

**Aktivitätserhöhung der α -Sekretasen ADAM10 und TACE bei der
Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie der
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
in Mainz

ANDREAS ANDERS

geboren in Bad Homburg vor der Höhe

Mainz 2001

Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 12.11.2001

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	NEUROCHEMIE DER ALZHEIMER-DEMENZ	3
2.1.1	Die zentrale Rolle des β -Amyloidpeptids.....	4
2.1.2	Die Konkurrenz zwischen der α - und der β -Sekretase	7
2.1.2.1	Disintegrin-Metalloproteinasen.....	8
2.1.2.2	Die α -Sekretase TACE	11
2.1.2.3	Die α -Sekretase ADAM10.....	14
2.1.2.4	Die β -Sekretase BACE	15
2.2	DIE FAMILIE DER PROPROTEIN-KONVERTASEN	17
2.2.1	Die Proprotein-Konvertase Furin.....	20
2.2.2	Die Proprotein-Konvertase PC7.....	21
2.2.3	Die Substratspezifität der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin.....	22
2.3	ZIELSETZUNG	24
3	MATERIALIEN	27
3.1	CHEMIKALIEN UND HILFSMITTEL	27
3.1.1	Allgemeine Laborchemikalien	27
3.1.2	Enzyme und Kitsysteme	29
3.1.3	Antikörper	29
3.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	30
3.2	MATERIALIEN	30
3.2.1	Laborgeräte	30
3.2.2	Materialien für die Molekular- und Zellbiologie	32
3.2.2.1	Plasmide.....	32
3.2.2.2	Oligonukleotide	33
3.2.2.3	Bakterienstämme.....	33
3.2.2.4	Zell-Linien	34
3.3	STAMMLÖSUNGEN, PUFFER UND ZELLKULTURMEDIEN	34
4	METHODEN	41
4.1	ARBEITEN MIT <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
4.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	41
4.1.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	41
4.1.3	Transformation von <i>E. coli</i>	41
4.1.4	Lagerung von <i>E. coli</i>	42
4.2	ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	42
4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
4.2.1.1	Plasmidschnellpräparation zur Analyse von <i>E. coli</i> -Transformanden	42
4.2.1.2	Plasmidpräparation unter Verwendung von Silicagelmatrix-Säulen.....	43
4.2.1.3	Plasmidgroßpräparation.....	43
4.2.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	44
4.2.3	Reinigung und Fällung von Nukleinsäuren.....	44

4.2.3.1	PCI-Extraktion	44
4.2.3.2	Fällung von DNA durch Alkohole	45
4.2.3.3	Fällung von DNA durch Polyethylenglykol	46
4.2.3.4	Reinigung von PCR-Amplifikaten	46
4.2.4	Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nucleinsäuren	46
4.2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	46
4.2.4.2	Isolierung von Nucleinsäuren aus Agarosegelen	47
4.2.5	Enzymatische Modifikation von Nucleinsäuren.....	47
4.2.5.1	Restriktionshydrolyse von Nucleinsäuren	47
4.2.5.2	Modifizierung von DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase	48
4.2.5.3	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden.....	48
4.2.5.4	Phosphorylierung der 5'-Enden von PCR-Produkten	48
4.2.5.5	Ligation von DNA-Molekülen	49
4.2.6	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
4.2.6.1	PCR-Mutagenese.....	50
4.3	ARBEITEN MIT EUKARYONTISCHEN ZELLEN.....	50
4.3.1	Kultivierung und Konservierung von Zellen.....	50
4.3.1.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	50
4.3.1.2	Passagieren von Zellen	50
4.3.1.3	Kryokonservierung	51
4.3.2	Zellzahlbestimmung	51
4.3.3	Transfektion adhärenter Zellen.....	52
4.3.4	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin.....	53
4.4	BIOTINYLIERUNG VON ZELLOBERFLÄCHENPROTEINEN	53
4.5	DEGLYKOSYLIERUNG	54
4.5.1	Membranpräparation zur Deglykosylierung von ADAM10.....	54
4.5.2	Deglykosylierung von ADAM10	54
4.5.2.1	Deglykosylierung mit N-Glykosidase F	55
4.5.2.2	Deglykosylierung mit Endoglykosidase H	55
4.5.3	Chloroform-Methanol-Fällung von Proteinen	56
4.6	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD	56
4.7	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN	57
4.7.1	Nachweis membranständiger Proteine eukaryontischer Zellen.....	57
4.7.2	Immunpräzipitation von ADAM10	57
4.7.3	Nachweis von APPs α im Zellkulturüberstand	58
4.7.4	Nachweis des SEAPs/APP ₁₁₉ -Reporterproteins im Zellkulturüberstand.....	59
4.7.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
4.7.5.1	Herstellung der Gele.....	59
4.7.5.2	Vorbereitung der Proben	60
4.7.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
4.7.6	Western-Blot-Analyse.....	61
4.7.6.1	Elektro-Blot.....	61
4.7.6.2	Chemilumineszenz-vermittelter Proteinnachweis.....	61
4.7.6.3	Radioaktiv-vermittelte Proteindetektion	62
5	ERGEBNISSE.....	63
5.1	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR REIHENUNTERSUCHUNG α-SEKRETASE-STIMULIERENDER SUBSTANZEN.....	63
5.1.1	Klonierung einer cDNA für ein Reporterprotein mit der cDNA der α -Sekretase ADAM10 in einen Expressionsvektor	64
5.1.1.1	Amplifizierung einer kodierenden DNA-Sequenz für die sekretierte alkalische Phosphatase	64
5.1.1.2	Klonierung einer cDNA für ein Reporterprotein aus SEAPs und APP ₁₁₉	65

INHALTSVERZEICHNIS

5.1.1.3	Klonierung eines Vektors für ein Reporterprotein und ADAM10.....	65
5.1.2	Optimierung der Testbedingungen.....	66
5.1.2.1	Einfluss der Temperatur und der Reaktionsdauer.....	68
5.1.2.2	Einfluss des pH-Werts.....	70
5.1.2.3	Überprüfung der Linearität der enzymatischen Reaktion.....	71
5.1.2.4	Inhibierung der endogenen alkalischen Phosphatase.....	74
5.1.2.5	Die Freisetzung von APPs in HEK293-SEAPs/APP.....	76
5.1.3	Die Stimulierbarkeit des SEAPs/APP ₁₁₉ -Reporterproteins.....	77
5.1.4	Kinetik der PMA-Stimulierung.....	79
5.2	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON ADAM10.....	80
5.2.1	Prozessierung von ADAM10 durch Proprotein-Konvertasen.....	80
5.2.2	Proteolytische Prozessierung von ADAM10 durch PC7 und Furin.....	81
5.2.2.1	PCR-Mutagenese zur Beseitigung der Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle	81
5.2.2.2	Klonierung der cDNAs von PC7 und Furin in pIRES1 <i>hyg</i>	82
5.2.2.3	Auswirkung der mutierten Spaltstelle und der Überexpression von PC7 und Furin auf die Prozessierung von ADAM10.....	83
5.2.3	Prozessierung von ADAM10 in Furin-defizienten LoVo-Zellen.....	87
5.2.4	Zusammenhang zwischen der Prozessierung von ADAM10 und der APPs α -Sekretion.....	88
5.2.5	Proteolytische Prozessierung von ADAM10 im sekretorischen Weg.....	90
5.3	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON TACE.....	94
5.3.1	Die Auswirkung der Inhibierung von Proprotein-Konvertasen auf die Prozessierung von TACE.....	94
5.3.2	Proteolytische Prozessierung von TACE durch PC7 und Furin.....	95
5.3.3	Proteolytische Prozessierung von TACE in der Abwesenheit von Furin.....	97
6	DISKUSSION.....	99
6.1	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR REIHENUNTERSUCHUNG α-SEKRETASE- STIMULIERENDER SUBSTANZEN.....	99
6.1.1	Etablierung und Optimierung des Testsystems.....	100
6.2	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON ADAM10.....	101
6.3	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON TACE.....	109
6.4	AUSBLICK.....	111
7	ANHANG.....	113
7.1	KLONIERUNGSSCHEMATA.....	113
7.1.1	Klonierung einer cDNA für ein Reporterprotein mit der cDNA der α -Sekretase ADAM10 in einen Expressionsvektor.....	113
7.1.1.1	Klonierung einer verkürzten alkalischen Phosphatase in pcDNA3.....	113
7.1.1.2	Klonierung eines Reporterproteins.....	114
7.1.1.3	Klonierung des Reporterproteins und ADAM10 in einen Vektor.....	115
7.1.2	Klonierung der kodierenden Sequenz für ADAM10 Δ RKKR in pcDNA3.....	116
7.2	PROTEINSEQUENZ DES SEAPs/APP₁₁₉-FUSIONSPROTEINS.....	117
7.3	INTERNE BEZEICHNUNGEN DER HERGESTELLTEN PLASMIDE.....	117
8	ABKÜRZUNGEN.....	119
9	LITERATUR.....	123

1 ZUSAMMENFASSUNG

In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten werden sogenannte β -Amyloid-Plaques gefunden, deren Hauptbestandteile die neurotoxischen β -Amyloid-Peptide ($A\beta$) sind. Den ersten Schritt der $A\beta$ -Entstehung stellt die proteolytische Prozessierung des membranständigen Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch die β -Sekretase dar. Die darauffolgende enzymatische Aktivität der γ -Sekretase resultiert schließlich in der Freisetzung des $A\beta$ -Peptids von der Zellmembran. Daneben wird APP im Verlauf des nicht-amyloidogenen Wegs innerhalb der $A\beta$ -Sequenz durch die α -Sekretase prozessiert, wobei das neuroprotektive $APPs\alpha$ freigesetzt und die $A\beta$ -Entstehung verhindert wird.

Die Stimulierung der α -Sekretase ADAM10 könnte somit den nicht-amyloidogenen Weg begünstigen und eine übermäßige Produktion der $A\beta$ -Peptide abwenden. Zum Auffinden ADAM10-stimulierender Substanzen konnte ein Testsystem entwickelt werden, das auf der Fusion der 119 C-terminalen Aminosäurereste des Amyloid-Vorläuferproteins mit der als Reporterprotein fungierenden sekretierten alkalischen Phosphatase aus der menschlichen Plazenta beruht. Das erzeugte Fusionsprotein deckt sowohl die Sequenz des $A\beta$ -Peptids als auch die Transmembran- und die zytoplasmatische Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins ab. Wird es in adhäsiv wachsenden Zellen zur Expression gebracht, so kann es stellvertretend für das freigesetzte endogene APP durch seine alkalische Phosphataseaktivität photometrisch im Zellkulturüberstand quantifiziert werden. Durch die Untersuchung der Stimulierbarkeit des Fusionsproteins konnte sichergestellt werden, dass es sich wie endogenes APP verhält und somit zum Auffinden α -Sekretase-stimulierender Substanzen geeignet ist. Die Koexpression des Reporterproteins zusammen mit der α -Sekretase ADAM10 ermöglicht es, mit diesem Testverfahren Substanzen, die aktivierend auf den nicht-amyloidogenen Weg des Amyloid-Vorläuferproteins wirken, schnell und mit einer hohen Empfindlichkeit zu ermitteln.

Die α -Sekretase ADAM10 wird als Zymogen synthetisiert und besitzt eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RKKR) zwischen der Prodomäne und der Metalloproteinase-Domäne. Mit Hilfe des synthetischen Proprotein-Konvertasen-Inhibitors Decanoyl-RVKR-chloromethylketon konnte nachgewiesen werden, dass Proprotein-Konvertasen an der Prozessierung des ADAM10-Zymogens beteiligt sind. Zudem wurde ADAM10 durch die Überexpression der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin in HEK293-Zellen in einem größeren Umfang prozessiert, so dass mehr reifes ADAM10 entstand, welches wiederum größere Mengen des neuroprotektiven $APPs\alpha$ von der Zellmembran freisetzte. Im Gegensatz dazu konnte mutiertes ADAM10 ohne Proprotein-

Konvertasen-Spaltstelle auch durch eine Überexpression von PC7 nicht mehr in die katalytisch aktive Form überführt werden, was eine verringerte α -Sekretaseaktivität zur Folge hatte. Damit konnte insbesondere die Bedeutung der Proprotein-Konvertase PC7 für die α -Sekretase-Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins aufgeklärt werden: PC7 leistet zwar einen Beitrag zur α -Sekretase-Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins, jedoch nicht durch eine direkte Prozessierung von APP sondern durch die Aktivierung der α -Sekretase ADAM10. PC7 fungiert demnach wie Furin als α -Sekretase-aktivierendes Enzym. Durch die Deglykosylierung von ADAM10 mit der N-Glykosidase F und der Endoglykosidase H konnte das zelluläre Kompartiment, in dem die Entfernung der Prodomäne erfolgt, näher bestimmt werden. Dem Deglykosylierungsmuster von ADAM10 zufolge wird die Prodomäne im *trans*-Golgi-Apparat oder in nachfolgenden Kompartimenten entfernt. Dies stimmt mit einer Beteiligung der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin an diesem Vorgang überein, da sie in genau diesen Zellkompartimenten katalytische Aktivität aufweisen. Diese Ergebnisse vertiefen das Verständnis der Regulationsmechanismen, denen die pathologisch bedeutsame Disintegrin-Metalloproteinase ADAM10 unterworfen ist und sollen dazu beitragen, neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung zu entwickeln.

Die Disintegrin-Metalloproteinase TACE (ADAM17) wird ebenfalls als inaktives Zymogen synthetisiert und besitzt wie ADAM10 sowohl eine α -Sekretaseaktivität als auch eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RVKR). Zudem erfolgt die proteolytische Entfernung der Prodomäne wie bei ADAM10 in einem späten Golgi-Kompartiment innerhalb des sekretorischen Wegs. Daher erscheint eine Beteiligung von Proprotein-Konvertasen an der Prozessierung von TACE als sehr wahrscheinlich.

Nach der Analyse von HEK293-Zellen, die mit dem Proprotein-Konvertasen-Inhibitor Decanoyl-RVKR-chloromethylketon inkubiert wurden, konnte die Mitwirkung von Proprotein-Konvertasen an der TACE-Prozessierung bestätigt werden. Zudem resultierte sowohl die Überexpression von PC7 als auch die von Furin in HEK293-Zellen in einer erhöhten Menge der prozessierten Form von endogenem TACE. Demzufolge wird TACE von beiden Proprotein-Konvertasen in die aktive Form überführt. Obwohl die Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenzen von ADAM10 und TACE geringfügig voneinander abweichen, konnte bei ihrer Aktivierung durch Proprotein-Konvertasen kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Auch in Furin-defizienten LoVo-Zellen konnte eine proteolytische Entfernung der Prodomänen von ADAM10 und TACE beobachtet werden. Sowohl ADAM10 als auch TACE können folglich in Abwesenheit von Furin prozessiert werden. Die Aktivierung der Disintegrin-Metalloproteinasen ADAM10 und TACE erfolgt somit in sehr ähnlicher Weise.

2 EINLEITUNG

2.1 Neurochemie der Alzheimer-Demenz

Von allen Demenzformen ist die Alzheimer-Krankheit die häufigste (Citron, 2000). Sie ist gekennzeichnet durch einen allmählichen, jedoch stetig voranschreitenden Verlust an Neuronen und damit verbunden mit einem generellen Rückgang der kognitiven Fähigkeiten. Nach zunehmenden Gedächtnis- und Orientierungsstörungen leiden die Erkrankten unter einem wachsenden Verlust ihres Denk- und Urteilsvermögens, ihrer Sprache, verlieren schließlich ihre Persönlichkeit und sind vollständig auf die Hilfe Dritter angewiesen. Klassische neuropathologische Merkmale sind Proteinablagerungen in Form von neurofibrillären Bündeln, die sich erst spät im Krankheitsverlauf zeigen und von extrazellulären amyloiden Plaques (Selkoe, 1999, 2001). Amyloide Plaques, auch senile Plaques genannt, treten schon früh im Krankheitsverlauf auf und ihr massives Vorkommen im Hippocampus und der Großhirnrinde ist für die Alzheimer-Krankheit kennzeichnend. Sie bestehen vor allem aus den neurotoxischen β -Amyloidpeptiden ($A\beta$, Yankner, 1996). Diese können Nervenzellen auf mehrere Weisen schädigen: durch Störung der Calciumregulation (Luo *et al.*, 1995, Wolozin *et al.*, 1995), indem sie die Entstehung freier Radikale fördern (Behl *et al.*, 1994, Harris *et al.*, 1995) oder auch indem sie entzündliche Reaktionen auslösen, an denen Mikrogliazellen beteiligt sind (McGeer und McGeer, 1995, Weninger und Yankner, 2001).

Bei den neurofibrillären Bündeln handelt es sich um intrazelluläre Aggregate aus dem hyperphosphorylierten Protein Tau, das normalerweise an Tubulin bindet und somit zu den Mikrotubuli assoziierten Proteinen gehört. Als Bestandteil des Zytoskeletts haben die Mikrotubuli die Funktion, die zelluläre Struktur und die innerzellulären Transportvorgänge aufrechtzuerhalten. Durch eine abnorme Phosphorylierung verliert das Tau-Protein jedoch seine Fähigkeit, die Mikrotubuli der Nervenzellen vor einem spontanen Zerfall zu schützen (Mandelkow und Mandelkow, 1998). Einschränkungen dieser wichtigen Funktionen führen daher kurzfristig zu Fehlfunktionen und langfristig zum Absterben der veränderten Zellen. Diese Vorgänge haben einen beträchtlichen Verlust an Nervenzellen in den betroffenen Gehirngebieten zur Folge, so im Hippocampus - einer Struktur für das Gedächtnis - und in der Großhirnrinde, der Hauptschaltstelle für Vernunft, Sprache, Lernen und andere wichtige Denkprozesse. Die betroffenen Gehirnregionen leiden aufgrund des Neuronenverlustes somit auch an einer Unterversorgung mit dem Neurotransmitter Acetylcholin. Eine Linderung und Hinauszögerung der Krankheit ist daher mit

Acetylcholinesterasehemmern wie Tacrin (Cognex) oder Donepezil (Acricept) möglich. Durch die Blockierung des Neurotransmitterabbaus erhöhen sie die Menge an Acetylcholin im Gehirn und helfen auf diese Weise, die Gehirnleistungen zu verstärken. Leider wirken diese Mittel aber nicht mehr im Spätstadium der Demenz, wenn schon zu viele Nervenzellen fehlen, wenn also kaum noch Acetylcholin produziert wird. Außerdem richten sich diese Medikamente nicht gegen die eigentlichen pathogenen Mechanismen und können daher das Fortschreiten der Krankheit nicht aufhalten.

2.1.1 Die zentrale Rolle des β -Amyloidpeptids

Anhand der Aminosäuresequenz des β -Amyloidpeptids konnte in einer fötalen Hirn cDNA-Bibliothek ein Klon identifiziert werden, der den kodierenden Bereich des A β -Peptids als Teil eines 695 Aminosäuren umfassenden Vorläuferproteins enthält (Kang *et al.*, 1987, Dyrks *et al.*, 1988). Nachfolgend wurden zwei weitere Isoformen des APP (APP: amyloid precursor protein) entdeckt, die zusätzliche Aminosäuren aufweisen und dementsprechend als APP₇₅₁ und APP₇₇₀ bezeichnet werden (Ponte *et al.*, 1988, Kitaguchi *et al.*, 1988). Beide besitzen zusätzlich eine Sequenz aus 56 Aminosäuren, die für eine Kunitz-Serinproteinasen-Inhibitor-domäne kodiert, APP₇₇₀ enthält außerdem noch eine OX-2-Domäne (Abbildung 2.1 A). Alle drei Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen bei der Transkription des APP-Gens und werden im Gehirn exprimiert. Allerdings weist von diesen drei Isoformen APP₆₉₅ die höchste Expression in Neuronen auf (Goedert, 1987, LeBlanc *et al.*, 1991).

