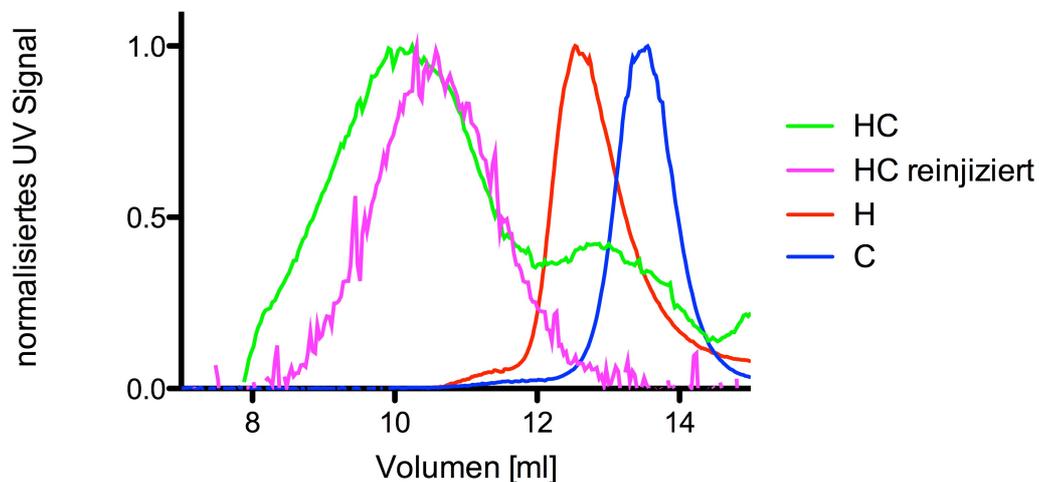


Abb. 3.5.10: Größenausschlusschromatographie für TEM Aufnahmen

Chromatogramm der analytischen Größenausschlusschromatographie. In rot wurde die HTRA1 und in blau die Calpain 2 Vorreinigung dargestellt. Im Anschluss an die Vorinkubation von HTRA1 (100 μ M) und Calpain 2 (100 μ M) wurde die Probe nach Zentrifugation auf die Chromatographiesäule (Superdex200 10/300 GL) injiziert (grün). Teile des Komplex-*Peaks* wurden vereinigt und wieder injiziert (magenta).

Die Fraktionen des Komplex-*Peaks* wurden nach Färbung und Anlagerung an ein Gitternetz im EM analysiert. Es zeigten sich homogene Partikel von ähnlicher Größe (Abb. 3.5.11 A), die deutlich größer waren als die einzelnen Proteine in der Kontrolle (Abb. 3.5.11 B, C). Als Dimensionen des HTRA1- Calpain 2 Komplexes ließen sich etwa 18 x 15 x 11 nm ermitteln. In Abb. 3.5.11 sind außerdem noch Vergrößerungen einzelner Partikel dargestellt. Hier ließ sich eine dreieckige Form der Partikel gut erkennen.

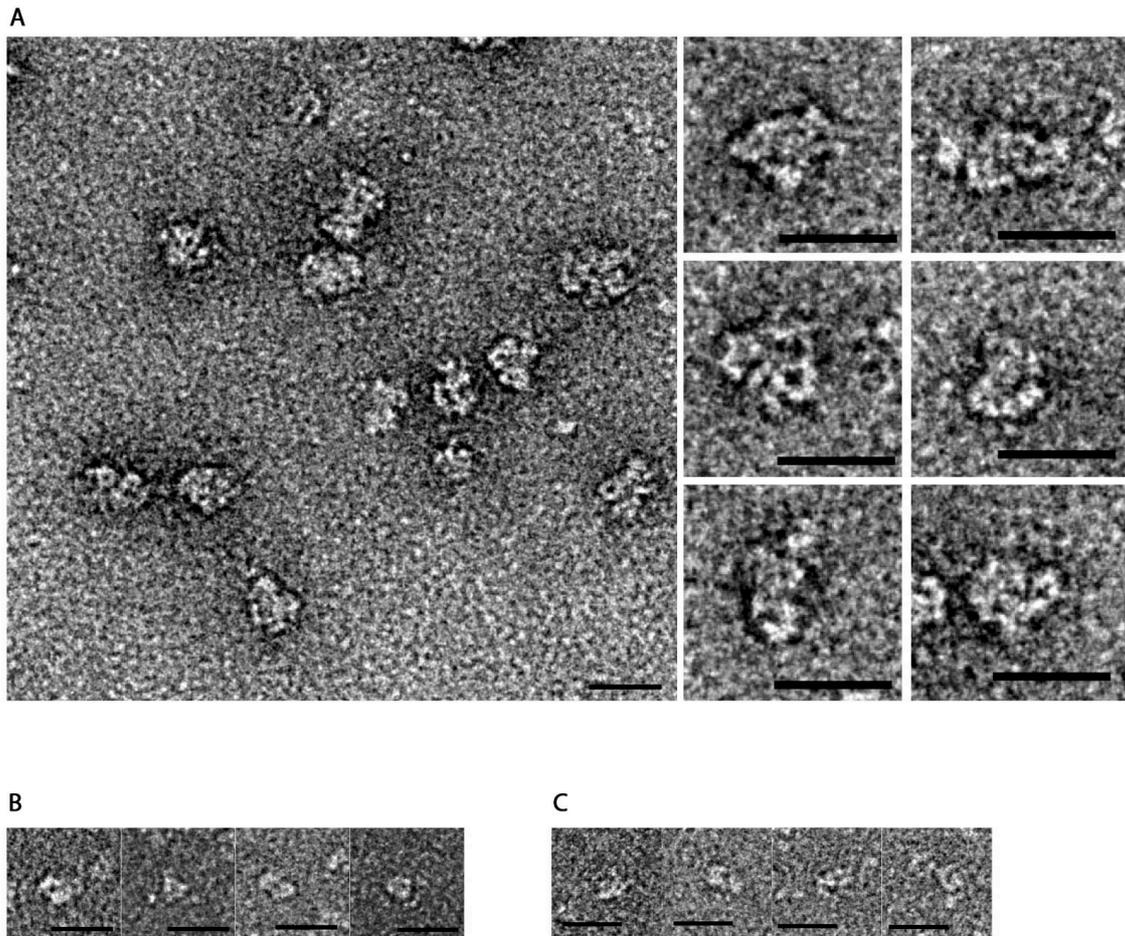


Abb. 3.5.11: TEM Aufnahmen des HTRA1-Calpain 2 Komplexes

Maßstabsleiste entspricht 20 nm. **A:** Aufnahmen des HTRA1-Calpain 2 Komplexes, Probe stammt aus dem HTRA1 – Calpain 2 Komplex-*Peaks* aus der Größenausschlusschromatographie. **B:** Aufnahmen von HTRA1. **C:** Aufnahmen von Calpain 2

3.6. Charakterisierung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 mittels Aktivitätsassays

Für die funktionelle Charakterisierung der Interaktion von HTRA1 und Calpain wurde mit Hilfe verschiedener Aktivitätsassays eine Änderung in der Proteolysegeschwindigkeit betrachtet. Dafür wurden pNA Aktivitätsassays (2.3.11) und die Proteolyse von Proteinsubstraten (2.3.13) durchgeführt.

3.6.1. pNA Aktivitätsassays

Mit Hilfe von pNA Aktivitätsassays (2.3.11) wurde überprüft ob die Zugabe von Calpain 2 zu HTRA1 zu einer Änderung in der Geschwindigkeit der Proteolyse des pNA-Substrats durch HTRA1 führte.

Für die Untersuchung der Interaktion beider Proteasen wurden diese vor Zugabe des Substrats für zehn Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Aktivität von HTRA1 und HTRA1ΔPDZ wurde durch Zugabe von Calpain 2, unabhängig vom Verhältnis, erhöht (Abb. 3.6.1).

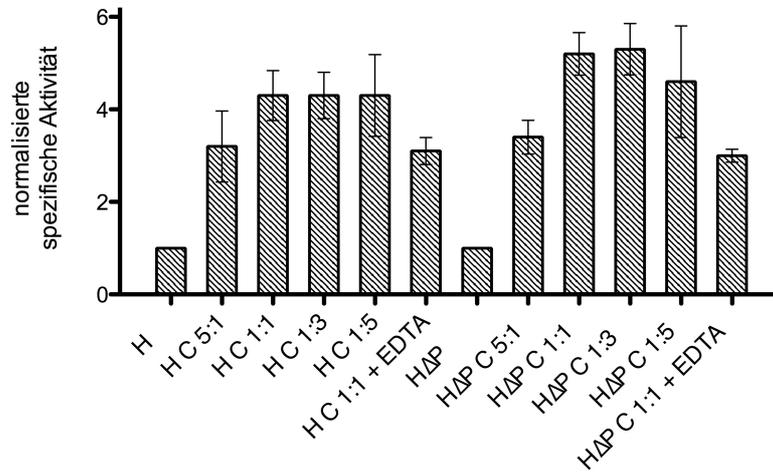


Abb. 3.6.1: pNA-Aktivitätsassays HTRA1 mit Calpain 2

Es wurden 1 μM HTRA1 (H) bzw. HTRA1ΔPDZ (HΔP) und 500 μM pNA-Peptid bei 37°C über die Dauer von zwei Stunden inkubiert. Calpain 2 (C) wurde in den Konzentrationen 0,2; 1; 3 und 5 μM zugegeben. HTRA1 wurde durch Zugabe von Calpain 2 um das drei bis vierfache aktiviert. Als Kontrolle wurde die Zugabe von 100 mM EDTA genutzt, das die Aktivität von Calpain 2 komplett inhibiert. HTRA1ΔPDZ wurde ebenfalls durch die Zugabe von Calpain 2 aktiviert. Die Aktivitäten wurden für den Vergleich auf die spezifische Aktivität von HTRA1 (5,6 nmol/(mg*min)) bzw. HTRA1ΔPDZ (10,9 nmol/(mg*min)) normalisiert.

In der Kontrolle konnte gezeigt werden, dass Calpain 2 auch bei Zugabe von 5 mM CaCl₂ (AMC Puffer) keine Aktivität im pNA Assay mit dem verwendeten pNA-Peptid der Sequenz VFNTLPMMGKASPV-pNA zeigte. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass das pNA Substrat nur von HTRA1 umgesetzt wird. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Zugabe von 100 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gewählt. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, wie z.B. Ca²⁺, und führt so dazu, dass Calpain 2 kein Calcium zur Aktivierung zur Verfügung steht und somit inaktiv bleibt. Diese Kontrolle dient dazu, auszuschließen, dass eine mögliche Aktivierung von HTRA1 durch eine Aktivität von Calpain 2 verfälscht wird.

Es wurde außerdem getestet ob HTRA1 umgekehrt einen Einfluss auf die Aktivität von Calpain 2 hat. Im AMC Assay (2.3.12) von Calpain 2 zeigte sich keine Änderung der Aktivität durch Zugabe von HTRA1 (Abb. 3.6.2). Als Kontrolle wurde getestet ob HTRA1 das AMC gekoppelte Peptidsubstrat von Calpain 2 proteolysieren kann. HTRA1 zeigte dabei keine proteolytische Aktivität.

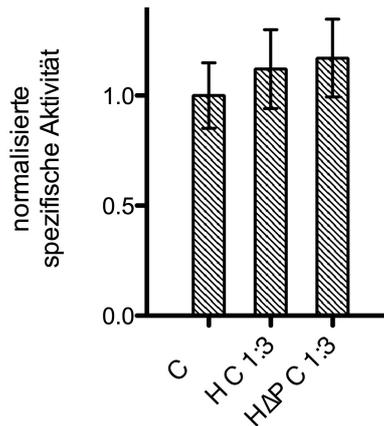


Abb. 3.6.2: AMC-Aktivitätsassay Calpain 2 mit HTRA1

Es wurden 1,5 μM Calpain 2 und 200 μM AMC gekoppeltes Peptidsubstrat bei 23°C für 90 Minuten inkubiert und jede Minute die Fluoreszenz von freiem AMC durch Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm und Emission bei 450 nm gemessen. Die Zugabe von je 0,5 μM HTRA1 bzw. HTRA1 Δ PDZ zeigte keine Änderung in der Aktivität von Calpain 2. Die Aktivitäten wurden zum Vergleich auf die spezifische Aktivität von Calpain 2 (1,12 nmol/(mg*min)) normalisiert.

3.6.2. Proteolyse von löslichem Tau

In den vorherigen Experimenten wurden Enzymaktivitäten mit synthetischen Substraten bestimmt. Um diese Daten zu ergänzen, wurde im Folgenden die Aktivitäten HTRA1 und Calpain 2 mit ihrem natürlichen Proteinsubstrat Tau untersucht (Tennstaedt *et al.*, 2012, Johnson *et al.*, 1989). Um die Auswirkungen der Interaktion beider Proteasen bei der Proteolyse eines nativen Substrats zu untersuchen, wurde das rekombinant gereinigte Tau 4R genutzt (3.3). In die Reaktion wurde eine inaktive Calpain Mutante (2.2.2) eingesetzt, um sicherzustellen, dass nur die Aktivität von HTRA1 betrachtet wird. Die Zugabe von inaktivem Calpain 2 (CA) zu HTRA1 führte in allen Verhältnissen zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität, wobei der Einfluss auf HTRA1 (Abb. 3.6.3) größer war als auf HTRA1 Δ PDZ (Abb. 3.6.4). HTRA1 selbst kann Tau 4R innerhalb von 30 Minuten nicht komplett proteolysieren (Abb. 3.6.3 A).

3. Ergebnisse

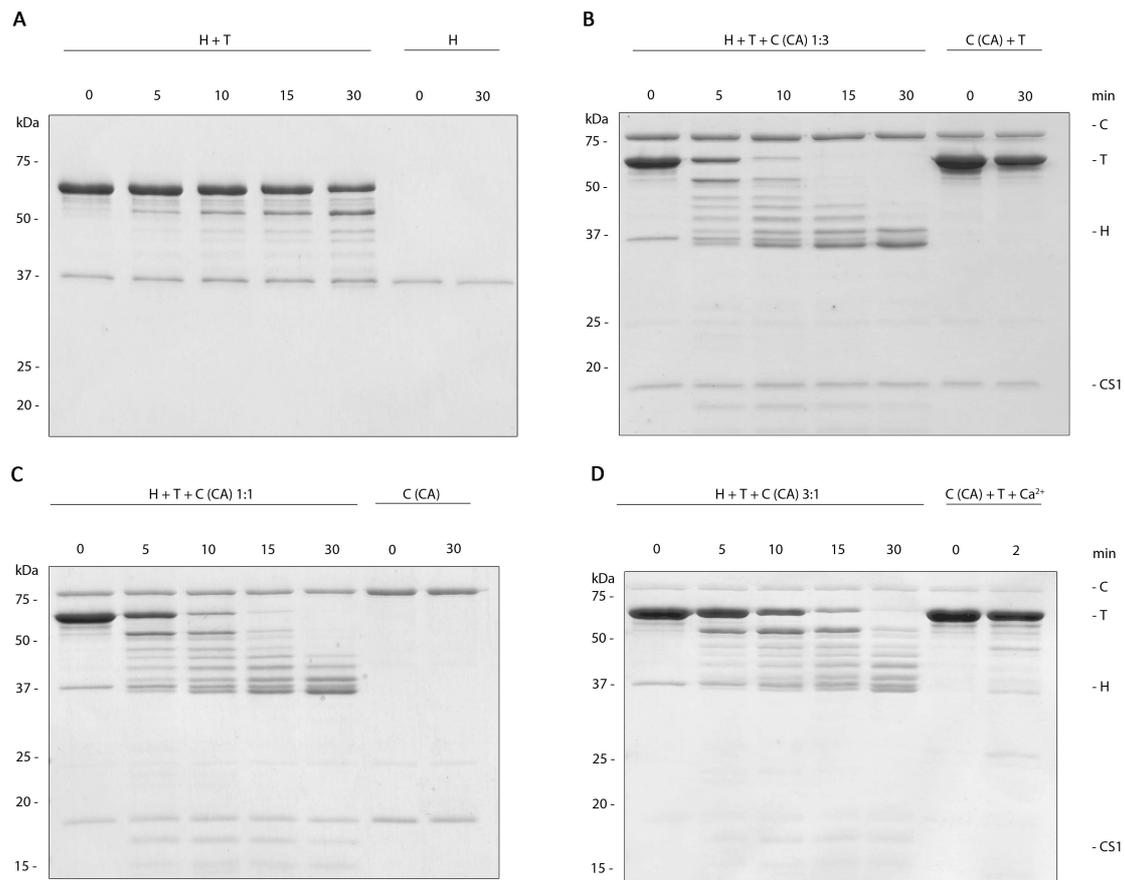


Abb. 3.6.3: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 zusammen mit inaktivem Calpain 2 (CA)

SDS-Polyacrylamid-Gel mit Proben der Proteolysen, die Dauer wurde in Minuten angegeben. Nach einer Vorinkubation von HTRA1 und inaktivem Calpain 2 (CA) für zehn Minuten bei 37°C folgte die Zugabe von Tau 4R (2.3.13). In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse (2.3.7) entnommen. **A:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R (T) durch 0,5 μM HTRA1 (H) und HTRA1 Kontrolle (0,5 μM). **B:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R durch 0,5 μM HTRA1 nach Vorinkubation mit 1,5 μM Calpain 2 (C, kleine Untereinheit CS1, 1:3). Inkubation von 1,5 μM Calpain 2 mit 5 μM Tau 4R. **C:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R durch 0,5 μM HTRA1 nach Vorinkubation mit 0,5 μM Calpain 2 (1:1) und Calpain 2 Kontrolle (1,5 μM). **D:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R durch 0,5 μM HTRA1 und 0,17 μM Calpain 2 (3:1). Calpain 2 Kontrolle mit Calcium zeigte keinen deutlichen Verdau von Tau 4R.

Wie in Abb. 3.6.3 A, C zu erkennen ist, waren HTRA1 und Calpain 2 (CA) stabil über den Zeitraum des Assays und zeigten keine Autoproteolyse. Die Steigerung der Aktivität nahm mit steigendem Calpain 2 (CA) Anteil zu. Es konnte gezeigt werden, dass Calpain 2 (CA) sogar nach Zugabe von Calcium inaktiv blieb (Abb. 3.6.3 D). Die Aktivierung von HTRA1 ließ sich vor allem durch Vergleich der Proben bei zehn Minuten erkennen. Die zunehmende Anzahl an Banden unterhalb der Tau 4R Bande entsprechen Proteolyseprodukten von Tau 4R. HTRA1 Δ PDZ zeigt eine zu HTRA1 vergleichbare langsame Proteolyse von Tau 4R (Abb. 3.6.4 A). Durch die Vorinkubation mit dreifachem

3. Ergebnisse

Überschuss von Calpain 2 (CA), äquimolarem Verhältnis oder dreifachem Überschuss von HTRA1 Δ PDZ zeigte sich eine deutliche Beschleunigung der Proteolyse (Abb. 3.6.4 B, C, D).

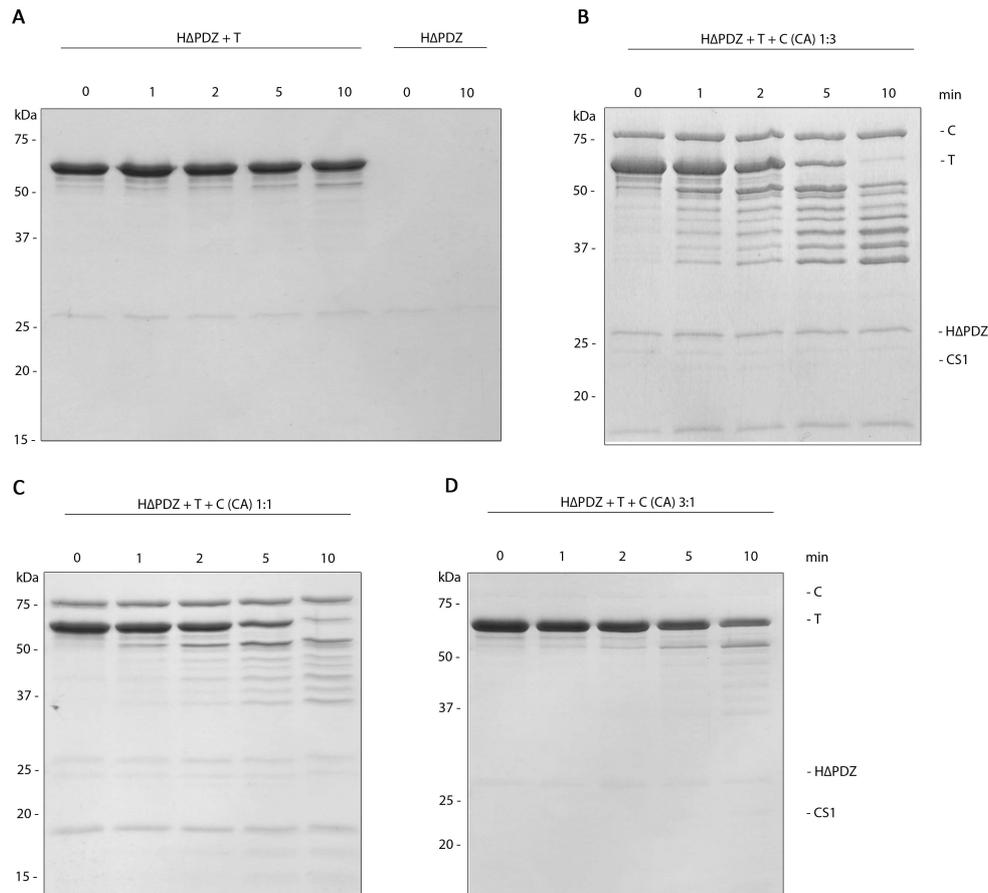


Abb. 3.6.4: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 Δ PDZ zusammen mit inaktivem Calpain 2 (CA)

SDS-Polyacrylamid-Gel mit Proben der Proteolysen, die Dauer wurde in Minuten angegeben. Nach einer Vorinkubation von HTRA1 Δ PDZ und inaktivem Calpain 2 (CA) für zehn Minuten bei 37°C folgte die Zugabe von Tau 4R (2.3.13). In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse (2.3.7) entnommen. **A:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R (T) durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ (H Δ PDZ) und HTRA1 Δ PDZ Kontrolle (0,5 μ M). **B:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ nach Vorinkubation mit 1,5 μ M Calpain 2 (C, kleine Untereinheit CS1, 1:3). **C:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ nach Vorinkubation mit 0,5 μ M Calpain 2 (1:1). **D:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ nach Vorinkubation mit 0,17 μ M Calpain 2 (3:1).

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei Verwendung von aktivem Calpain 2. Auch hier war der Einfluss auf HTRA1 (Abb. 3.6.5) größer als auf HTRA1 Δ PDZ (Abb. 3.6.6).

