



Doctoral Thesis

A study of biomolecules that influence α -cleavage of APP in a cell culture model

Author(s):

Murri-Plesko, Samuel

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007587040> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 20297

A study of biomolecules that influence α -cleavage of APP in a cell culture model

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH

for the degree of
Doktor der Wissenschaften

presented by
SAMUEL MURRI-PLESKO

Diplom als Naturwissenschaftler
from K niz BE
born March 13, 1980

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Heidi Wunderli-Allenspach, examiner
PD Dr. Stefanie Kr mer, co-examiner
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner
Prof. Dr. Hans-Peter Landolt, co-examiner

Z rich, 2012

Abstract

The Alzheimer's disease (AD) hallmark peptide A β is generated after β -cleavage of its precursor protein APP and its production is precluded by α -cleavage. Hence, measuring the concentrations of the soluble cleavage products sAPP α and sAPP β produced after α - or β -cleavage, respectively, indicates changes in APP cleavage. Previous reports suggested biomolecules such as fatty acids and cortisol to influence APP cleavage. We aimed at verifying those findings in a cell culture model.

Growth medium of SH-SY5Y cells was supplemented with sera from different species origin (human, bovine or equine), saturated and unsaturated fatty acids, i.e. *trans*-vaccenic acid (VA), elaidic acid (EA), docosahexaenoic acid (DHA) and stearic acid (SA) or hormones and growth factors (cortisol and retinoic acid). The concentrations of the APP cleavage products sAPP α and sAPP β were measured by ELISA and compared to concentration of samples from not supplemented cells. APP, ADAM10 (the major α -secretase) and BACE1 (β -secretase) levels were estimated by Westernblot analysis.

Providing cells with fatty acids, VA and DHA, respectively, led to an increased concentration of sAPP α , while SA supplementation decreased the concentration of sAPP α . However, the cleavage ratio remained unaffected for all fatty acids. We found a clear effect of serum origin on the sAPP α /sAPP β ratio: human or equine serum significantly increased this ratio compared to foetal calf serum. Moreover, heat-inactivation of foetal calf serum significantly reduced sAPP α concentration and the sAPP α /sAPP β ratio, while inactivation of human serum had the opposite effect. Experiments with dialysed sera showed that at least one of the factors responsible for the different effects of serum origins on sAPP levels had a molecular weight of more than 12 kDa.

Therefore, this factor might be a protein differing in its expression levels in the three investigated sera. Identification of this factor could help elucidating the control mechanism for APP cleavage. The effects seen for cortisol supplementation ranged from clearly increasing to slightly decreasing ratios with high inter-experimental variations.

Developing new drugs against AD, tight junctions need to be considered, as they represent the molecular basis for the barrier effect in epithelia preventing e.g. the targeting of drug molecules with high molecular weight that are not able to partition through cell membranes to the brain. Proteins of the claudin family were shown to play a pivotal role in establishing a tight barrier at cell junctions with claudin-1 being the most common and providing the tightest junctions. We aimed at setting up an assay to test the strength of the interaction between extracellular loop domains of claudin. This test would allow screening for molecules able to reversibly open tight junctions, opening new strategies to target hydrophilic molecules or macromolecules to the brain. We aimed at generating the extracellular loop domain of claudin-1 by purification from mammalian cell culture, by solid phase peptide synthesis or by cloning and expression in bacteria. However, none of the strategies led to successful generation of the desired loop domain.

Zusammenfassung

A β ist ein Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit. Das Peptid entsteht nach β -Spaltung seines Vorläuferproteins APP. Vorgängige α -Spaltung verhindert seine Bildung. Die löslichen Spaltprodukte sAPP α und sAPP β können gemessen werden und geben einen Hinweis auf Änderungen in der APP-Spaltung. Gemäss früheren Studien beeinflussen Biomoleküle wie Fettsäuren und Cortisol die APP-Spaltung.

Das Wachstumsmedium von SH-SY5Y-Zellen wurde mit Serum von unterschiedlichen Spezies (Mensch, Rind oder Pferd), mit den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren *trans*-Vaccensäure (VA), Elaidinsäure (EA), Docosahexaensäure (DHA) und Stearinsäure (SA) oder mit Hormonen und Wachstumsfaktoren (Cortisol und Retinsäure) ergänzt. Die Konzentration der APP Spaltprodukte sAPP α und sAPP β wurden mit ELISA gemessen. Die Ergebnisse wurden mit Proben von Zellen verglichen, welche normales, nicht ergänztes Medium erhalten hatten. Die Expression von APP, ADAM10 (der wichtigsten α -Sekretase) und BACE1 (β -Sekretase) wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft.

Wenn Zellmedium mit Fettsäuren angereichert wurde, führte dies bei VA und DHA jeweils zu einer erhöhten Konzentration von sAPP α , während die Konzentration von sAPP α bei SA abnahm. Das sAPP α /sAPP β Verhältnis blieb jedoch für alle Fettsäuren unbeeinflusst. Wir fanden einen deutliche Einfluss von unterschiedlichen Seren auf das sAPP α /sAPP β Verhältnis: Menschen- oder Pferdeserum erhöhten dieses Verhältnis signifikant im Vergleich zu fötalem Kälberserum. Hitzeinaktivierung von fötalem Kälberserum führte ausserdem zu signifikant reduzierter sAPP α Konzentration und einem signifikant reduzierten sAPP α /sAPP β Verhältnis,

während Inaktivierung von humanem Serum das Gegenteil bewirkte. Experimente mit dialysiertem Serum zeigten, dass mindestens einer der Faktoren, welcher für die unterschiedlichen Auswirkungen der untersuchten Seren auf die sAPP-Konzentrationen verantwortlich ist, ein Molekulargewicht von mehr als 12 kDa haben muss. Daher könnte dieser Faktor ein Protein sein, welches in den drei untersuchten Seren unterschiedlich stark exprimiert wird. Die Identifizierung dieses Faktors könnte bei der Aufklärung der Kontrollmechanismen für die APP-Spaltung hilfreich sein. Die Behandlung mit Cortisol führte zu stark schwankenden Ergebnissen, welche von deutlich steigenden bis zu leicht abnehmenden Verhältnissen reichten.

Bei der Entwicklung neuer Medikamente gegen AD müssen insbesondere die sogenannten „Tight-Junctions“ berücksichtigt werden, welche die molekulare Grundlage für die Barrierenwirkung von Epithelien darstellen und so z.B. das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke von Wirkstoffmolekülen mit hohem Molekulargewicht verhindern. Es wurde gezeigt, dass Proteine der Claudin Familie eine zentrale Rolle bei der Schaffung einer dichten Barriere bei Zellverbindungen spielen. Dabei ist Claudin-1 der häufigste Vertreter, welcher zudem zu den dichtesten Verbindungen führt. Unser Ziel war die Etablierung eines Tests, um die Stärke der Wechselwirkung zwischen den extrazellulären Loop-Domänen von Claudin zu testen. Dieser Test würde ein Screening von Molekülen ermöglichen, welche Tight Junctions reversibel öffnen können. Damit wäre die Grundlage zu neuen Strategien gelegt, welche zum Ziel haben, hydrophile Moleküle oder Makromolekülen in das Gehirn zu bringen. Unser Ziel war die Herstellung der extrazellulären Loop-Domäne von Claudin-1 durch Aufreinigung aus Zellkultur, durch Festphasenpeptidsynthese oder Klonierung und Expression in Bakterien. Mit keiner dieser Strategien gelang es jedoch, die gewünschte Loop-Domäne herzustellen.