Das Amyloid-Vorläuferprotein ist ein Typ I-Transmembranprotein, das nach seiner Synthese den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche durchläuft und von dort zu den Endosomen gelangt (Weidemann *et al.*, 1989, Haass *et al.*, 1992, De Strooper *et al.*, 1993, Selkoe, 1999). Auf seinem Weg zur Zelloberfläche unterliegt es der Spaltung durch drei enzymatische Aktivitäten (Nitsch *et al.*, 1994, Checler, 1995, Selkoe *et al.*, 1996, Mills und Reiner, 1999, Nunan und Small, 2000). Dabei kann zwischen zwei Wegen beziehungsweise Möglichkeiten der Spaltung unterschieden werden (Abbildung 2.1 B). Der nicht-amyloide Weg führt nicht zur A β -Entstehung, wogegen es im amyloiden Weg zur A β -Entstehung und somit zur Plaque-Bildung und damit zur Alzheimer-Erkrankung kommt.

Der nicht-amyloide Weg ist charakterisiert durch die enzymatische Aktivität der α -Sekretase, die das APP mitten in der β -Amyloidsequenz schneidet und damit die Bildung von A β verhindert (Esch *et al.*, 1990, Anderson *et al.*, 1991, Wang *et al.*, 1991). Dabei wird das lösliche N-terminale Fragment von APP, das APP α , freigesetzt. APP α hat trophische Effekte auf neuronale Zellen in Kultur (Araki *et al.*, 1991), stimuliert das

Neuritenwachstum (Small *et al.*, 1994), reguliert die Synapsenbildung (Morimoto *et al.*, 1998), stabilisiert das Calciumgleichgewicht (Mattson *et al.*, 1993) und schützt die Neuronen des Hippocampus und der Großhirnrinde vor den toxischen Eigenschaften der A β -Peptide (Furukawa *et al.*, 1996). Der amyloidogene Weg dagegen ist gekennzeichnet durch die enzymatische Aktivität der β -Sekretase, die den freien N-Terminus des A β -Peptids generiert und damit den ersten entscheidenden Schritt in der Krankheitsentstehung ausführt (Haass *et al.*, 1992, Shoji *et al.*, 1992, Citron *et al.*, 1995).

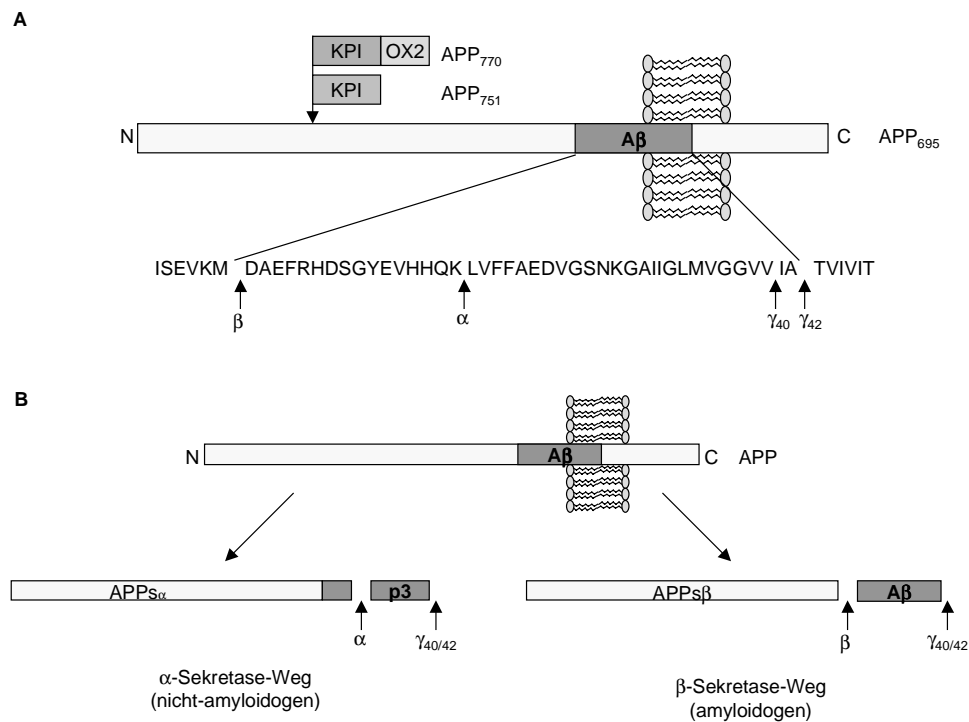


Abbildung 2.1 **A, Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläuferproteins** Die Sequenz des A β -Peptids ist unter Verwendung des Einbuchstaben-Codes für Aminosäuren herausprojiziert und die Spaltstellen der α -, β - und γ - Sekretase sind kenntlich gemacht. **B, Prozessierung des APP auf zwei alternativen Wegen.** Im Verlauf des nicht-amyloidogenen Wegs wird APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Region an Lysin-16 prozessiert, wobei das lösliche Fragment APP_{s α} von der Zellmembran freigesetzt wird. Das in der Membran verbliebene C-terminale Fragment wird anschließend von der γ -Sekretase prozessiert, dabei entsteht das nicht-amyloidogene p3-Peptid. Im A β -bildenden Weg wird zunächst APP_{s β} durch eine über die β -Sekretase vermittelte Proteolyse des APP freigesetzt. Die nachfolgende Prozessierung durch die γ -Sekretase führt schließlich zur Entstehung des amyloidogenen A β -Peptids.

Beide Spaltungseignisse produzieren membrangebundene C-terminale Fragmente. Diese Fragmente unterscheiden sich in ihren N-Termini und werden C99 (von der β -Sekretase erzeugt) und C83 (von der α -Sekretase erzeugt) genannt, entsprechend der Anzahl an Aminosäuren die sie enthalten. Sowohl C99 als auch C83 können schließlich durch die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne

prozessiert werden, was zur Freisetzung des A β -Peptids im Fall von C99 (Anderson *et al.*, 1992) und zur Freisetzung des p3-Peptids (Haass *et al.*, 1993), einem kürzeren, nicht amyloidogenen Peptid, im Fall von C83 führt. Überwiegend spaltet die γ -Sekretase an einer von zwei möglichen Positionen: nach Rest 40 oder nach Rest 42 (bezogen auf C99), was zur Entstehung von A β 40 beziehungsweise A β 42 führt (Citron *et al.*, 1996).

Die besondere Struktur des β -Amyloids ist dafür verantwortlich, dass es leicht mit sich selbst interagiert und aggregiert. A β neigt zur Bildung von antiparallelen β -Faltblattstrukturen und erzeugt dadurch schnell unlösliche Polymere, die schwer wieder dissoziieren. Die biochemische Basis für diesen Vorgang liegt in der Interaktion hydrophober Aminosäuren beziehungsweise deren anhängenden Resten. Die Länge des β -Amyloids ist für das Aggregationsverhalten von Bedeutung, da die längere Version des Peptids zusätzlich zwei hydrophobe Aminosäuren enthält, die die Amyloidizität erhöhen (Citron *et al.*, 1992, 1997, Cai *et al.*, 1993, Jarret *et al.*, 1993, Barelli *et al.*, 1997). So findet man im Kern eines senilen Plaques ausschließlich A β 42 (Roher *et al.*, 1993, Gravina *et al.*, 1995).

Die genauen Mechanismen, durch die das in den senilen Plaques abgelagerte β -Amyloid die neuronale Degeneration verursacht, sind noch nicht aufgeklärt, jedoch scheinen mehrere Ereignisse daran beteiligt zu sein. Zum einen stört dieses Peptid den Calciumhaushalt von Zellen (Luo *et al.*, 1995, Wolozin *et al.*, 1995) und fördert außerdem die Entstehung freier Radikale (Behl *et al.*, 1994, Harris *et al.*, 1995), die wiederum wichtige Zellbestandteile angreifen, darunter Proteine und die DNA. Andererseits können A β -Peptide, in Abhängigkeit ihrer Konzentration, auch Apoptose oder Nekrose induzieren. Die auf diese Weise geschädigten Zellen setzen Cytokine frei und aktivieren Mikrogliazellen – die Immunzellen des Gehirns. Die folgenden Entzündungsprozesse verstärken schließlich die Anfangsschäden (McGeer und McGeer, 1995, Weninger und Yankner, 2001). Es wird somit erklärlich, warum die fortschreitende Ablagerung von β -Amyloid in senilen Plaques mit einer Minderung der Hirnleistung einhergeht.

Das therapeutische Ziel ist daher eine Reduktion der A β -Produktion. Hierbei können drei Strategien verfolgt werden. Erstens eine Stimulierung der α -Sekretaseaktivität, um Substrat vom A β -bildenden amyloidogenen Weg abzuleiten, zweitens eine Inhibierung der β -Sekretase und schließlich eine Inhibierung der γ -Sekretase. Die erste Strategie stellt die größte Herausforderung dar, da sie die Stimulierung eines proteolytisch aktiven Enzyms erfordert, was allgemein schwieriger zu erreichen ist, als eine Inhibierung. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren, welche an die Proteinkinase C-vermittelte Signalkaskade gekoppelt sind, den α -Sekreta-

se-Weg auf Kosten des β -Sekretase-Wegs stimuliert (Buxbaum *et al.*, 1993, Hung *et al.*, 1993).

2.1.2 Die Konkurrenz zwischen der α - und der β -Sekretase

Das *trans*-Golgi-Netzwerk gilt als bedeutender Ort der β -Sekretaseaktivität, da hier der größte Teil der sekretierten A β -Peptide generiert wird (Xu *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu sekretiertem A β entsteht intrazelluläres A β im endoplasmatischen Retikulum und/oder im frühen Golgi-Apparat, was eine proteolytische Aktivität, sowohl von der β - als auch von der γ -Sekretase, in diesen Zellkompartimenten nahelegt (Cook *et al.*, 1997, Hartmann *et al.*, 1997, Wild-Bode *et al.*, 1997). Neben diesem, im endoplasmatischen Retikulum und *trans*-Golgi-Netzwerk ablaufenden, amyloidogenen Weg, kann APP auch innerhalb der A β -Sequenz zwischen Lysin-16 und Leucin-17 von der α -Sekretase prozessiert werden (Esch *et al.*, 1990). Dies erfolgt unabhängig von der Aminosäuresequenz der Spaltstelle. Eine α -helikale Struktur und eine definierte Entfernung der zu hydrolysierenden Peptidbindung (12 Aminosäuren von der Plasmamembran) gelten als einzige Anforderungen der α -Sekretase an die Spaltstelle (Maruyama *et al.*, 1991, Sisodia, 1992). Die Bildung des neurotoxischen A β wird im Verlauf dieses nicht-amyloidogenen Wegs verhindert (Nitsch und Growdon, 1994, Checler, 1995).

Das Verhältnis der APP-Prozessierung durch die α -Sekretase gegenüber der β -Sekretase legt die Menge des produzierten A β fest, daher ist die Regulation dieser beiden Wege entscheidend für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit. Tatsächlich kann durch die Aktivierung der Proteinkinase C in Zellkulturen der α -Sekretase-Weg auf Kosten der β -Sekretase-Spaltung stimuliert werden (Caporaso *et al.*, 1992, Buxbaum *et al.*, 1993). Transgene Mäuse, die erzeugt wurden um große Mengen an humanem A β zu produzieren, weisen nach Behandlung mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), einem Aktivator der Proteinkinase C, ebenfalls erniedrigte Mengen an A β auf (Savage *et al.*, 1998). Daher könnte die Stimulierung des α -Sekretase-Wegs bei der Therapie der Alzheimer-Demenz von Nutzen sein.

Im Gegensatz zur β -Sekretase, die nur konstitutiv aktiv ist, besitzt die α -Sekretaseaktivität sowohl eine konstitutive als auch eine regulierte Komponente. Während die konstitutive α -Sekretase-Spaltung auf der Zelloberfläche stattfindet (Skovronsky *et al.*, 2000, Sisodia, 1992, Ikezu *et al.*, 1998, Haas *et al.*, 1992, Parvathy *et al.*, 1999), erfolgt die Proteinkinase C-regulierte α -Sekretase-Spaltung im *trans*-Golgi-Netzwerk (Skovronsky *et al.*, 2000, Kuentzel *et al.*, 1993, De Strooper *et al.*, 1993, Sambamurti *et al.*, 1992, Tomita *et al.*, 1998), also im gleichen Kompartiment wie die Prozessierung von APP durch die β -Sekretase (Skovronsky *et al.*, 2000). Unter unstimulierten Bedingungen unterliegt die β -Se-

kretase keiner begrenzten Verfügbarkeit des Substrats, jedoch wird die α -Sekretaseaktivität im *trans*-Golgi-Netzwerk nach Stimulierung der Proteinkinase C erhöht und infolgedessen vermehrt APPs α produziert. Dadurch wird das vorhandene APP umgesetzt und somit der β -Sekretase entzogen. Die Folge ist eine verringerte β -Spaltung und damit verbunden eine verminderte Produktion von A β -Peptiden (Skovronsky *et al.*, 2000).

Bisher konnten drei Enzyme mit α -Sekretaseaktivität identifiziert werden. Sie stammen alle drei aus der Familie der Disintegrin-Metalloproteinasen (ADAM, **A Disintegrin And Metalloproteinase**) und werden als ADAM9, ADAM10 und ADAM17 (TACE, **Tumor necrosis factor-Alpha-Convertin**g Enzyme) bezeichnet (Koike *et al.*, 1999, Lammich *et al.*, 1999, Buxbaum *et al.*, 1998).

2.1.2.1 Disintegrin-Metalloproteinasen

Anhand gemeinsamer Strukturmerkmale, Sequenzmotive und Faltungsmuster können etwa 30 Familien von Metalloproteinasen unterschieden werden, die sich in fünf elementare Gruppen einordnen lassen (Rawlings und Barret, 1995). Eine dieser Gruppen wird von den sogenannten Metzincinen gebildet, deren Mitglieder zu den Zink-abhängigen Metalloproteinasen gehören (Bode *et al.*, 1993, Stöcker *et al.*, 1995). Metzincine werden wiederum in vier Subgruppen unterteilt: die Astacine, die Serralysine, die Matrixine (Matrix-Metalloproteinasen) und die Reprolysine (Hooper, 1994). Zu den letzteren gehören die löslichen Metalloproteinasen aus Schlangengiften (SVMP, **s**nake **v**enom **m**etallo**p**roteinase) und die Disintegrin-Metalloproteinasen der ADAM-Familie (Bode *et al.*, 1993, Wolfsberg und White, 1996). Ein besonderes Merkmal der Reprolysine ist ihre multifunktionelle Domänenstruktur.

Alle 30 bisher bekannten Mitglieder der ADAM-Familie werden als lange Vorläuferproteine synthetisiert, die aus einer Prodomäne, einer Metalloproteinasen- oder Metalloproteinasen-ähnlichen Domäne, einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer cysteinreichen und einer EGF-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne bestehen.

Wie alle Metzincine weisen auch sie eine dreidimensionale Struktur auf, die auf einem fünfsträngigen β -Faltblatt und drei α -Helices beruht (Stöcker *et al.*, 1995). Aber nur etwa die Hälfte der 30 Disintegrin-Metalloproteinasen verfügt über das für die katalytische Aktivität notwendige konservierte Zinkbindungsmotiv HEXXHXXGXXH (Rawlings und Berret, 1995, Wolfsberg *et al.*, 1995, Wolfsberg und White, 1996). Die übrigen Mitglieder der ADAM-Familie enthalten abweichende Aminosäuresequenzen in der Metalloproteinasen-Domäne und sind somit vermutlich katalytisch inaktiv. Die Zinkbindung erfolgt mit Hilfe der drei Histidinreste (unterstrichen), die das Zink-Ion im katalytischen Zentrum

komplexieren. Die Carbonylgruppe des konservierten Glutamatrestes (fettgedruckt) katalysiert die Spaltung der Peptidbindung durch eine Erleichterung des nukleophilen Angriffs eines vom Zink-Ion gebundenen Wassermoleküls auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung. Das Glycin (kursiv) erlaubt eine strukturell wichtige Umkehrschleife. C-terminal von dieser Konsensussequenz befindet sich ein sogenannter „Met-Turn“, der bei der Ausbildung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrums beteiligt ist, indem er eine Rückfaltung des Peptidrückgrats ermöglicht und so die Zink-Liganden stabilisiert (Bode *et al.*, 1993, Stöcker *et al.*, 1995).

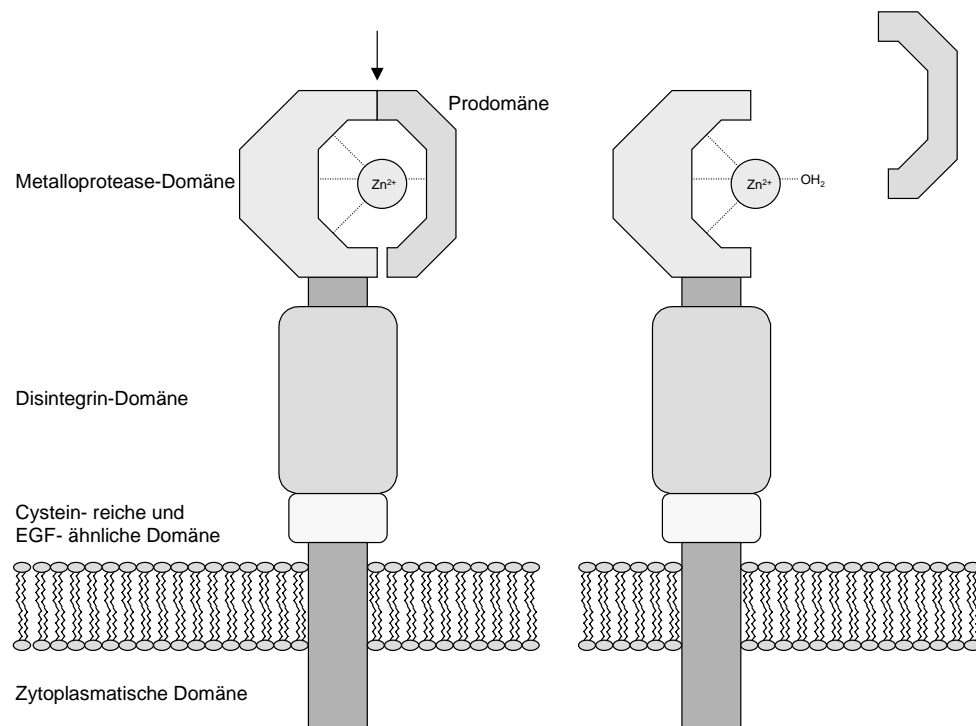


Abbildung 2.2 **Domänenstruktur der Disintegrin-Metalloproteinasen.** Die Prodomäne besitzt vermutlich eine regulatorische Funktion: Sie hält die Metalloprotease durch die Komplexierung des Zink-Ions in einem inaktiven Zustand, erst nach ihrer Abspaltung wird die vierte Koordinationsstelle des Zink-Ions für Wassermoleküle zugänglich.

Die Proteinaseaktivität der ADAM-Proteine wird, wie bei vielen Mitgliedern der Metzincine, wahrscheinlich durch ein Cystein in der Prodomäne, über den sogenannten „Cystein-Switch“-Mechanismus (Van Wart und van Birkedahl-Hansen, 1990, Grams *et al.*, 1993) reguliert (Loechel *et al.*, 1998, 1999, Roghani *et al.*, 1999). Hier komplexiert ein konservierter Cystein-Rest die vierte Koordinationsstelle des Zink-Ions im katalytischen Zentrum und verhindert damit die für die Proteolyse wichtige Anlagerung des Wassermoleküls an das Zink-Ion. Die Proteinase wird so in einem inaktiven Zustand gehalten. Viele ADAM-Proteine besitzen zwischen der Prodomäne und der Metalloprotease-Domäne die Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz RX(K/R)R. Durch

proteolytische Abspaltung der Prodomäne an dieser Stelle wird der inhibitorisch wirkende Cystein-Rest entfernt und das katalytische Zentrum wird für Wassermoleküle zugänglich, was eine Aktivierung der Proteinase bedeutet. So stellt die posttranslationale proteolytische Abspaltung der Prodomäne sowohl von ADAM9 (Roghani *et al.*, 1999) als auch von ADAM15 (Lum *et al.*, 1998) einen wichtigen Schritt in der Entfaltung ihrer katalytischen Aktivität dar. Dieser Vorgang wird in der Zelle vermutlich durch eine oder mehrere Proprotein-Konvertasen im *trans*-Golgi-Netzwerk ausgeführt. Daneben scheint die Prodomäne aber auch für den Transport zur Zelloberfläche und die korrekte Faltung der ADAM-Proteine wichtig zu sein (Milla *et al.*, 1999, Anders *et al.*, 2001). Eine Funktion als intramolekulares Chaperon wird diskutiert.