3. Ergebnisse

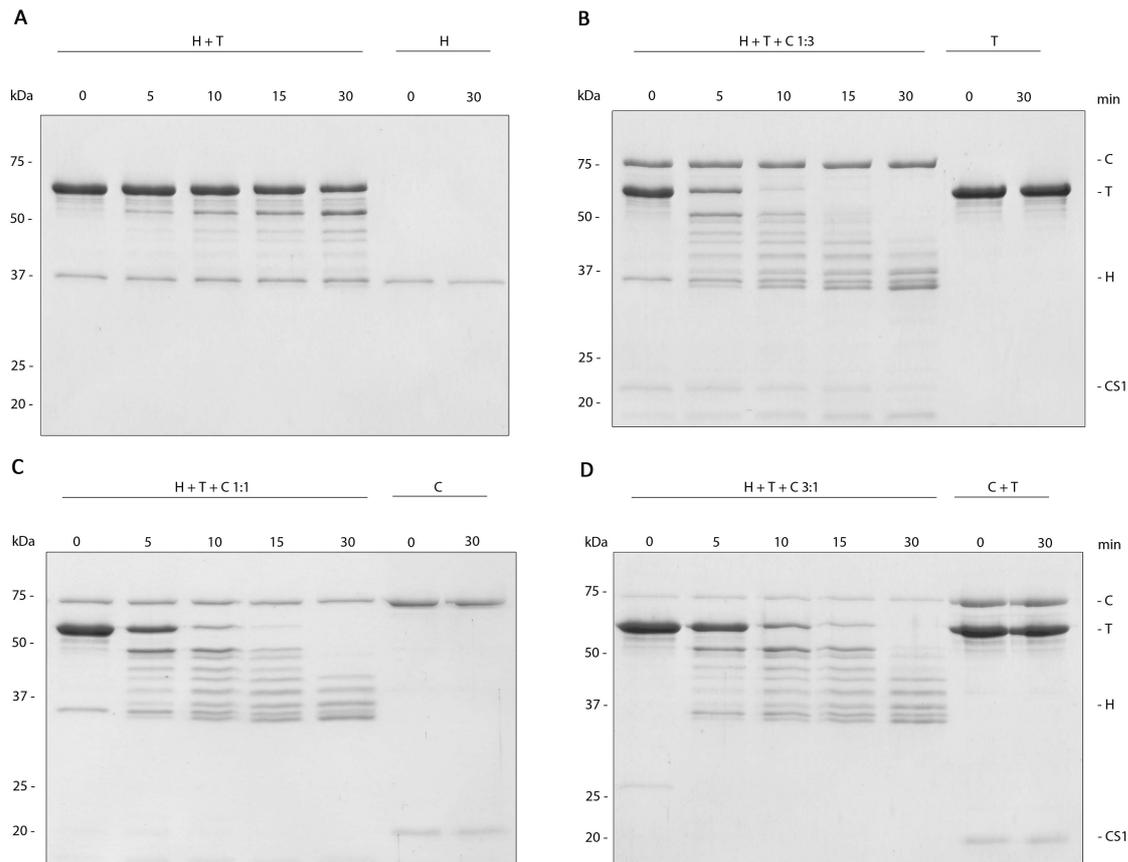


Abb. 3.6.5: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 zusammen mit aktivem Calpain 2

SDS-Polyacrylamid-Gel mit Proben der Proteolysen, die Dauer wurde in Minuten angegeben. Nach einer Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 für zehn Minuten bei 37°C folgte die Zugabe von Tau 4R (2.3.13). In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse (2.3.7) entnommen. **A:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R (T) durch 0,5 μM HTRA1 (H) und HTRA1 Kontrolle (0,5 μM). **B:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R durch 0,5 μM HTRA1 nach Vorinkubation mit 1,5 μM Calpain 2 (C, kleine Untereinheit CS1, 1:3) und Tau 4R Kontrolle (5 μM). **C:** Proteolyse von 5 μM Tau 4R durch 0,5 μM HTRA1 vorinkubiert mit 0,5 μM Calpain 2 (1:1) und Calpain 2 Kontrolle (1,5 μM). **D:** Verdau von 5 μM Tau 4R durch 0,5 μM HTRA1 nach Vorinkubation mit 0,17 μM Calpain 2 (3:1) und Calpain 2 (1,5 μM) Kontrolle mit 5 μM Tau.

HTRA1, Tau 4R und Calpain 2 alleine waren stabil im verwendeten Puffer und zeigten keine Autoproteolyse (Abb. 3.6.5 A, B, C). Inkubation von aktivem Calpain 2 zusammen mit Tau 4R im HTRA1 Puffer führte nicht zur Degradation von Tau 4R (Abb. 3.6.5 D). Ein steigender Anteil von Calpain 2 in der Vorinkubation führte zu einer gesteigerten Aktivität von HTRA1.

3. Ergebnisse

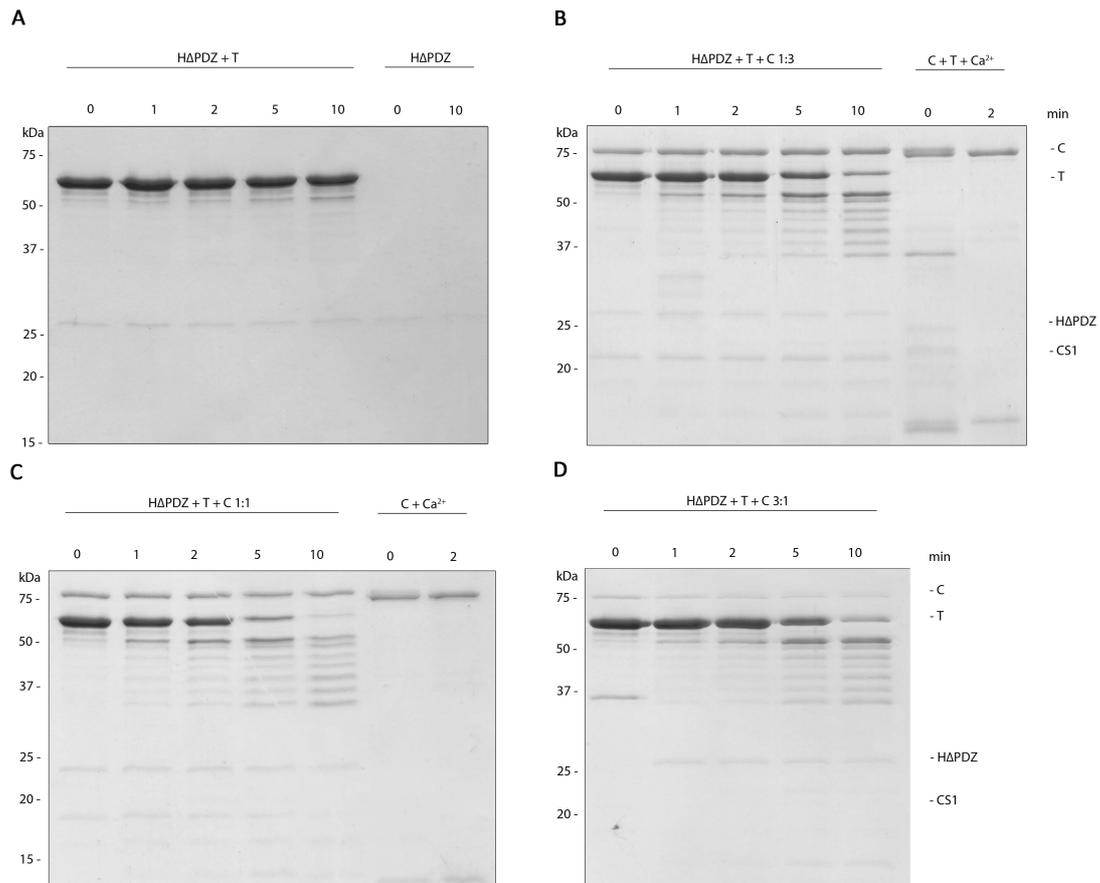


Abb. 3.6.6: Proteolyse von löslichem Tau 4R durch HTRA1 Δ PDZ zusammen mit aktivem Calpain 2

SDS-Polyacrylamid-Gel mit Proben der Proteolysen, die Dauer wurde in Minuten angegeben. Nach einer Vorinkubation von HTRA1 Δ PDZ und Calpain 2 für zehn Minuten bei 37°C folgte die Zugabe von Tau 4R (2.3.13). In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse (2.3.7) entnommen. **A:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R (T) durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ (H Δ PDZ) und HTRA1 Δ PDZ (0,5 μ M). **B:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ nach Vorinkubation mit 1,5 μ M Calpain 2 (C, kleine Untereinheit CS1, 1:3). Calpain 2 (1,5 μ M) ist bei Zugabe von Calcium aktiv und baut 5 μ M Tau 4R innerhalb von zwei Minuten ab. Die Proteolyse war so schnell, dass eine Probenentnahme zum Zeitpunkt 0 Minuten kaum möglich war. **C:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ mit 0,5 μ M Calpain 2 (1:1) und Calpain 2 Kontrolle (1,5 μ M). **D:** Proteolyse von 5 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ nach Vorinkubation mit 0,17 μ M Calpain 2 (3:1).

Der Einfluss von Calpain 2 auf die Aktivität von HTRA1 Δ PDZ war ebenfalls deutlich zu erkennen, jedoch bleibt dieser Einfluss geringer als im Vergleich zu HTRA1 (Abb. 3.6.6 A - D). Aktives Calpain 2 zeigte im Puffer von HTRA1 keine Proteolyse von Tau 4R. Doch wird dieser Verdau im AMC Puffer, einem Puffer mit Calcium, durchgeführt, so kann Calpain 2 Tau 4R innerhalb von zwei Minuten komplett verdauen (Abb. 3.6.6 B). Dieser Verdau ist so schnell, dass eine Probenentnahme direkt nach Zugabe von Tau 4R nur noch eine dünne Bande von Tau 4R zeigt, obwohl die Mengen mit denen der Proteolyse durch

3. Ergebnisse

HTRA1 übereinstimmen. Diese Beobachtung wurde in allen durchgeführten Tau 4R Proteolysen gemacht. Calpain 2 zeigte bei Zugabe von Calcium Autoproteolyse (Abb. 3.6.6 C). Die Bande der großen Untereinheit von Calpain 2 ändert ihre Höhe im SDS-Gel deutlich. Diese Änderung war bei Inkubation von Calpain 2 im Puffer ohne Calcium nicht zu beobachten (Abb. 3.6.5 C).

3.6.3. Proteolyse von fibrillärem Tau

Eine Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 in der Proteolyse von fibrillärem Tau, dessen gesteigerte Konzentration charakteristisch für die Alzheimer'sche Erkrankung ist, sollte im Folgenden untersucht werden. Um fibrilläres Tau als Substrat verwenden zu können, wurde die Fibrillenbildung von rekombinantem Tau 4R und F3 (3.3) durch die Zugabe von Heparin induziert (2.3.16). Nach Ultrazentrifugation wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse (2.3.7) entnommen und die Proteinkonzentration (2.3.6) des fibrillären Taus bestimmt (Abb. 3.6.7). Aus etwa 50 % der eingesetzten Tau 4R Moleküle bildeten sich durch Zugabe von Heparin Fibrillen (Abb. 3.6.7 A). Ohne Zugabe von Heparin konnten keine unlöslichen und dementsprechend fibrillären Anteile von Tau 4R beobachtet werden (Abb. 3.6.7 B). Die Zugabe von Heparin zu Tau F3 führte zu einer vollständigen Bildung von Fibrillen F3 (Abb. 3.6.7 C). Ohne Zugabe von Heparin konnte unlösliches Tau F3 in geringerem Maß detektiert werden (Abb. 3.6.7 D).

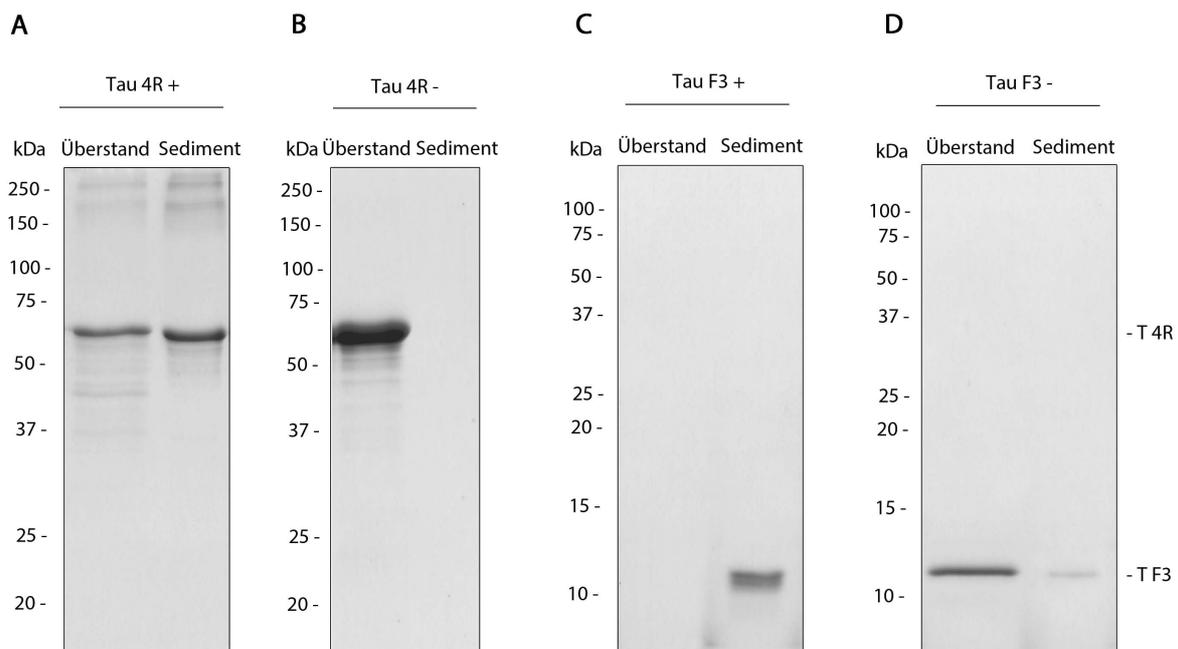


Abb. 3.6.7: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Bildung von Tau Fibrillen durch Zugabe von Heparin

Für die Bildung der Tau Fibrillen wurden 20 μM Tau (4R/F3) mit 50 μM Heparin über einen Zeitraum von 24 Stunden für Tau F3 bzw. 72 Stunden für Tau 4R bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. **A:** Überstand und Pellet von Tau 4R (- T 4R) mit Heparin nach Ultrazentrifugation (+). **B:** Proben nach Ultrazentrifugation von Tau 4R ohne Heparin (-). **C:** Tau F3 (- T F3) Ansatz mit Heparin, Proben nach Ultrazentrifugation (+). **D:** Tau F3 ohne Heparin nach Ultrazentrifugation (-).

Die Bildung der Tau Fibrillen konnte mittels ThT Fluoreszenz verfolgt werden (2.3.16). Das ThT Fluoreszenz-Signal stieg im Fall von Tau 4R mit Heparin deutlich an und blieb ohne Heparin unverändert (Abb. 3.6.8 A). Das ThT Fluoreszenz-Signal von Tau F3 erhöhte sich mit und ohne Heparin, was mit der Beobachtung der SDS-PAGE Analyse übereinstimmte (Abb. 3.6.8 B). Nach Zugabe von Heparin stieg das ThT Fluoreszenz-Signal jedoch deutlicher an.

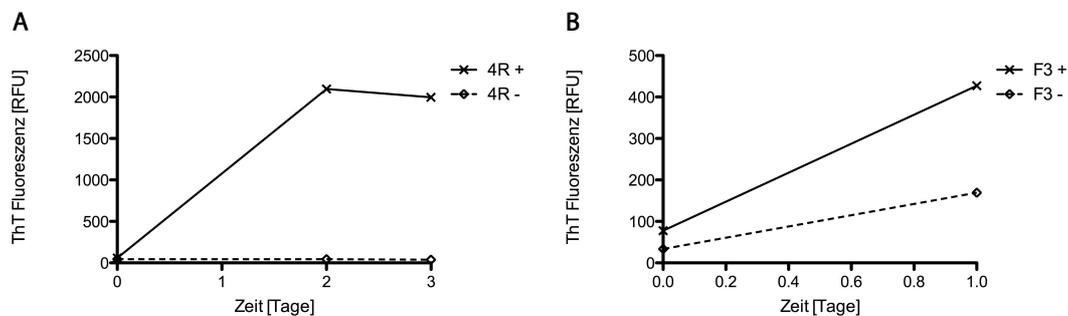


Abb. 3.6.8: ThT Fluoreszenz der Bildung von Tau Fibrillen durch Zugabe von Heparin

A: ThT Fluoreszenz von Tau 4R mit (+, durchgezogene Linie) und ohne (-, gestrichelte Linie) Heparin. **B:** ThT Fluoreszenz von Tau F3 Ansätzen mit (+, durchgezogene Linie) und ohne (-, gestrichelte Linie) Zugabe von Heparin.

Zur Überprüfung der gebildeten Fibrillen auf regelmäßige Fibrillenstrukturen wurden diese mit Hilfe des AFM visualisiert (2.3.18) (Abb. 3.6.9).

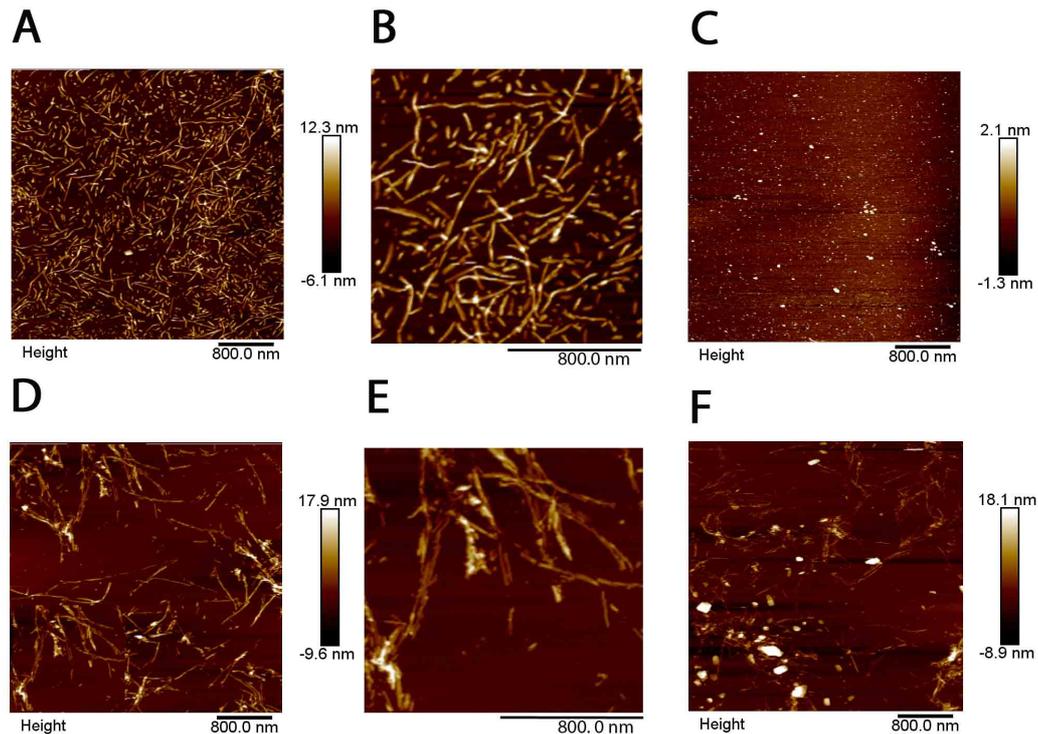


Abb. 3.6.9: AFM Aufnahmen der Tau Fibrillen

Die Skala rechts neben den Bildern gibt die Höhe der Nadel und somit die Dicke der Partikel an. Die Maßstabsleiste entspricht 800 nm. **A:** 1 μ M Tau 4R in PBS pH 7,4, Probe mit Zugabe von Heparin. **B:** Vergrößerung von A. **C:** 1 μ M Tau 4R in PBS pH 7,4, Probe ohne Zugabe von Heparin. **D:** 80 μ M Tau F3 in PBS pH 7,4, Probe mit Zugabe von Heparin. **E:** Vergrößerung von D **F:** 80 μ M Tau F3 in PBS pH 7,4, Probe mit Zugabe von Heparin.

Die Tau 4R und F3 Ansätze mit Zugabe von Heparin zeigten regelmäßige fibrilläre Strukturen (Abb. 3.6.9 A, D). Die Tau 4R Fibrillen erschienen als eher kürzere Stäbchen mit vereinzelt längeren Fibrillen (Abb. 3.6.9 B). Diese Fibrillen zeigten durch Vergleich mit der Skalierung eine Länge von 50 bis über 800 nm. In der Tau 4R Kontrolle ohne Heparin ließen sich wie erwartet keine Fibrillen erkennen (Abb. 3.6.9 C). Tau F3 zeigte mit und ohne Zugabe von Heparin Fibrillen im AFM (Abb. 3.6.9 D, E, F). Ohne Heparin scheinen sich öfter unstrukturierte Aggregate, die in Abb. 3.6.9 F als weiße Flecken zu sehen sind, zu bilden als mit Heparin. In den Proben mit Heparin sind Tau F3 Fibrillen von oft mehr als 800 nm zu finden (Abb. 3.6.9 E).

Die hergestellten Fibrillen wurden nun ebenfalls als Substrat für HTRA1 in einen Proteinverdau eingesetzt (Abb. 3.6.10 A). Die Aktivität von HTRA1 wurde durch Vorinkubation mit dreifachem Überschuss von Calpain 2 erhöht (Abb. 3.6.10 B). Die Beschleunigung des Verdau ließ sich anhand der Proteolyseprodukte bei etwa 30 kDa im Verdau durch HTRA1 erkennen. Für den Verdau durch HTRA1 Δ PDZ mit und ohne

3. Ergebnisse

Vorinkubation mit Calpain 2 wurden die Proteolyseprodukte bei 37 kDa verglichen (Abb. 3.6.10 C, D). Auch die Proteolysegeschwindigkeit von HTRA1 Δ PDZ wurde nach Vorinkubation mit Calpain 2 erhöht.

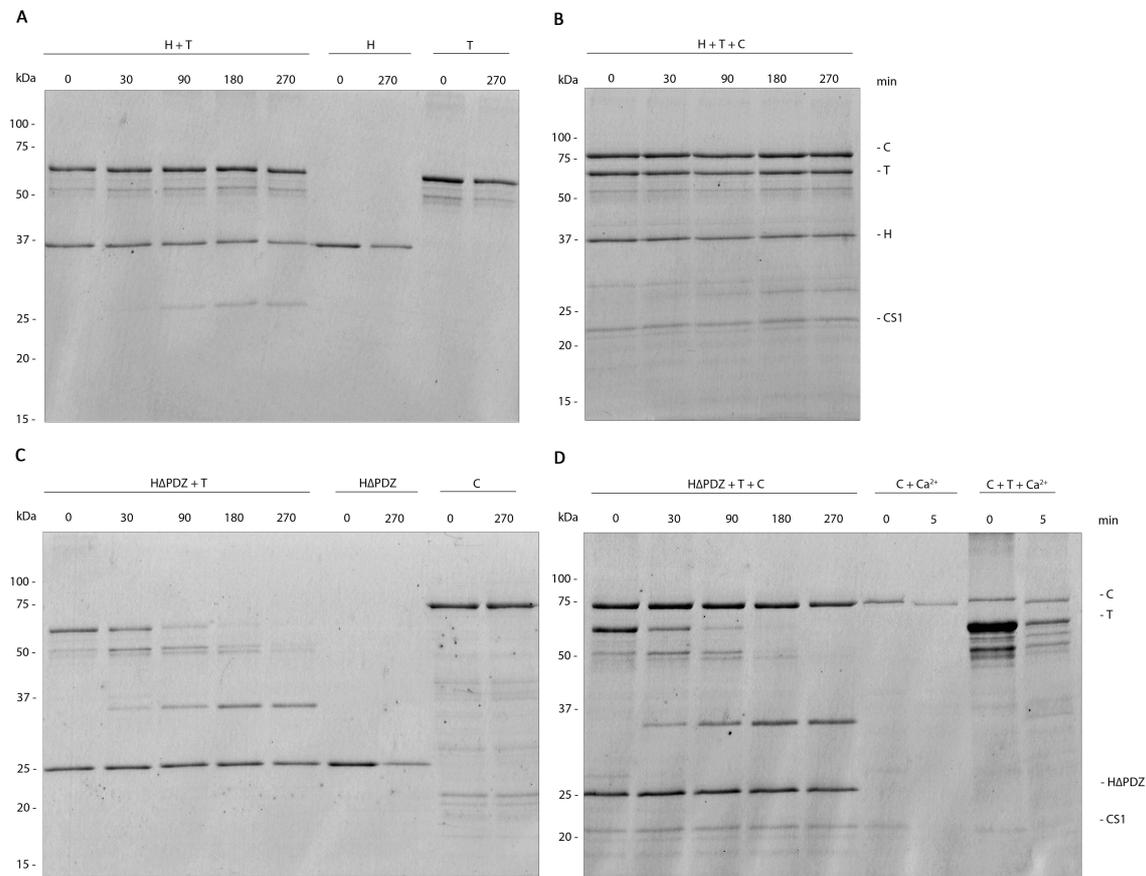


Abb. 3.6.10: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des Tau 4R Fibrillen Verdaus

SDS-Polyacrylamid-Gel mit Proben der Proteolysen, die Dauer wurde in Minuten angegeben. Nach einer Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 für zehn Minuten bei 37°C folgte die Zugabe von Tau 4R (2.3.13). In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die SDS-PAGE Analyse (2.3.7) entnommen. **A:** Proteolyse von 1,25 μ M Tau 4R Fibrillen (T) durch 0,5 μ M HTRA1 (H) und HTRA1 Kontrolle (0,5 μ M) sowie Tau 4R Kontrolle (1,25 μ M). **B:** 1,25 μ M Tau 4R Fibrillen Proteolyse durch 0,5 μ M HTRA1 nach Vorinkubation mit 1,5 μ M Calpain 2 (C, kleine Untereinheit CS1). **C:** 1,25 μ M Tau 4R Verdaus durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ (H Δ PDZ) und HTRA1 Δ PDZ (0,5 μ M) sowie Calpain 2 (1,5 μ M) Kontrolle. **D:** Proteolyse von 1,25 μ M Tau 4R durch 0,5 μ M HTRA1 Δ PDZ mit 1,5 μ M Calpain 2. Calpain 2 (1,5 μ M) Kontrolle mit Calcium sowie Proteolyse von 5 μ M Tau 4R Fibrillen durch 0,5 μ M Calpain 2.

Im Vergleich zu löslichem Tau ist die Proteolyse der Fibrillen deutlich langsamer. Calpain 2 kann die Tau 4R Fibrillen innerhalb von fünf Minuten nicht komplett proteolysieren (Abb. 3.6.10 D), dagegen wurde lösliches Tau 4R innerhalb von zwei Minuten vollständig proteolysiert (Abb. 3.6.6 B).

Die Beschleunigung der Proteolyse von Tau Fibrillen durch HTRA1 nach Vorinkubation mit Calpain 2 könnte mit einer Veränderung der Schnittstellen

3. Ergebnisse

zusammenhängen. Daher wurde untersucht inwiefern sich die Schnittmuster der Tau 4R und F3 Fibrillen unterscheiden, je nach proteolytisch aktiver Protease bzw. Proteasenkomples. Zu diesem Zweck wurde eine analytische Größenausschlusschromatographie von aktivem HTRA1 und Calpain 2 durchgeführt (2.3.15). Die Fraktionen des Komplex-*Peaks* wurden vereinigt und nach Proteinkonzentrationsbestimmung (2.3.6) in die Proteolyse der Tau Fibrillen eingesetzt. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für eine massenspektrometrische Analyse entnommen (2.3.19). Die Proteolyseprodukte nach einer Inkubation von 10, 30 und 120 Minuten wurden in Abb. 3.6.11 verglichen. Die Daten der Massenspektrometrie sind im Anhang in Tab. 8.1 und Tab 8.2 zu finden.

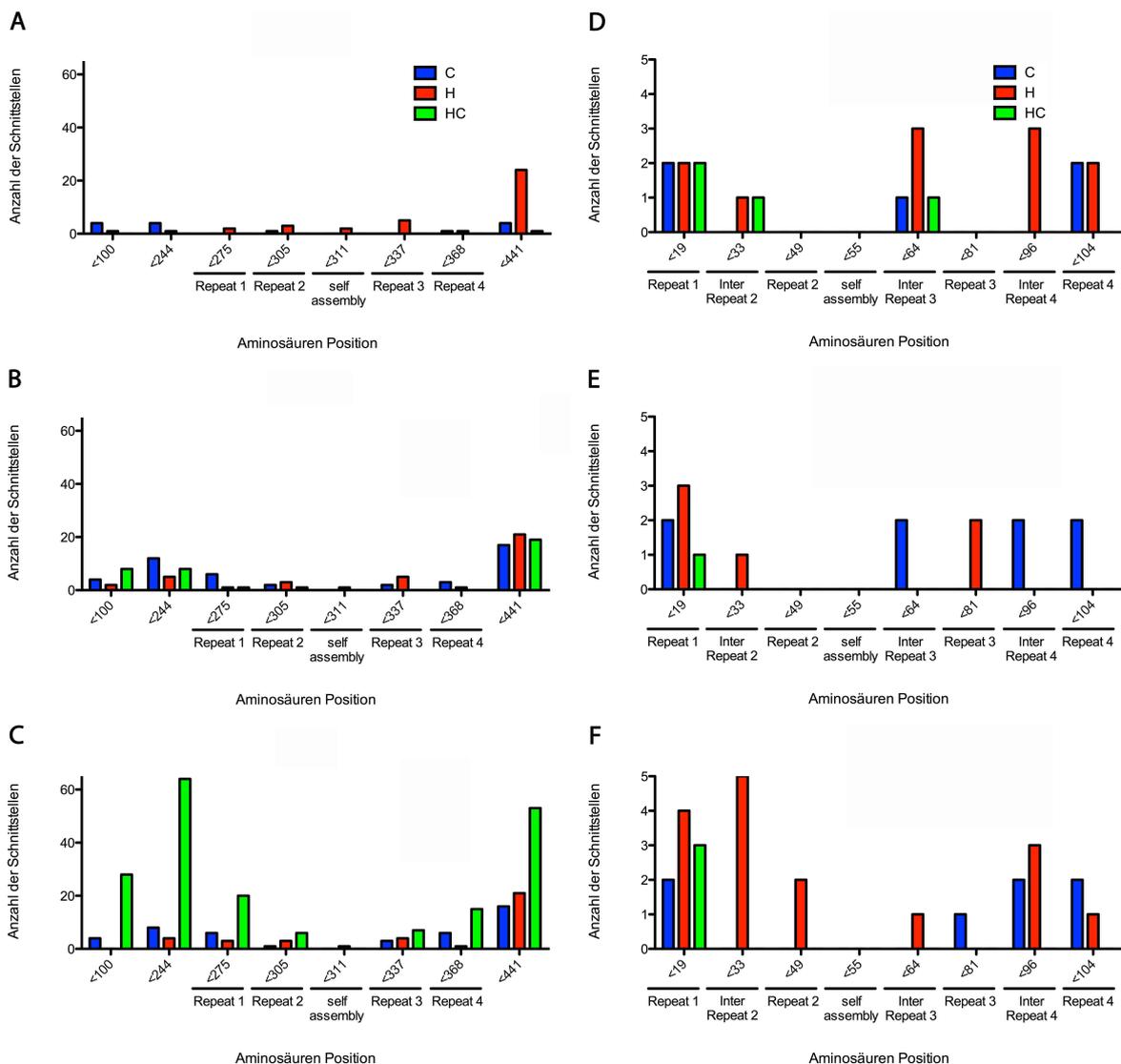


Abb. 3.6.11: Vergleich der Anzahl der Schnittstellen von HTRA1, Calpain 2 und dem HTRA1 – Calpain 2 Komplex in Tau Fibrillen

Es wurden 680 nM Tau 4R mit 272 nM HTRA1 bzw. HTRA1 – Calpain 2 Komplex inkubiert (Verhältnis Protease : Substrat 1:2.5). Von Calpain 2 wurden 6,8 nM eingesetzt (Verhältnis Protease : Substrat 1:50). 1,42 µM Tau F3 wurden mit 0,568 µM HTRA1 bzw. HTRA1 – Calpain 2 Komplex

inkubiert (Verhältnis Protease : Substrat 1:2.5). Von Calpain 2 wurden 28,4 nM eingesetzt (Verhältnis Protease : Substrat 1:50). Die Inkubation erfolgte bei 37°C. **A:** Anzahl der Schnittstellen in Tau 4R nach 10 Minuten Inkubation. **B:** Anzahl der Schnittstellen in Tau 4R nach 30 Minuten Inkubation. **C:** Anzahl der Schnittstellen in Tau 4R nach 120 Minuten Inkubation. **D:** Anzahl der Schnittstellen in Tau F3 nach 10 Minuten Inkubation. **E:** Anzahl der Schnittstellen in Tau F3 nach 30 Minuten Inkubation. **F:** Anzahl der Schnittstellen in Tau F3 nach 120 Minuten Inkubation.

Interessant sind vor allem die Bereiche der *Repeat* und *self assembly* Regionen von Tau. Die *Repeat* Regionen sind für die Bindung an Mikrotubuli verantwortlich und bilden den Kern der Tau Fibrillen. Die Bildung der Tau Fibrillen hängt von der *self assembly* Region ab, die ein hohes Potential zeigt β -Faltblattstrukturen zu formen (von Bergen *et al.*, 2000).

Es fiel auf, dass im Verlauf der Proteolyse von Tau 4R die Anzahl der Schnittstellen in den Repeat Regionen vor allem durch den HTRA1 – Calpain 2 Komplex zunimmt (Abb. 3.6.11 A - C). Tau F3 besteht nur aus den *Repeat* Regionen mit der *self assembly* Region, wobei ein Teil von *Repeat 4* fehlt. In Tau F3 Fibrillen sind grundsätzlich weniger Schnittstellen zu detektieren. Hier fällt außerdem auf, dass der HTRA1 – Calpain 2 Komplex deutlich weniger Schnittstellen als die einzelnen Proteasen zeigt (Abb. 3.6.11 D - E). Das Muster der Schnittstellenverteilung unterscheidet sich dennoch von denen der einzelnen Proteasen.

3.7. *In vivo* Untersuchungen zur Interaktion von HTRA1 und Calpain 2

Aufgrund der zuvor gezeigten Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 war nun die Analyse ob beide Proteasen ebenfalls *in vivo* interagieren von Interesse. Für die *in vivo* Untersuchungen zur Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 wurden verschiedene immortale eukaryontische Zelllinien (HeLa und SH-SY5Y Zellen) verwendet (2.1.2). Zunächst wurde mittels qRT-PCR (2.2.11) und Western Blot (2.3.10) überprüft, ob die Zelllinien HTRA1 und Calpain 2 exprimieren (3.7.1). Anschließend wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen (2.4.6) und konfokaler Lasermikroskopie (2.4.7) die zelluläre Lokalisation der Proteasen untersucht (3.7.2). Final wurde die Kolo-kalisation von HTRA1 und Calpain 2 durch Immunfluoreszenzfärbung, konfokaler Lasermikroskopie und anschließender Bestimmung der Korrelationskoeffizienten überprüft (3.7.3).

3.7.1. qRT-PCR und Western Blot Analyse der verwendeten Zelllinien

Vor der Untersuchung der Interaktion von HTRA1 und Calpain in den verwendeten Zelllinien wurde überprüft ob die Zelllinien beide Proteasen exprimieren. Zu diesem Zweck

mussten zunächst Oligonukleotide (*Primer*) für Calpain 2 für die qRT-PCR kreiert (2.1.4) und deren Primereffizienz bestimmt werden (2.2.11). Es wurde RNA aus den zu untersuchenden Zelllinien isoliert (2.2.8), die cDNA Synthese durchgeführt (2.2.10) und mit einem Gemisch aus cDNA die Primereffizienz bestimmt. Von der kleinen Untereinheit von Calpain 2 wurden keine qRT-PCR Primer etabliert, da deren Expression auch für Calpain 1 benötigt wird und somit nicht aussagekräftig für eine Expression von funktionalem Calpain 2 ist.

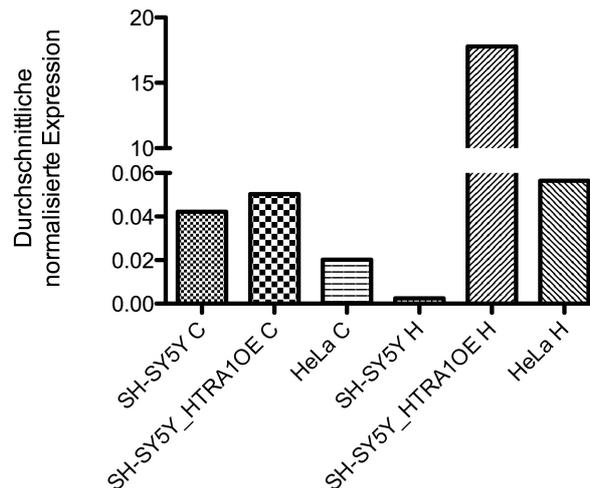


Abb. 3.7.1: qRT-PCR von SH-SY5Y parental, SH-SY5Y_HTRA1OE und HeLa

Angegeben ist die durchschnittliche auf GAPDH normalisierte Expression. C bezeichnet die Expression von Calpain 2, H die Expression von HTRA1 in den entsprechenden Zelllinien. Es wurden je 20 ng cDNA von SH-SY5Y parental p12, SH-SY5Y_HTRA1 OE (Klon 4) p16/12 und HeLa p7 eingesetzt.

Die Calpain 2 Expression auf mRNA Level ist in allen Zelllinien recht gering. HTRA1 war in HeLa und SH-SY5Y ebenfalls niedrig exprimiert. In SH-SY5Y sogar um das zehnfache geringer als in HeLa. Die Expressionslevel von HTRA1 und Calpain 2 ist in HeLa vergleichbar. Aufgrund der sehr geringen Expression von HTRA1 wurden aus SH-SY5Y Zellen mittels Transfektion (2.4.5) mit einem Plasmid für die Überexpression von HTRA1 (2.1.3) stabile Zelllinien generiert. Insgesamt wurden fünf verschiedene Klone vereinzelt und mittels qRT-PCR auf ihre HTRA1 Expression untersucht (Abb. 3.7.2). Als Kontrolle wurde ein Vektor für die Überexpression ohne Insert gewählt. Der Klon mit einer durchschnittlich hohen Expression wurde für die Interaktionsstudien ausgewählt (Klon 4).

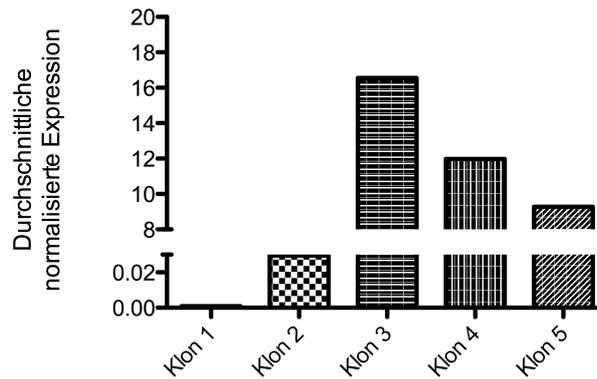


Abb. 3.7.2: qRT-PCR der stabil HTRA1 überexprimierenden SH-SY5Y Klone

Angegeben ist die durchschnittliche auf GAPDH normalisierte Expression. Es wurden je 20 ng cDNA von SH-SY5YHTRA1OE Klon eins bis fünf eingesetzt.

Die Expression von Calpain 2 und HTRA1 wurde außerdem auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Abb. 3.7.3). Calpain 2 und HTRA1 wurden in alle untersuchten Zelllinien ebenfalls auf Proteinebene detektiert.

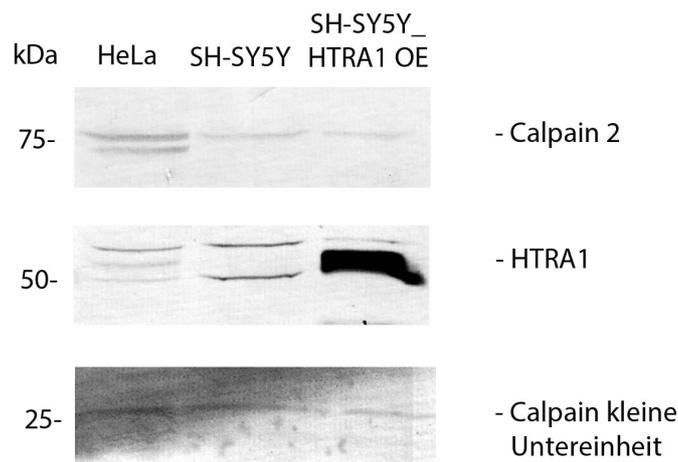


Abb. 3.7.3: Western Blot Analyse der Expression von HTRA1 und Calpain 2

Western Blot Analyse der drei verwendeten Zelllinien. Es wurden je 25 µg Zelllysate von HeLa p5, SH-SY5Y parental p 10 und SH-SY5Y_HTRA1OE (Klon 4) p 14/10 aufgetragen. Im oberen Abschnitt wurde im Western Blot der Primärantikörper gegen Calpain 2 aus Maus (Sigma) und im mittleren Abschnitt der Antikörper gegen HTRA1 aus Kaninchen verwendet. Im unteren Abschnitt wurde der Antikörper gegen die kleine Untereinheit von Calpain 2 aus Maus genutzt. Immundetektion erfolgte mit alkalischer Phosphatase.

Von Calpain 2 wurden die große und die kleine Untereinheit in allen untersuchten Zelllinien detektiert. Nur in HeLa Zellen fiel auf, dass zwei Calpain 2 Banden im Western Blot zu erkennen waren. HTRA1 konnte ebenfalls in allen Zelllinien nachgewiesen werden. In SH-SY5Y und SH-SY5Y_HTRA1OE waren zwei Banden im HTRA1 Western Blot zu erkennen. Da nur die untere Bande bei Überexpression von HTRA1 stärker wurde, kann

davon ausgegangen werden, dass es sich nur bei der unteren Bande um HTRA1 handelt. In HeLa Zellysaten ließ sich eine weitere Bande auf der Höhe von HTRA1 im Western Blot erkennen. Im direkten Vergleich mit den Banden in SH-SY5Y Zellysaten sollte es sich bei der unteren der drei Banden um HTRA1 handeln.

3.7.2. Analyse der zellulären Lokalisation von HTRA1 und Calpain 2

Für die Untersuchung einer möglichen Kolo­kalisierung von HTRA1 und Calpain 2 wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen (2.4.6) durchgeführt, um die Lokalisation der Proteasen in den Zellen zu bestimmen. Die Färbungen wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie dokumentiert (2.4.7). Beide Proteasen zeigten eine cytosolische Lokalisation in der Überlagerung (Abb. 3.7.4 A, B). In den einzelnen Darstellungen der Immunfluoreszenzfärbung ließ sich erkennen, dass HTRA1 und Calpain 2 nicht im Kern vorhanden sind (Abb. 3.7.4 C, D, E).

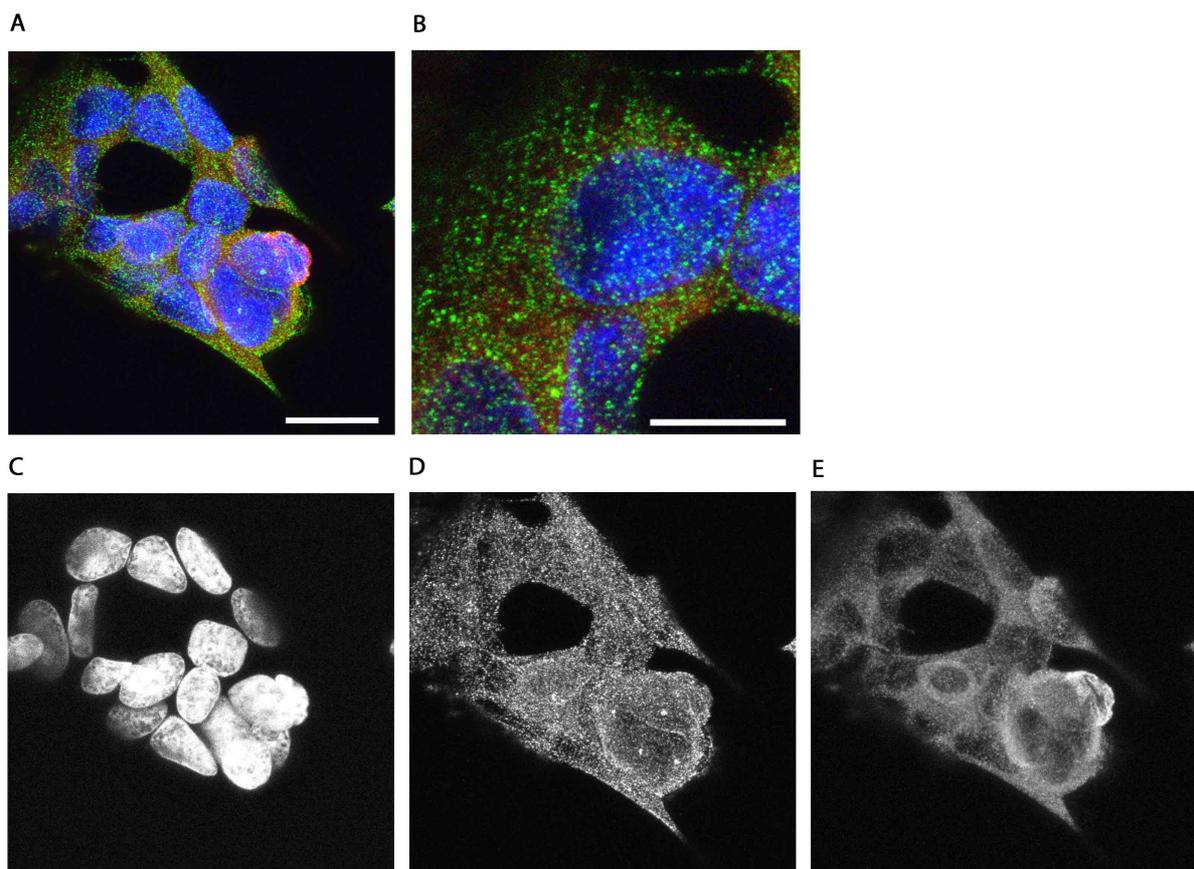


Abb. 3.7.4: Immunfluoreszenzfärbung SH-SY5Y mit HTRA1 und Calpain 2 Antikörpern

Die Maßstabsleiste entspricht 20 µm (A) und 10 µm (B). Beispielhaft für die intrazelluläre Lokalisation wurde die Immunfärbung von HTRA1 (Kaninchen, Sekundärantikörper Alexa 488, grün) und Calpain 2 (Maus, Sekundärantikörper Alexa 594, rot) zusammen mit DAPI (blau) in SH-SY5Y parental p 10 gezeigt. Dabei wurde ein Z-Stack durch eine Maximum Projektion zu einem Bild

3. Ergebnisse

verarbeitet. A: Überlagerung der Kanäle. B: Zoombild eines einzelnen Stack Bildes. C: DAPI. D: HTRA1, Sekundäntikörper Alexa 488. E: Calpain 2, Sekundäntikörper Alexa 594.

HTRA1 zeigte vor allem bei Überexpression tubulinartige Strukturen innerhalb der Zellen (Abb. 3.7.5 A, B). Diese Strukturen ließen sich besonders gut am Rand der Zellen erkennen. In der Immunfluoreszenzfärbung von HTRA1 waren Cytoskelett ähnliche Strukturen von HTRA1 im Vergleich mit α -Tubulin zu erkennen (Abb. 3.7.5 D, E).

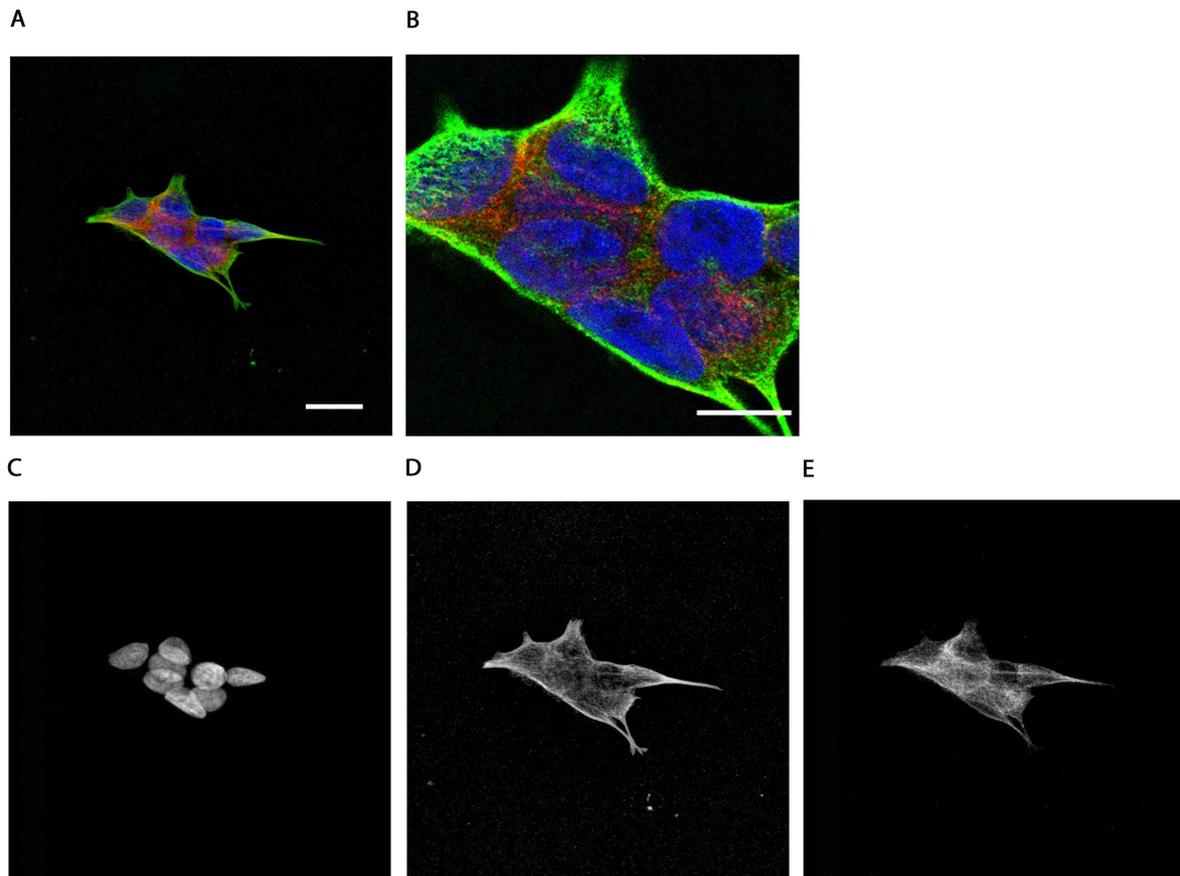


Abb. 3.7.5: Immunfluoreszenzfärbung von HTRA1 und α -Tubulin in SH-SY5Y_HTRA1OE

Die Maßstabsleiste entspricht 20 μ m (A) und 10 μ m (B). Beispielhaft für die intrazelluläre Lokalisation wurde die Immunfärbung von HTRA1 (Kaninchen, Sekundäntikörper Alexa 488, grün) und α -Tubulin (Ratte, Sekundäntikörper Alexa 594, rot) zusammen mit DAPI in SH-SY5Y_HTRA1OE p20/16 gezeigt. Dabei wurde ein Z-Stack durch eine Projektion der durchschnittlichen Intensitäten zu einem Bild verarbeitet. A: Überlagerung der Kanäle. B: Vergrößerung eines einzelnen Z-Stack Bildes. C: DAPI. D: HTRA1, Sekundäntikörper Alexa 488. E: α -Tubulin, Sekundäntikörper Alexa 594.