Disintegrin-Metalloproteinasen sind unter den Membranproteinen insofern außergewöhnlich, als sie sowohl eine proteolytische Domäne als auch eine Adhäsionsdomäne (Disintegrin-Domäne) besitzen. Es ist bekannt, dass Disintegrine aus Schlangengiften mit Integrinen wechselwirken (Huang *et al.*, 1987, Gould *et al.*, 1990), und man nimmt daher an, dass die Disintegrin-Domänen aus ADAM-Proteinen ebenfalls mit Integrinen oder anderen Zelloberflächenrezeptoren in Wechselwirkung treten können. Solche Interaktionen könnten nicht nur dazu dienen, ADAM-exprimierende Zellen in direkten Kontakt mit anderen Zellen oder Komponenten der extrazellulären Matrix zu bringen, sie könnten die ADAM-Proteine auch zum Reaktionsort dirigieren. Tatsächlich konnte eine Wechselwirkung von ADAM2 (Fertilin β) mit Integrinen bei der Befruchtung von Eizellen nachgewiesen werden (Myles *et al.*, 1994, Almeida *et al.*, 1995, Cho *et al.*, 1998). ADAM2 selbst ist katalytisch inaktiv, es bildet jedoch Heterodimere mit dem katalytisch aktiven ADAM1 (Fertilin α), welches zusätzlich ein aus viralen Fusionsproteinen bekanntes Peptid in der cysteinreichen Domäne enthält (Wolfsberg *et al.*, 1993, Blobel *et al.*, 1992, Muga *et al.*, 1994). Dieses bildet eine für die Fusion mit der Zielmembran wichtige hydrophobe α -Helix aus. Die Bindung der Disintegrin-Domäne von ADAM2 auf der Spermazelle an das Integrin $\alpha 6\beta 1$ auf der Eizelle schafft somit die Voraussetzungen für den anschließenden Fusionsprozess.

Bislang wurde bei zwei weiteren Mitgliedern der ADAM-Familie eine Interaktion mit Integrinen dokumentiert. Dabei handelt es sich um Maus-ADAM9 (Zhou *et al.*, 2001) und um menschliches ADAM15 (Zhang *et al.*, 1998), welches als einziges ADAM das in Schlangengift-Disintegrinen vorhandene Tripeptid RGD in seiner Disintegrin-Domäne aufweist. Dieses Tripeptid ist Bestandteil einer 13 bis 14 Aminosäuren umfassenden Schleife (Adler *et al.*, 1991, Niewiarowski *et al.*, 1994), die in die Bindungstasche eines Integrin-Heterodimers hineinzuragen vermag und so die Bindung vermittelt (Krätschmar *et al.*, 1996). Alle anderen Mitglieder enthalten davon abweichende Sequenzen, in denen jedoch andere Aminosäurereste die Funktion der Integrinbindung übernehmen könnten.

Die Variationsbreite dieses Bereichs lässt zumindest vermuten, dass die verschiedenen ADAM-Proteine entweder mit verschiedenen Integrin-Rezeptoren interagieren, oder dass nicht alle proteinbindende Eigenschaften besitzen (Wolfsberg *et al.*, 1995). Tatsächlich konnte bei ADAM9, das genau wie ADAM2 kein RGD-Tripeptid besitzt, eine Interaktion mit dem Integrin $\alpha\beta 5$ auf der Zelloberfläche von Myeloma-Zellen nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2001).

Von struktureller Bedeutung sind vermutlich die cysteinreiche Domäne und der EGF-ähnliche Bereich. Sie stabilisieren wahrscheinlich die Proteinstruktur und positionieren die übrigen Domänen, um Interaktionen mit anderen Proteinen bestmöglich zu gewährleisten (Fox und Bjarnason, 1996). Weiterhin enthalten die cysteinreichen Domänen einiger ADAM-Proteine ein Fusionspeptid, das durch Ausbildung einer hydrophoben α -Helix zur Fusion von Zellmembranen führt (Blobel *et al.*, 1992, Muga *et al.*, 1994, Huovila *et al.*, 1996). Auch ADAM12, welches bei der Fusion von Myoblasten zu Myotuben beteiligt ist, besitzt ein solches Fusionspeptid (Yagami-Hiromasa *et al.*, 1995).

Die zytoplasmatische Domäne besitzt wahrscheinlich eine regulatorische Funktion, da viele ADAM-Proteine dort Phosphorylierungsstellen oder potentielle SH3-Ligandenbindungsdomänen aufweisen (Pawson, 1995). Eine Bestätigung dessen stellt die Phosphorylierung von ADAM9 dar, die nach Behandlung mit dem Phorbolster PMA, einem synthetischen Aktivator der Proteinkinase C, nachweisbar ist (Roghani *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer besonderen Domänenstruktur sind ADAM-Proteine an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Neben der Fertilisation von Eizellen und der Zell-Adhäsion beziehungsweise -Fusion sind sie außerdem bei der Zelldifferenzierung (Rooke *et al.*, 1996, Fambrough *et al.*, 1996, Pan und Rubin, 1997) sowie der Spaltung membranständiger Zelloberflächenproteine von Bedeutung (Arribas *et al.*, 1996, Black und White, 1998). Bei diesem als „Shedding“ bezeichneten Prozess gehören Rezeptoren, Cytokine und Adhäsionsmoleküle, die in den Extrazellulärraum freigesetzt werden, zu ihren Substraten.

2.1.2.2 Die α -Sekretase TACE

Entzündliche Reaktionen können unter anderem durch die Freisetzung der löslichen Ektodomäne des Tumor Nekrose-Faktor- α (TNF α) ausgelöst werden. Es wurde daher versucht, das für die TNF α -Freisetzung verantwortliche Enzym zu finden. Aufgrund seiner Fähigkeit, den Tumor Nekrose-Faktor- α an der physiologischen Spaltstelle zu prozessieren (Moss *et al.*, 1997, Black *et al.*, 1997), wurde das identifizierte Enzym TACE genannt (TACE: Tumor necrosis faktor-**A**lpha-**C**onverting **E**nzyme). Als Mitglied der

Disintegrin-Metalloproteinasen wird es auch als ADAM17 bezeichnet. Neben der Spaltung des Tumor Nekrose-Faktor- α ist TACE auch an der Freisetzung des Transformierenden Wachstums-Faktor- α (TGF α), des p75 Tumor Nekrose-Faktor-Rezeptors, des L-Selectins und des Amyloid-Vorläuferproteins beteiligt (Peschon *et al.*, 1998, Buxbaum *et al.*, 1998). Untersuchungen in TACE-defizienten Mäusen, die eine ganze Reihe von Entwicklungsdefekten aufweisen, bestätigen, dass TACE eine breite Substratspezifität besitzt und eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Säugern einnimmt (Peschon *et al.*, 1998). Obwohl TACE die typische Domänenstruktur der Disintegrin-Metalloproteinasen aufweist, ist die Sequenzhomologie zu anderen Mitgliedern der ADAM-Familie gering. Das am nächsten verwandte Mitglied ist ADAM10 mit einer Aminosäuresequenzidentität von nur 29%.

Die reife Form des Enzyms entsteht durch die proteolytische Abspaltung der Prodomäne an der Proprotein-Konvertasen-Konsensussequenz, die sich genau an der Grenze zur Metalloprotease-Domäne befindet. Als starker Inhibitor der katalytischen Aktivität hat die Prodomäne die Funktion, TACE solange in einem inaktiven Zustand zu halten, bis eine Abspaltung und damit eine Aktivierung erfolgt (Schlöndorff *et al.*, 2000). Die Dissoziation der Prodomäne kann durch die Thiol-modifizierende Quecksilberverbindung APMA vermittelt werden, wodurch die Vermutung gestützt wird, dass TACE über den postulierten „Cystein-Switch“-Mechanismus reguliert wird. Darüber hinaus scheint die Prodomäne auch für die korrekte Faltung des Enzyms notwendig zu sein und somit als intramolekulares Chaperon zu fungieren (Milla *et al.*, 1999). Entfernt wird die Prodomäne im *trans*-Golgi-Apparat, übereinstimmend mit der naheliegenden Beteiligung von Proprotein-Konvertasen an diesem Prozess (Schlöndorff *et al.*, 2000). Das reife Enzym kommt zwar auch auf der Zelloberfläche vor, ist aber vorwiegend in einem perinukleären Kompartiment vorzufinden, was darauf schließen lässt, dass die durch TACE vermittelte Prozessierung von Transmembranproteinen sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Organellen erfolgen kann. Einen Hinweis darauf geben die Prozessierungen der Cytokine TNF α und TGF α (Merlos-Suarez *et al.*, 1998, Solomon *et al.*, 1997, Arribas und Massague, 1995, Arribas *et al.*, 1996). Während die Spaltung des TNF α im sekretorischen Weg innerhalb der Zelle erfolgt, wird TGF α auf der Zelloberfläche in die lösliche Form überführt.

Die Phosphorylierung von Enzymen durch Proteinkinasen ist ein weitverbreiteter Mechanismus zur Regulation von Enzymaktivitäten. Eine wertvolle Eigenschaft der Proteinkinase C ist dabei ihre Aktivierbarkeit durch Phorbolster, die in ihrer Struktur dem sekundären Botenstoff Diacylglycerin ähneln. So bindet die Proteinkinase C den Phorbolster PMA mit hoher Affinität und wird durch diese Bindung aktiviert. Durch die Behandlung von Zellkulturen mit PMA wird TACE stimuliert und infolgedessen die

enzymatische Aktivität erhöht (Black *et al.*, 1997, Peschon *et al.*, 1998, Buxbaum *et al.*, 1998). Die Mechanismen der PMA-induzierten Stimulierung von TACE sind allerdings sehr vielschichtig und weitgehend unverstanden. So wird es infolge der PMA-Einwirkung zwar phosphoryliert (Black *et al.*, 1997), doch konnte durch die Transfektion einer TACE-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne die PMA-Stimulierbarkeit der enzymatischen Aktivität in TACE-defizienten Zellen wiederhergestellt werden. Eine Phosphorylierung wäre für die Stimulierung somit nicht erforderlich und insofern wäre die TACE-Aktivität keiner Regulation durch die Phosphorylierung seiner zytoplasmatischen Domäne unterworfen (Reddy *et al.*, 2000). Neben einer erhöhten Spaltung von Zelloberflächenproteinen induziert die Behandlung von Zellen mit PMA aber auch die Internalisierung von auf der Zelloberfläche vorhandenem, reifen TACE (Doedens und Black, 2000). Dies wird anschließend abgebaut, ohne dass ein genereller Abbau von Zelloberflächenproteinen stattfindet. Auffälligerweise erfolgt die Reduzierung des reifen TACE auf der Zelloberfläche langsamer als die proteolytische Freisetzung seiner Substratproteine. L-Selectin wird zum Beispiel innerhalb weniger Minuten durch PMA-induziertes Shedding freigesetzt, während die Menge der reifen Proteinase erst nach etwa 90 min um die Hälfte reduziert ist. Diese allmähliche Verringerung von reifem TACE auf der Zelloberfläche könnte die Menge an freigesetzten Proteinen langsam beschränken und der Zelle so die „Auffüllung“ der Zelloberflächenproteine ermöglichen (Doedens und Black, 2000).

In primären embryonalen Maus-Fibroblasten wird die Freisetzung von APPs α durch die Aktivierung der Proteinkinase C mit PMA um das drei- bis fünffache erhöht (Buxbaum *et al.*, 1998). Dies wird durch Immunex compound 3, einem wirkungsvollen Inhibitor sowohl der ADAM-Proteine als auch der Matrixine, blockiert. Im Gegensatz dazu kann in Zellen, die aus TACE-knockout Mäusen isoliert wurden, die APPs α -Sekretion durch PMA nicht mehr erhöht werden. Dieser nahezu vollständige Verlust der PMA-Stimulierbarkeit TACE-defizienter Zellen deutet auf eine Funktion von TACE bei der regulierten APPs α -Freisetzung hin. Allerdings ist die basale APPs α -Sekretion in diesen Zellen unverändert, was wiederum auf die Existenz von zumindest einer weiteren α -Sekretase hinweist. Bestätigt wird die beobachtete α -Sekretaseaktivität durch die *in vitro*-Spaltung eines synthetischen Dekapeptids, das die Aminosäuresequenz der α -Sekretase-Spaltstelle von APP umfasst und durch die rekombinante, katalytische Domäne von TACE spezifisch prozessiert wird (Buxbaum *et al.*, 1998).

Die konstitutive Komponente der α -Sekretaseaktivität von TACE wird bei dessen Überexpression in HEK293-Zellen erkennbar (Slack *et al.*, 2001). In diesen Zellen ist die konstitutive APPs α -Spaltung stark erhöht, allerdings werden infolgedessen auch die Inhibierungskonstanten für die konstitutive und Carbachol-induzierte APPs α -Freisetzung

deutlich erniedrigt, so dass offenbar eine andere Proteinase als TACE den endogenen Vermittler der APPs α -Sekretion darstellt.

Auch die *in-situ* Hybridisierungsmuster von TACE und APP, die sowohl bei sich entwickelnden und erwachsenen Mäusehirnen als auch in menschlichen Gehirnen nur teilweise eine Überlappung aufweisen, deuten eher darauf hin, dass TACE nicht die für die Alzheimer-Demenz relevante α -Sekretase ist (Marcinkiewicz und Seidah, 2000).

2.1.2.3 Die α -Sekretase ADAM10

Identifiziert wurde ADAM10 zunächst als MBP-spaltendes (MBP: **M**yeelin **B**asic **P**rotein) Enzym in Myelinmembranen des Rinderhirns (Chantry *et al.*, 1988, 1989). Die beobachtete Spaltung des MBPs stellte sich zwar als Artefakt heraus, doch konnte hier erstmals die proteolytische Aktivität von ADAM10 belegt werden (Howard und Glynn, 1995, Howard *et al.*, 1996).

Durch Spaltungsversuche mit dem aus Rindernieren gereinigten Enzym konnte schließlich die spezifische α -Sekretaseaktivität von ADAM10 *in vitro* nachgewiesen werden (Lammich *et al.*, 1999). Als Substrat diente hierbei ein synthetisches, α -helikales Oktadekapeptid, das die Aminosäuresequenz der α -Sekretase-Spaltstelle von APP umfasst. Wie für die α -Sekretase gefordert, spaltet ADAM10 dieses Peptid zwischen den Aminosäuren Lysin-16 und Leucin-17 (Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Lage der Aminosäuren innerhalb des A β -Peptids.). Wird jedoch das Alanin in Position 21 gegen Glycin ausgetauscht und so die α -helikale Struktur des Peptids zerstört, so wird die Spaltung fast vollständig verhindert.

Wie für eine α -Sekretase erwartet, besitzt ADAM10 sowohl eine konstitutive als auch eine regulierte Enzymaktivität (Lammich *et al.*, 1999). Die konstitutive Komponente zeigt sich bei der Überexpression von ADAM10 in HEK293-Zellen, hier ist die APPs α -Bildung um etwa das Vierfache erhöht. Nach Stimulierung der Proteinkinase C mit dem Phorbolster PMA wird die regulierte Komponente erkennbar, da hier die APPs α -Bildung gegenüber der konstitutiven APPs α -Sekretion nochmals stark erhöht wird. Darüber hinaus wird die Sekretion von APPs α durch eine Punktmutation im Zinkbindungsmotiv (E384A) der katalytischen Domäne von überexprimiertem ADAM10 erheblich reduziert. Aufgrund der dominant negativen Wirkung dieser Mutante wird hierbei auch die endogene α -Sekretase weitgehend ausgeschaltet. Auch das Inhibierungsspektrum, sowohl von dem isolierten als auch dem überexprimierten Enzym, stimmt mit dem der α -Sekretase überein.

Wie alle katalytisch aktiven Disintegrin-Metalloproteinasen wird auch ADAM10 als Zymogen mit einer potentiellen Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RKKR) zwischen der Prodomäne und der Metalloprotease-Domäne synthetisiert (Howard *et al.*,

1996). In Übereinstimmung mit der erwarteten Lokalisierung der α -Sekretase (Kuentzel *et al.*, 1993, Ikezu *et al.*, 1998) ist ADAM10 im *trans*-Golgi-Netzwerk und auf der Zelloberfläche vorhanden (Lammich *et al.*, 1999). Es besitzt ein weites Expressionsspektrum (Yavari *et al.*, 1998), doch insbesondere die überlappende Expression von ADAM10 mit APP im Gehirn untermauert die Hypothese, dass ADAM10 die physiologisch relevante α -Sekretase mit APP als Substrat darstellt (Marcinkiewicz und Seidah, 2000).

Durch den Entzug von Cholesterin aus der Plasmamembran unter einen kritischen Grenzwert wird die Membranfluidität beträchtlich gesteigert, was zu einer vermehrten APP α -Sekretion führt (Kojro *et al.*, 2001). Dabei könnte die höhere Membranfluidität eine erhöhte laterale Bewegung von APP und der α -Sekretase innerhalb der Membran bewirken und so die proteolytische Prozessierung erleichtern. Gleichzeitig tritt nach Cholesterin-Abreicherung eine inhibierte Endozytose von APP auf, die zu einer Anhäufung von APP auf der Zelloberfläche und, infolgedessen, zu einer verstärkten α -Sekretase-Spaltung führt. Auch die Behandlung von peripheren und neuronalen Zellen mit Lovastatin, einem Inhibitor der Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA-Reduktase, resultiert in einer erhöhten α -Sekretaseaktivität.

Diese Befunde veranschaulichen, dass die Abreicherung von Cholesterin den nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Weg begünstigt und damit die Konzentration der A β -Peptide limitiert. In APP-überexprimierenden Neuronen des Hippocampus konnte nach Cholesterin-Abreicherung ebenfalls eine verminderte A β -Produktion festgestellt werden (Simons *et al.*, 1998).

2.1.2.4 Die β -Sekretase BACE

Der erste Schritt der A β -Peptidentstehung ist die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch die β -Sekretase. Fünf Gruppen entdeckten unabhängig voneinander ein Enzym, das viele der geforderten Merkmale erfüllt und somit einen Kandidaten für die β -Sekretase verkörpert (Vassar *et al.*, 1999, Yan *et al.*, 1999, Sinha *et al.*, 1999, Hussain *et al.*, 1999, Lin *et al.*, 2000). Da es das APP an Asparagin-1 der A β -Sequenz genauso prozessiert wie an Glutamat-11, einer alternativen β -Spaltstelle, und zugleich ein Mitglied der Pepsin-Familie von Aspartyl-Proteinasen darstellt, wurde es als BACE (**B**eta-site **A**PP **C**leaving **E**nzyme) oder Asp2 beziehungsweise memapsin2 (**m**embrane-anchored **a**spartic **p**rotease of the **p**epsin family) bezeichnet. Die verwandte Transmembran-Aspartyl-Proteinase BACE2 (oder Asp1) besitzt zwar eine ähnliche Substratspezifität (Yan *et al.*, 1999, Farzan *et al.*, 2000), ist im Gehirn allerdings nicht hoch exprimiert (Bennet *et al.*, 2000). BACE dagegen besitzt eine breite Gewebeverteilung mit einer hohen Expression

im Gehirn (Vassar *et al.*, 1999). In humanen kortikalen Neuronen ist BACE darüber hinaus mit APP und ADAM10 kolokalisiert, was ebenfalls BACE als physiologisch relevante β -Sekretase favorisiert (Marcinkiewicz und Seidah, 2000).