Für Calpain 2 ließ sich keine bestimmte Struktur erkennen, die Cytoskellebestandteilen ähnelt. Aufgrund der eher punktförmigen Färbung (Abb. 3.7.4 E) ließ sich schließen, dass Calpain 2 im gesamten Cytosol vorhanden ist.

3.7.3. Untersuchung der Kollokalisierung von HTRA1 und Calpain 2 *in vivo*

Aus der Untersuchung der Lokalisation von HTRA1 und Calpain 2 ergab sich, dass beide Proteasen cytosolisch vorliegen. Eine Interaktion beider Proteasen in der Zelle war also theoretisch möglich. Um diese Interaktion zu untersuchen, wurde die Kollokalisierung beider Proteasen mittels Immunfluoreszenzfärbungen (2.4.6) und anschließender konfokaler Lasermikroskopie (2.4.7) betrachtet. Für die Auswertung von Kollokalisierungen ist es notwendig verschiedene Korrelationskoeffizienten zu betrachten (2.4.7). Eine Kollokalisierung nur durch eine optische Mischung beider Farben der Sekundärantikörper zu bestimmen, sollte nur bei gleicher Fluoreszenzintensität durchgeführt werden. Um dieses Problem zu umgehen wurden die *Pearsons* und *Manders* Koeffizienten hinzu gezogen. Es wurden pro Zelllinie drei Bilder willkürlich für die Auswertung ausgewählt (Abb. 3.7.6).

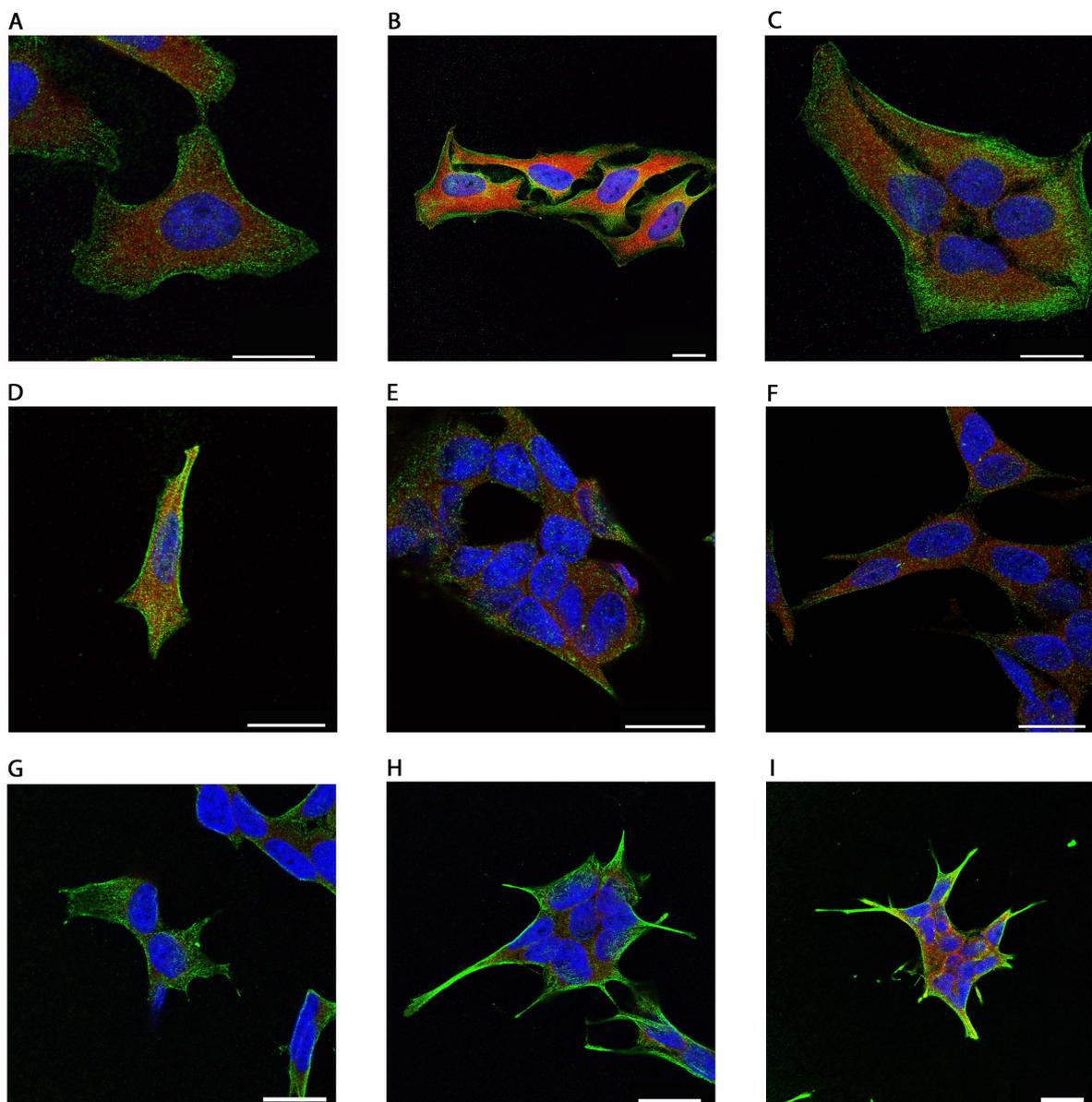


Abb. 3.7.6: Kollokalisierung von HTRA1 und Calpain 2 in Immunfluoreszenzfärbungen

3. Ergebnisse

Die Maßstabsleiste entspricht 20 μm . Die dargestellten Immunfluoreszenzfärbungen von HTRA1 (Kaninchen, Sekundärantikörper Alexa 488, grün) und Calpain 2 (Maus, Sekundärantikörper Alexa 594, rot) zusammen mit DAPI (blau) wurden für die Auswertung der Kolokalisation mittels des JACoP Plugins von ImageJ verwendet. A: HeLa p5. B - C: HeLa p8. D - F: SH-SY5Y parental p10. G - H: SH-SY5Y_HTRA1OE p17/13. I: SH-SY5Y_HTRA1OE p20/16

Mit Hilfe des JACoP Plugins von ImageJ wurden die *Pearsons* und *Manders* Koeffizienten der Immunfluoreszenzfärbungen der HeLa, SH-SY5Y und SH-SY5Y_HTRA1OE Zelllinien bestimmt (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Pearsons und Manders Koeffizienten der Kolokalisation von HTRA1 und Calpain 2

Für die Kalkulation des *Pearson* und *Manders* Koeffizienten wurde der für das jeweilige Bild ermittelte Schwellenwert verwendet (JACoP Plugin von ImageJ, Abb. 3.7.6). Zum Vergleich wurden zwei Immunfluoreszenzfärbungen von HTRA1 und Tubulin (Abb. 3.7.5), sowie von Calpain 2 und der kleinen Untereinheit von Calpain 2 ausgewählt.

Immunfluoreszenzbild	<i>Pearsons</i>	<i>Manders</i> M1	<i>Manders</i> M2
A	0,324	0,834	0,898
B	0,275	0,884	0,928
C	0,208	0,934	0,959
D	0,376	0,553	0,889
E	0,434	0,809	0,917
F	0,598	0,661	0,877
G	0,57	0,665	0,65
H	0,307	0,745	0,875
I	0,367	0,789	0,693
HTRA1 und Tubulin	0,277	0,793	0,85
Calpain 2 große und kleine Untereinheit	0,6	0,981	0,877

Für alle der neun betrachteten Bilder lag der *Manders* Koeffizient über einem Wert von 0,5 und gab so eine mögliche Kolokalisation an. Die *Manders* Koeffizienten geben eine sensitivere Quantifizierung der Kolokalisation im Vergleich zum *Pearsons* Koeffizienten an. Der *Pearsons* Koeffizient ist von einer starken Fluoreszenzintensität abhängig. Im Fall der neun betrachteten Immunfluoreszenzfärbungen von HTRA1 und Calpain 2 lag der *Pearsons* Koeffizient nur bei zwei Bildern im Bereich zwischen 0,5 und 1 und deutet hiermit eine Kolokalisation an. Auch die Kolokalisation von HTRA1 und Tubulin wird nur durch die *Manders* Koeffizienten angezeigt. Die Kolokalisation der beiden Untereinheiten von Calpain 2 ist dagegen mit beiden Koeffizienten deutlich. Eine Kolokalisation von HTRA1 und Calpain 2 war demnach aufgrund der *Manders* Koeffizienten theoretisch möglich.

4. Diskussion

4.1. HTRA1 und Calpain 2 zeigen gegensätzliche Auswirkungen in neurodegenerativen Erkrankungen

HTRA1 und auch Calpain 2 sind beide in neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer'schen Krankheit (AD, *alzheimer's disease*), involviert, wobei die Auswirkungen ihrer Funktionen gegensätzlich sind. AD ist durch das Auftreten von extrazellulären senilen Plaques, bestehend aus A β , und intrazellulären NFTs, die aus Tau Aggregaten aufgebaut sind, charakterisiert (Crews & Masliah, 2010). HTRA1 ist dazu in der Lage das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau und seine Aggregate *in vitro* zu proteolysieren und zeigt *in vivo* eine erhöhte Expression und Aktivität bei gesteigerten Tau Konzentrationen (Tennstaedt *et al.*, 2012). HTRA1 wird ebenfalls mit senilen Plaques in Verbindung gebracht, da eine Inhibierung von HTRA1 zu einer Akkumulation von A β im Überstand von Astrozyten führt und HTRA1 außerdem eine Kolo-kalisation mit amyloiden Ablagerungen in Patientenproben zeigt (Grau *et al.*, 2005). Calpain 2 ist dazu in der Lage Tau zu proteolysieren und die entstandenen Produkte zeigen eine hohe Tendenz zur Aggregation (Park & Ferreira, 2005). Des Weiteren wird die Aggregation von Tau durch Aktivierung einiger Kinasen durch Calpain 2 und anschließende Hyperphosphorylierung gesteigert. Eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von A β führt zur Aktivierung von NMDA Rezeptoren und damit zu einem Einstrom von Calcium in das Cytosol. So kann es zu einer Überaktivierung von Calpain 2 kommen, was wiederum beispielsweise zu mehr aggregiertem Tau und außerdem zur Apoptose führen kann (Vosler *et al.*, 2008).

Anhand eines sogenannten C-Terminus Screens, der in Kooperation mit dem Institut für medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin in Berlin im Vorfeld dieser Dissertation durchgeführt worden war, konnte Calpain 2 als potentieller Interaktionspartner von HTRA1 identifiziert werden. Da eine Zugänglichkeit des C-Terminus im gefalteten Zustand nicht bei allen Proteinen gegeben ist, wurde anhand einer Röntgenkristallstrukturanalyse des Calpain 2 Heterodimers aus *Rattus norvegicus* zunächst überprüft ob der C-Terminus im nativen Protein zugänglich wäre (Abb. 4.1.1) (Hanna *et al.*, 2008).

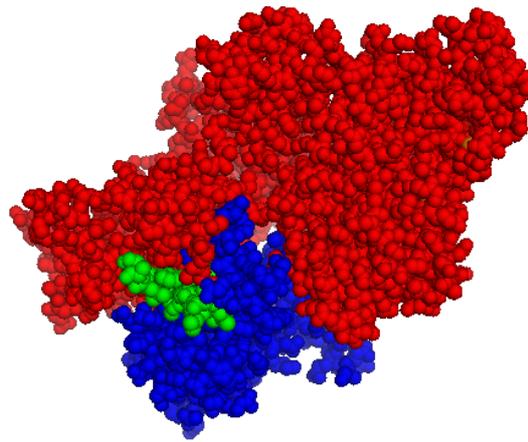


Abb. 4.1.1: Position des C-Terminus von Calpain 2

Kristallstruktur von Calpain 2 des pdb Eintrags 3BOW (Hanna et al., 2008). Die große Untereinheit von Calpain 2 wird in rot und die kleine Untereinheit von Calpain 2 in blau dargestellt. Die letzten 14 C-Terminalen Aminosäuren werden in grün markiert.

Wie der Abb. 4.1.1 zu entnehmen ist, liegt der C-Terminus von Calpain 2 (grün hervorgehoben) in der betrachteten Röntgenkristallstruktur an der Oberfläche des Proteins und ist damit potentiell für eine Interaktion mit HTRA1 zugänglich.

4.2. HTRA1 und Calpain 2 zeigen eine Interaktion *in vitro*

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die potentielle Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 analysiert werden. Für die Untersuchung wurde die cDNA der großen und kleinen humanen Untereinheit von Calpain 2 in geeignete Expressionsvektoren kloniert und schließlich heterolog in *E. coli* exprimiert (3.1). Die anschließende Proteinreinigung wurde im Verlauf dieser Dissertation etabliert. Calpain 2 wurde in einem Reinheitsgrad von durchschnittlich 94 % gereinigt. Die HTRA1 Proteinreinigung wurde auf der Grundlage eines zuvor etablierten Reinigungsprotokolls durchgeführt und weiterhin optimiert (3.2). HTRA1 zeigte einen Reinheitsgrad von durchschnittlich 95 %.

Die Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 sollte zunächst mittels eines *in vitro* Pulldown-Assays überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde HTRA1 mit StrepII-Tag und Calpain 2 mit His₆-Tag fusioniert. Der Pulldown-Assay wurde mit Strep-Tactin markierten *Beads* etabliert. Vorinkubation beider Proteasen und anschließende Bindung an die magnetischen *Beads* ergab eine gemeinsame Elution von HTRA1 und Calpain 2 (Abb. 3.4.1), die sich ebenfalls mittels Western Blot Analyse nachweisen ließ (Abb. 3.4.2). Dieser *in vitro* Pulldown-Assay war ein deutlicher Nachweis, dass beide Proteasen miteinander interagieren.

4.3. HTRA1 und Calpain 2 bilden einen Proteasenkomplex *in vitro*

Nachdem die Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 mittels Pulldown-Assay nachgewiesen werden konnte, sollte nun die Komplexbildung und dessen Stöchiometrie im Detail charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden beide Proteasen vorinkubiert und anschließend mittels analytischer Größenausschlusschromatographie auf eine Änderung ihrer hydrodynamischen Radien und molekularen Massen untersucht.

4.3.1. Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex lässt sich mittels analytischer Größenausschlusschromatographie nachweisen

Für die analytische Größenausschlusschromatographie wurden HTRA1 und Calpain 2 vorinkubiert. Anhand einer zuvor durchgeführten Analyse mit Hilfe eines Größenstandards ließ sich die molekulare Masse der Proteine eines bestimmten Elutionsvolumens berechnen. Nach Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 kam es zur Bildung einer neuen Proteinspezies mit einem deutlich erhöhten hydrodynamischen Radius. Diese Proteinspezies ist in den Analysen der einzelnen Proteine nicht beobachtet worden. Die Komplexfractionen wiesen ein Elutionsvolumen von etwa 1,3 ml auf und entsprachen damit einer molekularen Masse von 400 bis 600 kDa. Um für weitere Analysen einen stabilen Komplex zu generieren, wurden verschiedene Pufferbedingungen für die Vorinkubation getestet (Tab. 3.2, Abb. 3.5.4, Abb. 3.5.5). Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität des Komplexes abhängig vom pH Wert des Inkubationspuffers war. Der Komplex war stabiler je basischer der pH Wert des verwendeten Puffers wird. Vorinkubation und Größenausschlusschromatographie in 50 mM Bicin pH 9, 150 mM NaCl erzielten die höchste Komplexstabilität. Hier ließ sich beobachten, dass die UV Absorption des Proteasenkomplexes ein doppelt so hohes UV Signal im Vergleich zum *Peak* der Einzelproteine aufweist (Abb. 3.5.6, Abb. 3.5.7). Dies zeigt, dass deutlich mehr HTRA1 und Calpain 2 im Komplex gebunden vorlag als freie Proteinkomponenten. In basischer Umgebung liegen geladene Aminosäuren, je nach pKs-Wert, als Anionen vor. Aufgrund dieser Ladung könnten sich Konformationsänderungen ergeben, durch die sich der HTRA1 – Calpain 2 Komplex besser bilden oder stabilisieren kann.

Für die Untersuchung der Stöchiometrie des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes wurde das Verhältnis von HTRA1 und Calpain 2 mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Probe der Komplexfraction mit bekannten Proteinmengen verglichen (Abb. 3.5.8). Die semiquantitative Auswertung der Mengen aus der Komplexfraction ließen

eine Abschätzung des Verhältnisses von 1:1 zu. Diese Stöchiometrie stellt eine mögliche physiologisch relevante Lösung dar, denn ein HTRA1 Trimer weist ein Molekulargewicht von ca. 109 kDa und ein Calpain 2 Heterodimer ca. 104 kDa auf. Ausgehend von einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa ergibt sich aus einer Addition von einem HTRA1 Trimer und drei Calpain 2 Heterodimeren ein Molekulargewicht von 421 kDa. In dieser Kalkulation wäre die Stöchiometrie von 1:1 erfüllt.

4.3.2. Die PDZ-Domäne von HTRA1 ist essentiell für die Bildung des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes

Im Verlauf der Untersuchung der Komplexbildung mittels Größenausschlusschromatographie stellte sich heraus, dass eine Vorinkubation von Calpain 2 mit einer PDZ-losen Mutante von HTRA1 (HTRA1 Δ PDZ) nicht zur Bildung einer neuen Proteinspezies führte (Abb. 3.5.1). Ebenso konnten in einer Silber gefärbten SDS-PAGE Analyse der Fraktionen der Größenausschlusschromatographie lediglich nach Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 eine Komplexbildung nachgewiesen werden (Abb. 3.5.2). Diese Komplexbildung schien also durch die PDZ-Domäne vermittelt oder stabilisiert zu werden. Im Hinblick auf eine zuvor ermittelte mögliche Stöchiometrie von 1:1 wurde der potentielle Einfluss der PDZ-Domäne von HTRA1 deutlich. Wenn jede PDZ-Domäne von HTRA1 einen Calpain 2 Heterodimer binden konnte, würde sich ein 1:1 Verhältnis ergeben.

4.3.3. Der Proteasenkomples aus HTRA1 und Calpain 2 hat eine molekulare Masse von 535 kDa und ist stabil

Für eine detaillierte Analyse des nachgewiesenen Komplexes aus HTRA1 und Calpain 2 wurde eine Kombination aus Größenausschlusschromatographie und statischer Lichtstreuung (MALS-SEC) genutzt. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie wurde wie zuvor der Komplex von den einzelnen Proteinen separiert. Durch Messungen der statischen Lichtstreuung ließen sich genaue molekulare Massen ermitteln. Für den HTRA1 – Calpain 2 Komplex ließ sich mittels MALS-SEC eine molekulare Masse von $535 \pm 0,5$ kDa bestimmen (Abb. 3.5.9). Außerdem ließ sich beobachten, dass ein gebildeter Komplex aus HTRA1 und Calpain 2 stabil blieb. Wurden die Fraktionen des Komplexes nochmals mittels Größenausschlusschromatographie analysiert, so konnte der Proteasenkomples in vergleichbarer Intensität nachgewiesen werden, ohne dass eine Dissoziation in die Einzelkomponenten stattgefunden hatte. Diese Stabilität des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes

deutet darauf hin, dass der Komplex sich auch durchaus *in vivo* bilden und über einen gewissen Zeitraum stabil bleiben könnte.

Mit Hilfe der experimentell bestimmten Größe von $535 \pm 0,5$ kDa und der zuvor abgeschätzten Stöchiometrie laut Western Blot Analyse von etwa 1:1 ließen sich theoretische Kalkulationen über die Zusammensetzung des Komplexes aufstellen. Ein HTRA1 Trimer besitzt die molekulare Masse von ca. 109 kDa, ein Calpain 2 Heterodimer von 104 kDa. Bindet ein HTRA1 Trimer drei Calpain 2 Heterodimere, wäre der zuvor postulierte Komplex mit 421 kDa zu klein. Damit war eine exakte 1:1 Stöchiometrie nicht sehr wahrscheinlich. Die zusätzliche Addition eines Calpain 2 Heterodimers ergibt eine Größe von 525 kDa und passt damit sehr gut zur experimentell bestimmten Masse. Alternativ ergeben zwei HTRA1 Trimere mit drei Calpain 2 Heterodimeren eine Summe von 530 kDa. Allerdings stimmt diese letzte Kalkulation nicht mit den Mengenverhältnissen aus der Western Blot Analyse überein. Es ist daher wahrscheinlicher, dass ein HTRA1 Trimer insgesamt vier Calpain 2 Heterodimere bindet. Davon könnten drei Calpain 2 Heterodimere an die drei PDZ Domänen binden und ein weiterer möglicherweise an ein aktives Zentrum oder an den Sensor Loop L3 von HTRA1. Die Bindung an die PDZ-Domänen des HTRA1-Trimers ist wahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass die PDZ-Domänen für die Komplexbildung essentiell waren (4.3.2). In Abb. 4.3.1 ist ein Modell des möglichen HTRA1 – Calpain 2 Komplexes dargestellt. Für dieses Modell wurde die Röntgenkristallstruktur der HTRA Protease DegS verwendet (pdb 1sot, grün) (Wilken *et al.*, 2004). DegS bildet wie HTRA1 einen Homotrimer und hat mit 34 kDa eine vergleichbare molekulare Masse (HTRA1 37 kDa). In der Röntgenkristallstruktur von DegS ist im Gegensatz zu allen bisher bekannten Strukturen von HTRA1 die PDZ-Domäne vorhanden. Da die PDZ-Domäne im postulierten HTRA1 – Calpain 2 Komplex eine entscheidende Rolle spielt, wurde diese Röntgenkristallstruktur verwendet. Von humanem Calpain 2 existiert keine Röntgenkristallstruktur, daher wurde für dieses Modell die Struktur von Calpain 2 aus *Rattus norvegicus* verwendet (pdb 3bow, rot) (Hanna *et al.*, 2008).

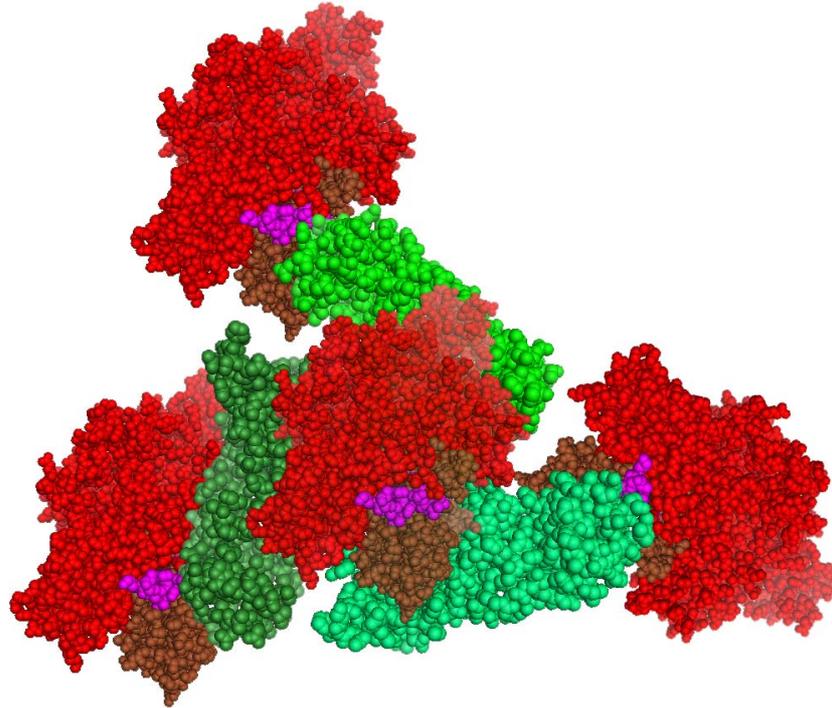


Abb. 4.3.1: Modell eines möglichen HTRA1 – Calpain 2 Komplexes

Modell des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes aus einem Trimer und vier Calpain 2 Heterodimeren. In grün ist die Kristallstruktur des bakteriellen HTRA1 Homologs DegS dargestellt (pdb 1SOT), da die bekannten HTRA1 Strukturen keine PDZ besitzen. In rot ist die Kristallstruktur des Calpain 2 Homologs aus der Ratte dargestellt (pdb 3BOW), die große Untereinheit mit dem C-Terminus in magenta und in braun die kleine Untereinheit.