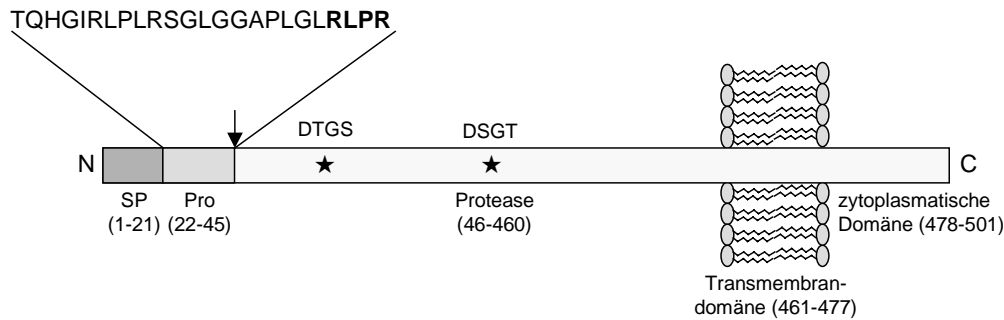


Abbildung 2.3 **Schematische Darstellung der β -Sekretase BACE.** Das BACE-Vorläuferprotein besitzt ein Signalpeptid (SP), eine Prodomäne (Pro), eine Proteinase-Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Die Sequenz der Prodomäne ist unter Verwendung des Einbuchstaben-Codes für Aminosäuren herausprojiziert und die Furin-Spaltstelle ist fettgedruckt. Die Aspartyl-Proteinase-Motive (DTGS und DSGT) des aktiven Zentrums werden durch Sternchen angezeigt. In den Klammern sind die Aminosäure-Reste jeder Domäne angegeben.

Strukturell ist BACE durch eine N-terminale Prodomäne, eine katalytische Domäne, die zwei wichtige Aspartat-Reste enthält, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne gekennzeichnet (Vassar *et al.*, 1999). Die N-terminale Sequenzierung von gereinigtem BACE erwies, dass das reife Enzym mit Glutaminsäure-46 beginnt. Dies deutet auf eine proteolytische Entfernung der Prodomäne hin (Bennett *et al.*, 2000, Capell *et al.*, 2000, Creemers *et al.*, 2001, Benjannet *et al.*, 2001, Shi *et al.*, 2001). Viele Proteinasen, einschließlich der Proprotein-Konvertasen und vieler Metalloproteinasen, werden als inaktive Zymogene synthetisiert und erst nach Abspaltung der Prodomäne katalytisch aktiv. Unklar ist, ob die Prodomäne von BACE ebenfalls eine inhibitorische Funktion ausübt. Zwar verringerte sich die Substratspaltung bei *in vitro* Spaltexperimenten in Anwesenheit der Prodomäne um etwa 20%, doch auch Pro-BACE scheint schon im ER zumindest teilweise katalytisch aktiv zu sein (Benjannet *et al.*, 2001). Grundsätzlich ist die Prodomäne für den effizienten Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum *trans*-Golgi-Netzwerk notwendig (Huse *et al.*, 2000), aber auch um die korrekte Faltung des Proteins zu erleichtern (Shi *et al.*, 2001). Zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne besitzt BACE eine potentielle Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RLPR). Inhibitorstudien bestätigen, dass Pro-BACE im *trans*-Golgi-Apparat von zumindest einem Mitglied aus der Familie der Proprotein-Konvertasen prozessiert wird (Bennett *et al.*, 2000, Benjannet *et al.*, 2001). Ein Beitrag von Furin wird

bei der Untersuchung von Furin-defizienten LoVo-Zellen erkennbar, da hier eine Prozessierung von Pro-BACE nicht stattfindet, durch eine Transfektion mit Furin-cDNA jedoch wiederhergestellt werden kann (Bennett *et al.*, 2000). Gleichzeitig kann ein Mitwirken von PC7 und PACE4 an der Reifung von BACE ausgeschlossen werden, da sie die einzigen in LoVo-Zellen exprimierten Proprotein-Konvertasen darstellen und den Verlust der Furin-Aktivität nicht kompensieren können. *In vitro*-Spaltversuche belegen zusätzlich, dass die Abspaltung der Prodomäne von Pro-BACE durch Furin am besten und deutlich weniger wirkungsvoll durch PC5A erfolgt (Benjannet *et al.*, 2001). Im Einklang mit den Befunden in LoVo-Zellen wird Pro-BACE *in vitro* von PACE4 kaum und von PC7 nicht prozessiert.

Hauptsächlich ist BACE im *trans*-Golgi-Netzwerk, an der Zelloberfläche und in den Endosomen vorzufinden (Vassar *et al.*, 1999, Hussain *et al.*, 1999, Lin *et al.*, 2000, Capell *et al.*, 2000, Huse *et al.*, 2000). Bestimmt wird die intrazelluläre Lokalisierung von Motiven in der zytoplasmatischen Domäne. So scheint ein Dileucin-Motiv für die Reinternalisierung von an der Zelloberfläche befindlichem BACE in die Endosomen verantwortlich zu sein (Walter *et al.*, 2001). Ein weiteres Motiv ist die Casein Kinase I-Phosphorylierungsstelle, die offenbar für den regulierten Transport des Enzyms aus frühen Endosomen zu späten endosomalen und/oder *trans*-Golgi-Kompartimenten ausschlaggebend ist und auf diese Weise BACE wieder dem sekretorischen Weg zuführt. Die Phosphorylierung findet ausnahmslos bei der vollkommen reifen Form statt, also nach Entfernung der Prodomäne und komplexer N-Glykosylierung.

Ein kleiner Teil von BACE wird „gesheddet“ und so in eine lösliche Form überführt, die den sekretorischen Weg sehr schnell durchläuft und in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Gleichzeitig werden vermehrt A β -Peptide produziert und somit das amyloidogene Potential von BACE erhöht (Benjannet *et al.*, 2001). Eine regulatorische Funktion nehmen hierbei die drei in der zytoplasmatischen Domäne vorhandenen Palmitoylierungsstellen ein, denn ausschließlich nicht-palmitoyliertes BACE wird „gesheddet“. Im Gegensatz dazu ist bei einer Palmitoylierung die Freisetzung von BACE unterbunden und dadurch die A β -Produktion reduziert. Folglich könnte dies einen Schutzmechanismus darstellen, um das amyloidogene Potential von BACE herabzusetzen.

2.2 Die Familie der Proprotein-Konvertasen

Die Prozessierung von Vorläuferproteinen durch eine begrenzte Proteolyse ist ein wichtiger und weit verbreiteter Mechanismus bei der Erzeugung biologisch aktiver

Proteine und Peptide. Ausgeführt wird diese Funktion von einer Proteinasefamilie, die im sekretorischen Weg und auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Die Enzyme dieser Familie gehören zu den calciumabhängigen Serin-Endopeptidasen und sind sowohl mit der bakteriellen Proteinase Subtilisin als auch mit der Hefe-Proteinase Kexin verwandt. Sie werden daher als subtilisinähnliche Proprotein-Konvertasen oder einfach als Proprotein-Konvertasen bezeichnet. Sieben Mitglieder dieser Familie konnten in Säugetieren identifiziert und charakterisiert werden, und zwar Furin/PACE, PC2, PC1/PC3, PACE4, PC4, PC5/PC6 und PC7/PC8/LPC (Steiner, 1998, Seidah und Chretien, 1999, Zhou *et al.*, 1999). Sie alle besitzen ein N-terminales Prosegment, gefolgt von einer hoch konservierten katalytischen Domäne und einer konservierten P-Domäne. Einige Mitglieder verfügen zusätzlich über eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne. Die P-Domäne scheint eine regulatorische Funktion auszuüben, sie bestimmt das Maß der Calciumabhängigkeit und das pH-Wert-Optimum der jeweiligen Konvertase. Zusätzlich scheint sie für die strukturelle Stabilität notwendig zu sein. Weniger konserviert sind die zytoplasmatischen Domänen. Sie enthalten unter anderem Phosphorylierungsstellen und bestimmen die zelluläre Lokalisierung der betreffenden Konvertase.

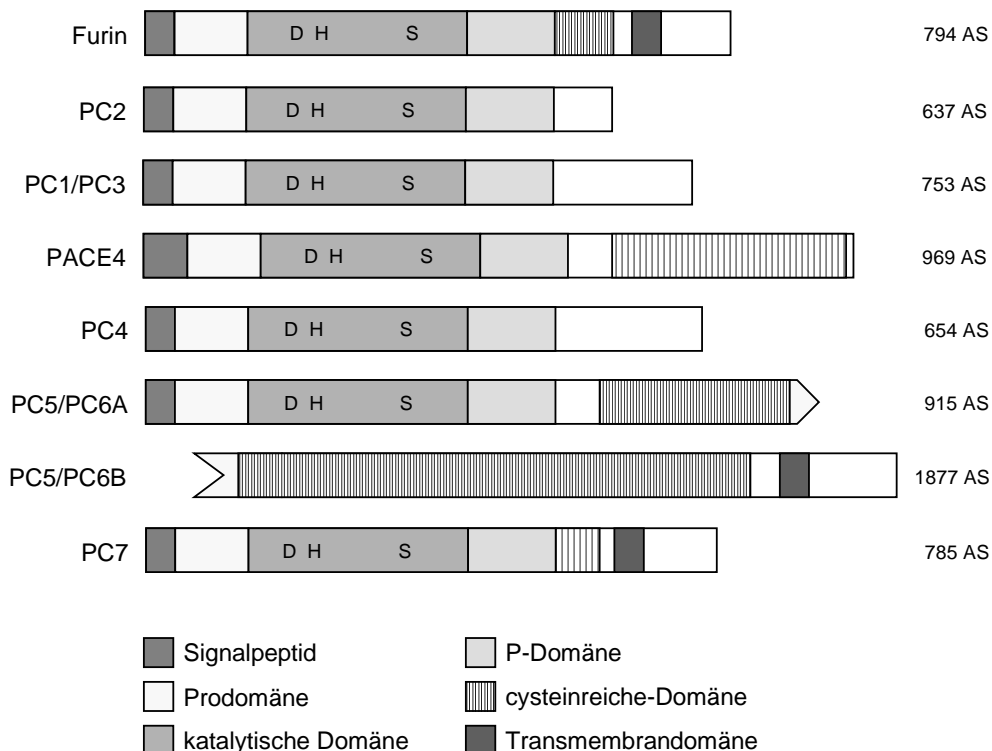


Abbildung 2.4 **Die Domänenstruktur der Proprotein-Konvertasen.** Alle sieben Mitglieder haben ein konserviertes Signalpeptid, eine Prodomäne, eine katalytische Domäne und eine P-Domäne, unterscheiden sich jedoch in ihrer C-terminalen Domäne. Nur Furin, PC5/PC6B und PC7 besitzen eine Transmembrandomäne. In der katalytischen Domäne sind die Aminosäurereste der katalytischen Triade des aktiven Zentrums unter Verwendung des Einbuchstaben-Codes für Aminosäuren dargestellt (nach Nakayama *et al.*, 1997).

Wie Subtilisin werden auch die Proprotein-Konvertasen durch eine autokatalytische Entfernung ihres Prosegments aktiviert (Nakayama, 1997). Die Autoaktivierung des Furins dient dabei als Modell für die anderen Proprotein-Konvertasen mit Ausnahme von PC2, das auf andere Weise aktiviert wird. In diesem Modell wird Furin als inaktives Vorläuferprotein mit einer Prodomäne synthetisiert, die für die korrekte Faltung im endoplasmatischen Retikulum erforderlich ist (Anderson *et al.*, 1997). Sobald die native Struktur gebildet ist, erfolgt die autokatalytische Prozessierung der Prodomäne. Diese intramolekulare Spaltung des Prosegments ist die Grundvoraussetzung dafür, dass Furin das endoplasmatische Retikulum verlassen kann. Das Prosegment verbleibt jedoch nicht-kovalent an das Furin gebunden und fungiert als potenter Autoinhibitor der katalytischen Aktivität. Erreicht die latente Form des Furins den *trans*-Golgi-Apparat wird das Prosegment durch eine zweite Spaltung innerhalb des Prosegments entfernt und die vollständige Aktivität hergestellt. Erleichtert wird die Dissoziation durch die saure (pH \approx 6,5) und calciumreiche Umgebung des *trans*-Golgi-Apparats (Anderson *et al.*, 1997).

Proprotein-Konvertasen können anhand ihrer Expressionsmuster in drei Gruppen eingeteilt werden (Nakayama, 1997). Furin, PACE4, PC5/PC6 und PC7 gehören zu den ubiquitär exprimierten Konvertasen, sie werden in einer Reihe von Geweben und Zell-Linien exprimiert. Im Gegensatz dazu werden PC2 und PC1/PC3 nur in neuroendokrinen Geweben, wie den pankreatischen Inseln, der Schilddrüse und vielen Hirnregionen exprimiert. Die Expression von PC4 beschränkt sich ausschließlich auf testikuläre spermatogene Zellen. Im Allgemeinen sind Proprotein-Konvertasen für die Prozessierung von verschiedenartigen Vorläuferproteinen verantwortlich, darunter Vorläufer von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Matrix-Metalloproteinasen, Rezeptoren, viralen Glykoproteinen und bakteriellen Toxinen (Steiner, 1998, Seidah und Chretien, 1999, Zhou *et al.*, 1999). Typischerweise erfolgt die Proteolyse an Sequenzen, die durch das Konsensusmotiv R X (K/R) R[↓] gekennzeichnet sind.

Obwohl APP nur einen basischen Rest in der Nähe der α -Sekretase-Spaltstelle besitzt, nämlich ein Lysin in Position -1, wurde die Möglichkeit untersucht, dass Proprotein-Konvertasen bei der α -Sekretase-Spaltung von APP beteiligt sein könnten. Anlass hierfür war die Tatsache, dass Proprotein-Konvertasen im sekretorischen Weg und demzufolge im *trans*-Golgi-Netzwerk sowie auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, also genau an den Orten, an denen α -Sekretaseaktivität nachgewiesen wurde. Dazu wurden PK-Zellen (pig kidney) transient mit den cDNAs verschiedener Proprotein-Konvertasen infiziert und der Einfluss der Überexpression auf die Sekretion von APPs α ermittelt (De Strooper *et al.*, 1995). Getestet wurden mit Ausnahme von PC7 alle weiteren Mitglieder der Proprotein-Konvertasenfamilie. Eine Auswirkung auf die APP-Prozessierung zeigte keine der getesteten Proteinase.

2.2.1 Die Proprotein-Konvertase Furin

Furin ist die erste identifizierte und auch die am besten untersuchte Proprotein-Konvertase. Der Name Furin leitet sich von dem dazugehörigen Gen FUR ab (Van de Ven *et al.*, 1990). Dieses Gen ist unmittelbar oberhalb des FES/FSP-Proto-Onkogens (FUR: FES/FSP Upstream Region) lokalisiert und wurde aufgrund seiner Nähe zum menschlichen FES/FSP-Gen während dessen Untersuchung gefunden (Roebroek *et al.*, 1986). Anhand von Sequenzhomologien konnte es als Säuger-Analogon der Hefe-Endopeptidase Kexin ermittelt werden (Van den Ouweland *et al.*, 1990). Furin ist ein Typ I Transmembranprotein, das als glykosyliertes Vorläuferprotein von etwa 100 kDa synthetisiert und durch autokatalytische Spaltung in die reife 94 kDa-Form überführt wird. Das reife Enzym ist ausschließlich im sekretorischen Weg aktiv, so dass es sich zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk, der Zelloberfläche und den Endosomen bewegt (Molloy *et al.*, 1994, 1999, Teuchert *et al.*, 1999). Die gegenwärtige intrazelluläre Lokalisierung wird dabei durch die in der zytoplasmatischen Domäne enthaltenen Motive bestimmt (Abbildung 2.5). So verfügt Furin über eine auf Tyrosin-basierende Sequenz (YKGL), eine Dileucin-ähnliche Sequenz und zwei Casein Kinase II-Phosphorylierungsstellen (Jones *et al.*, 1995, Schäfer *et al.*, 1995). Das auf Tyrosin basierende Motiv dient als endozytische Signalsequenz und damit der Internalisierung der Konvertase von der Plasmamembran. Eine Dephosphorylierung der Casein Kinase II-Stellen durch Isoformen der Proteinphosphatase 2 fördert die Rückkehr des Furins von der Zelloberfläche zum *trans*-Golgi-Netzwerk, wogegen die Phosphorylierung den Transport zur Zelloberfläche bewirkt (Dittie *et al.*, 1997). Alternativ kann phosphoryliertes Furin an PACS-1 (**P**hosphofurin **A**cidic **C**luster **S**orting protein 1) binden und so im *trans*-Golgi-Netzwerk zurückgehalten werden. PACS-1 vermittelt hierbei die Assoziation des phosphorylierten Furins mit einem Clathrin-Adapter-Komplex über das Adapterprotein AP-1 (Molloy *et al.*, 1999).

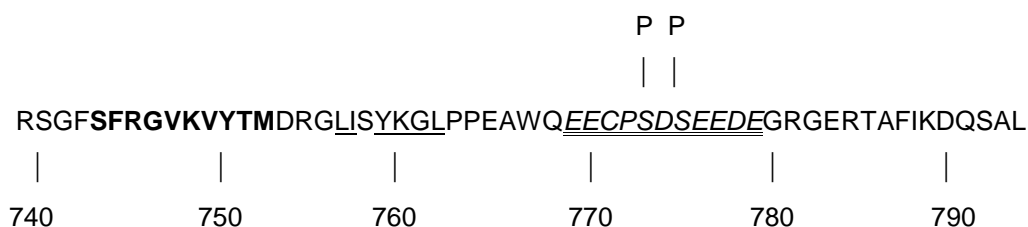


Abbildung 2.5 **Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von humanem Furin.** Diese aus 56 Aminosäuren bestehende Domäne enthält Sequenz-Motive, die die intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms bestimmen. Die Internalisierungssignale sind einfach unterstrichen, die Sequenz, durch die Furin an der Zelloberfläche zurückgehalten wird, ist fettgedruckt und die saure Sequenz mit den Casein-Kinase II-Phosphorylierungsstellen, über die das Protein in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand in das *trans*-Golgi-Netzwerk, in die Lysosomen oder zur Zelloberfläche dirigiert wird, ist kursivgedruckt und doppelt unterstrichen. Die Casein Kinase II-Phosphorylierungsstellen werden durch ein P angezeigt.

Auf dem Weg zur Zelloberfläche kann Furin an einer Spaltstelle zwischen der P-Domäne und der Transmembrandomäne prozessiert und damit in eine lösliche, aber weiterhin katalytisch aktive Form überführt werden (Vidricaire *et al.*, 1993, Vey *et al.*, 1994). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob es sich hierbei um einen autokatalytischen Prozess handelt, oder ob andere Proteinasen daran beteiligt sind.

2.2.2 Die Proprotein-Konvertase PC7

PC7 stellt das zuletzt entdeckte Mitglied aus der Familie der Proprotein-Konvertasen dar (Seidah *et al.*, 1996, Constam *et al.*, 1996). Man bezeichnet es auch als LPC (Lymphoma Proprotein Convertase, Meerabux *et al.*, 1996) oder PC8 (Bruzzaniti *et al.*, 1996). Der Name PC8 ist heute allerdings nicht mehr gebräuchlich, da er eingeführt wurde, nachdem eine Form von PACE4 aufgrund eines Sequenzierungsfehlers irrtümlich als PC7 bezeichnet wurde. PC7 wird als glykosyliertes Zymogen von etwa 100 kDa synthetisiert und im endoplasmatischen Retikulum durch Autoproteolyse in das reife Enzym von etwa 90 kDa überführt. Obwohl sich PC7, wie Furin, zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und der Zelloberfläche aufhält, unterscheiden sich die zytoplasmatischen Domänen der beiden Proteinasen beträchtlich voneinander (Wouters *et al.*, 1998). So enthält die zytoplasmatische Domäne des PC7 nicht das auf Tyrosin basierende Rückhol-Motiv YXXL und wird zudem nicht phosphoryliert (Van de Loo *et al.*, 1997). Sie enthält allerdings zwei Dileucin-Motive, die für die Rückkehr des auf der Zelloberfläche vorhandenen PC7 in das *trans*-Golgi-Netzwerk verantwortlich sein könnten (Abbildung 2.6). Weiterhin wird ein in der zytoplasmatischen Domäne vorhandenes Cystein reversibel palmitoyliert (Van de Loo *et al.*, 2000). Hierdurch scheint aber eher die Stabilität, beziehungsweise die Halbwertszeit, als die intrazelluläre Lokalisierung reguliert zu werden.

EV CLSQRSKAST HGCRRGCCPW PPQSQNSKEV GTALES MPLC SSKDL DGVD S

EHGDCTTASS LLAPELLGEA DWSLSQNSKS DLDCPPHQPP DLKDGQIC

Abbildung 2.6 **Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von PC7 aus Ratte.** Diese aus 100 Aminosäuren bestehende Domäne enthält zwei Palmitoylierungsstellen (fettgedruckt) und zwei Dileucin-Motive (unterstrichen).

Sowohl Furin als auch PC7 sind im *trans*-Golgi-Netzwerk konzentriert und werden von dort zur Zelloberfläche und den Endosomen gelenkt. Darüber hinaus verfügen sie über eine vergleichbare Substratspezifität und ein ähnliches Expressionsmuster in den

verschiedenen Geweben (Steiner, 1998, Seidah und Chretien, 1999, Zhou *et al.*, 1999). Dennoch lässt sich nicht vorhersagen, ob ein potentielles Vorläuferprotein, das die basische Erkennungssequenz enthält und damit die Anforderungen für eine Prozessierung erfüllt, von beiden Proteinasen oder nur einer beziehungsweise gar nicht prozessiert wird. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass geringfügige, aber ausschlaggebende Unterschiede in der Lokalisierung bestehen können. PC7 und Furin besitzen sehr verschiedenartige zytoplasmatische Domänen und so ist es möglich, dass sie in unterschiedlichen Bereichen des *trans*-Golgi-Netzwerks auftreten. In diesem Fall würde die Prozessierung vom Aufenthaltsort des Vorläuferproteins abhängen, also davon, mit welcher Konvertase es in Kontakt treten kann. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit verschiedenen Proteinen als Marker für definierte Zellkompartimente wurde die intrazelluläre Lokalisierung von PC7 und Furin untersucht. Tatsächlich scheint der größte Teil des Furins im *trans*-Golgi-Netzwerk vorhanden zu sein, während PC7 eher in den sekretorischen Vesikeln zu finden ist (Wouters *et al.*, 1998). Ferner existiert PC7 ausschließlich als Transmembranprotein, während Furin teilweise „gesheddet“ und so in eine lösliche Form überführt wird. Aber auch die Unterschiede in der Substratspezifität können sich auf die Prozessierung von Vorläuferproteinen auswirken. Zum Beispiel werden die Pro- α -Untereinheiten der Integrine von Furin gespalten, von PC7 jedoch nicht (Lissitzky *et al.*, 2000). Daneben kann die Prozessierung sicherlich auch vom Expressionsmuster und der Expressionsrate des jeweiligen Enzyms abhängen. Aufgrund der hohen Expressionsrate von PC7 im Hippocampus (Seidah *et al.*, 1996), einer bei der Alzheimer-Demenz betroffenen Hirnregion, wurde die Möglichkeit eines Beitrags von PC7 an der α -Sekretase-Spaltung von APP untersucht (Lopez-Perez *et al.*, 1999, 2001). Dabei stellte sich heraus, dass die APPs α -Sekretion durch die Überexpression von PC7 deutlich erhöht wird. Obwohl APP keine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz besitzt und eine direkte APP-Spaltung durch PC7 nicht gezeigt wurde, wird PC7 als mögliche α -Sekretase diskutiert.

2.2.3 Die Substratspezifität der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin

Basierend auf der Kristallstruktur von Subtilisin konnte die dreidimensionale Struktur des katalytischen Zentrums von Furin modelliert werden (Siezen *et al.*, 1991, Creemers *et al.*, 1993). Bemerkenswert ist hier die große Anzahl an sauren Resten innerhalb der Substratbindungsregion, die eine entscheidende Funktion bei der spezifischen Wechselwirkung mit den basischen Abschnitten des Substrats ausüben und so die Substratspezifität bedingen. Darauf beruhend werden Substrate, die die Erkennungssequenz $^{-4}\text{R}^{-3}\text{X}^{-2}(\text{R/K})^{-1}\text{R}^{\downarrow}$ aufweisen, am effektivsten prozessiert. Um die Substratspezifitäten der

Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin genauer zu untersuchen wurde pro-Renin als Substrat mit Mutationen in den Positionen -1 bis -6 eingesetzt (van de Loo *et al.*, 1997). Die pro-Renin-Mutanten wurden mit PC7 bzw. Furin koexprimiert und die Auswirkung auf die Überführung von pro-Renin in Renin ermittelt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Sequenz der Spaltstelle	PC7	Furin
D V R T K R	teilweise	√
D V F R K R	-	-
R V R T K R	√	√
R V F T Q R	-	-
R V R T Q R	-	√
R V F T K R	√	√
D V R T K K	-	teilweise
<u>D</u> V F T K R	-	-
D V R T Q R	-	teilweise
D R R R K R	teilweise	√

Tabelle 2.1 **Prozessierung von Wildtyp-pro-Renin und der pro-Renin-Mutanten durch PC7 und Furin** (nach van de Loo *et al.*, 1997). Dargestellt sind die Sequenzen der pro-Renin-Spaltstelle. Basische Aminosäurereste sind fettgedruckt, die Sequenz des Wildtyps ist unterstrichen. Die vollständige Spaltung eines Substrats wird durch einen Haken symbolisiert.

Substrate die Arginin-Reste in den Positionen -1 und -4, sowie einen basischen Rest in Position -2 besitzen werden von Furin mit der höchsten Effizienz prozessiert. Es können jedoch auch Substrate, denen ein basischer Rest in Position -2 fehlt, gespalten werden - allerdings mit einer etwa zehnfach geringeren Effizienz. Hierdurch ergibt sich als minimales Furin-Spaltmotiv die Sequenz R X X R (Van de Loo *et al.*, 1997, Munzer *et al.*, 1997). Die Spaltung an monobasischen Sequenzen erfordert unbedingt einen basischen Rest in Position -4 oder -6. Dieser Rest muss entweder ein Arginin- oder ein Lysin-Rest sein und kann nicht durch einen Histidin-Rest ersetzt werden (Munzer *et al.*, 1997). Ferner kann ein Arginin in Position -6 das Arginin in Position -4 ersetzen, jedoch ist dann ein basischer Rest in Position -2 unbedingt erforderlich. Bei einer Überexpression von Furin kann auch eine Spaltung von Substraten stattfinden, die ein Lysin in Position -1 besitzen. Auch hier ist jedoch ein basischer Rest in Position -2 notwendig.

Wie Furin, so prozessiert auch PC7 Vorläuferproteine mit der Erkennungssequenz R X (K/R) R am effektivsten. Verglichen mit Furin ist die Substratspezifität ähnlich, jedoch nicht identisch (Van de Loo *et al.*, 1997, Munzer *et al.*, 1997). So ist PC7 nicht in der

Lage, an monobasischen Resten zu spalten, vielmehr ist ein basischer Rest in Position -2 essentiell. Fehlt er, findet keine Prozessierung statt. Zusätzlich benötigt PC7 unbedingt ein Arginin in Position -1, das selbst von Lysin nicht ersetzt werden kann. Allerdings kann, genau wie bei Furin, das Arginin in Position -4 durch ein Arginin in Position -6 ersetzt werden.

2.3 Zielsetzung

Ein therapeutisches Ziel zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit ist eine reduzierte A β -Produktion. Eine Strategie hierfür geht von der Stimulierung der α -Sekretaseaktivität aus, um so das Substrat APP vom A β -bildenden β -Sekretase Weg abzuleiten. Grundsätzlich kann dies durch die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren, welche an die Proteinkinase C-vermittelte Signalkaskade gekoppelt sind, erfolgen (Nitsch *et al.*, 1992, Buxbaum *et al.*, 1993, Hung *et al.*, 1993). Aber auch durch die Behandlung von Zellen mit Lovastatin resultiert, infolge einer erhöhten ADAM10-Expression, eine verstärkte α -Sekretaseaktivität (Kojro *et al.*, 2001). Substanzen, die aktivierend auf die α -Sekretase ADAM10 wirken, könnten somit bei der Entwicklung von Pharmaka zur Behandlung der Alzheimer-Demenz hilfreich sein.

Erschwert wird das Auffinden ADAM10-stimulierender Substanzen insofern, als Auswirkungen auf die α -Sekretaseaktivität in der Regel durch das Spaltprodukt APPs α nachgewiesen werden und etablierte Methoden zu dessen Detektion, wie zum Beispiel Western-Blot-Analysen, umständlich, zeitaufwendig und teuer sind. Ein Ziel war es daher, ein Testverfahren zu etablieren, das den Nachweis des freigesetzten APPs im Überstand von Zellkulturen schnell und zuverlässig ermöglicht. Zu diesem Zweck sollte ein Reportergen mit der cDNA der 119-C-terminalen Aminosäuren des Amyloid-Vorläuferproteins fusioniert und anschließend mit der cDNA der α -Sekretase ADAM10 in einem Expressionsvektor vereinigt werden. Im weiteren Verlauf sollten beide cDNAs in HEK293-Zellen stabil zur Expression gebracht werden und das Testverfahren soweit optimiert werden, dass das proteolytisch freigesetzte Reporterprotein anstelle des endogenen APPs α photometrisch im Zellkulturüberstand nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivierung der α -Sekretasen ADAM10 und TACE durch die Entfernung der Prodomäne zu untersuchen. Die α -Sekretase ADAM10 wird als Zymogen mit einer Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RKKR) zwischen der Prodomäne und der Metalloproteinase-Domäne synthetisiert. Mit Hilfe eines synthetischen Proprotein-Konvertasen-Inhibitors sollte daher zunächst ermittelt werden,

ob Proprotein-Konvertasen an der Entfernung der Prodomäne von ADAM10 beteiligt sind. Durch die Überexpression von PC7 zusammen mit ADAM10 in HEK293-Zellen sollte insbesondere die Bedeutung von PC7 für die Prozessierung von ADAM10 und die Auswirkung auf die APPs α -Freisetzung aufgeklärt werden, da PC7 als mögliche α -Sekretase in Betracht gezogen wird, eine direkte APP-Spaltung aufgrund der Substratspezifität von PC7 jedoch sehr unwahrscheinlich erscheint. Furin sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht werden, da es der Proprotein-Konvertase PC7 in bezug auf Funktion und Substratspezifität sehr ähnlich ist. Eine weitere Aufgabe war es, die Sequenzanforderungen der Proteinasen, die für die Abspaltung der Prodomäne von ADAM10 verantwortlich sind, durch eine PCR-Mutagenese der Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz zu untersuchen. Ferner sollte das zelluläre Kompartiment, in dem die Entfernung der Prodomäne erfolgt, durch eine Deglykosylierung von ADAM10 mit der N-Glykosidase F und der Endoglykosidase H näher bestimmt werden.

Die Disintegrin-Metalloproteinase TACE wird ebenfalls als inaktives Zymogen synthetisiert und besitzt wie ADAM10 sowohl eine α -Sekretaseaktivität als auch eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RVKR). Zudem erfolgt die proteolytische Entfernung der Prodomäne in einem späten Golgi-Kompartiment innerhalb des sekretorischen Wegs, so dass eine Beteiligung von Proprotein-Konvertasen an diesem Vorgang als sehr wahrscheinlich erscheint. Da die Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenzen von ADAM10 und TACE geringfügig voneinander abweichen, sollte überprüft werden, ob TACE ebenfalls durch Proprotein-Konvertasen, insbesondere PC7 und Furin, prozessiert wird und ob hierbei Unterschiede zu ADAM10 bestehen.

3 MATERIALIEN

3.1 Chemikalien und Hilfsmittel

3.1.1 Allgemeine Laborchemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München
Bactoagar	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BES	Sigma, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
BSA (fettsäurefrei)	Sigma, Deisenhofen
Butanol	Roth, Karlsruhe
CAPS	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	Sigma, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Entwickler (für Hyperfilm ECL)	Kodak, Rochester (USA)
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, St. Augustin
Fixierer (für Hyperfilm ECL)	Kodak, Rochester (USA)
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe

Glyzerin	Roth, Karlsruhe
HA-Peptid	Boehringer, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
L-Homoarginin	Sigma, Deisenhofen
I-Block	Tropix, Weiterstadt
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NaOAc	Merck, Darmstadt
4-Nitrophenylphosphat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet-P40	Calbiochem, Schwalbach
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Proteinaseinhibitoren-Tabletten complete mini	Boehringer, Mannheim
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SDS	BioRad, München
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylenediamine)	BioRad, München
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg

3.1.2 Enzyme und Kitsysteme

Bradford Protein Assay Kit	Roth, Karlsruhe
CIAP (C alf I ntestine A lcalic P hosphatase)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Endoglykosidase H	Roche, Mannheim
N-Glykosidase F	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsenzyme	Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsenzyme	Gibco BRL, Eggenstein
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase	Gibco, Life Technologies, Eggenstein
Trypsin	PAA, Linz (Österreich)
Vent-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Plasmid Midi/Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Nucleo Spin Kit 2 in 1 Extract	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Kit Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Western-Star Protein Detection Kit	Tropix, Bedford, MA (USA)

3.1.3 Antikörper

Primärantikörper

anti-HA Maus-IgG (16B12, monoklonal)	Babco, Richmond, CA (USA)
anti-HA Kaninchen-IgG (Y-11, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-APP Maus-IgG (6E10, monoklonal)	Senetek, St. Louis (USA)
anti-ADAM10 Kaninchen-IgG (polyklonal)	Chemicon, Temecula, (USA)
anti-TACE Kaninchen-IgG (polyklonal)	Chemicon, Temecula, (USA)
anti-PC7 Kaninchen-Antiserum	Prof. Dr. W. Garten, Universität Marburg
anti-Furin Kaninchen-Antiserum	Prof. Dr. W. Garten, Universität Marburg

Sekundärantikörper

Alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-Maus-IgG aus Ziege	Tropix, Bedford, MA (USA)
Alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG aus Ziege	Tropix, Bedford, MA (USA)
³⁵ S-markierter anti-Maus-IgG	Amersham, Freiburg

3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's modified Eagle medium	PAA, Linz (Österreich)
Dulbecco's modified Eagle medium	Sigma, Deisenhofen
DMEM (ohne Phenolrot)	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	PAA, Linz (Österreich)
Geneticin (G418-Sulfat)	PAA, Linz (Österreich)
Glutamin (100x)	PAA, Linz (Österreich)
Hygromycin B	PAA, Linz (Österreich)
minimum essential medium (ME-Medium)	Sigma, Deisenhofen
Serum Plus Serum Supplement (Nu-Serum)	JRH Biosciences, Andover (England)
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA, Linz (Österreich)

3.2 Materialien**3.2.1 Laborgeräte**

Acryl-Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Analysenwaage	Mettler-Toledo GMBH, Gießen
Bildplatte BAS-MP 2025	Fujifilm, Düsseldorf
Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fuji)	raytest, Straubenhardt
Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen
Brandel Cell Harvester	Brandel, Gaithersburg (USA)
CCD-Kamera	raytest, Straubenhardt
Doppelstrahlphotometer U-2000	Hitachi (Japan)
Filterpapier (3-MM)	Whatman, Springfield (Großbritannien)
Flachbettgelapparatur für DNA	Eigenbau
Elektrophorese-Apparatur	Biometra, Göttingen
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
Gewebekulturschalen	Greiner, Kremsmünster (Österreich)

Glaspotter (Homogenisatoren)	GLW, Würzburg
Glaszentrifugenröhrchen	DuPont, Bad Homburg
Heizblock	Bioblock Scientific, Illkirch Cedex (F)
Hyperfilm-ECL	Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubationsschüttler Multitron	Infors GmbH, Bottmingen (Schweiz)
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Kunststoffspritzen (10 und 50 ml)	Braun, Melsungen
Kunststoffzentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Mikrofilter (0,2 und 0,4 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Phasenkontrast-Mikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	peq Lab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Polystyrolküvetten	Sarstedt, Nürnberg
PVDF-Membran	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Scanner BAS-1800	Fujifilm, Düsseldorf
Semi-Dry-Blotapparatur	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Power-All	Serva, Heidelberg
Sterilwerkbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau
Speed-Vac	Savant Instruments, Farmingdale, (USA)
Tischzentrifuge (5415C)	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge (5415R)	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator 4000	Stratagene, Heidelberg
Thermocycler	Perkin-Elmer, Norwalk, CT (USA)
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
NuPAGE (4-12%) Fertiggele	Novex, Frankfurt
Überkoprotierer	Fröbel Labortechnik, Lindau
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman, München
Vortexer	Janke und Kunkel, Heitersheim
Wasserbad	BFL, Burgwedel
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifugenbecher (50 und 250 ml)	Beckmann, München
Zentrifugenrotoren JA14 und JA20	Beckmann, München

3.2.2 Materialien für die Molekular- und Zellbiologie

3.2.2.1 Plasmide

pcDNA3-Vektor

der Firma Invitrogen, Leek (Niederlande). Dieser eukaryontische Expressionsvektor trägt den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, der eine hohe transiente und stabile Expression von Genen in vielen eukaryontischen Zellen ermöglicht. Er trägt außerdem den SV40-Origin, ein Polyadenylierungssignal und das Neomycin-Resistenzgen zur Selektion von Transformanten mit Geneticin (G418).

pcDNA3-ADAM10-HA

enthält die C-terminal HA-Epitop-markierte ADAM10-cDNA aus Rind und wurde von Herrn Dr. R. Postina, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

pcDNA3-bFur

enthält das 2795 bp *Sma*I-Fragment der Rinder-Furin-cDNA in der *Eco*RV-Schnittstelle von pcDNA3 und wurde von Herrn Dr. Rolf Postina, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

pRC/CMV-rPC7

enthält die PC7-cDNA aus Ratte und wurde von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

pIRES1hyg-Vektor

der Firma Clontech Laboratories, Heidelberg. Dieser eukaryontische Expressionsvektor enthält die interne Ribosomen-Eintrittsstelle des Encephalomyocarditis-Virus, die die Translation zweier offener Leserahmen auf einer mRNA ermöglicht. Nach Selektion mit Hygromycin B exprimieren daher nahezu alle überlebenden Kolonien das einklonierte Gen stabil. Die Expressionskassette enthält außerdem den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, ein synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA, das Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen und ein Polyadenylierungssignal.

pSBC-2-SEAP

enthält die cDNA für die sekretierte alkalische Phosphatase aus der menschlichen Plazenta und wurde von Frau Bettina Lingen, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

pSG5new-bFur

ist ein im Polylinker modifizierter pSG5-Vektor der Firma Stratagene, La Jolla (USA). Das Plasmid enthält die Furin-cDNA aus Rind in der *Sma*I-Schnittstelle und wurde von Herrn Prof. Dr. W. Garten, Institut für Virologie, Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

3.2.2.2 Oligonukleotide

Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5' → 3'-Orientierung aufgeführt. Die Oligonukleotide sind entschützt und entsalzt geliefert worden und wurden nicht weiter aufbereitet.

PCR-Primer für SEAP

SEAP-for: ATC GAT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GGG CCT *Clal*
 SEAP-rev: TCA AGT GTA CAC CCC CGG GTG CGC GGC GTC GGT *BsrGI*

PCR-Primer für APP₇₅₁

APP-for: CGA GGA CTG TAC ACT CGA CCA GGT TCT GGG TTG *BsrGI*
 APP-rev: TCT AGA CTC GAG CTA GTT CTG CAT CTG CTC AAA GAA CT *XbaI, XhoI*

PCR-Primer für ADAM10-Mutagenese

AD Δ FUR: ATG CGC AAG CAA CAA CTG TAG CTG AAA AAA ATA C *FspI*
 AD_{60170R}: ACA GTC TGT GAA CTG CGG TTT AGG ATC AGA GGC

Fehlpaarungen der DNA-Basen sind unterstrichen, neu eingefügte Restriktionsschnittstellen zur Analyse der Klone sind fettgedruckt beziehungsweise sowohl fett- als auch kursivgedruckt und das dazugehörige Enzyme ist hinter der DNA-Sequenz angeführt.

3.2.2.3 Bakterienstämme***Escherichia coli* DH5 α :**

ϕ 80 δ lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *relA1*, *deoR*, D(*lacZYA-argFV169*), F⁻, λ^- ; von Clontech, Heidelberg.

***Escherichia coli* JM109:**

e14-(McrA-), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *relA1*, D(*lac-proAB*), [F' traD36 proAB lacIqZDM15] von Stratagene, La Jolla (USA).

Beide Stämme dienen zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA.