Die Struktur des HTRA1 - Calpain 2 Komplexes wurde des Weiteren mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurden beide Proteasen ebenso wie für die MALS-SEC einzeln vorgereinigt, vorinkubiert und mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie separiert (Abb. 3.5.10). Die durch Negativfärbung sichtbar gemachten Partikel des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes unterschieden sich deutlich durch ihre Größe von den kleineren Partikeln der einzelnen Proteasen (Abb. 3.5.11). Als Dimensionen des HTRA1- Calpain 2 Komplexes ließen sich ca. 18 x 15 x 11 nm bestimmen. Die Struktur des Komplexes schien eher dreieckig zu sein, was zu einem HTRA1 Trimer mit vier gebundenen Calpain 2 Heterodimeren passt (Abb. 4.3.1). Im Modell aus Abb. 4.3.1 ließ sich für die längste Seite eine Länge von ca. 20 nm ermitteln (Abb. 4.3.2 A). Die kürzeste Länge in der Aufsicht entsprach etwa 15 nm. Die kürzeste Länge, die anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt wurde, ist etwa 11 nm. Diese Abmessung könnte einer Seitenansicht des Komplexes entsprechen (Abb. 4.3.2 B). Die Abstände wurden in MacPyMol 1.3 gemessen und für das gezeigte Modell abgeschätzt.

Aufgrund der Struktur des Komplexes und den MALS-SEC Daten ist die Stöchiometrie von vier Calpainen und drei HTRA1 sehr wahrscheinlich.

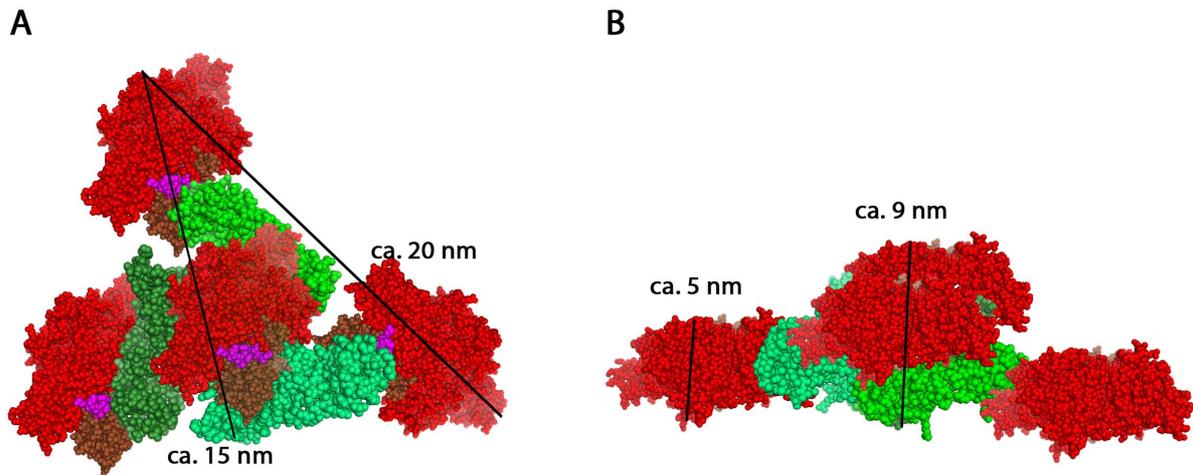


Abb. 4.3.2: Modell eines möglichen HTRA1 – Calpain 2 Komplexes mit Längenangaben in nm

Modell des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes aus einem Trimer und vier Calpain 2 Heterodimeren mit Angaben der Abstände in nm. In grün ist die Kristallstruktur des bakteriellen HTRA1 Homologs DegS dargestellt (pdb 1SOT), da die bekannten HTRA1 Strukturen keine PDZ besitzen. In rot ist die Kristallstruktur des Calpain 2 Homologs aus der Ratte dargestellt (pdb 3BOW), die große Untereinheit mit dem C-Terminus in magenta und in dunkelrot die kleine Untereinheit. Die Abstände wurden für jede Struktur in MacPyMol 1.3 gemessen und für das Modell abgeschätzt. **A:** Ansicht von oben auf den HTRA1 – Calpain 2 Komplex. **B:** Seitenansicht des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes

4.3.4. Eine Kolokalisation von HTRA1 und Calpain 2 ist *in vivo* möglich

Es konnte gezeigt werden, dass der HTRA1 – Calpain 2 Komplex *in vitro* stabil ist. Daher ist es möglich, dass sich dieser Komplex auch *in vivo* bildet und nachgewiesen werden kann. Für die Untersuchung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 *in vivo* wurde zunächst getestet, ob beide Proteasen in den genutzten Zelllinien vorkommen. Mittels qRT-PCR ließen sich HTRA1 und Calpain 2 in HeLa und SH-SY5Y Zellen nachweisen (Abb. 3.7.1). Aufgrund der sehr niedrigen Expression von HTRA1 in SH-SY5Y Zellen wurden durch Transfektion mit einem Plasmid und anschließender Selektion von Einzelklonen stabile Zelllinien erstellt. Von den zum Schluss verbleibenden fünf Klonen mit dem Plasmid für die HTRA1 Überexpression zeigten drei eine Überexpression von HTRA1 (Abb. 3.7.2). HTRA1 sowie die große und kleine Untereinheit von Calpain 2 ließen sich mittels Western Blot in allen verwendeten Zelllinien nachweisen (Abb. 3.7.3).

Die zelluläre Lokalisation von HTRA1 und Calpain 2 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen und anschließender Dokumentation durch konfokale Lasermikroskopie untersucht. Beide Proteasen zeigten eine deutliche intrazelluläre Lokalisation (Abb. 3.7.4). Endogenes HTRA1 zeigte, obwohl es eine Signalsequenz zur

Sekretion besitzt, eine deutliche cytosolische Lokalisation. Zusätzlich zeigte eine Färbung von HTRA1 und α -Tubulin eine tubuläre Struktur der HTRA1 Färbung vor allem im Bereich der Peripherie der Zellen (Abb. 3.7.5).

Die Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation von HTRA1 und Calpain 2 erfolgte durch Ermittlung der *Pearsons* und *Manders* Koeffizienten mit Hilfe des ImageJ Plugins JACoP. Es wurden pro Zelllinie drei willkürliche Bilder ausgewählt und analysiert (Abb. 3.7.6, Tab. 3.3). Die *Manders* Koeffizienten lagen für alle analysierten Bilder über 0,5 und deuteten damit auf eine Kolo-kalisation der beiden Antikörper hin. Der *Pearsons* Koeffizient lag dagegen nur bei zwei der neun betrachteten Bilder im unteren Bereich von 0,5 bis 1 und weist lediglich in diesen beiden Bildern auf eine Kolo-kalisation hin.

Eine Kolo-kalisation *in vivo* kann anhand der Mikroskopiedaten nicht eindeutig nachgewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung dieser Frage müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Allerdings ist eine Kolo-kalisation beider Proteasen unter normalen physiologischen Umständen nicht unbedingt notwendig und daher möglicherweise auch experimentell nicht nachweisbar. Denn erst nach Auftreten der ersten Tau Aggregate ist ein Komplex aus HTRA1 und Calpain 2 physiologisch sinnvoll, da dann die Proteolyse von Tau durch HTRA1 gesteigert werden muss. In ersten Untersuchungen konnte die Transfektion von Zellen mit einem Plasmid für die Tau Überproduktion jedoch keine eindeutige Interaktion zeigen.

4.4. Calpain 2 aktiviert HTRA1

4.4.1. Die Proteolyse von pNA-gekoppelten Peptiden wird deutlich beschleunigt

HTRA1 und Calpain 2 konnten einen Komplex *in vitro* bilden, der sogar nach Reinjektion stabil blieb. Die Frage, ob durch diese Komplexbildung eine Änderung der Aktivität der Proteasen auftrat, wurde mit Hilfe verschiedener Aktivitätsassays untersucht. Zunächst wurde mittels pNA-Aktivitätsassays untersucht ob die Zugabe von Calpain 2 die proteolytische HTRA1 Aktivität mit einem spezifischen Substrat ändert (3.6.1). Die Aktivität von HTRA1 und HTRA1 Δ PDZ wurde nach Vorinkubation mit Calpain 2 deutlich gesteigert (Abb. 3.6.1). HTRA1 wurde um das Drei- bis Vierfache aktiviert, HTRA1 Δ PDZ um das Drei- bis Fünffache. Der Einfluss von Calpain 2 auf die Aktivität von HTRA1 Δ PDZ entsprach nicht den Erwartungen, da HTRA1 ohne PDZ Domäne keinen Komplex mit Calpain 2 bildet. Daher ist die postulierte Interaktion von mindestens einem Calpain 2 mit dem Sensor Loop von HTRA1 im HTRA1 – Calpain 2 Komplex wahrscheinlich. Die Interaktion zwischen

HTRA1 und Calpain 2 wird durch die PDZ Domänen zu mindestens so stabilisiert, dass der Komplex mittels Größenausschlusschromatographie nachzuweisen ist. Die Aktivierung scheint jedoch nicht PDZ vermittelt zu sein, da sonst keine Aktivierung von HTRA1 Δ PDZ zu beobachten wäre. Eine Übersicht des Einflusses von Calpain 2 auf die HTRA1 Aktivität ist in Tab. 4.1 dargestellt. Die Kontrollen von Calpain 2 und durch EDTA inaktivem Calpain 2 zeigten keine Proteolyse des pNA-Substrats. Umgekehrt wurde ebenfalls getestet ob die Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 die Aktivität von Calpain 2 erhöht. Zu diesem Zweck wurde das AMC gekoppelte Substrat von Calpain 2 verwendet, das von HTRA1 nicht proteolysiert werden konnte. Die Anwesenheit von HTRA1 sowie von HTRA1 Δ PDZ zeigte keinen Einfluss auf die Proteolyseaktivität von Calpain 2 (Abb. 3.6.2).

4.4.2. Vorinkubation von Calpain 2 und HTRA1 beschleunigen die Proteolyse von Tau

Die Auswirkung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 wurde außerdem mit einem physiologisch relevanten Proteinsubstrat getestet. Zu diesem Zweck wurde das zuvor gereinigte Tau 4R genutzt (3.3). Tau 4R kann durch beide Proteasen, HTRA1 und Calpain 2, proteolysiert werden (Tennstaedt *et al.*, 2012, Johnson *et al.*, 1989). Wurden HTRA1 und eine inaktive Mutante von Calpain 2 (CA) vor der Zugabe von Tau 4R vorinkubiert, so wurde die Proteolyse von Tau 4R durch HTRA1 beschleunigt (Abb. 3.6.3). Auch HTRA1 Δ PDZ wurde durch die Vorinkubation mit Calpain 2 (CA) aktiviert, was durch eine mögliche Interaktion von Calpain 2 (CA) mit dem Sensor Loop zu erklären wäre (Abb. 3.6.4). Die Aktivierung von HTRA1 Δ PDZ durch Calpain 2 (CA) war jedoch geringer als die von HTRA1. Dieser geringere Einfluss durch Calpain 2 könnte durch die schwächere Interaktion beider Proteasen erklärt werden, da ein Komplex von HTRA1 Δ PDZ und Calpain 2 sich mittels Größenausschlusschromatographie nicht nachweisen ließ. Eine Übersicht der Effekte von Calpain 2 auf die Aktivität von HTRA1 sowie HTRA1 Δ PDZ ist in Tab. 4.1 dargestellt. Der gleiche Einfluss auf die Geschwindigkeit der Tau 4R Proteolyse durch HTRA1 und HTRA1 Δ PDZ lässt sich durch Vorinkubation mit aktivem Calpain 2 erkennen (Abb. 3.6.5). Wurde aktives Calpain 2 und Tau 4R mit Calcium inkubiert so zeigte sich eine Proteolyse von Tau 4R. HTRA1 Δ PDZ zeigte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Aktivität nach Vorinkubation mit aktivem Calpain 2 (Abb. 3.6.6). Diese Daten sind in einem Schema zur Aktivierung durch Komplexbildung zusammengefasst (Abb. 4.4.1). Eine intrazelluläre Aktivierung von HTRA1 könnte auch *in vivo* zu einer beschleunigten Proteolyse von frei vorliegendem Tau (Abb. 4.4.1 grau) führen. Dies hätte große physiologische Relevanz, da so

bereits die Entstehung von Tau Fibrillen, die beispielsweise zur Alzheimer'schen Erkrankung führen können, beeinflusst werden kann.

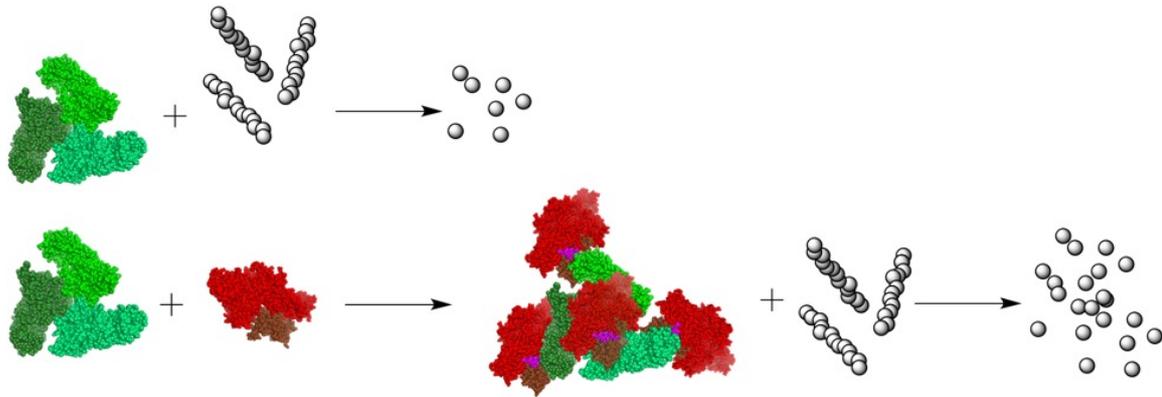


Abb. 4.4.1: Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 aktiviert HTRA1

Modell der Aktivierung von HTRA1 im HTRA1 – Calpain 2 Komplex. In grün ist die Kristallstruktur des bakteriellen HTRA1 Homologes DegS (pdb 1SOT) und in rot ist die Kristallstruktur des Calpain 2 Homologes aus der Ratte dargestellt (pdb 3BOW), die große Untereinheit mit dem C-Terminus in magenta und in dunkelrot die kleine Untereinheit. Der Verdau von Tau (grau) durch HTRA1 ist im oberen Teil gezeigt. Die dabei entstehenden Peptide sind als einzelne graue Kreise dargestellt. Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 führen zur Bildung eines Komplexes, der dann im Verdau des Substrats schneller ist. Die Beschleunigung wird durch die vermehrten Proteolyseprodukte dargestellt.

4.4.3. Tau Fibrillen werden vom HTRA1 – Calpain 2 Komplex schneller proteolysiert

Für eine detaillierte Untersuchung des Effekts der HTRA1 – Calpain 2 Interaktion wurden Tau Fibrillen aus zuvor gereinigtem Tau 4R und F3 hergestellt. Zu diesem Zweck wurde die Fibrillenbildung durch die Zugabe von Heparin induziert. Die Fibrillenbildung von Tau wurde durch Fettsäuren (Wilson & Binder, 1997), insbesondere durch Heparin (Giasson *et al.*, 2003), stimuliert. Der Erfolg der Bildung von Tau Fibrillen konnte mehrfach überprüft werden. So konnte eine SDS-PAGE Analyse mit anschließender Coomassie-Blau Färbung nach Zentrifugation der Proben, im Überstand freies Tau und im Sediment aggregiertes, fibrilläres Tau nachweisen (Abb. 3.6.7). Des Weiteren ließ sich die Bildung von Fibrillen mittels Thioflavin T-Fluoreszenz verfolgen. Thioflavin T (ThT) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der amyloide Strukturen bindet (Abb. 3.6.8). Ob die Tau Fibrillen tatsächlich typisch fibrilläre Formen bilden (Sahara *et al.*, 2007), ließ sich zusätzlich durch Analyse mit Hilfe der AFM untersuchen (Abb. 3.6.9). Der Tau 4R Ansatz ohne Heparin Behandlung zeigte in AFM Analysen keine Fibrillen. Im Gegensatz dazu konnten bei Tau 4R nach Heparin Zugabe im AFM fibrilläre Strukturen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen stimmten mit den

Proben der Zentrifugation sowie der ThT-Fluoreszenz überein. Die hergestellten Tau Fibrillen wurden als Substrat für den proteolytischen Verdau durch HTRA1 eingesetzt (Abb. 3.6.10). Der Abbau der Tau Fibrillen war sehr langsam. Lösliches Tau 4R konnte innerhalb weniger Stunden komplett proteolysiert werden, die Tau 4R und F3 Fibrillen benötigten dagegen eine über Nacht Inkubation mit HTRA1. Die Proteolyse der Fibrillen wurde durch Vorinkubation von HTRA1 bzw. HTRA1 Δ PDZ und dreifachem Überschuss von Calpain 2 beschleunigt. Bereits gebildete Tau Fibrillen könnten demnach intrazellulär durch die Bildung eines HTRA1 – Calpain 2 Komplexes schneller abgebaut werden. Auch hier könnte die Entstehung des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes von Vorteil für den Verlauf von AD sein. Die Proteolyseprodukte der Tau 4R und F3 Fibrillen durch HTRA1, Calpain 2 oder den HTRA1 – Calpain 2 Komplex wurden massenspektrometrisch analysiert (Abb. 3.6.11). Daraus ergab sich, dass lediglich in den Tau Fibrillen, welche durch den HTRA1 – Calpain 2 Komplex abgebaut worden sind, neue Schnittstellen innerhalb der Tau Fibrillen entstehen und teilweise mehr proteolytische Schnitte durchgeführt wurden. Aufgrund dieser Analyse kann vermutet werden, dass die Prozessierung der Tau Fibrillen nicht nur auf eine erhöhte HTRA1 Aktivität zurückgeführt werden kann, sondern zusätzlich neue Schnittstellen einen schnelleren Verdau durch den Proteasenkomples ermöglichen.

In Tab. 4.1 ist eine Übersicht der Aktivierung von HTRA1 und HTRA1 Δ PDZ in den durchgeführten Aktivitätsassays durch Vorinkubation mit Calpain 2 dargestellt. Im Vergleich ist die Aktivierung von HTRA1 und HTRA1 Δ PDZ im Fall der Tau 4R Fibrillen am geringsten.

Tab. 4.1: Aktivierung von HTRA1 durch Calpain 2

HTRA1 wird durch Vorinkubation mit Calpain 2 aktiviert. Die verschiedenen Verhältnisse von HTRA1 bzw. HTRA1 Δ PDZ und Calpain 2 wurden mit pNA Peptid, löslichem Tau 4R und fibrillärem Tau 4R als Substrate getestet. Der Grad der Aktivierung wird mit + angegeben. Für die pNA Peptide wurde die spezifische Aktivität ermittelt und die + entsprechen der Aktivierung bezogen auf die spezifische Aktivität von HTRA1 bzw. HTRA1 Δ PDZ ohne Calpain 2. Für die Proteinsubstrate wird der Grad der Aktivierung untereinander verglichen. Für die Tau 4R Fibrillen wurde nur der Überschuss von Calpain 2 getestet, die anderen Verhältnisse wurden nicht überprüft (/).

Substrat	HTRA1			HTRA1 Δ PDZ		
	Überschuss Calpain 2	äquimolar	Überschuss HTRA1	Überschuss Calpain 2	äquimolar	Überschuss HTRA1 Δ PDZ
pNA Peptid	++++	++++	+++	+++++	+++++	+++
Tau 4R löslich	++++	+++	++	+++	++	+
Tau 4R Fibrillen	+	/	/	+	/	/

4.5. Eine mögliche physiologische Rolle für den HTRA1 – Calpain 2 Komplex

Es konnte im Verlauf dieser Arbeit mittels Pulldown-Assay und Größenausschlusschromatographie nachgewiesen werden, dass HTRA1 und Calpain 2 einen stabilen Multienzym-Komplex bilden können. Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex wird nicht gebildet sobald die PDZ-Domäne von HTRA1 fehlt. PDZ-Domänen anderer HTRA Proteasen dienen der Substratprozessierung, Oligomerisierung oder Regulation (Clausen *et al.*, 2011), die PDZ-Domäne von HTRA1 ist dafür jedoch nicht notwendig (Eigenbrot *et al.*, 2012, Truebestein *et al.*, 2011). Bisher wird angenommen, dass die PDZ-Domäne von HTRA1 durch Interaktion mit Substraten die Lokalisierung von HTRA1 beeinflusst, beispielsweise die Kolo-kalisation mit Mikrotubuli durch das Mikrotubuli assoziierte Substrat Tau. Die Bildung oder Stabilisierung des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes durch die PDZ-Domäne beschreibt eine neuartige Funktion dieser Domäne. Die Regulation der Komplexbildung von HTRA1 und Calpain 2 könnte durch verschiedene noch nicht näher bekannte PDZ Liganden, die um die Bindung mit der PDZ Domäne kompetitieren, reguliert werden.

Durch die Bildung des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes kommt es zu einer Steigerung der HTRA1 Aktivität. Diese Aktivierung ließ sich in Proteolysen von pNA-gekoppelten Peptiden sowie des physiologisch relevanten Substrats Tau und seinen Fibrillen erkennen. Als physiologische Funktion des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes kann demnach die Proteolyse von Tau und insbesondere seinen Fibrillen angesehen werden. Ein intrazellulärer Abbau von frei vorliegendem Tau könnte die Möglichkeit der Aggregation von Tau vermindern. Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex sollte außerdem eine Funktion in der Bekämpfung der Fibrillen beispielsweise in AD erfüllen. Erhöhte Calpain 2 Konzentration und Aktivität sind dafür bekannt negative physiologische Auswirkungen, vor allem in neurodegenerativen Erkrankungen, zu haben (Vosler *et al.*, 2008). HTRA1 ist *in vitro* dazu in der Lage Tau Aggregate zu proteolysieren (Tennstaedt *et al.*, 2012). Ein Komplex, in dem HTRA1 aktiviert wird, könnte bereits die in der Zelle gebildeten Tau Aggregate abbauen und so ein Absterben der Zellen verhindern.

Ein Beispiel für Proteinkomplexe aus Proteasen sind die AAA Proteasen (*ATPases associated with diverse cellular activities*) Yta10 und Yta12 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Arlt *et al.*, 1996). Beide Proteasen bilden einen Komplex, der an der Assemblierung der F₀F₁-ATP-Synthase beteiligt ist (Galluhn & Langer, 2004). Bereits die Deletion eines Partners des Yta10/12 Komplexes führt zu Defiziten in der Atmungskette (Paul & Tzagoloff, 1995). Ein weiteres Beispiel für AAA Proteasen sind die HSP100 Chaperone, die eine ATP-abhängige Disaggregase Aktivität zeigen (Saibil, 2013). Mitglieder dieser Chaperon Familie,

wie z.B. HSP104 aus der Hefe, werden durch das HSP70 System zu aggregierten Proteinen rekrutiert. HSP100 bilden Oligomere, die ihrer Mitte eine Pore besitzen, in die Polypeptide der aggregierten Proteine hineingezogen und somit entfaltet werden (Doyle *et al.*, 2013). Eine solche Interaktion wäre für den HTRA1 – Calpain 2 ebenfalls denkbar. Da nur die HTRA1 Aktivität durch die Interaktion beider Proteasen geändert wird, könnte es sein, dass Calpain 2 hilft, HTRA1 zu rekrutieren und so die Proteolyse beschleunigt. Außerdem könnte Calpain 2 eine Disaggregase Aktivität zeigen und so beispielsweise die Tau Fibrillen leichter zugänglich machen. Andererseits zeigt sich die Aktivierung von HTRA1 durch Calpain 2 am deutlichsten im Aktivitätsassay mit pNA gekoppeltem Peptidsubstrat, bei dem eine mögliche Disaggregase Funktion nutzlos wäre, da hier keine Aggregate vorliegen.

Der hier charakterisierte HTRA1 – Calpain 2 Komplex ist im Gegensatz zu den beschriebenen Komplexen der AAA Proteasen im Hinblick auf die Stabilität transient, da eine Co-Immunpräzipitation bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass zahlreiche Proteinkomplexe nur zu dem Zeitpunkt gebildet wurden, wenn sie benötigt wurden (Wilkins & Kummerfeld, 2008). Es wurde gezeigt, dass HTRA1 in von AD betroffenen Zellen erhöht exprimiert wird (Tennstaedt *et al.*, 2012). Das könnte darauf hindeuten, dass hier der HTRA1 – Calpain 2 Komplex vermehrt gebildet wird. In diesen von AD betroffenen Zellen kann der HTRA1 – Calpain 2 Komplex den Abbau der intrazellulären Tau Fibrillen beschleunigen.

5. Ausblick

In dieser Dissertation konnte die Interaktion der Serinprotease HTRA1 und der Cysteinprotease Calpain 2 nachgewiesen werden. Ein Komplex aus beiden Proteasen wurde biochemisch charakterisiert und ein Modell aus einem HTRA1 Trimer mit vier Calpain 2 Heterodimeren postuliert. Da sich mit der PDZ-losen Mutante von HTRA1 (HTRA1 Δ PDZ) kein Komplex bilden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der Komplex zumindest von den PDZ-Domänen stabilisiert wurde. Die Interaktion von Calpain 2 mit HTRA1 Δ PDZ, die zur Aktivierung führt, könnte beispielsweise über den Sensor Loop L3 vermittelt werden. An diesen Loop könnte das Calpain 2 Heterodimer binden, das nicht mit den PDZ-Domänen des HTRA1 Trimers interagiert. Für genauere Erkenntnisse über die Interaktion wäre es von großem Vorteil die Struktur des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes näher zu untersuchen. Für eine Berechnung der Struktur des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes könnten Aufnahmen mittels *Cryo-EM* angefertigt werden. Auch eine Kristallisierung des Komplexes scheint aufgrund seiner beobachteten Stabilität möglich zu sein.

Die Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 steigerte die Aktivität von HTRA1 deutlich. Als gemeinsames physiologisch relevantes Substrat wurde Tau untersucht. In ersten Versuchen zeigte sich bei der Aggregation von Tau keine Änderung durch Inkubation mit dem HTRA1 – Calpain 2 Komplex. Daher kann davon ausgegangen werden, dass dieser Komplex seine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von AD haben kann. Die Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation von HTRA1 und Calpain 2 in Proben von an AD verstorbenen Patienten wäre daher von Interesse. In diesem Zusammenhang ist die strukturelle Analyse des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes sehr wichtig. Eine Identifikation der interagierenden Aminosäuren könnte bei der Entwicklung spezifischer HTRA1 Aktivatoren hilfreich sein.

Die Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 *in vivo* konnte bisher nur mittels Kolo-kalisation gezeigt werden. Eine genauere Analyse mittels Co-Immunpräzipitation auch nach zuvor durchgeführter Cross-Link-Methode war bisher nicht erfolgreich. Aufgrund der Annahme, dass der HTRA1 – Calpain 2 Komplex transienter Natur ist, wäre eine Co-Immunpräzipitation aus AD Modellsystemen interessant. Eine Möglichkeit die Kolo-kalisation *in vivo* quantitativ zu untersuchen, wäre die Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauer (FLIM). Auch hier wäre die Untersuchung von AD Modellsystemen oder auch AD Patientenproben von großem Interesse.

Ein weiteres gemeinsames Substrat von HTRA1 und Calpain 2 ist Tuberin (Campioni *et al.*, 2010, Briz *et al.*, 2013). Beide proteolysieren Tuberin und entfernen so den

Inhibierungsmechanismus der mTOR-Signalkaskade (*mammalian target of rapamycin*), so dass die Translation verschiedener Zielgene ausgelöst wird. Eine Analyse, ob die Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 auch hier zu einer Veränderung der Aktivität von einem der Komplexpartner führt, wäre von Interesse. Die mTOR-Signalkaskade spielt in der Kontrolle des Zellwachstums und der Proliferation eine entscheidende Rolle (Zoncu *et al.*, 2011). Mutationen von Tuberin und dem Komplexpartner Hamartin können zur Überaktivierung von mTOR und damit zur Bildung von Tumoren führen (Inoki *et al.*, 2003).

6. Zusammenfassung

6.1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde die Interaktion von HTRA1 und Calpain 2 charakterisiert und deren potentielle physiologische Rolle analysiert. Die Proteasen HTRA1 und Calpain 2 zeigen beide vielfältige physiologische Funktionen. HTRA1 ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Proteinqualitätskontrolle, die Inhibierung von HTRA1 führt beispielsweise zur Akkumulation des mit der Alzheimer'schen Krankheit (AD, *alzheimer's disease*) assoziierten A β Peptids (Grau *et al.*, 2005). Auch intrazellulär ist HTRA1 in den Verlauf von AD involviert. HTRA1 ist dazu in der Lage das Mikrotubuli bindende Protein Tau und seine Aggregate zu proteolysieren (Tennstaedt *et al.*, 2012). Intrazelluläre Tau Fibrillen und extrazelluläre A β Aggregate kennzeichnen AD (Crews & Masliah, 2010). Steigt die extrazelluläre A β Konzentration kommt es durch Aktivierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren zu einem Calcium Einstrom in das Cytosol der Zelle. Dadurch wird Calpain 2 aktiviert, kann Tau proteolysieren und die entstandenen Produkte zeigen ein erhöhtes Potential zur Aggregation (Park & Ferreira, 2005). Außerdem aktiviert Calpain 2 verschiedene Kinasen, die durch Hyperphosphorylierung von Tau zur Aggregation von diesem und schließlich zur Apoptose führen können (Vosler *et al.*, 2008). Eine Aktivierung von HTRA1 ist also wünschenswert, die Aktivierung von Calpain 2 ist dagegen ein negativer Faktor in von AD.

Mit Hilfe eines sogenannten C-Terminus Screens konnte Calpain 2 als ein potentieller Interaktionspartner von HTRA1 identifiziert werden. Der C-Terminus Screen wurde in Kooperation mit dem Institut für medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin in Berlin durchgeführt und beinhaltete insgesamt 6223 Peptide, die den C-Termini des humanem Proteoms entsprechen. Für die Untersuchung der möglichen Interaktion beider Proteasen wurde Calpain 2 im Verlauf dieser Dissertation kloniert und die Proteinreinigung etabliert. In einem Pulldown-Assay konnte die Bindung von Calpain 2 an HTRA1 nachgewiesen werden. Nach der Vorinkubation beider Proteasen konnte in einer Größenausschlusschromatographie eine neue Proteinpopulation detektiert werden. Diese konnte bei Vorinkubation mit einer Mutante von HTRA1, der die PDZ-Domäne fehlt, nicht beobachtet werden. Die PDZ-Domäne von HTRA1 ist demnach essentiell für die Bildung des HTRA1 – Calpain 2 Komplexes. Durch Vergleiche mit bekannten HTRA1 und Calpain 2 Mengen konnte eine Stöchiometrie im Komplex von 1:1 abgeschätzt werden. Die molekulare Masse des Komplexes wurde mittels statischer Lichtstreuung nach Größenausschlusschromatographie, MALS-SEC (*multi-angle light scattering with size*

exclusion chromatography), genauer analysiert. Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex besitzt eine molekulare Masse von $535 \pm 0,5$ kDa. Der Komplex besteht wahrscheinlich aus einem HTRA1 Trimer (109 kDa), was der stabilen oligomeren Form von HTRA1 entspricht, und vier Calpain 2 Heterodimeren (je 104 kDa). Damit ergibt sich für den HTRA1 – Calpain 2 Komplex eine berechnete molekulare Masse von 525 kDa und eine Stöchiometrie von 3:4 (1:1,3). Des Weiteren wurde die Struktur des Komplexes mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Die Partikel, die im Transmissionselektronenmikroskop detektiert werden konnten, wiesen eine Größe von etwa $18 \times 15 \times 11$ nm auf. Die Längen eines Modells aus Röntgenkristallstrukturen eines HTRA1 Trimers zusammen mit vier Calpain 2 Heterodimeren stimmt mit diesen experimentell bestimmten Längen gut überein. Außerdem konnte festgestellt werden, dass der HTRA1 – Calpain 2 Komplex stabil ist, die Fraktionen des Komplexes der Größenausschlusschromatographie wurden vereinigt und nochmals chromatographisch aufgetrennt. Hier konnte nur der Komplex, nicht jedoch die einzelnen Proteine, detektiert werden. Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex dissoziiert demnach nicht in seine Einzelkomponenten. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen von HTRA1 und Calpain 2 konnte ebenfalls eine mögliche Kolo-kalisation und damit wahrscheinlich eine Komplexbildung beider Proteasen in HeLa und SH-SY5Y Zelllinien *in vivo* gezeigt werden.

Eine Vorinkubation von HTRA1 und Calpain 2 führt zu einer deutlichen Aktivierung von HTRA1 nicht aber von Calpain 2. Es wurden pNA gekoppelte Peptide und das physiologisch relevante Substrat Tau sowie seine Fibrillen getestet. Massenspektrometrische Analysen der Proteolyseprodukte von Tau Fibrillen ergaben, dass der HTRA1 – Calpain 2 Komplex vor allem in der *Repeat* Regionen und der *self assembly* Region von Tau, die für die Aggregation verantwortlich ist, vermehrte Schnittstellen im Vergleich zu den einzelnen Proteasen zeigte.

Der HTRA1 – Calpain 2 Komplex könnte in der Bekämpfung von AD eine Rolle spielen. Schon zu Fibrillen aggregiertes Tau könnte nach der Bildung des Komplexes schneller abgebaut und somit die Apoptose der Zelle verhindert werden.

6.2. Summary

The aim of this work was the characterization of the interaction of two proteases, the serine protease HTRA1 and the cysteine protease calpain 2. Both proteases are involved in various neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). More specifically, HTRA1 is a key player in protein quality control. Inhibition of HTRA1 leads to an accumulation of extracellular A β , a hallmark of AD (Grau *et al.*, 2005). Intracellular HTRA1 is known to degrade tau and its aggregates (Tennstaedt *et al.*, 2012). Elevated concentrations of the extracellular A β lead to an activation of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors followed by an influx of calcium ions into the cytosol. Consequently, calpain 2 gets activated upon increasing calcium concentrations. Calpain 2 is involved in AD by degrading tau and activating various kinases, which promote the aggregation of tau by phosphorylation and finally lead to apoptosis (Vosler *et al.*, 2008).

A screen involving a nonredundant set of 6223 decameric peptides, which correspond to the C-termini of all human proteins revealed candidate ligands of HTRA1 (cooperation with Institut für medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin). The hits from this screen suggest that HTRA1 and calpain 2 might interact. To test this hypothesis human calpain 2 and its small human subunit were expressed in *E. coli* and the calpain 2 heterodimer was purified. Interaction of HTRA1 and calpain 2 could be demonstrated by using pulldown-assays. Moreover, incubation of the calpain 2 heterodimer with HTRA1 resulted in the formation of a stable complex as detected by size exclusion chromatography. The formation of the HTRA1 – calpain 2 complex was probably mediated via the PDZ domain of HTRA1 due to the fact that PDZ-less HTRA1 failed to form a complex. The complex was stable after reinjection as it did not dissociate into the single components. 1:1 stoichiometry of the HTRA1 – calpain 2 complex was determined. Detailed analysis of the molecular weight of this complex was performed via multi-angle light scattering in combination with size exclusion chromatography (MALS-SEC). This analysis revealed a size of $535 \pm 0,5$ kDa. The formation of the protease complex was additionally confirmed via a negative staining technique using transmission electron microscopy whereby particles of similar size were detected. A model was introduced based on the parameters molecular weight, stoichiometry and the size of the particles. It consisted of four calpain 2 heterodimers, each 104 kDa, bound to one HTRA1 trimer (109 kDa). The calculation of the complex model showed a molecular weight of 525 kDa and a stoichiometry of 3:4 (1:1,3) and with that confirmed the obtained data. By using immunofluorescently labeled HTRA1 and calpain 2 a possible colocalization in HeLa and SH-SY5Y cells could be demonstrated.

Further, digestion assays suggested that the formation of the protease complex increases the activity of HTRA1. Additionally, the use of mass spectrometry indicated more proteolysis sites in the repeat region of tau fibrils.

This protease complex could play an important role in various diseases, especially in AD. Calpains are known to be an aggravating factor in AD and HTRA1 is implicated in the digestion of pathogenic aggregates like tau, therefore this protease complex where HTRA1 is activated by calpain 2 could be beneficial to cell survival.

7. Literatur

- Alba, B. M., J. A. Leeds, C. Onufryk, C. Z. Lu and C. A. Gross, 2002: DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.*, **16**, 2156-2168.
- Amm, I., T. Sommer and D. H. Wolf, 2014: Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1843**, 182-196.
- Appelqvist, H., P. Wäster, K. Kågedal and K. Öllinger, 2013: The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of Molecular Cell Biology*, **5**, 214-226.
- Arlt, H., R. Tauer, H. Feldmann, W. Neupert and T. Langer, 1996: The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell*, **85**, 875-885.
- Arthur, J. S., J. S. Elce, C. Hegadorn, K. Williams and P. A. Greer, 2000: Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol*, **20**, 4474-4481.
- Asherie, N., 2004: Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, **34**, 266-272.
- Azam, M., S. S. Andrabi, K. E. Sahr, L. Kamath, A. Kuliopulos and A. H. Chishti, 2001: Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol*, **21**, 2213-2220.
- Bainton, D. F., 1981: The discovery of lysosomes. *J Cell Biol*, **91**, 66s-76s.
- Barrett, A. J., N. D. Rawlings and E. A. O'Brien, 2001: The MEROPS Database as a Protease Information System. *Journal of Structural Biology*, **134**, 95-102.
- Bartlett, A. I. and S. E. Radford, 2009: An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 582-588.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, A. Held, L. Stryer, C. Lange, K. Mahlke, G. Maxam, L. Seidler, B. Häcker and N. Zellerhoff, 2012: *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Bertipaglia, I. and E. Carafoli, 2007: Calpains and human disease. *Sub-cellular biochemistry*, **45**, 29-53.
- Betts, R. and J. Anagli, 2004: The beta- and gamma-CH2 of B27-WT's Leu(11) and Ile(18) side chains play a direct role in calpain inhibitions. *Biochemistry*, **43**, 2596-2604.
- Betts, R., S. Weinsheimer, G. E. Blouse and J. Anagli, 2003: Structural determinants of the calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 7800-7809.

- Biswas, S., F. Harris, S. Dennison, J. P. Singh and D. Phoenix, 2005: Calpains: enzymes of vision? *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **11**, RA301-310.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross, 1987: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Boisguerin, P., B. Ay, G. Radziwill, R. D. Fritz, K. Moelling and R. Volkmer, 2007: Characterization of a putative phosphorylation switch: adaptation of SPOT synthesis to analyze PDZ domain regulation mechanisms. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, **8**, 2302-2307.
- Bolte, S. and F. P. Cordelieres, 2006: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, **224**, 213-232.
- Bowden, M. A., L. A. Di Nezza-Cossens, T. Jobling, L. A. Salamonsen and G. Nie, 2006: Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.*, **103**, 253-260.
- Bowden, M. A., A. E. Drummond, P. J. Fuller, L. A. Salamonsen, J. K. Findlay and G. Nie, 2010: High-temperature requirement factor A3 (Htra3): a novel serine protease and its potential role in ovarian function and ovarian cancers. *Mol. Cell Endocrinol.*, **327**, 13-18.
- Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brini, M. and E. Carafoli, 2009: Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev*, **89**, 1341-1378.
- Briz, V., Y. T. Hsu, Y. Li, E. Lee, X. Bi and M. Baudry, 2013: Calpain-2-mediated PTEN degradation contributes to BDNF-induced stimulation of dendritic protein synthesis. *J Neurosci*, **33**, 4317-4328.
- Brocker, C., A. Kuhlee, C. Gatsogiannis, H. J. Balderhaar, C. Honscher, S. Engelbrecht-Vandre, C. Ungermann and S. Raunser, 2012: Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 1991-1996.
- Campbell, R. L. and P. L. Davies, 2012: Structure - function relationships in calpains. *Biochem. J.*, **447**, 335-351.
- Campioni, M., A. Severino, L. Manente, I. L. Tuduca, S. Toldo, M. Caraglia, S. Crispi, M. Ehrmann, X. He, J. Maguire, M. De Falco, A. De Luca, V. Shridhar and A. Baldi,

- 2010: The serine protease HtrA1 specifically interacts and degrades the tuberous sclerosis complex 2 protein. *Molecular cancer research : MCR*, **8**, 1248-1260.
- Carragher, N. O., 2006: Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Current pharmaceutical design*, **12**, 615-638.
- Carrillo-Mora, P., L. A. Mendez-Cuesta, V. Perez-De La Cruz, T. I. Fortoul-van Der Goes and A. Santamaria, 2010: Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. *Behav Brain Res*, **210**, 240-250.
- Caughey, B. and P. T. Lansbury, 2003: Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 267-298.
- Chao, J. R., E. Parganas, K. Boyd, C. Y. Hong, J. T. Opferman and J. N. Ihle, 2008: Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature*, **452**, 98-102.
- Chien, J., G. Aletti, A. Baldi, V. Catalano, P. Muretto, G. Keeney, K. Kalli, J. Staub, M. Ehrmann, W. Cliby, Y. Lee, K. Bible, L. Hartmann, S. Kaufmann and V. Shridhar, 2006: Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest*, **116**, 1994-2004.
- Chien, J., M. Campioni, V. Shridhar and A. Baldi, 2009a: HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, **9**, 451-468.
- Chien, J., T. Ota, G. Aletti, R. Shridhar, M. Boccellino, L. Quagliuolo, A. Baldi and V. Shridhar, 2009b: Serine Protease HtrA1 Associates with Microtubules and Inhibits Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 4177-4187.
- Chu, J., N. A. Hong, C. A. Masuda, B. V. Jenkins, K. A. Nelms, C. C. Goodnow, R. J. Glynn, H. Wu, E. Masliah, C. A. Joazeiro and S. A. Kay, 2009: A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2097-2103.
- Chua, B. T., K. Guo and P. Li, 2000: Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem*, **275**, 5131-5135.
- Cilenti, L., M. M. Soundarapandian, G. A. Kyriazis, V. Stratico, S. Singh, S. Gupta, J. V. Bonventre, E. S. Alnemri and A. S. Zervos, 2004: Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death. *J. Biol. Chem.*
- Clausen, T., M. Kaiser, R. Huber and M. Ehrmann, 2011: HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 152-162.

- Clausen, T., C. Southan and M. Ehrmann, 2002: The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell*, **10**, 443-455.
- Coffey, J. W. and C. De Duve, 1968: Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem*, **243**, 3255-3263.
- Colak, A., M. Kaya, A. Karaoglan, A. Sagmanligil, O. Akdemir, E. Sahan and O. Celik, 2009: Calpain inhibitor AK 295 inhibits calpain-induced apoptosis and improves neurologic function after traumatic spinal cord injury in rats. *Neurocirugia*, **20**, 245-254.
- Crews, L. and E. Masliah, 2010: Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, R12-R20.
- Croall, D. E. and G. N. DeMartino, 1991: Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, **71**, 813-847.
- Das, A., M. K. Guyton, A. Smith, G. t. Wallace, M. L. McDowell, D. D. Matzelle, S. K. Ray and N. L. Banik, 2013: Calpain inhibitor attenuated optic nerve damage in acute optic neuritis in rats. *Journal of Neurochemistry*, **124**, 133-146.
- Dayton, W. R., D. E. Goll, M. G. Zeece, R. M. Robson and W. J. Reville, 1976: A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, **15**, 2150-2158.
- Dear, N., K. Matena, M. Vingron and T. Boehm, 1997: A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics*, **45**, 175-184.
- Dear, T. N. and T. Boehm, 1999: Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. *Mechanisms of development*, **89**, 201-209.
- Dear, T. N., N. T. Meier, M. Hunn and T. Boehm, 2000: Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. *Genomics*, **68**, 152-160.
- Degterev, A., M. Boyce and J. Yuan, 2003: A decade of caspases. *Oncogene*, **22**, 8543-8567.
- Delobel, P., C. Mailliot, M. Hamdane, A. V. Sambo, S. Begard, A. Violleau, A. Delacourte and L. Buee, 2003: Stable-tau overexpression in human neuroblastoma cells: an open door for explaining neuronal death in tauopathies. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**, 623-634.
- Donkor, I. O., 2011: Calpain inhibitors: a survey of compounds reported in the patent and scientific literature. *Expert Opin Ther Pat*, **21**, 601-636.
- Doyle, S. M., O. Genest and S. Wickner, 2013: Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**, 617-629.

- Dunn, K. W., M. M. Kamocka and J. H. McDonald, 2011: A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American journal of physiology. Cell physiology*, **300**, C723-742.
- Dutt, P., D. E. Croall, J. S. Arthur, T. D. Veyra, K. Williams, J. S. Elce and P. A. Greer, 2006: m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol*, **6**, 3.
- Ehrmann, M. and T. Clausen, 2004: Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet*, **38**, 709-724.
- Eigenbrot, C., M. Ultsch, M. T. Lipari, P. Moran, S. J. Lin, R. Ganesan, C. Quan, J. Tom, W. Sandoval, M. van Lookeren Campagne and D. Kirchhofer, 2012: Structural and functional analysis of HtrA1 and its subdomains. *Structure*, **20**, 1040-1050.
- Faccio, L., C. Fusco, A. Chen, S. Martinotti, J. Bonventre and A. Zervos, 2000: Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2581-2588.
- Fadeel, B. and E. Grzybowska, 2009: HAX-1: a multifunctional protein with emerging roles in human disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1790**, 1139-1148.
- Fairbanks, G., T. L. Steck and D. F. Wallach, 1971: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.
- Feng, Y., Y. Xia, G. Yu, X. Shu, H. Ge, K. Zeng, J. Wang and X. Wang, 2013: Cleavage of GSK-3beta by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3beta activity induced by H(2)O(2). *J Neurochem*, **126**, 234-242.
- Finka, A. and P. Goloubinoff, 2013: Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. *Cell stress & chaperones*, **18**, 591-605.
- Franco, S. J. and A. Huttenlocher, 2005: Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of Cell Science*, **118**, 3829-3838.
- Gafni, J., X. Cong, S. F. Chen, B. W. Gibson and L. M. Ellerby, 2009: Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J Biol Chem*, **284**, 25441-25449.
- Gafni, J., E. Hermel, J. E. Young, C. L. Wellington, M. R. Hayden and L. M. Ellerby, 2004: Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem*, **279**, 20211-20220.

- Galluhn, D. and T. Langer, 2004: Reversible assembly of the ATP-binding cassette transporter Mdl1 with the F1F0-ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 38338-38345.
- Garg, S., T. Timm, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow and Y. P. Wang, 2011: Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiol. Aging*, **32**, 1-14.
- Giasson, B. I., M. S. Forman, M. Higuchi, L. I. Golbe, C. L. Graves, P. T. Kotzbauer, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee, 2003: Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science*, **300**, 636-640.
- Glading, A., P. Chang, D. A. Lauffenburger and A. Wells, 2000: Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, **275**, 2390-2398.
- Goll, D., V. Thompson, H. Li, W. Wei and J. Cong, 2003: The calpain system. *Physiol Rev*, **83**, 731-801.
- Gonen, H., D. Shkedy, S. Barnoy, N. S. Kosower and A. Ciechanover, 1997: On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett*, **406**, 17-22.
- Goni-Oliver, P., J. J. Lucas, J. Avila and F. Hernandez, 2007: N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem*, **282**, 22406-22413.
- Gottesman, S., 2003: Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **19**, 565-587.
- Grau, S., A. Baldi, R. Bussani, X. Tian, R. Stefanescu, M. Przybylski, P. Richards, S. Jones, V. Shridhar, T. Clausen and M. Ehrmann, 2005: Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6021-6026.
- Grau, S., P. Richards, B. Kerr, C. Hughes, B. Caterson, A. Williams, U. Junker, S. Jones, T. Clausen and M. Ehrmann, 2006: The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem*, **281**, 6124-6129.
- Gray, C. W., R. V. Ward, E. Karran, S. Turconi, A. Rowles, D. Viglienghi, C. Southan, A. Barton, K. G. Fantom, A. West, J. Savopoulos, N. J. Hassan, H. Clinkenbeard, C. Hanning, B. Amegadzie, J. B. Davis, C. Dingwall, G. P. Livi and C. L. Creasy, 2000: Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5699-5710.

- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder, 1986: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4913-4917.
- Guroff, G., 1964: A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J Biol Chem*, **239**, 149-155.
- Hamos, J. E., B. Oblas, D. Pulaski-Salo, W. J. Welch, D. G. Bole and D. A. Drachman, 1991: Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology*, **41**, 345-350.
- Hanahan, D., 1983: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanna, R. A., R. L. Campbell and P. L. Davies, 2008: Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, **456**, 409-U478.
- Hansen, G. and R. Hilgenfeld, 2013: Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell Mol Life Sci*, **70**, 761-775.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl, 2002: Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, **295**, 1852-1858.
- Hasenbein, S., M. Meltzer, P. Hauske, M. Kaiser, R. Huber, T. Clausen and M. Ehrmann, 2010: Conversion of a regulatory into a degradative protease. *J Mol Biol*, **397**, 957-966.
- Higuchi, M., M. Tomioka, J. Takano, K. Shirotani, N. Iwata, H. Masumoto, M. Maki, S. Itohara and T. C. Saido, 2005: Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *J Biol Chem*, **280**, 15229-15237.
- Hol, E. M. and W. Scheper, 2008: Protein Quality Control in Neurodegeneration: Walking the Tight Rope Between Health and Disease. *J. Mol. Neurosci.*, **34**, 23-33.
- Hosfield, C. M., J. S. Elce, P. L. Davies and Z. Jia, 1999: Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *Embo J*, **18**, 6880-6889.
- Hu, S. I., M. Carozza, M. Klein, P. Nantermet, D. Luk and R. M. Crowl, 1998: Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34406-34412.
- Huston, R. B. and E. G. Krebs, 1968: Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca²⁺. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry*, **7**, 2116-2122.

- Huttunen, H. J., S. Y. Guenette, C. Peach, C. Greco, W. Xia, D. Y. Kim, C. Barren, R. E. Tanzi and D. M. Kovacs, 2007: HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem*, **282**, 28285-28295.
- Imajoh, S., H. Kawasaki and K. Suzuki, 1987: The COOH-terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity. *J Biochem*, **101**, 447-452.
- Inoki, K., Y. Li, T. Xu and K. L. Guan, 2003: Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, **17**, 1829-1834.
- Jamsa, A., A. Backstrom, E. Gustafsson, N. Dehvari, G. Hiller, R. F. Cowburn and M. Vasange, 2006: Glutamate treatment and p25 transfection increase Cdk5 mediated tau phosphorylation in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 324-331.
- Jiang, J., X. Zhang, Y. Chen, Y. Wu, Z. H. Zhou, Z. Chang and S. F. Sui, 2008: Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11939-11944.
- Jin, S., M. Kalkum, M. Overholtzer, A. Stoffel, B. T. Chait and A. J. Levine, 2003: CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev*, **17**, 359-367.
- Johnson, G. V., R. S. Jope and L. I. Binder, 1989: Proteolysis of tau by calpain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **163**, 1505-1511.
- Keller, J. N., K. B. Hanni and W. R. Markesbery, 2000: Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **75**, 436-439.
- Kim, K., S. Park, S. Kang, G. Cheong and C. Chung, 1999: Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **294**, 1363-1374.
- Kim, S., R. A. Grant and R. T. Sauer, 2011: Covalent linkage of distinct substrate degrons controls assembly and disassembly of DegP proteolytic cages. *Cell*, **145**, 67-78.
- Kishimoto, A., K. Mikawa, K. Hashimoto, I. Yasuda, S. Tanaka, M. Tominaga, T. Kuroda and Y. Nishizuka, 1989: Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem*, **264**, 4088-4092.
- Kiss, R., D. Kovacs, P. Tompa and A. Perczel, 2008: Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain. *Biochemistry*, **47**, 6936-6945.

- Kolmar, H., P. Waller and R. Sauer, 1996: The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.*, **178**, 5925-5929.
- Koonin, E. V. and L. Aravind, 2002: Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ.*, **9**, 394-404.
- Krojer, T., M. Garrido-Franco, R. Huber, M. Ehrmann and T. Clausen, 2002: Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, **416**, 455-459.
- Krojer, T., J. Sawa, E. Schäfer, H. Saibil, M. Ehrmann and T. Clausen, 2008: Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, **453**, 885-890.
- Kubbutat, M. H. and K. H. Vousden, 1997: Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol*, **17**, 460-468.
- Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Larsen, C. N. and D. Finley, 1997: Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell*, **91**, 431-434.
- Lazure, C., 2002: The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis. *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 511-531.
- Lebart, M. C. and Y. Benyamin, 2006: Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *The FEBS journal*, **273**, 3415-3426.
- Lee, J. W., K. Beebe, L. A. Nangle, J. Jang, C. M. Longo-Guess, S. A. Cook, M. T. Davisson, J. P. Sundberg, P. Schimmel and S. L. Ackerman, 2006: Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*, **443**, 50-55.
- Li, B., Q. Hu, H. Wang, N. Man, H. Ren, L. Wen, N. Nukina, E. Fei and G. Wang, 2010: Omi/HtrA2 is a positive regulator of autophagy that facilitates the degradation of mutant proteins involved in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.*, **17**, 1773-1784.
- Li, H., V. F. Thompson and D. E. Goll, 2004: Effects of autolysis on properties of mu- and m-calpain. *Biochim Biophys Acta*, **1691**, 91-103.
- Li, W., S. M. Srinivasula, J. Chai, P. Li, J. W. Wu, Z. Zhang, E. S. Alnemri and Y. Shi, 2002: Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 436-441.
- Lipinska, B., S. Sharma and C. Georgopoulos, 1988: Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 10053-10067.

- Lloyd, J. B., 1996: Metabolite efflux and influx across the lysosome membrane. *Sub-cellular biochemistry*, **27**, 361-386.
- Maki, M., E. Takano, H. Mori, A. Sato, T. Murachi and M. Hatanaka, 1987: All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Lett*, **223**, 174-180.
- Manders, E. M., J. Stap, G. J. Brakenhoff, R. van Driel and J. A. Aten, 1992: Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci*, **103 (Pt 3)**, 857-862.
- Marambaud, P., U. Dreses-Werringloer and V. Vingtdeux, 2009: Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.*, **4**, 15.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang and S. H. Bryant, 2009: CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic acids research*, **37**, D205-210.
- McCall, K., 2010: Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*, **22**, 882-888.
- Meltzer, M., S. Hasenbein, P. Hauske, N. Kucz, M. Merdanovic, S. Grau, A. Beil, D. Jones, T. Krojer, T. Clausen, M. Ehrmann and M. Kaiser, 2008: Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 1332-1334.
- Michalski, A., E. Damoc, O. Lange, E. Denisov, D. Nolting, M. Muller, R. Viner, J. Schwartz, P. Remes, M. Belford, J. J. Dunyach, J. Cox, S. Horning, M. Mann and A. Makarov, 2012: Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol Cell Proteomics*, **11**, O111 013698.
- Miller, J., 1972: Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Mishizen-Eberz, A. J., E. H. Norris, B. I. Giasson, R. Hodara, H. Ischiropoulos, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski and D. R. Lynch, 2005: Cleavage of alpha-synuclein by calpain: potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of alpha-synuclein. *Biochemistry*, **44**, 7818-7829.

- Moldoveanu, T., K. Gehring and D. R. Green, 2008: Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature*, **456**, 404-U473.
- Moldoveanu, T., C. M. Hosfield, D. Lim, J. S. Elce, Z. C. Jia and P. L. Davies, 2002: A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell*, **108**, 649-660.
- Mukrasch, M. D., S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow and M. Zweckstetter, 2009: Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol*, **7**, e34.
- Murwantoko, M. Yano, Y. Ueta, A. Murasaki, H. Kanda, C. Oka and M. Kawaichi, 2004: Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem. J.*, **381**, 895-904.
- Nakagawa, K., H. Masumoto, H. Sorimachi and K. Suzuki, 2001: Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J Biochem*, **130**, 605-611.
- Ohi, M., Y. Li, Y. Cheng and T. Walz, 2004: Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biological procedures online*, **6**, 23-34.
- Ohkuma, S. and B. Poole, 1978: Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 3327-3331.
- Olsen, J. V., L. M. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning and M. Mann, 2005: Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 2010-2021.
- Onder, O., S. Turkarslan, D. Sun and F. Daldal, 2008: Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol: disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 875-890.
- Ono, Y. and H. Sorimachi, 2012: Calpains - An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1824**, 224-236.
- Page, M. J. and E. Di Cera, 2008: Evolution of peptidase diversity. *J. Biol. Chem.*, **283**, 30010-30014.
- Paquet-Durand, F., L. Johnson and P. Ekstrom, 2007: Calpain activity in retinal degeneration. *J. Neurosci. Res.*, **85**, 693-702.

- Park, H. J., S. S. Kim, Y. M. Seong, K. H. Kim, H. G. Goo, E. J. Yoon, S. Min do, S. Kang and H. Rhim, 2006: Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **281**, 34277-34287.
- Park, S. Y. and A. Ferreira, 2005: The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: An alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J. Neurosci.*, **25**, 5365-5375.
- Patil, C. and P. Walter, 2001: Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 349-355.
- Patrick, G. N., L. Zukerberg, M. Nikolic, S. de la Monte, P. Dikkes and L. H. Tsai, 1999: Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, **402**, 615-622.
- Paul, M. F. and A. Tzagoloff, 1995: Mutations in RCA1 and AFG3 inhibit F1-ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **373**, 66-70.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell, 1999: Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan and L. Dempfle, 2002: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, **30**, e36.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet and T. P. Neuvians, 2004: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, **26**, 509-515.
- Rao, M. V., P. S. Mohan, C. M. Peterhoff, D. S. Yang, S. D. Schmidt, P. H. Stavrides, J. Campbell, Y. Chen, Y. Jiang, P. A. Paskevich, A. M. Cataldo, V. Haroutunian and R. A. Nixon, 2008: Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST overexpression. *J Neurosci*, **28**, 12241-12254.
- Rappsilber, J., M. Mann and Y. Ishihama, 2007: Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols*, **2**, 1896-1906.

- Rock, M. T., A. R. Dix, W. H. Brooks and T. L. Roszman, 2000: Beta1 integrin-mediated T cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. *Exp Cell Res*, **261**, 260-270.
- Sahara, N., S. Maeda, M. Murayama, T. Suzuki, N. Dohmae, S. H. Yen and A. Takashima, 2007: Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *The European journal of neuroscience*, **25**, 3020-3029.
- Saibil, H., 2013: Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**, 630-642.
- Saito, K. I., J. S. Elce, J. E. Hamos and R. A. Nixon, 1993: WIDESPREAD ACTIVATION OF CALCIUM-ACTIVATED NEUTRAL PROTEINASE (CALPAIN) IN THE BRAIN IN ALZHEIMER-DISEASE - A POTENTIAL MOLECULAR-BASIS FOR NEURONAL DEGENERATION. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 2628-2632.
- Salceda, S. and J. Caro, 1997: Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions: ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 22642-22647.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri, 2012: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*, **9**, 671-675.
- Selkoe, D. J., 1989: Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell*, **58**, 611-612.
- Shen, Q. T., X. C. Bai, L. F. Chang, Y. Wu, H. W. Wang and S. F. Sui, 2009: Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4858-4863.
- Shi, Y., 2002: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, **9**, 459-470.
- Sohn, J., R. A. Grant and R. T. Sauer, 2007: Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell*, **131**, 572-583.
- Song, J. Q., X. C. Chen, J. Zhang, T. W. Huang, Y. Q. Zeng, J. Shen and L. M. Chen, 2008: [JNK/p38 MAPK involves in ginsenoside Rb1 attenuating beta-amyloid peptide (25-35) -induced tau protein hyperphosphorylation in embryo rat cortical neurons]. *Yao Xue Xue Bao*, **43**, 29-34.
- Sorimachi, H., S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, H. Kawasaki, S. Ohno, Y. Minami and K. Suzuki, 1989: Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **264**, 20106-20111.

- Sorimachi, H., S. Ishiura and K. Suzuki, 1993: A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca(2+)-binding domain. *J Biol Chem*, **268**, 19476-19482.
- Spiess, C., A. Beil and M. Ehrmann, 1999: A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, **97**, 339-347.
- Steiner, B., E. M. Mandelkow, J. Biernat, N. Gustke, H. E. Meyer, B. Schmidt, G. Mieskes, H. D. Soling, D. Drechsel, M. W. Kirschner and et al., 1990: Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca2(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J*, **9**, 3539-3544.
- Storr, S. J., N. O. Carragher, M. C. Frame, T. Parr and S. G. Martin, 2011: The calpain system and cancer. *Nature Reviews Cancer*, **11**, 364-374.
- Strauch, K. L. and J. Beckwith, 1988: An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1576-1580.
- Strobl, S., C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, H. Bartunik, K. Suzuki and W. Bode, 2000: The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 588-592.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt, 1986: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Suzuki, K., S. Hata, Y. Kawabata and H. Sorimachi, 2004: Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S12-18.
- Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi, 2001: A serine protease, htra2, is released from the mitochondria and interacts with xiap, inducing cell death. *Mol. Cell*, **8**, 613-621.
- Takano, J., M. Tomioka, S. Tsubuki, M. Higuchi, N. Iwata, S. Itohara, M. Maki and T. C. Saido, 2005: Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *J Biol Chem*, **280**, 16175-16184.
- Tennstaedt, A., S. Popsel, L. Truebestein, P. Hauske, A. Brockmann, N. Schmidt, I. Irle, B. Sacca, C. M. Niemeyer, R. Brandt, H. Ksiazak-Reding, A. L. Tirniceriu, R. Egensperger, A. Baldi, L. Dehmelt, M. Kaiser, R. Huber, T. Clausen and M. Ehrmann, 2012: Human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) degrades tau protein aggregates. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 20931-20941.

- Tiaden, A. N., M. Breiden, A. Mirsaidi, F. A. Weber, G. Bahrenberg, S. Glanz, P. Cinelli, M. Ehrmann and P. J. Richards, 2012: Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein. *Stem Cells*, **30**, 2271-2282.
- Tocharus, J., A. Tsuchiya, M. Kajikawa, Y. Ueta, C. Oka and M. Kawaichi, 2004: Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. *Dev. Growth Differ.*, **46**, 257-274.
- Tonikian, R., Y. Zhang, S. L. Sazinsky, B. Currell, J. H. Yeh, B. Reva, H. A. Held, B. A. Appleton, M. Evangelista, Y. Wu, X. Xin, A. C. Chan, S. Seshagiri, L. A. Lasky, C. Sander, C. Boone, G. D. Bader and S. S. Sidhu, 2008: A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol*, **6**, e239.
- Truebestein, L., A. Tennstaedt, T. Monig, T. Krojer, F. Canellas, M. Kaiser, T. Clausen and M. Ehrmann, 2011: Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 386-388.
- Tsai, L. H., I. Delalle, V. S. Caviness, Jr., T. Chae and E. Harlow, 1994: p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*, **371**, 419-423.
- Tsuchiya, A., M. Yano, J. Tocharus, H. Kojima, M. Fukumoto, M. Kawaichi and C. Oka, 2005: Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone*, **37**, 323-336.
- Vande Walle, L., M. Lamkanfi and P. Vandenabeele, 2008: The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.*, **15**, 453-460.
- Veeranna, T. Kaji, B. Boland, T. Odrliin, P. Mohan, B. S. Basavarajappa, C. Peterhoff, A. Cataldo, A. Rudnicki, N. Amin, B. S. Li, H. C. Pant, B. L. Hungund, O. Arancio and R. A. Nixon, 2004: Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, **165**, 795-805.
- Verzijl, N., J. DeGroot, S. R. Thorpe, R. A. Bank, J. N. Shaw, T. J. Lyons, J. W. J. Bijlsma, F. P. J. G. Lafeber, J. W. Baynes and J. M. TeKoppele, 2000: Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 39027-39031.
- von Bergen, M., P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, 2000: Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a

- local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 5129-5134.
- Vosler, P. S., C. S. Brennan and J. Chen, 2008: Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, **38**, 78-100.
- Wilhelmus, M. M., W. C. Boelens, I. Otte-Holler, B. Kamps, R. M. de Waal and M. M. Verbeek, 2006a: Small heat shock proteins inhibit amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta protein toxicity. *Brain Res*, **1089**, 67-78.
- Wilhelmus, M. M., W. C. Boelens, I. Otte-Holler, B. Kamps, B. Kusters, M. L. Maat-Schieman, R. M. de Waal and M. M. Verbeek, 2006b: Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta toxicity. *Acta Neuropathol*, **111**, 139-149.
- Wilhelmus, M. M., I. Otte-Holler, P. Wesseling, R. M. de Waal, W. C. Boelens and M. M. Verbeek, 2006c: Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer's disease brains. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **32**, 119-130.
- Wilken, C., K. Kitzing, R. Kurzbauer, M. Ehrmann and T. Clausen, 2004: Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell*, **117**, 483-494.
- Wilkins, M. R. and S. K. Kummerfeld, 2008: Sticking together? Falling apart? Exploring the dynamics of the interactome. *Trends Biochem Sci*, **33**, 195-200.
- Wilson, D. M. and L. I. Binder, 1997: Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, **150**, 2181-2195.
- Winklhofer, K. F. and C. Haass, 2010: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**, 29-44.
- Wolf, D. H. and W. Hilt, 2004: The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1695**, 19-31.
- Woo, M. G., K. Xue, J. Liu, H. McBride and B. K. Tsang, 2012: Calpain-mediated Processing of p53-associated Parkin-like Cytoplasmic Protein (PARC) Affects Chemosensitivity of Human Ovarian Cancer Cells by Promoting p53 Subcellular Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 3963-3975.

- Yoshimura, Y., T. Nomura and T. Yamauchi, 1996: Purification and characterization of active fragment of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II from the post-synaptic density in the rat forebrain. *J Biochem*, **119**, 268-273.
- Zaher, H. S. and R. Green, 2009: Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell*, **136**, 746-762.
- Zhao, H., R. Chang, H. Che, J. Wang, L. Yang, W. Fang, Y. Xia, N. Li, Q. Ma and X. Wang, 2013: Hyperphosphorylation of tau protein by calpain regulation in retina of Alzheimer's disease transgenic mouse. *Neurosci Lett*, **551**, 12-16.
- Zheng, Y. L., S. Kesavapany, M. Gravell, R. S. Hamilton, M. Schubert, N. Amin, W. Albers, P. Grant and H. C. Pant, 2005: A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *Embo J*, **24**, 209-220.
- Zimmerman, U. J., L. Boring, J. H. Pak, N. Mukerjee and K. K. Wang, 2000: The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB life*, **50**, 63-68.
- Zoncu, R., A. Efeyan and D. M. Sabatini, 2011: mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 21-35.
- Zumbrunn, J. and B. Trueb, 1996: Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett.*, **398**, 187-192.

8. Anhang

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse des Tau F3 und 4R Proteolyse sind in Tab. 8.1 und Tab. 8.2 dargestellt. Die Proteolyse und die massenspektrometrische Analyse erfolgten wie unter 2.3.13 und 2.3.19 beschrieben.

Tab. 8.1: Massenspektrometrische Analyse der Proteolyseprodukte von Tau 4R

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
76	89	TAPLVDEGAPGKQA	HTRA1 – 10 Minuten Inkubation
111	125	TPSLEDEAAGHVTA	
245	256	TAPVPMPLKLV	
257	266	KSKIGSTENL	
278	287	INKKLDLSNV	
279	287	NKKLDLSNV	
279	289	NKKLDLSNVQS	
292	308	GSKDNIKHVPGGGSVQI	
298	308	KHVPGGGSVQI	
309	318	VYKPVDLSKV	
309	322	VYKPVDLSKVTSKC	
310	322	YKPVDLSKVTSKC	
314	321	DLSKVTSK	
314	322	DLSKVTSKC	
351	360	QSKIGSLDNI	
393	402	VYKSPVVSVD	
393	403	VYKSPVVSVDL	
393	406	VYKSPVVSVDLSPR	
393	407	VYKSPVVSVDLSPRH	
393	408	VYKSPVVSVDLSPRHL	
393	410	VYKSPVVSVDLSPRHLSN	
393	411	VYKSPVVSVDLSPRHLSNV	
394	408	YKSPVVSVDLSPRHL	
399	408	VSGDLSPRHL	
399	411	VSGDLSPRHLSNV	
401	411	GDTSPRHLSNV	
409	418	SNVSSTGSID	
409	419	SNVSSTGSIDM	
409	420	SNVSSTGSIDMV	
409	421	SNVSSTGSIDMVD	
409	423	SNVSSTGSIDMVDSP	
409	424	SNVSSTGSIDMVDSPQ	
409	425	SNVSSTGSIDMVDSPQL	
409	426	SNVSSTGSIDMVDSPQLA	
412	423	SSTGSIDMVDSP	
412	424	SSTGSIDMVDSPQ	
412	426	SSTGSIDMVDSPQLA	

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch	
412	428	SSTGSIDMVDSPLATL		
415	426	GSIDMVDSPLA		
427	441	TLADEVASLAKQGL		
428	441	LADEVASLAKQGL		
429	441	ADEVASLAKQGL		
431	441	EVSASLAKQGL		
432	441	VSASLAKQGL		
433	441	SASLAKQGL		
65	75	DAKSTPTAEDV		HTRA1 – 30 Minuten Inkubation
76	88	TAPLVDEGAPGKQ		
102	125	TAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA		
102	128	TAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV		
107	125	GIGDTPSLEDEAAGHVTQA		
107	128	GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV		
111	125	TPSLEDEAAGHVTQA		
245	256	TAPVMPDLKNV		
279	287	NKKLDLSNV		
279	289	NKKLDLSNVQS		
279	291	NKKLDLSNVQSKC		
292	308	GSKDNIHVPGGGSVQI		
309	318	VYKPVDSLKV		
309	321	VYKPVDSLKVTSK		
309	322	VYKPVDSLKVTSKC		
310	322	YKPVDSLKVTSKC		
314	322	DLSKVTSKC		
351	360	QSKIGSLDNI		
393	403	VYKSPVVSAGDT		
393	408	VYKSPVVSAGDTSRHL		
393	410	VYKSPVVSAGDTSRHLNS		
393	411	VYKSPVVSAGDTSRHLNSV		
394	408	YKSPVVSAGDTSRHL		
399	408	VSGDTSRHL		
399	411	VSGDTSRHLNSV		
409	418	SNVSSTGSID		
409	419	SNVSSTGSIDM		
409	420	SNVSSTGSIDMV		
409	421	SNVSSTGSIDMVD		
409	423	SNVSSTGSIDMVDSP		
409	425	SNVSSTGSIDMVDSPL		
409	426	SNVSSTGSIDMVDSPLA		
409	428	SNVSSTGSIDMVDSPLATL		
409	432	SNVSSTGSIDMVDSPLATLADEV		
412	425	SSTGSIDMVDSPL		
412	426	SSTGSIDMVDSPLA		
412	428	SSTGSIDMVDSPLATL		

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
412	432	SSTGSIDMVDSPLATLADEV	
415	432	GSIDMVDSPLATLADEV	
421	441	DSPQLATLADEVASLAKQGL	
427	441	TLADEVASLAKQGL	
428	441	LADEVASLAKQGL	
429	441	ADEVASLAKQGL	
430	441	DEVASLAKQGL	
431	441	EVSASLAKQGL	
433	441	SASLAKQGL	
107	125	GIGDTPSLEDEAAGHVTQA	
107	128	GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV	
111	125	TPSLEDEAAGHVTQA	
227	237	AVVRTPPKSPS	
244	256	QTAPVMPDLKNV	
245	256	TAPVMPDLKNV	
256	266	VKSKIGSTENL	
279	287	NKKLDLSNV	
279	289	NKKLDLSNVQS	
279	291	NKKLDLSNVQSKC	
292	308	GSKDNIKHVPGGGSVQI	
309	321	VYKPVDSLKVTSK	
309	322	VYKPVDSLKVTSKC	
314	321	DLSKVTSK	
314	322	DLSKVTSKC	
350	360	VQSKIGSLDNI	
393	403	VYKSPVVS GDT	
393	404	VYKSPVVS GDT S	
393	406	VYKSPVVS GDT SPR	
393	408	VYKSPVVS GDT SPRHL	
393	411	VYKSPVVS GDT SPRHLSNV	
399	408	VSGDTSPRHL	
399	411	VSGDTSPRHLSNV	
409	418	SNVSSTGSID	
409	419	SNVSSTGSIDM	
409	420	SNVSSTGSIDMV	
409	421	SNVSSTGSIDMVD	
409	423	SNVSSTGSIDMVDSPL	
409	424	SNVSSTGSIDMVDSPLQ	
409	425	SNVSSTGSIDMVDSPLQL	
412	420	SSTGSIDMV	
412	424	SSTGSIDMVDSPLQ	
412	425	SSTGSIDMVDSPLQL	
412	426	SSTGSIDMVDSPLQLA	
412	428	SSTGSIDMVDSPLATL	
415	428	GSIDMVDSPLATL	