3.2.2.4 Zell-Linien

HEK293:

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC 1573-CRL

LoVo:

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC CCL 229

Humane Adenokarzinom-Zellen aus dem Darm. Diese kontinuierliche Zell-Linie wächst als Monoschicht mit einer epithelienähnlichen Morphologie und wurde von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

HEK293-ADAM10-HA, Klon D3:

Stabiler Einzelklon, der nach einer Calciumphosphat-vermittelten Transfektion von HEK293-Zellen mit pcDNA3-ADAM10-HA selektioniert und von Frau Dr. Sandra Gilbert, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt wurde.

3.3 Stammlösungen, Puffer und Zellkulturmedien

Antibiotika-Stammlösungen:

100 mg/ml	Ampicillin,
250 mg/ml	Geneticin (G418)
100 mg/ml	Hygromycin B
Lagerung bei -20°C	

Assay-Puffer:

200 mM	Tris-HCl
10 mM	MgCl ₂
pH 9,8	

BBS:

50 mM	BES
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
pH 6,95, sterilfiltriert	
Lagerung bei 4°C	

2 x Deglykosylierungspuffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5% (v/v)	Nonidet-P40
	0,25% (v/v)	SDS
	pH 7,5	
Dephosphorylierungspuffer:	50 mM	Tris-HCl
	0,1 mM	EDTA
	pH 8,5	
DMEM:	DMEM (high modified: 4,5 g/l Glukose, 110 mg/ml Natriumpyruvat) ohne weitere Zusätze	
DNA-Probenauftragungspuffer:	50% (v/v)	Glyzerin
	0,2% (v/v)	SDS
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05% (w/v)	Xylencyanol
	10 mM	EDTA
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid Lagerung lichtgeschützt bei 4°C	
Glycinlösung:	100 mM	Glycin
	10 µg	HA-Epitoppeptid
	pH 2,5	
glukosehaltiges LB-Medium:	LB-Medium mit 20 mM Glukose	
I-Block-Puffer:	0,2% (w/v)	I-Block
	0,1% (v/v)	Tween 20
	in PBS	

Imidazol-Lysispuffer:	20 mM	Imidazol
	100 mM	KCl
	2 mM	MgCl ₂
	10 mM	EGTA
	300 mM	Saccharose
	0,2% (w/v)	Triton X-100
	pH 6,8 (vor Gebrauch wurde eine Proteinaseinhibitor-Tablette zugefügt)	
Laufpuffer für Gelelektrophorese:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
LB-Agarplatten:	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar	
LB-Medium:	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,4, autoklaviert (121°C, 20 min)	
LB-Selektionsmedium:	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin	
Ligasepuffer:	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	DTT
	1 mM	ATP
	25 µg/ml	BSA
	pH 7,5	
Lösung P1:	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	pH 8,0	
Lösung P2:	0,2 M	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Lösung P3:	3 M Kaliumacetat pH 4,8	

PBS:	8 g/l	NaCl
	0,2 g/l	KCl
	1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄
	0,24 g/l	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4, autoklaviert (121°C, 20 min)	
PCI:	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol, 25 : 24 : 1 (v/v/v)	
PEG/NaCl-Lösung:	13% (w/v)	Polyethylenglykol 8000
	1,6 M	NaCl
Poly-L-Lysinlösung:	0,1 mg Poly-L-Lysin in Wasser	
Proteinauftragspuffer (reduzierend):	62,5 mM	Tris-HCl
	20% (w/v)	Glyzerin
	3% (w/v)	SDS
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
	100 m	DTT
	pH 6,8	
Proteingrößenstandard: "SeeBlue Pre-Stained Standard"	98 kDa	BSA
	64 kDa	Glutamat-Dehydrogenase
	50 kDa	Alkohol-Dehydrogenase
	36 kDa	Carbonyl-Anhydrase
	30 kDa	Myoglobin
	16 kDa	Lysozym
Puffer A:	5 mM	Hepes
	1 mM	EDTA
	pH 7, Lagerung bei 4°C (vor Gebrauch wurde eine Proteinaseinhibitor-Tablette zugefügt)	
Puffer B:	15 mM	Hepes
	pH 7,4, Lagerung bei 4°C (vor Gebrauch wurde eine Proteinaseinhibitor-Tablette zugefügt)	

RNaseA-Lösung: 10 mg/ml in 100 mM Natriumacetat pH 5,2
DNasen wurden durch eine 10-minütige
Inkubation bei 100°C irreversibel denaturiert.

SDS-Polyacrylamidgele:	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel 10%</u>	<u>Trenngel 8%</u>
Acrylamid:	4% (w/v)	10% (w/v)	8% (w/v)
N,N'-Methylenbis(acrylamid):	0,1% (w/v)	0,3% (w/v)	0,3% (w/v)
Tris-HCl:	125 mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8	375 mM, pH 8,8
SDS:	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
<i>Zur Polymerisation:</i>			
APS:	0,05% (v/v)	0,05% (v/v)	0,05% (v/v)
TEMED:	0,1% (v/v)	0,05% (v/v)	0,05% (v/v)

STET-Puffer: 50 mM Tris-HCl
8% (w/v) Saccharose
5% (w/v) Triton X-100
50 mM EDTA
pH 8,0

T4-Polynukleotidkinasepuffer: 70 mM Tris-HCl
0,1 M KCl
10 mM MgCl₂
1 mM 2-Mercaptoethanol
pH 7,6

T4-DNA-Polymerase-Puffer: 25 mM Tris-HCl
37,5 mM NaCl
7,5 mM MgCl₂
2 mM DTT
1 mM ATP
0,5 mM dNTPs
pH 7,5

TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA
pH 8,4

TBE-Puffer:	89 mM	Tris-HCl
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
	pH 8,0	
TBS:	20 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	pH 7,5, autoklaviert (121°C, 20 min)	
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
	pH 7,5	
Towbin-Puffer:	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
	0,05% (w/v)	SDS
	pH 8,3	
Transfektionsmedium:	2 mM	Glutamin
	100 U/ml	Penicillin
	100 mg/ml	Streptomycin
	10% (v/v)	Serum Plus Serum Supplement
	in MEM	
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05% (w/v)	Trypsin
	0,54 mM	EDTA
	in PBS	
Vent-PCR-Reaktionspuffer:	20 mM	Tris-HCl
	10 mM	KCl
	10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	2 mM	MgSO ₄
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	pH 8,8	

Zellkulturmedium:

DMEM (high modified)

10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS)

2 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 mg/ml Streptomycin

4 METHODEN

4.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte ausschließlich in LB-Medium (3.3), zur Selektion transformierter Zellen wurde zudem eine Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml eingestellt. Transformanden wurden durch einen verdünnenden Ausstrich auf LB-Agarplatten vereinzelt. Die Kultivierung der Bakterien für Plasmidschnellpräparationen (4.2.1.1) erfolgte auf LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht, wohingegen die Kultivierung für Plasmidgroßpräparationen (4.2.1.3) in LB-Flüssigmedium unter Schütteln (120 rpm, Inkubationsschüttler) bei 37°C über Nacht erfolgte.

4.1.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

400 ml LB-Medium (3.3) wurden mit 1 ml einer *E. coli*-Kultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Wachstum der Bakterien konnte photometrisch durch Messungen bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt werden. Erreichte die Zellsuspension eine optische Dichte von 0,4-0,6, so wurde das Wachstum durch Inkubation auf Eis gestoppt. Die Bakterien wurden für 15 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend in 50 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ suspendiert. Nach erneuter Inkubation für 15 min auf Eis erfolgte die Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (1000 g, 4°C, 15 min). Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂/10% (v/v) Glycerin resuspendiert und für 4 h auf Eis inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.3 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden entweder Ligationsansätze (4.2.5.5) oder Plasmid-DNA (4.2.1.3) verwendet. Dazu wurden 100 µl der transformationskompetenten Zellen (4.1.2) auf Eis aufgetaut, nach Zugabe der DNA (maximal ein Zehntel des Volumens der Bakteriensuspension) vorsichtig durchmischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Bei dem nachfolgenden Hitzeschock wurde die Bakteriensuspension für 90 s bei 42°C erhitzt und

umgehend für 3 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 800 µl glukosehaltigem LB-Medium (3.3) wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C unter Schütteln (Inkubationsschüttler, 120 rpm) inkubiert und auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Die transformierten Bakterien wurden dann bei 37°C für 15 h im Brutschrank inkubiert.

4.1.4 Lagerung von *E. coli*

Für die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Transformanden wurde der entsprechende Klon in 800 µl glukosehaltigem LB-Selektionsmedium (3.3) herangezogen (15 h, 37°C, 120 rpm, Inkubationsschüttler) und anschließend mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt. Die so auf 20% (v/v) Glycerin eingestellte Bakteriensuspension wurde gut durchmischt und bei -80°C gelagert. Flüssigkulturen von Bakterien lassen sich im Kühlschrank bis zu 10 Tage und auf Agarplatten etwa 4 bis 6 Monate aufbewahren, ohne dass die Bakterien ihre Teilungsfähigkeit verlieren.

4.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.2.1.1 Plasmidschnellpräparation zur Analyse von *E. coli*-Transformanden

Bei dieser Präparationsmethode wird zunächst die Bakterienzellwand durch Lysozym zerstört und anschließend die Zellmembran durch Hitze einwirkung aufgelöst.

Mit Hilfe einer Impföse wurden die Bakterien von der Agarplatte in ein mit 350 µl STET-Puffer (3.3) befülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Vortexen suspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym (20 mg/ml in Wasser) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min erfolgte der Zellaufschluss durch Erhitzen für 50 s im kochenden Wasserbad. Der Zelldebris wurde nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 38 µl 3 M KOAc pH 4,8 und 400 µl Isopropanol aus der Lösung gefällt. Im Anschluss daran wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min sedimentiert und, um das Pellet von Salzen zu befreien, mit 70% (v/v) Ethanol überschichtet und nochmals zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 60 µl sterilem Wasser aufgenommen. Für die analytische Restriktion wurde etwa ein Sechzigstel der Plasmid-DNA dieser DNA-Lösung verwendet. Vorhandene RNA konnte vorher durch den Verdau mit 1 µl RNaseA-Lösung (1mg/ml, DNase- frei) bei 37°C für 10 min entfernt werden.

4.2.1.2 Plasmidpräparation unter Verwendung von Silicagelmatrix-Säulen

Für Klonierungen, Transfektionen und Sequenzierungen wurde die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* bei Bedarf kleiner Mengen über käufliche Silicagelmatrix-Säulen ausgeführt (3.1.2). Die Durchführung der Präparation erfolgte hierbei nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen oder Macherey-Nagel).

4.2.1.3 Plasmidgroßpräparation

Unter Verwendung dieser Methode konnten größere Mengen (1-2 mg) sauberer Plasmid-DNA für Transfektionen (4.3.3) und Klonierungen erhalten werden. Ausgehend von 400 ml einer Flüssigkultur wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 3000 g) pelletiert, in 8 ml Lösung P1 (3.3) aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 8 ml Lösung P2 (3.3) und sehr vorsichtigem Durchmischen des Ansatzes tritt während einer Inkubation für 7 min bei Raumtemperatur die alkalische Lyse der Bakterien ein.

Nach der Neutralisation des Bakterienlysats mit 8 ml eiskalter Lösung P3 (3.3) und vorsichtigem Durchmischen wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Da die genomische DNA im Gegensatz zur frei vorliegenden Plasmid-DNA mit der Bakterienzellwand verknüpft ist, konnte sie zusammen mit denaturierten Proteinen und Zelltrümmern durch Zentrifugation (40 min, 4°C, 27000 g) abgetrennt werden. Aus dem Überstand konnte dann die Plasmid-DNA durch Zugabe von 17 ml Isopropanol (Volumenanteil 0,7) gefällt werden. Dazu wurde das Isopropanol mit der DNA-haltigen Lösung gut durchgemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden anschließend für 20 min bei 27000 g und 4°C zentrifugiert. Um Isopropanolreste zu entfernen, wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 3 ml Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 3,5 ml einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung mit pH 4,8 und gutem Durchmischen wurde hochmolekulare RNA, die in Lösungen hoher Ionenstärke nicht löslich ist, durch eine Inkubation für 20 min auf Eis ausgesalzt.

Die Abtrennung der RNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 14000 g. Aus dem Überstand konnte die Plasmid-DNA präzipitiert werden, indem nach Zugabe von 4 ml Isopropanol für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert wurde (siehe oben). Das Nukleinsäurepräzipitat wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 500 µl Wasser gelöst. Der Abbau der restlichen, niedermolekularen RNA erfolgte durch Behandlung mit RNaseA. Dazu wurde mit 4 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml; DNase-frei) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Für die folgende Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 500 µl PEG/NaCl-Lösung (3.3) gut durchgemischt, für 20 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (20 min, RT,

7000 rpm, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Fügt man einer proteinhaltigen, wässrigen Lösung Phenol zu, so werden die Proteine in der Interphase konzentriert. Zur Entfernung von Proteinen wurde die DNA-Lösung daher so lange mit PCI (3.3) extrahiert, bis nach Phasentrennung durch Zentrifugation (4 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge) keine Zwischenphase mehr sichtbar war. Reste von Phenol und Chloroform konnten durch zweimalige Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether beseitigt werden. Nachdem restlicher Ether bei Raumtemperatur abgedampft war, konnte die Plasmid-DNA erneut mit Ethanol gefällt werden. Dazu wurden 50 µl P3 sowie 1500 µl 100% Ethanol zugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Sedimentation der präzipitierten DNA durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 20 min in der Tischzentrifuge. Zur Entfernung von Salzen wurde die DNA mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 500 µl Wasser gelöst.

Sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der erhaltenen DNA wurden photometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde die Identität der DNA durch Restriktionsanalysen verifiziert.

4.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung konnte durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Dafür wurde die Nukleinsäurelösung in einer geeigneten Verdünnung in eine Quarzküvette gegeben. Der photometrischen Konzentrationsbestimmung einer Lösung liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde. Der Wert 1 der Extinktion bei 260 nm entspricht für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 ng/µl, für einzelsträngige DNA einer Konzentration von 33 ng/µl und für einzelsträngige RNA einer Konzentration von 40 ng/µl. Die Ermittlung von Proteinverunreinigungen in der DNA-Lösung erfolgte durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (E_{260}/E_{280}) liegt für proteinfreie DNA-Lösungen bei 1,8 und für reine RNA-Lösungen bei 2.

4.2.3 Reinigung und Fällung von Nukleinsäuren

4.2.3.1 PCI-Extraktion

Nukleinsäurelösungen konnten durch mehrere aufeinanderfolgende Phenolextraktionen und anschließende Fällung der Nukleinsäuren von vorhandenen Proteinverunreinigungen befreit werden. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen PCI (3.3)

gemischt. Anwesende Proteine, überwiegend DNA-assoziierte, wurden dabei denaturiert und in der Interphase angereichert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge wurde die obere, DNA-haltige wässrige Phase abgenommen und nochmals mit PCI extrahiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis nach der Zentrifugation keine Zwischenphase mehr zu sehen war. Reste von Phenol wurden anschließend durch zweimalige Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether aus der wässrigen DNA-Lösung entfernt. Auch hier erfolgte die Phasentrennung durch eine Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur. Die Etherphase wurde verworfen und restlicher Ether bei Raumtemperatur unter der Sterilbank verdampft. Schließlich wurde die DNA-Lösung einer Fällung durch Alkohole unterworfen.

4.2.3.2 Fällung von DNA durch Alkohole

Die Löslichkeit von Nukleinsäuren wird durch organische Lösungsmittel deutlich verringert. Diese Abnahme der Löslichkeit ist auf die Verminderung der dielektrischen Konstante des Mediums und auf Dehydratation zurückzuführen. Verkleinert sich die dielektrische Konstante des Lösungsmittels, so vergrößern sich die Anziehungskräfte zwischen den entgegengesetzt geladenen Oberflächenresten. Daraus folgt die Bildung von großen Aggregaten, die aus der Lösung ausfallen. Da sich die organischen Lösungsmittel auch in Wasser lösen müssen und so Wechselwirkungen mit Wasser eingehen, tritt zusätzlich eine Dehydratation der Proteine auf.

Für die Fällung von DNA aus einer wässrigen Lösung wurde entweder Isopropanol oder Ethanol verwendet. In beiden Fällen wurde der DNA-Lösung zunächst 0,1 Volumen 3 M Kaliumacetat pH 4,8 zugesetzt. Die Ethanol-Fällung erfolgte durch Zugabe des dreifachen Volumens an absolutem Ethanol und einer Inkubation des Gemisches für 1 h bei -20°C . Wurde das absolute Ethanol durch ein Volumenanteil Isopropanol ersetzt, konnte die Ausbeute an zu präzipitierender DNA erhöht und auf eine Abkühlung verzichtet werden. Präzipitiert wurde die DNA durch eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur (Tischzentrifuge). Zur Entfernung von Salzen erfolgte eine Waschung des DNA-Präzipitats mit 70% (v/v) Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm und dem Trocknen unter der Sterilbank wurde die DNA in einem für die anschließende Verwendung zweckmäßigen Volumen an Wasser wieder in Lösung gebracht.

4.2.3.3 Fällung von DNA durch Polyethylenglykol

Hohe Salzkonzentrationen können bei der Fällung von DNA durch die Verwendung von Polyethylenglykol vermieden werden. Zur Fällung der DNA aus wäßrigen Lösungen wurde das gleiche Volumen einer PEG/NaCl-Lösung (3.3) hinzugefügt und für 20 min bei 0°C inkubiert. Das DNA-Präzipitat wurde dann durch eine Zentrifugation für 20 min bei 7000 rpm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge gewonnen, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in Wasser gelöst.

4.2.3.4 Reinigung von PCR-Amplifikaten

Die Reinigung von Amplifikaten aus PCR-Ansätzen erfolgte entweder über die gelelektrophoretische Trennung der amplifizierten DNA-Fragmente und anschließender Reinigung aus dem Agarosegel (4.2.4.2) oder mit Hilfe von Kitsystemen nach Angaben der Hersteller (Qiagen oder Macherey-Nagel).

4.2.4 Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren

4.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von Restriktionen und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA auf 0,8 bis 1,2% (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Elektrolytlösung diente TAE-Puffer (3.3). Die Agarose wurde in TAE-Puffer durch Kochen im Mikrowellenherd in Lösung gebracht und nach der Abkühlung auf unter 50°C und dem Hinzufügen von 4 µl Ethidiumbromidlösung (final 1 µg/ml) in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Gele in einer Flachbettgelapparatur mit der Elektrolytlösung (TAE-Puffer) überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einem Fünftel Volumen DNA-Probenauftragspuffer (3.3) gemischt, in die Geltaschen gegeben und bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Interkalation von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren ermöglichte die Dokumentation durch Photographie im UV-Durchlicht bei 312 nm mit Hilfe einer Digitalkamera.

Die verwendeten DNA-Größenstandards von MBI Fermentas enthielten folgende Fragmente (Angaben in Basenpaaren):

1 kb-Marker: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500,
1000, 750, 500, 250

100 bp-Marker: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

4.2.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen und zur Reinigung von PCR-Amplifikaten wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA das zu isolierende DNA-Fragment im UV-Durchlicht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Extraktion der wässrigen DNA-Lösung aus dem Gelstück erfolgte durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff in Gegenwart von Phenol. Dazu wurde das Gelstück grob zerkleinert, mit TE-gesättigtem Phenol versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen und kräftigem Mischen erfolgte ein erneutes Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (10 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge) und die wässrige Phase einmal mit PCI (3.3) und zweimal mit wassergesättigtem Diethylether extrahiert. Die Phasentrennungen erfolgten hierbei stets durch Zentrifugation (2 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Verdampfen des restlichen Ethers wurde die DNA mit Ethanol gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 25 µl Wasser gelöst.

Wurde für die Isolierung ein Kitsystem verwendet, so erfolgte die Durchführung nach Angaben des Herstellers.

4.2.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Um optimale Reaktionsbedingungen bei der Durchführung der enzymatischen Modifikationen zu gewährleisten, wurden die Enzyme unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen und in den mitgelieferten Puffern verwendet. Bei aufeinanderfolgenden, unterschiedlichen Modifikationen an den gleichen Nukleinsäuren, wurde zwischen den Reaktionen eine PCI-Extraktion (4.2.3.1) zur Entfernung des Puffers und des nicht mehr benötigten Enzyms der vorhergehenden Reaktion durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung der Nukleinsäuren (4.2.3.2), die nach einer Waschung mit 70% (v/v) Ethanol in dem idealen Reaktionspuffer für die nachfolgende Reaktion aufgenommen werden konnten.

4.2.5.1 Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren

Angewandt wurde die Restriktionshydrolyse zur Überprüfung von Plasmid-DNA aus Schnell- und Großpräparationen, zur molekularen Klonierung von cDNAs sowie zur Kontrolle von PCR-Amplifikaten. Bei Verwendung der Restriktions-Endonukleasen wurde darauf geachtet, dass mindestens 2 U Enzymaktivität für je 1 µg Nukleinsäure eingesetzt wurde und dass das Volumen der glyzerinhaltigen Enzymlösung nicht ein Zehntel des Gesamtvolumens überschritt.

4.2.5.2 Modifizierung von DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase

Entstanden bei einer Restriktionshydrolyse DNA-Fragmente mit inkompatiblen, kohäsiven Enden, so wurde zum Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden und zum Abbau von 3'-überstehenden DNA-Enden die T4-DNA-Polymerase verwendet. Dazu wurde die DNA nach der PCI-Extraktion (4.2.3.1) und anschließender Ethanolfällung in 40 µl T4-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (3.3) gelöst und mit 3 U T4-DNA-Polymerase pro µg DNA für 30 min bei 12°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann zur Isolierung der DNA-Fragmente auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen (4.2.4.2), oder für eine weitere enzymatische Reaktion einer erneuten PCI-Extraktion unterworfen.

4.2.5.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Enden durch die DNA-Ligase erfordert phosphorylierte 5'-DNA-Enden. DNA-Moleküle, die am 5'-Ende dephosphoryliert sind, können somit nicht durch die Ligase mit 3'-Enden verknüpft werden. Dadurch kann bei einer Ligation verhindert werden, dass das 5'-Ende eines DNA-Moleküls mit dem 3'-Ende der gleichen DNA verknüpft wird. Zur Ligation wurden deshalb ausschließlich Klonierungsvektoren eingesetzt, die nach der Restriktionshydrolyse dephosphoryliert wurden. Die Hydrolyse der Phosphatgruppen an den 5'-Enden der DNA-Moleküle erfolgte durch die Behandlung mit einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm. Hierfür wurden 10 µg DNA in Dephosphorylierungspuffer (3.3) für 20 min bei 37°C und anschließend für 20 min bei 56°C mit 0,2 U alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 0,2 U alkalischer Phosphatase und einer wiederholten Inkubation des Ansatzes unter den oben beschriebenen Bedingungen ließ sich die Ausbeute an dephosphorylierten DNA-Enden erhöhen.

Nach der Dephosphorylierung wurde die DNA-Lösung entweder mit PCI extrahiert und die DNA gefällt (4.2.3.1), oder der gesamte Reaktionsansatz auf ein präparatives Agarosegel zur Isolierung der DNA-Fragmente aufgetragen (4.2.4.2).

4.2.5.4 Phosphorylierung der 5'-Enden von PCR-Produkten

Da die 5'-Enden synthetischer Oligonukleotide und daher auch die mit ihnen erzeugten PCR-Produkte keine Phosphatgruppen besitzen, erfolgt die Klonierung dieser PCR-Produkte weniger wirkungsvoll. Zudem ist das Einfügen dieser PCR-Produkte in linearisierte und dephosphorylierte Vektoren nicht durchführbar. PCR-Amplifikate wurden daher mit der T4-Polynukleotidkinase behandelt, um die 5'-DNA-Enden vor der Ligation zu phosphorylieren. Durchgeführt wurde diese Reaktion in T4-Polynukleotidkinasepuffer (3.3) mit 1 mM ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase für 30 min bei 37°C in einem

Gesamtvolumen von 25 µl. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine Inkubation bei 70°C für 10 min.

4.2.5.5 Ligation von DNA-Molekülen

Das Einfügen einer cDNA in einen linearisierten Vektor wird durch die DNA-Ligase ermöglicht, die in der Lage ist, 5'-phosphorylierte und 3'-hydroxylierte DNA-Enden unter Bildung einer Phosphodiesterbindung miteinander zu verknüpfen. Für die Ligation wurden ausschließlich durch PCI-Extraktion (4.2.3.1) oder über Silicagelmatrices (4.2.1.2) aufgereinigte DNA-Fragmente eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in Ligasepuffer (3.3) mit einer Vektorkonzentration von etwa 20 ng/µl und einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss des einzubauenden DNA-Fragments in einem Volumen von 15 µl. Bei der Ligation von glatten Enden („blunt ends“) wurden 20 U T4 DNA-Ligase eingesetzt und über Nacht bei 12°C inkubiert. Wurden kohäsive Enden („sticky ends“) verknüpft, so wurden 4 U T4 DNA-Ligase eingesetzt und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C ligiert. Mit der Hälfte der Ligationsansätze erfolgte dann die Transformation kompetenter *E. coli* (4.1.3).

4.2.6 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion bietet eine einfache Möglichkeit, um DNA-Segmente *in vitro* spezifisch zu vervielfältigen. Sie wird eingeleitet, indem man die als Matrize dienende, denaturierte DNA mit DNA-Polymerase und zwei Primern inkubiert. Während der multiplen Zyklen erfolgt dann die Synthese der komplementären Stränge.

Die PCR-Ansätze enthielten 20 ng Plasmid-DNA als Matrize, 50 pmol von jedem Primer, 200 mM von jedem Nukleotid und 2 U der thermostabilen Vent-DNA-Polymerase. Ausgeführt wurde die Reaktion in Vent-PCR-Reaktionspuffer (3.3) in einem Reaktionsvolumen von 100 µl. Jeder Reaktionsansatz wurde vor dem Reaktionsstart im Thermocycler mit Paraffinöl überschichtet, um den Flüssigkeitsverlust durch Verdampfen und die dadurch bedingten Konzentrationsveränderungen im PCR-Ansatz zu mindern.

Der Thermocycler war so programmiert, dass die DNA zuerst für 3 min bei 95°C denaturiert und dann in 25 bis 30 Zyklen amplifiziert wurde.

Der verwendete Programmzyklus war:

Denaturierung:	1 min bei 95°C
Anlagern der Primer:	2 min bei 60 bis 65°C
Polymerisation:	2 min bei 72°C

Abschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 72°C bevor die Reaktion schließlich durch eine Abkühlung auf 4°C gestoppt wurde. Alle aus Polymerase-Kettenreaktionen hervorgegangenen Sequenzen wurden nach der Klonierung durch DNA-Sequenzierung überprüft.

4.2.6.1 PCR-Mutagenese

Das Einbringen von Mutationen in kodierende DNA-Sequenzen erfolgte unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion. Hierbei trugen die als Primer verwendeten Oligonukleotide die geänderten Sequenzen. Im Anhang (7.1) sind die verschiedenen Mutagenese-Schemata dargestellt. Alle mutierten Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

4.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

4.3.1 Kultivierung und Konservierung von Zellen

4.3.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung adhärent wachsender Zellen erfolgte entweder mit DMEM (für HEK293-Zellen) oder DMEM-F12 (für LoVo-Zellen) als Zellkulturmedium. Durch den Zusatz von 10% (v/v) fötalem Kälberserum sowie 2 mM Glutamin und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) wurden die Medien vervollständigt. Die Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% wassergesättigter Luft in einem Zellkulturbrutschrank inkubiert. In Abhängigkeit des Zellwachstums wurden annähernd konfluente Kulturen etwa alle zwei bis vier Tage umgesetzt. Alle Arbeiten erfolgten in einer Sterilwerkbank der Sicherheitsstufe 2, nachdem die verwendeten Geräte vor dem Einbringen mit 80% (v/v) Ethanol desinfiziert worden waren. Daneben wurden alle Materialien und Lösungen, die mit den Zellen in Berührung kamen, durch geeignete Methoden sterilisiert. Dies erfolgte durch Autoklavieren (30 min, 121°C), Filtration (Porengröße 0,2 µm) oder trockene Hitze (4 h, 180°C, bei Glasmaterialien).

4.3.1.2 Passagieren von Zellen

Zur Passage von adhärent wachsenden Zellen wurden diese von der Kunststoffoberfläche der Gewebekulturschalen abgelöst und nach dem Verdünnen auf neuen Kulturschalen ausgesät. Dazu wurde das verbrauchte Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette

abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 5 ml PBS (3.3) gewaschen. Da die Proteine, mit deren Hilfe sich die Zellen am Substrat anheften, durch Calcium- und Magnesium-Ionen stabilisiert werden, wurde Trypsin in Kombination mit EDTA eingesetzt. Das Trypsin hat dabei die Aufgabe, die Adhäsionsproteine zu spalten, während EDTA alle zweiwertigen Kationen bindet. Die abgelösten Zellen wurden dann mit 5 ml Kulturmedium verdünnt und bei 800 rpm für 5 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml frischem DMEM-Komplettmedium resuspendiert und in geeigneten Verdünnungen auf neue Kulturschalen verteilt.

4.3.1.3 Kryokonservierung

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden nur die Zellen eingefroren, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Sie wurden vorher besonders sorgfältig auf Kontaminationen untersucht. Zum Einfrieren wurden die Zellen in einer Lösung suspendiert, die neben dem Kulturmedium einschließlich 10% (v/v) FCS noch 10% (v/v) DMSO als Gefrierschutzsubstanz enthielt. Die Gefrierschutzsubstanz hat dabei die Funktion, den Wassergehalt der Zellen zu reduzieren. DMSO ist ein kleines Molekül, das fettlöslich ist und deshalb durch Diffusion schnell in die Zelle gelangt. In Gegenwart von DMSO können sich keine Eiskristalle bilden, welche die Membranen der Zelle zerstören und damit die Lyse der Zellen herbeiführen würden. Zellsuspensionen (1 bis $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden in 1,5 ml-Portionen in Kryoröhrchen bei -20°C eingefroren und anschließend für 16 h bei -80°C gelagert, bevor sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Für die erneute Aussaat wurden die Zellen so schnell wie möglich aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann sofort mit dem 10-fachen Volumen des vorgewärmten Kulturmediums verdünnt und in Gewebekulturschalen ausgesät. Zellkulturen erholen sich in unterschiedlicher Weise vom Einfrieren in flüssigem Stickstoff, deshalb wurden die aufgetauten Kulturen noch einige Tage genau beobachtet, bevor sie für Experimente oder Transfektionen verwendet wurden.

4.3.2 Zellzahlbestimmung

Wurden bei Experimenten mehrere Zellkulturschalen oder Zell-Linien eingesetzt, so wurde die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die Aussaat gleicher Mengen an Zellen sichergestellt. Zur Bestimmung der Zellzahl einer fast konfluenten Kulturschale wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (3.3) von der Kunststoffoberfläche abgelöst, in ein mit 5 ml Zellkulturmedium befülltes 15 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (800 rpm, 5 min, RT, Tisch-zentrifuge). Das Zellpellet wurde

dann in 10 ml Zellkulturmedium suspendiert. Zum Auszählen wurden einige Mikroliter dieser Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Grundfläche des Zählrasters dieser Kammer besteht aus einem großen Quadrat, das 16 mittlere Quadrate enthält, die wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Gezählt wurden alle Zellen innerhalb des Zählrasters unter einem Umkehrphasenkontrastmikroskop. Aus dem Ergebnis wurde das arithmetische Mittel für die Zellzahl innerhalb eines mittleren Quadrats gebildet und mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro Milliliter zu erhalten. Den ermittelten Zellzahlen liegen jeweils Doppelbestimmungen zugrunde.

4.3.3 Transfektion adhärenter Zellen

Die stabile Expression von Proteinen in HEK293-Zellen konnte durch die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion erreicht werden. Sie beruht auf der Aufnahme von DNA-Calciumphosphat-Aggregaten durch Endozytose.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer geeigneten Verdünnung auf Gewebekulturschalen ausgesät, so dass sie sich am Tag der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und noch genügend Platz für zwei weitere Tage Wachstum nach der Transfektion vorhanden war. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette entfernt und durch das Transfektionsmedium ersetzt. Das Transfektionsmedium für eine 10-cm-Kulturschale enthielt 10 µg Expressionsplasmid, das mit 750 µl Wasser, 250 µl 1 M CaCl_2 -Lösung und 1 ml BBS-Puffer (3.3) vorsichtig durchmischt und für 3 min bei RT inkubiert worden war. Zur Vervollständigung des Transfektionsmediums folgte die Zugabe von 8 ml ME-Medium (3.1.4). Die Zellen wurden mit dem vervollständigtem Transfektionsmedium vorsichtig überschichtet und für 4,5 h bei 37°C in einer Atmosphäre von 3% CO_2 und 97% wassergesättigter Luft belassen. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen für 3 min mit 5 ml 10% (v/v) Glycerin in PBS behandelt. Danach wurde der Zellrasen zweimal mit PBS (3.3) gewaschen und die Zellen in Zellkulturmedium (3.3) für zwei Tage weiterkultiviert.

Für die stabile Proteinexpression wurde dem Zellkulturmedium 24 h nach der Transfektion die betreffende Selektionssubstanz hinzugefügt. Zur Selektion mit G418-Sulfat wurde das Medium in den ersten drei Wochen nach der Transfektion auf 1 mg G418/ml eingestellt. Die Selektion durch Hygromycin B erfolgte mit einer Konzentration von 600 µg/ml im Zellkulturmedium.

4.3.4 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Eine stärkere Anheftung von Zellen an eine Kulturschale kann durch eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin erzielt werden. Hierdurch wird die Durchführung von Experimenten erleichtert, bei denen das Zellkulturmedium gewechselt und der Zellrasen gewaschen werden muss. Zur Beschichtung von 10-cm-Schalen wurden diese mit 4 ml Poly-L-Lysinlösung (3.3) befüllt und für 30 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank inkubiert. Die Lysinlösung wurde anschließend abgenommen und die Kulturschale zweimal mit jeweils 5 ml PBS (3.3) gewaschen. Beschichtete Kulturschalen konnten entweder umgehend verwendet oder unter der Sterilbank getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Beschichtung von 6-cm-Schalen erfolgte mit 3 ml Poly-L-Lysinlösung in gleicher Weise.

4.4 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Zum Nachweis von Zelloberflächenproteinen wurde das membranundurchlässige Biotinylierungsreagenz EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin eingesetzt. Es vermittelt die Übertragung von Biotin auf primäre Amine und reagiert überwiegend mit der ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin sowie mit endständigen Aminogruppen von Proteinen.

Für die Biotinylierungsreaktion wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten (4.3.4) 10-cm-Schalen ausgesät. Zunächst wurde der Zellrasen der nahezu konfluent bewachsenen Kulturschalen, nach dem Entfernen des Mediums, zweimal mit 5 ml kaltem PBS (3.3) gewaschen und dann mit 8 ml Biotinylierungslösung (0,4 mg/ml EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin in kaltem PBS) überschichtet. Anschließend folgte die Inkubation der Zellen für 30 min bei 4°C in dieser Lösung. Zur Abreaktion des restlichen, nicht reagierten Biotinylierungsreagenz wurden die Zellen dreimal mit 10 ml TBS (3.3) gewaschen und mit 1 ml TBS unter Verwendung eines Zellschabers geerntet. Nach Zentrifugation für 3 min bei 3000 rpm (4°C, Tischzentrifuge) wurden die Zellen in 1 ml Imidazol-Lysispuffer (3.3) resuspendiert. Während einer Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte die Lyse der Zellen. Nachdem Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile durch eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4°C entfernt worden waren, konnte der Überstand für die Immunpräzipitation mit dem monoklonalen anti-HA Maus-Antikörper 16B12 (4.7.2) eingesetzt werden. Biotinylierte Proteine wurden anschließend während einer Inkubation (10 min, RT, unter Schütteln) mit 100 μ l Glycinlösung (3.3) von der Protein A-Sepharose und den Antikörpern getrennt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Eluate wurden nach der Zusammenführung mit 2 bis 3 μ l 3 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Vier Fünftel der Probe wurden nun mit 100 μ l Streptavidin-Sepharose versetzt und für 2 h bei

4°C unter Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe bei 2700 g und 4°C für 5 min, wurde die Streptavidin-Sepharose zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 80 µl 2 x SDS-Proteinauftragspuffer (3.3) versetzt. Die Elution der gebundenen biotinylierten Proteine erfolgte durch Inkubation für 5 min bei 100°C. Das verbliebene Fünftel wurde direkt mit 80 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min gekocht. Bis zum Auftragen auf ein 10% (v/v) SDS-Polyacrylamidgel (4.7.5) wurden die Proben bei -20°C gelagert. Zur Analyse wurden sie einem Western-Blot (4.7.6) und nachfolgender Detektion mit dem polyklonalen anti-HA Kaninchen-Antikörper (Y-11) als Zweitantikörper unterzogen (4.7.6.2).

4.5 Deglykosylierung

4.5.1 Membranpräparation zur Deglykosylierung von ADAM10

Die adhärennten Zellen einer Kulturschale wurden zweimal mit 5 ml PBS (3.3) gewaschen, bei Raumtemperatur mit 1 ml 1 mM EDTA in PBS unter Verwendung eines Zellschabers von der Oberfläche gelöst und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm (RT, Tischzentrifuge) wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 1 ml kaltem Puffer A (3.3) suspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in einem Glashomogenisator durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen des Pistills auf Eis homogenisiert und anschließend für 20 min bei 14000 rpm und 4°C in der Tischkühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthielt, wurde verworfen. Das Membransediment wurde in 1 ml kaltem Puffer B (3.3) suspendiert und erneut homogenisiert. Durch die folgende Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm und 4°C in der Tischkühlzentrifuge wurde das Homogenat pelletiert. Die Membranen wurden schließlich in 100 µl 1% (w/v) SDS / 2% (v/v) β-Mercaptoethanol für 10 min bei 95°C im Heizblock inkubiert und dabei sowohl gelöst als auch denaturiert.

4.5.2 Deglykosylierung von ADAM10

Umfang und Geschwindigkeit der Deglykosylierung hängen in hohem Maße von den Inkubationsbedingungen ab. Durch die Denaturierung der Glykoproteine mit 1% (w/v) SDS lässt sich die Deglykosylierungsrate erhöhen. Bei Verwendung der Endoglykosidase H muss jedoch darauf geachtet werden, dass der SDS-Gehalt der Ansätze 0,02% (w/v) nicht übersteigt, da ansonsten eine Inaktivierung des Enzyms eintreten kann.

β -Mercaptoethanol wurde den Proben zugesetzt, da es die Aktivität der Endoglykosidase H gegenüber Glykoproteinen mit inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken stark erhöht.

Um zu verhindern, dass die N-Glykosidase F durch SDS gehemmt wird, ist die Zugabe eines zweiten Detergens notwendig, bevor N-Glykosidase F zugegeben wird. Dieses Detergens sollte in fünf bis zehnfachem Überschuss, bezogen auf die SDS-Konzentration, vorliegen. Zu diesem Zweck wurde den N-Glykosidase F-Ansätzen Nonidet-P40 hinzugefügt.

Die N-Glykosidase F spaltet alle Typen asparagingebundener N-Glycanketten, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen und dass das Oligosaccharid eine bestimmte Mindestgröße aufweist. Die Reaktionsprodukte sind Ammoniak, Asparaginsäure (in der Peptidkette) und das komplette Oligosaccharid. Der Reaktionsmechanismus unterscheidet sich von dem der Endoglykosidase H, die im Gegensatz dazu die glykosidische Bindung zwischen den beiden N-Acetylglucosamin-Molekülen spaltet. Daneben unterscheiden sich die beiden Enzyme im pH-Optimum, denn im Gegensatz zur Endoglykosidase H, die bei pH 5-6 die höchste Aktivität besitzt, liegt das pH-Optimum der N-Glykosidase F bei pH 7-9. Aufgrund dieser Unterschiede mussten die Deglykosylierungen in verschiedenen Puffern durchgeführt werden, um für die jeweilige Glykosidase optimale Reaktionsbedingungen sicherzustellen.