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch	
421	432	DSPQLATLADEV		
426	441	ATLADEVSASLAKQGL		
427	441	TLADEVSASLAKQGL		
428	441	LADEVSASLAKQGL		
429	441	ADEVSASLAKQGL		
430	441	DEVASLAKQGL		
431	441	EVSASLAKQGL		
433	441	SASLAKQGL		
434	441	ASLAKQGL		
2	12	AEPRQEFEVME		Calpain 2 – 10 Minuten Inkubation
2	14	AEPRQEFEVMEDH		
77	89	APLVDEGAPGKQA		
77	90	APLVDEGAPGKQAA		
110	123	DTPSLEDEAAGHVT		
111	123	TPSLEDEAAGHVT		
116	129	DEAAGHVTQARMVS		
164	173	GQANATRIPA		
278	288	INKKLDLSNVQ		
352	360	SKIGSLDNI		
392	403	IVYKSPVVS GDT		
393	403	VYKSPVVS GDT		
394	403	YKSPVVS GDT		
399	411	VSGDTSRHL SNV		
429	441	ADEVSASLAKQGL		
431	441	EVSASLAKQGL		
432	441	VSASLAKQGL		
433	441	SASLAKQGL		
434	441	ASLAKQGL		
2	12	AEPRQEFEVME	Calpain 2 – 30 Minuten Inkubation	
2	18	AEPRQEFEVMEDHAGTY		
2	19	AEPRQEFEVMEDHAGTYG		
2	21	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLG		
90	124	AAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ		
91	123	AQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT		
91	124	AQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ		
96	124	EIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ		
101	123	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT		
101	129	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS		
109	123	GDTPSLEDEAAGHVT		
109	124	GDTPSLEDEAAGHVTQ		
110	123	DTPSLEDEAAGHVT		
111	123	TPSLEDEAAGHVT		
111	124	TPSLEDEAAGHVTQ		
113	124	SLEDEAAGHVTQ		
231	244	TPPKSPSSAKSRLQ		

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch	
231	245	TPPKSPSSAKSRLQT		
235	244	SPSSAKSRLQ		
235	245	SPSSAKSRLQT		
255	267	NVSKIGSTENLK		
257	267	KSKIGSTENLK		
279	288	NKKLDLSNVQ		
281	290	KLDLSNVQSK		
314	326	DLSKVTSKCGSLG		
315	326	LSKVTSKCGSLG		
341	351	SEKLDFKDRVQ		
352	359	SKIGSLDN		
352	360	SKIGSLDNI		
383	403	KAKTDHGAEIVYKSPVVGDT		
384	403	AKTDHGAEIVYKSPVVGDT		
386	403	TDHGAEIVYKSPVVGDT		
390	403	AEIVYKSPVVGDT		
393	403	VYKSPVVGDT		
394	403	YKSPVVGDT		
395	403	KSPVVGDT		
401	426	GDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLA		
404	418	SPRHLSNVSSTGSID		
404	421	SPRHLSNVSSTGSIDMVD		
404	424	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQ		
404	425	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQL		
404	426	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLA		
404	433	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV		
410	426	NVSSTGSIDMVDSPQLA		
413	426	STGSIDMVDSPQLA		
413	433	STGSIDMVDSPQLATLADEV		
426	441	ATLADEVASLAKQGL		
427	441	TLADEVASLAKQGL		
429	441	ADEVASLAKQGL		
433	441	SASLAKQGL		
434	441	ASLAKQGL		
2	12	AEPRQEFVME		Calpain 2 – 120 Minuten Inkubation
2	16	AEPRQEFVMEHDHAG		
2	18	AEPRQEFVMEHDHAGTY		
2	19	AEPRQEFVMEHDHAGTYG		
106	123	AGIGDTPSLEDEAAGHVT		
106	124	AGIGDTPSLEDEAAGHVTQ		
109	123	GDTPSLEDEAAGHVT		
109	124	GDTPSLEDEAAGHVTQ		
110	124	DTPSLEDEAAGHVTQ		
111	123	TPSLEDEAAGHVT		
111	124	TPSLEDEAAGHVTQ		

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch	
115	124	EDEAAGHVTVQ		
231	244	TPPKSPSSAKSRLQ		
235	244	SPSSAKSRLQ		
235	245	SPSSAKSRLQT		
255	264	NVSKKIGSTE		
255	267	NVSKKIGSTENLK		
257	267	KSKKIGSTENLK		
278	288	INKKLDLSNVQ		
305	314	SVQIVYKQVD		
314	326	DLSKVTSKCGSLG		
315	326	LSKVTSKCGSLG		
341	348	SEKLDFKD		
341	351	SEKLDFKDRVQ		
352	358	SKIGSLD		
352	359	SKIGSLDN		
352	360	SKIGSLDNI		
352	361	SKIGSLDNIT		
384	403	AKTDHGAEIVYKSPVVGDT		
386	403	TDHGAEIVYKSPVVGDT		
390	403	AEIVYKSPVVGDT		
391	403	EIVYKSPVVGDT		
392	403	IVYKSPVVGDT		
393	403	VYKSPVVGDT		
394	403	YKSPVVGDT		
395	403	KSPVVGDT		
401	426	GDTSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQLA		
404	419	SPRHLSNVSTGSIDM		
404	424	SPRHLSNVSTGSIDMVDSPQ		
404	425	SPRHLSNVSTGSIDMVDSPQL		
404	426	SPRHLSNVSTGSIDMVDSPQLA		
410	426	NVSTGSIDMVDSPQLA		
413	433	STGSIDMVDSPQLATLADEV		
427	438	TLADEV		
427	441	TLADEV		
429	441	ADEV		
431	441	EV		
433	441	S		
434	441	AS		
393	408	VYKSPVVGDTSPRHL		HTRA1 – Calpain 2 Komplex – 10 Minuten Inkubation
429	441	ADEV		
433	441	S		
434	441	AS		
64	75	SDAKSTPTAEDV	HTRA1 – Calpain 2 Komplex – 30 Minuten Inkubation	
65	75	DAKSTPTAEDV		
67	75	KSTPTAEDV		

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
76	88	TAPLVDEGAPGKQ	
76	89	TAPLVDEGAPGKQA	
76	90	TAPLVDEGAPGKQAA	
76	92	TAPLVDEGAPGKQAAAQ	
76	106	TAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIPEGTTAEEA	
80	89	VDEGAPGKQA	
90	106	AAQPHTIPEGTTAEEA	
102	125	TAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA	
102	128	TAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV	
107	122	GIGDTPSLEDEAAGHV	
107	123	GIGDTPSLEDEAAGHVT	
107	125	GIGDTPSLEDEAAGHVTQA	
107	128	GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV	
245	256	TAPVPMPLKNV	
278	287	INKKLDLSNV	
393	402	VYKSPVSGD	
393	403	VYKSPVSGDT	
393	408	VYKSPVSGDTSRHL	
393	411	VYKSPVSGDTSRHLNSV	
394	408	YKSPVSGDTSRHL	
399	408	VSGDTSRHL	
399	411	VSGDTSRHLNSV	
409	419	SNVSSTGSIDM	
409	420	SNVSSTGSIDMV	
409	421	SNVSSTGSIDMVD	
409	425	SNVSSTGSIDMVDSPQL	
409	432	SNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV	
412	425	SSTGSIDMVDSPQL	
412	426	SSTGSIDMVDSPQLA	
412	432	SSTGSIDMVDSPQLATLADEV	
415	426	GSIDMVDSPQLA	
415	432	GSIDMVDSPQLATLADEV	
420	432	VDSPQLATLADEV	
421	432	DSPQLATLADEV	
421	441	DSPQLATLADEVASLAKQGL	
426	441	ATLADEVASLAKQGL	
427	441	TLADEVASLAKQGL	
428	441	LADEVASLAKQGL	
429	441	ADEVASLAKQGL	
430	441	DEVASLAKQGL	
431	441	EVSASLAKQGL	
432	441	VSASLAKQGL	
433	441	SASLAKQGL	
2	11	AEPRQEFVEM	HTRA1 – Calpain 2 Komplex – 120 Minuten Inkubation
2	12	AEPRQEFVME	

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
2	14	AEPRQFEFVMDH	
2	15	AEPRQFEFVMDHA	
2	16	AEPRQFEFVMDHAG	
2	18	AEPRQFEFVMDHAGTY	
2	19	AEPRQFEFVMDHAGTYG	
2	21	AEPRQFEFVMDHAGTYGLG	
4	19	PRQFEFVMDHAGTYG	
76	89	TAPLVDEGAPGKQA	
76	94	TAPLVDEGAPGKQAAAQPH	
77	90	APLVDEGAPGKQAA	
77	94	APLVDEGAPGKQAAAQPH	
80	124	VDEGAPGKQAAAQPHTPEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
82	94	EGAPGKQAAAQPH	
82	123	EGAPGKQAAAQPHTPEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
82	124	EGAPGKQAAAQPHTPEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
89	123	AAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
90	100	AAQPHTEIPEG	
90	123	AAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
90	125	AAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA	
90	126	AAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQAR	
91	123	AQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
91	124	AQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
91	129	AQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	
95	123	TEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
95	124	TEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
95	129	TEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	
96	123	EIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
96	124	EIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
96	129	EIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	
101	123	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
101	124	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
101	125	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA	
101	126	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQAR	
101	128	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV	
101	129	TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	
102	129	TAAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	
103	124	AAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
104	123	EEAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
105	123	EAGIGDTPSLEDEAAGHVT	
105	124	EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
106	124	AGIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
107	123	GIGDTPSLEDEAAGHVT	
107	124	GIGDTPSLEDEAAGHVTQ	
107	128	GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMV	
107	129	GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
108	123	IGDTPSLEDEAAGHVT	
108	124	IGDTPSLEDEAAGHVTQ	
109	123	GDTPSLEDEAAGHVT	
109	124	GDTPSLEDEAAGHVTQ	
109	129	GDTPSLEDEAAGHVTQARMVS	
110	123	DTPSLEDEAAGHVT	
110	124	DTPSLEDEAAGHVTQ	
111	123	TPSLEDEAAGHVT	
111	124	TPSLEDEAAGHVTQ	
113	124	SLEDEAAGHVTQ	
114	123	LEDEAAGHVT	
114	124	LEDEAAGHVTQ	
156	168	GAAPPGQKQANA	
157	168	AAPPGQKQANA	
164	180	GQANATRIPAKTPPAPK	
227	234	AVVRTPPK	
227	244	AVVRTPPKSPSSAKSRLQ	
229	244	VRTPPKSPSSAKSRLQ	
229	245	VRTPPKSPSSAKSRLQT	
230	244	RTPPKSPSSAKSRLQ	
231	244	TPPKSPSSAKSRLQ	
231	245	TPPKSPSSAKSRLQT	
235	244	SPSSAKSRLQ	
235	246	SPSSAKSRLQTA	
235	254	SPSSAKSRLQTAPVMPDLK	
235	256	SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNV	
245	256	TAPVMPDLKNV	
246	256	APVMPDLKNV	
246	264	APVMPDLKNVKSIGSTE	
255	264	NVKSIGSTE	
255	265	NVKSIGSTEN	
255	266	NVKSIGSTENL	
255	267	NVKSIGSTENLK	
257	267	KSIGSTENLK	
258	267	SKIGSTENLK	
278	288	INKKLDLSNVQ	
278	290	INKKLDLSNVQSK	
279	288	NKKLDLSNVQ	
279	290	NKKLDLSNVQSK	
280	288	KKLDLSNVQ	
299	308	HVPGGGSVQI	
309	318	VYKPVDLSKV	
309	319	VYKPVDLSKVT	
309	321	VYKPVDLSKVTSK	
311	319	KPVDLSKVT	

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
314	326	DLSKVTSKCGSLG	
315	326	LSKVTSKCGSLG	
327	340	NIHHKPGGGQVEVK	
341	346	SEKLDF	
341	348	SEKLDFKD	
341	349	SEKLDFKDR	
341	351	SEKLDFKDRVQ	
341	352	SEKLDFKDRVQS	
341	353	SEKLDFKDRVQSK	
350	360	VQSKIGSLDNI	
352	358	SKIGSLD	
352	359	SKIGSLDN	
352	360	SKIGSLDNI	
352	361	SKIGSLDNIT	
352	362	SKIGSLDNITH	
360	372	ITHVPGGGNKKIE	
377	392	TFRENAKAKTDHGAEI	
379	392	RENAKAKTDHGAEI	
379	403	RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS	
382	403	AKAKTDHGAEIVYKSPVVS	
383	394	KAKTDHGAEIVY	
383	403	KAKTDHGAEIVYKSPVVS	
384	403	AKTDHGAEIVYKSPVVS	
386	400	TDHGAEIVYKSPVVS	
386	403	TDHGAEIVYKSPVVS	
389	403	GAEIVYKSPVVS	
390	403	AEIVYKSPVVS	
391	403	EIVYKSPVVS	
392	403	IVYKSPVVS	
393	402	VYKSPVVS	
393	403	VYKSPVVS	
393	408	VYKSPVVS	
393	411	VYKSPVVS	
393	412	VYKSPVVS	
394	403	YKSPVVS	
394	408	YKSPVVS	
395	403	KSPVVS	
395	408	KSPVVS	
399	408	VSGDTS	
399	411	VSGDTS	
399	412	VSGDTS	
400	411	SGDTS	
401	421	GDTSPRHLSNV	
401	426	GDTSPRHLSNV	
404	413	SPRHLSNV	

8. Anhang

Position in der Sequenz		Peptid	Verdaut durch
404	415	SPRHLSNVSSTG	
404	418	SPRHLSNVSSTGSID	
404	419	SPRHLSNVSSTGSIDM	
404	421	SPRHLSNVSSTGSIDMVD	
404	425	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQL	
404	426	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLA	
404	428	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATL	
404	433	SPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVS	
409	419	SNVSSTGSIDM	
409	420	SNVSSTGSIDMV	
409	421	SNVSSTGSIDMVD	
409	425	SNVSSTGSIDMVDSPQL	
409	426	SNVSSTGSIDMVDSPQLA	
409	433	SNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVS	
410	426	NVSSTGSIDMVDSPQLA	
412	425	SSTGSIDMVDSPQL	
412	426	SSTGSIDMVDSPQLA	
412	428	SSTGSIDMVDSPQLATL	
413	426	STGSIDMVDSPQLA	
413	433	STGSIDMVDSPQLATLADEVS	
415	426	GSIDMVDSPQLA	
415	433	GSIDMVDSPQLATLADEVS	
416	433	SIDMVDSPQLATLADEVS	
422	433	SPQLATLADEVS	
427	438	TLADEVSASLAK	
427	441	TLADEVSASLAKQGL	
429	441	ADEVASLAKQGL	
430	441	DEVASLAKQGL	
433	441	SASLAKQGL	
434	441	ASLAKQGL	

Tab. 8.2: Massenspektrometrische Analyse der Proteolyseprodukte von Tau F3

Position in der Sequenz	Peptid	Verdaut durch	Position in der Sequenz
2	11	ASKIGSTENL	HTRA1 – 10 Minuten Inkubation
2	12	ASKIGSTENLK	
25	32	KLDLSNVQ	
49	58	SVQIVYKPVD	
50	58	VQIVYKPVD	
55	63	KPVDLSKVT	
85	90	SEKLDLF	
85	92	SEKLDLFDK	
85	95	SEKLDLFDKDRVQ	
93	104	RVQSKIGSLDNI	
94	104	VQSKIGSLDNI	

8. Anhang

Position in der Sequenz	Peptid	Verdaut durch	Position in der Sequenz	
96	102	SKIGSLD		
96	103	SKIGSLDN		
96	104	SKIGSLDNI		
97	104	KIGSLDNI		
2	11	ASKIGSTENL	HTRA1 – 30 Minuten Inkubation	
2	12	ASKIGSTENLK		
3	11	SKIGSTENL		
23	31	INKLDLSNV		
53	65	VYKPVDLSKVTSK		
53	66	VYKPVDLSKVTSKC		
94	104	VQSKIGSLDNI		
95	104	QSKIGSLDNI		
2	11	ASKIGSTENL		HTRA1 – 120 Minuten Inkubation
2	14	ASKIGSTENLKHQ		
3	11	SKIGSTENL		
4	11	KIGSTENL		
21	31	QIINKLDLSNV		
22	31	IINKLDLSNV		
23	31	INKLDLSNV		
23	33	INKLDLSNVQS		
24	31	NKLDLSNV		
24	33	NKLDLSNVQS		
25	31	KLDLSNV		
53	62	VYKPVDLSKV		
77	88	GGGQVEVKSEKL		
78	88	GGQVEVKSEKL		
79	88	GQVEVKSEKL		
92	104	DRVQSKIGSLDNI		
93	104	RVQSKIGSLDNI		
94	104	VQSKIGSLDNI		
95	101	QSKIGSL		
95	104	QSKIGSLDNI		
97	104	KIGSLDNI		
2	11	ASKIGSTENL	Calpain 2 – 10 Minuten Inkubation	
2	12	ASKIGSTENLK		
49	58	SVQIVYKPVD		
94	104	VQSKIGSLDNI		
95	104	QSKIGSLDNI		
96	102	SKIGSLD		
96	103	SKIGSLDN		
96	104	SKIGSLDNI		
97	104	KIGSLDNI		
2	11	ASKIGSTENL	Calpain 2 – 30 Minuten Inkubation	
2	12	ASKIGSTENLK		
49	58	SVQIVYKPVD		

8. Anhang

Position in der Sequenz	Peptid	Verdaut durch	Position in der Sequenz
55	63	KPVDLSKVT	
85	90	SEKLDF	
85	92	SEKLDFKD	
94	104	VQSKIGSLDNI	
95	104	QSKIGSLDNI	
96	102	SKIGSLD	
96	103	SKIGSLDN	
96	104	SKIGSLDNI	
97	104	KIGSLDNI	
2	11	ASKIGSTENL	
2	12	ASKIGSTENLK	
59	70	LSKVTSKCGSLG	
85	90	SEKLDF	
85	92	SEKLDFKD	
94	104	VQSKIGSLDNI	
96	102	SKIGSLD	
96	103	SKIGSLDN	
96	104	SKIGSLDNI	
97	104	KIGSLDNI	
2	14	ASKIGSTENLKHQ	HTRA1 - Calpain 2 Komplex – 10 Minuten Inkubation
3	11	SKIGSTENL	
23	31	INKLDLSNV	
53	62	VYKPVDLSKV	
93	104	RVQSKIGSLDNI	
94	104	VQSKIGSLDNI	
96	104	SKIGSLDNI	
258	266	SKIGSTENL	HTRA1 - Calpain 2 Komplex – 30 Minuten Inkubation
351	360	QSKIGSLDNI	
352	360	SKIGSLDNI	
2	11	ASKIGSTENL	HTRA1 - Calpain 2 Komplex – 120 Minuten Inkubation
2	14	ASKIGSTENLKHQ	
3	11	SKIGSTENL	
94	104	VQSKIGSLDNI	
96	104	SKIGSLDNI	

9. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. Michael Ehrmann. Danke, dass ich in deiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchführen konnte. Vielen Dank für all die Freiheiten so vieles im Labor ausprobieren zu können. In meiner Zeit als Doktorandin habe eine Menge Neues lernen können. Danke, dass du es mir ermöglicht hast im letzten Jahr an der FASEB Calpain Konferenz teilzunehmen. Die Erfahrung hat mich wirklich weiter gebracht!

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Markus Kaiser für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Des Weiteren geht mein Dank Andreas Sprengel für die AFM Aufnahmen und Dr. Farnusch Kaschani für die massenspektrometrischen Analysen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Stefan Raunser, FU Berlin, MPI Dortmund, für die freundliche Kooperation. Danke auch an Daniel Prumbaum für die EM Aufnahmen vom Komplex.

Des Weiteren geht mein Dank an Alexander Wolf vom LDC in Dortmund. Der Alpha Screen hat zwar bei mir nicht funktioniert, dafür habe ich trotzdem noch zufällig den perfekten Puffer mit den Proben vom Alpha Screen gefunden.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Lutz Schmitt und Dr. André Abts vom Institut für Biochemie I der HHU Düsseldorf für die MALS-SEC Analysen und verzweifelte Versuche doch noch ITC oder SPR Analysen hinzu bekommen.

Liebe AG Ehrmann es war ein Träumchen (ganz aktuell wären das Melisa, Jasmin, Helmut, Adam, Vanda, Michael, Yvonne, Juliana, Jens, Kathi, Kamilla, Simon, Svenja und Mina), danke für die nette Arbeitsatmosphäre. Ohne die hätte ich bestimmt nicht vier lange Jahre durchgehalten. Zuallererst möchte ich Svenja danken. Ohne dich wären wir bestimmt schon alle im Chaos versunken. Danke, dass du immer die Ruhe selbst bleibst auch wenn ich zum gefühlt 80 Mio. Mal frage wie ich noch gleich eine Dienstreise beantrage... sorry ☺. Ein riesengroßes Dankeschön geht auch an Mina. Was würden wir bloß ohne dich machen? Die Spülkörbe quellen in deinem Urlaub regelmäßig über... und ohne dreimalige Begrüßung am Morgen wache ich einfach nicht mehr auf. Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an Juliane (auch wenn du einfach so die Arbeitsgruppe gewechselt hast) für Kaffeepausen, Auto- oder Bahn-Fahrten zwischen Essen und Düsseldorf, Drei Fragzeichen Events und vieles mehr! Ohne dich hätte ich die Zeit ganz bestimmt nicht so gut überstanden. Danke für dein offenes Ohr und ich verspreche ab jetzt weniger zu jammern. Michael und Juliane danke ich außerdem für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich hoffe, dass ich euch nicht zu sehr genervt habe. Meinem, mittlerweile, Zweitbüro (Vanda die „coole Mama“, Michael, Yvonne, Juliana und Jens) danke ich für die nette Atmosphäre. Schön, dass ihr mich aufgenommen habt, als

9. Danksagung

ich keine Lust mehr hatte so viele Treppen zu laufen und die Gelegenheit genutzt habe. Vielen Dank Melisa für deine tatkräftige Hilfe an der Äkta... und gelegentliche „please don't cry“ Aufmunterungen wenn ich etwas deprimiert war. Helmuuuuuut! Unser Weihnachtsdekofan, dir danke ich natürlich auch für deine Unterstützung mit den Tücken der Äkta und der Biorad Anlage und überhaupt und sowieso! Nächstes Jahr wieder Karneval feiern und wann grillen wir eigentlich wieder? Für unzählige Gele und Hilfe bei der French Press (dafür bin ich einfach zu schwach und zu klein) danke ich Adam. Simon, vielen Dank für all die Proteintauschgeschäfte von Tau und HTRA1 und für die gemeinsame Arbeit an den SH-SY5Y Zellen. Jasmin, meine allererste Praktikantin. Ich glaub ich hab dich ganz gut in unserem Labor angelernt und wenn wir jetzt noch regelmäßig üben Nein zu sagen, wird alles super laufen. Kathi, vielen Dank, dass du mich immer wieder mit neuen HeLa Zellen versorgt hast, wenn mir mal wieder spontan eine Idee kam.

Ein paar meiner Freunde mussten auch sehr ausdauernd sein, um diese Zeit mit mir zu überstehen. Danke Christina, wir haben uns gegenseitig die Ohren voll gejammert und am Ende haben wir es doch beide geschafft! Danke für deine jahrzehntelange Freundschaft und ich glaube da folgen noch ein paar! Das super vierer Team möchte ich natürlich auch erwähnen: Nadja, Judit und Marian. Es ist immer wieder schön, dass wir unsere Treffen in der einen oder anderen Konstellation bewahrt haben. Die Wege werden zwar immer länger, aber das schaffen wir. Auch wenn ich dafür bis nach Indonesien reisen muss liebe Judit! Danke Nina, dass ich immer anrufen kann wenn ich jemanden zum Quatschen brauche. Ich glaube ganz fest daran, dass du bald wieder fit bist! Anne, Andrea und Benni: Die spontanen Hochzeiten sind doch die schönsten ☺ Danke Mädels für viele schöne Abende. Mein Dank gilt natürlich auch allen anderen, wie der Düsseldorfer Dinner-/Doppelkopfcrowd und all denen ich jetzt in meinem Danksagungsflow vergessen habe!

Danken möchte ich auch meiner Familie, auch wenn ihr, so glaube ich, nicht immer so ganz verstanden habt, was ich eigentlich den ganzen Tag so mache. Jedenfalls bin ich damit jetzt fertig! ☺ Vielen dank an Mama, Papa und Ellen, dass ihr mich immer unterstützt habt auch wenn die letzten Jahre, vor allem die letzten des Studiums, doch etwas chaotisch waren.

Der allergrößte Dank von allen geht natürlich an André! Danke, dass du immer für mich da bist und alles mit mir ertragen hast. Egal ob ich himmelhochjauchzend, weil irgendwas tatsächlich funktioniert hat oder zutiefst betrübt oder doch noch unendlich genervt nach Hause komme... Jetzt haben wir es endlich geschafft! Ich freu mich so auf all das, was noch vor uns liegt.

10. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung der Interaktion von HTRA1 und Calpain 2“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Maike Breiden befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.