4.5.2.1 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F

In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 50 μ l des zweifach konzentrierten Deglykosylierungspuffers (3.3, pH 7,5) und 40 μ l Wasser vorgelegt. Danach wurden dem Ansatz 5 μ l der in 1% (w/v) SDS / 2% (v/v) β -Mercaptoethanol gelösten Membranen und 5 μ l (5 U) N-Glykosidase F zugefügt. Die Reaktion verlief in einem Gesamtvolumen von 100 μ l für 15 h bei 37°C im Wasserbad. Um den gesamten Ansatz auf ein NuPAGE (4-12%) Gradientengel auftragen zu können, musste eine Aufkonzentrierung der Proteinprobe durch eine Chloroform-Methanol-Fällung (4.5.3) erfolgen.

4.5.2.2 Deglykosylierung mit Endoglykosidase H

Diese Reaktion erfolgte in 50 mM NaOAc-Puffer bei einer SDS-Konzentration von 0,02% (w/v). Dazu wurden zunächst 83 μ l Wasser mit 5 μ l 1 M NaOAc pH 5,2 versetzt und gut durchmischt. Es folgte die Zugabe von 2 μ l der in 1% (w/v) SDS / 2% (v/v) β -Mercaptoethanol gelösten Membranen und von 10 μ l (10 mU) Endoglykosidase H. Zur Deglyko-

sylierung wurde der Ansatz (Gesamtvolumen 100 μl) für 15 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Auch hier musste eine Aufkonzentrierung durch eine Chloroform-Methanol-Fällung (4.5.3) durchgeführt werden, um die Probe vollständig auf ein NuPAGE (4-12%) Fertiggel auftragen zu können.

4.5.3 Chloroform-Methanol-Fällung von Proteinen

Diese Methode diente zur Aufkonzentrierung der Deglykosylierungsansätze. Gleichzeitig wurden Lipide, Detergenzien und Salze, die bei der anschließenden SDS-PAGE stören würden, abgetrennt. Zu 100 μl des Deglykosylierungsansatzes wurden 400 μl Methanol hinzugegeben und gut durchmischt. Es folgte die Zugabe von 100 μl Chloroform und, nach kräftigem Durchmischen, die Zugabe von 300 μl Wasser. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze nach dem Durchmischen für 2 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proteine präzipitierten dabei an der Phasengrenze. Der Überstand wurde verworfen und die im Reaktionsgefäß verbliebene Lösung mit 400 μl Methanol versetzt. Nach kräftigem Durchmischen der Probe wurde erneut für 2 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proteine wurden hierbei pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Das trockene Proteinpellet wurde in 20 μl SDS-Probenpuffer (3.3) für 10 min bei 95°C in erhitzt und so in Lösung gebracht. Die Proben der Deglykosylierungsansätze wurden anschließend einer Western-Blot-Analyse (4.7.6) unterzogen. Die dazu notwendige Gelelektrophorese (4.7.5) erfolgte mit einem 4-12% Fertiggel (NuPAGE) in MOPS-Puffer, um eine optimale Auftrennung der Proteine im Bereich von 50-90 kDa zu erzielen. Die angelegte Spannung betrug konstant 100 V.

4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen wurde der Bradford-Protein-Assay-Kit (3.1.2) verwendet. Die Proteinproben wurden dafür auf 50% (v/v) Ameisensäure in einem Volumen von 100 μl eingestellt. Parallel dazu wurden 50% (v/v) Ameisensäure als Nullwert und die Standards mit 2, 4, 6, 8 und 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ BSA ebenfalls in 50% (v/v) Ameisensäure angesetzt. Anschließend wurden sowohl die Proben als auch die Standards mit 900 μl Bradford-Färbereagenz (1:5 verdünnt) vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gemessen wurde zunächst die Absorption der Standards in Acryl-Halbmikroküvetten bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen die Nullprobe. Nach der Messung der Proteinproben konnte durch Vergleich mit der Eichgeraden die Protein-

konzentration ermittelt werden. Den gewonnenen Ergebnissen liegen jeweils Dreifachbestimmungen zugrunde.

4.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

4.7.1 Nachweis membranständiger Proteine eukaryontischer Zellen

Die Zellen einer nahezu konfluent bewachsenen Kulturschale wurden einmal mit 5 ml PBS (3.3) gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers in 5 ml PBS geerntet und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur wurden die Zellen sedimentiert. Nachdem sie in 1 ml Puffer A (3.3) suspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt worden waren, erfolgte die Lyse durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C, Tischzentrifuge) sedimentierten die Membranen einschließlich der membranständigen Proteine und anderer, unlöslicher Bestandteile. Der Überstand enthielt lösliche Proteine und wurde verworfen. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml Puffer A gewaschen und anschließend in 400 µl SDS-Probenpuffer (3.3) für 10 min gekocht. Bis zur Durchführung der Western-Blot-Analyse (4.7.6) wurde die Proteinprobe bei -20°C gelagert.

4.7.2 Immunpräzipitation von ADAM10

Die Zellen einer 10-cm-Schale wurden in 5 ml PBS mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 3 min bei 1500 rpm (RT, Tischzentrifuge) pelletiert. Zur Entfernung des restlichen Kulturmediums wurden die Zellen zweimal durch Resuspension in PBS und anschließender Zentrifugation (s.o.) gewaschen und in 1 ml Imidazol-Lysispuffer (3.3) mit 1 mg/ml proteinasefreiem BSA und Proteinaseinhibitoren (complete mini) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte für 1 h unter Rotieren bei 4°C. Anschließend wurde der Zelldebris durch eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm (4°C, Tischzentrifuge) sedimentiert. Zum Entfernen von Proteinen, die unspezifisch an Protein A-Sepharose binden, wurde der Überstand mit 100 µl 10% (w/v) Protein A-Sepharose für 1 h bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Die verwendete Protein A-Sepharose wurde einen Tag zuvor in Imidazol-Lysispuffer (3.3) mit 1 mg/ml proteinasefreiem BSA und Proteinaseinhibitoren vorgequollen. Nach Sedimentation der Protein A-Sepharose durch eine Zentrifugation für 4 min bei 4000 rpm und 4°C erfolgte die Präzipitation der ADAM10-Proteine aus dem Überstand mit 100 µl 10% Protein A-Sepharose und 10 µg 16B12 anti-

HA Maus-IgG für 15 h bei 4°C unter Rotieren. Die Protein A-Sepharose wurde anschließend sechsmal mit je 1 ml Imidazol-Lysispuffer gewaschen, wobei der Lysispuffer in den ersten drei Waschsritten 1 mg/ml proteinasefreies BSA enthielt. Durch eine Zentrifugation für 4 min bei 4000 rpm (4°C, Tischzentrifuge) wurde die Protein A-Sepharose nach jeder Waschung sedimentiert. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Elution der Proteine durch Kochen der Protein A-Sepharose für 10 min in Proteinauftragspuffer (3.3). Die Proben wurden anschließend zum Pelletieren der Sepharose kurz bei 14000 rpm zentrifugiert und bei -20°C bis zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.7.5) gelagert.

4.7.3 Nachweis von APPs α im Zellkulturüberstand

Zur Analyse der APPs α -Freisetzung transfizierter HEK293-Zellen wurden am Tag vor dem Experiment 4 000 000 Zellen jeder Zell-Linie auf Poly-L-Lysin-beschichteten (4.3.4) 10-cm-Kulturschalen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nahezu konfluenten Zellen zunächst zweimal mit je 5 ml DMEM ohne Zusätze gewaschen und mit 5 ml DMEM ohne FCS, jedoch mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 10 μ g/ml fettsäurefreiem BSA als Zusätze überschichtet. Die Sekretion von APPs α ins Zellkulturmedium erfolgte während einer Inkubation der Zellen für 4 h im Brutschrank. Danach wurde das Zellkulturmedium zum Entfernen eventuell vorhandener Zellen für 10 min bei 3000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und bis zur nachfolgenden Proteinfällung auf Eis gelagert.

Zur Kontrolle der für die Proteinsekretion eingesetzten Anzahl an Zellen wurde eine Proteinbestimmung des Zell-Lysats jeder Kulturschale durchgeführt. Zur Zell-Lyse wurden die Zellen mit 1 ml 50% (v/v) Ameisensäure versetzt, von der Kulturschale gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford (4.6) wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

Die Proteinfällung aus dem Zellkulturüberstand diente der Aufkonzentrierung und erfolgte mit Trichloressigsäure (TCA) als Fällungsreagenz. Zu 1500 μ l des Zellkulturmediums wurden 170 μ l kalter 100% (w/v) Trichloressigsäure (6,1 M) hinzugegeben, durch fünfmaliges Invertieren des 2 ml-Reaktionsgefäßes vermischt und für 4 min bei 14000 rpm (4°C, Tischkühlzentrifuge) zentrifugiert, um die ausgefällten Proteine zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang im gleichen Reaktionsgefäß mit dem restlichen Zellkulturmedium zweimal wiederholt. Zum Entfernen der Trichloressigsäure wurde das Proteinpellet zweimal mit -20°C-kaltem Aceton gewaschen. Dies erfolgte durch die Zugabe von jeweils 500 μ l Aceton zum Pellet und fünfmaliges Invertieren. Nach der

Zentrifugation für 4 min bei 14000 rpm (4°C, Tischkühlzentrifuge) und dem Trocknen wurde das Proteinpräzipitat in 50 µl SDS-Proteinauftragspuffer (3.3) aufgenommen, für 10 min im Heizblock gekocht und mit 2 bis 3 µl Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Bis zum Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel (4.7.5) wurden die Proben bei -20°C gelagert.

4.7.4 Nachweis des SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins im Zellkulturüberstand

Der Nachweis des SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins erfolgte durch dessen katalytische Aktivität im Zellkulturüberstand von HEK293-SEAPs/APP- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen. Als Kontrolle diente der Kulturüberstand untransfizierter HEK293-Zellen.

500 000 Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten 6-cm-Kulturschalen ausgesät und über Nacht in 4 ml Zellkulturmedium ohne Phenolrot kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) von eventuell vorhandenen Zellen befreit. 3 ml des Zellkulturüberstands wurden in ein frisches 15 ml-Röhrchen überführt und durch die Zugabe von 75 µl 1M Tris-HCl auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Vor der Durchführung der Enzymreaktion erfolgte eine Hitzeinaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase durch Erhitzen des Kulturüberstands für 15 min bei 56°C. Anschließend erfolgte die enzymatische Reaktion mit 500 µl des Zellkulturüberstands und 30 µl 0,8% (w/v) der 4-Nitrophenylphosphat-Substratlösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei einer Temperatur von 37°C. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Überführung der Proben auf Eis und die unmittelbare Zugabe von 500 µl 5 M NaOH. Als Referenz dienten 500 µl des Zellkulturüberstands, denen zuerst 500 µl 5 M NaOH auf Eis zugefügt wurden, um eine Reaktion des Reporterproteins mit dem Substrat 4-Nitrophenylphosphat zu vermeiden. Zur Vervollständigung der Referenz erfolgte dann die Zugabe des Substrats, ebenfalls auf Eis. Die Messung der Absorptionzunahme durch das entstandene 4-Nitrophenol erfolgte bei einer Wellenlänge von 389,5 nm. Alle Messwerte wurden durch eine Dreifachbestimmung erfasst.

4.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.7.5.1 Herstellung der Gele

Polyacrylamidgele lassen sich durch radikalische Polymerisation mit definierter Porengröße herstellen. Die Polymerisation der Monomere wird mit APS (3.1.1) gestartet, dabei dient TEMED (3.1.1) als Katalysator. Es entstehen Polyacrylamidketten, die durch Bisacrylamid quervernetzt sind.

Vor dem Aufbau wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurde ein Gemisch aus Acrylamid, Bisacrylamid (3.1.1) und Trenngelpuffer für zirka 15 min im Wasserstrahlvakuum entgast, um den gelösten Sauerstoff zu entfernen, da dieser die Polymerisation stören würde. Nach Zugabe von SDS, TEMED und APS wurde das Trenngel bis 1 cm unter den oberen Rand der Kammern pipettiert. Dann wurde es mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten und das Acrylamid vor Oxidation durch Luftsauerstoff zu schützen. Nach zirka 30 min war das Gel auspolymerisiert und das Butanol konnte durch Dekantieren und mehrmaligem Spülen mit dest. Wasser entfernt werden. Wasserreste wurden mit Filterpapier von der Geloberfläche abgesaugt. Analog dazu wurde das Sammelgel hergestellt. Nach der Zugabe des Polymerisationsstarters wurde es in die Apparatur gefüllt und die Taschenschablonen eingesetzt. Nach weiteren 30 min war das Gel vollständig polymerisiert.

4.7.5.2 Vorbereitung der Proben

Die Proteinproben wurden mit reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer (3.3) versetzt und für 10 min im Heizblock bei 100°C inkubiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben nochmals durchmischt und 1 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um nicht gelöste Membranbestandteile abzutrennen. Auf ein Minigel (Trenngel: 5,5 x 8,5 cm) wurden etwa 30 bis 50 µg Protein pro Geltasche aufgetragen.

4.7.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden durch das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergens SDS und das Reduktionsmittel DTT vollständig denaturiert und erhielten durch diese Behandlung eine einheitliche Oberflächenladung. Beim Anlegen einer Spannung wanderten die Proteine somit als Polyanionen in Richtung der Anode. Im großporigen Sammelgel wurden die Proben zu scharfen Banden konzentriert, die erst beim Eintritt in das Trenngel, das eine stärkere Quervernetzung aufwies, in die einzelnen Proteinbanden aufgetrennt wurden. Dies erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel. Die Elektrophorese war beendet, wenn die durch Bromphenolblau gefärbte Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Der immunologische Nachweis der betreffenden Proteine erfolgte anschließend durch eine Western-Blot-Analyse (4.7.6).

4.7.6 Western-Blot-Analyse

4.7.6.1 Elektro-Blot

Mit dieser Transfermethode wurden Proteine nach der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (4.7.5) auf eine PVDF-Membran übertragen und konnten dann durch immunologische Methoden nachgewiesen werden.

Sechs Whatman 3MM-Filterpapiere und eine PVDF-Membran wurden auf die Größe des zu blottenden Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 5 min in Methanol und anschließend zusammen mit den Filterpapieren für 15 min in Towbin-Puffer (3.3) geschwenkt. Nun wurde die Blot-Apparatur zusammengebaut. Auf die Anode der Apparatur wurden nacheinander drei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und die restlichen Filterpapiere gelegt. Luftblasen, die sich zwischen den Schichten befanden, wurden durch Rollen mit einer Glaspipette beseitigt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte dann für 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA.

4.7.6.2 Chemilumineszenz-vermittelter Proteinnachweis

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zur Sättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in 5 ml I-Block-Puffer (3.3) geschwenkt. Nach einmaligem Waschen der Blotmembran für 5 min mit I-Block-Puffer erfolgte die Erstantikörper-Reaktion während einer Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln in I-Block-Puffer. Dabei dienten die folgenden Antikörper, in den angegebenen Verdünnungen, als Primärantikörper:

anti-HA Kaninchen-IgG (Y-11, polyklonal)	gegen ADAM10-HA	1:2000 verdünnt
anti-APP Maus-IgG (6E10, monoklonal)	gegen APPs α	1:2000 verdünnt
anti-ADAM10 Kaninchen-IgG (polyklonal)	gegen endogenes ADAM10	1:2500 verdünnt
anti-TACE Kaninchen-IgG (polyklonal)	gegen endogenes TACE	1:2500 verdünnt
anti-PC7 Kaninchen-Antiserum	gegen endogenes PC7	1:1000 verdünnt
anti-Furin Kaninchen-Antiserum	gegen endogenes Furin	1:1000 verdünnt

Nach mehreren Waschungen über 1 h in 5 ml I-Block-Puffer folgte die Zweitantikörper-Reaktion. Die PVDF-Membran wurde dazu mit dem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Maus IgG- beziehungsweise anti-Kaninchen IgG-Zweitantikörper (1:8000 verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur in 8 ml I-Block-Puffer geschwenkt. Die Membran wurde dann für 1 h mit I-Block-Puffer unter mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen und anschließend fünfmal für 2 min in Assay-Puffer (3.3) geschwenkt. Dann wurde die Membran auf eine

Kunststoffolie gelegt, mit Whatman-Papier getrocknet und vollständig mit dem Substrat CDP-Star bedeckt. Nach einer Inkubation für 5 min wurde die PVDF-Membran mit Whatman-Papier trockengetupft. Die Aufnahme der Lichtemission des umgesetzten Substrats erfolgte mit Hilfe des DIANA II-Chemilumineszenz-Detektionssystems (raytest) unter Verwendung einer CCD-Kamera. Die quantitative Auswertung wurde schließlich mit dem Programm Aida Version 2.0 (raytest) durchgeführt.

4.7.6.3 Radioaktiv-vermittelte Proteindetektion

Die radioaktiv-vermittelte Proteindetektion wurde alternativ zur Chemilumineszenz-vermittelten Proteindetektion angewandt. Als Zweitantikörper diente hier ein mit dem Schwefelisotop ³⁵S-markierter anti-Maus IgG-Antikörper, der 1:300 in 5 ml I-Block-Puffer (3.3) verdünnt und für 1 h mit der PVDF-Membran inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit 5 ml I-Block-Puffer wurde die Membran getrocknet und zur Aufnahme der Radioaktivität auf eine Autoradiographieplatte gelegt. Die Auswertung erfolgte mit dem Bio-Imaging Analyzer unter Verwendung des Programms Aida Version 2.0.

5 ERGEBNISSE

5.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Reihenuntersuchung α -Sekretase-stimulierender Substanzen

Aus dem Amyloid-Vorläuferprotein entsteht durch eine zweifache Spaltung das β -Amyloid-Peptid, welches durch seine Hydrophobizität leicht aggregiert und in Gehirnen von Alzheimer-Patienten den Hauptbestandteil der β -Amyloid-Plaques bildet. Die Prozessierung des APP durch die α -Sekretase erfolgt dagegen innerhalb der β -Amyloidregion, wodurch die Bildung der A β -Peptide verhindert wird. Eine Strategie zur Verringerung der A β -Produktion ist daher die Stimulierung des nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Wegs. Die Aktivität der physiologisch relevanten α -Sekretase ADAM10 kann durch die Aktivierung der Proteinkinase C oder die Stimulierung muskarinischer Rezeptoren erheblich gesteigert werden. Die Suche nach weiteren Substanzen, die aktivierend auf die α -Sekretase ADAM10 wirken, stellt somit einen wesentlichen Beitrag zur Verringerung der A β -Produktion dar.

Auswirkungen auf die α -Sekretaseaktivität werden in der Regel durch das Spaltprodukt APPs α nachgewiesen. Dies erschwert das Auffinden ADAM10-stimulierender Substanzen insofern, als etablierte Methoden zur Detektion von APPs α , wie zum Beispiel Western-Blot-Analysen, umständlich, zeitaufwendig und teuer sind. Eine schnelle und einfache Untersuchung vieler Substanzen ist somit nicht realisierbar. Um zeitnah möglichst viele Substanzen zu analysieren, ist daher ein Verfahren notwendig, mit dessen Hilfe das freigesetzte APPs einfach, schnell, zuverlässig, sensitiv und preisgünstig bestimmt werden kann. Zur Entwicklung eines solchen Testverfahrens soll ein Reporterprotein mit der extrazellulären Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins fusioniert werden, um das freigesetzte APPs im Überstand von Zellkulturen nachweisen zu können. Ein geeignetes Reporterprotein stellt die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) aus der menschlichen Plazenta dar. Sie soll mit den 119 Aminosäuren des C-terminalen Endes des Amyloid-Vorläuferproteins vereinigt werden. Um die gemessenen Effekte leichter auf die α -Sekretase ADAM10 zurückführen zu können und die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen, wird das erzeugte Fusionsprotein (SEAPs/APP₁₁₉) anschließend mit ADAM10 auf einem Expressionsvektor vereinigt. Nachdem die cDNAs in HEK293-Zellen stabil zur Expression gebracht wurden, soll das freigesetzte SEAPs/APP₁₁₉ schließlich, stellvertretend für das freigesetzte endogene APPs, durch eine Enzymreaktion der sekretierten

alkalischen Phosphatase im Zellkulturüberstand spektroskopisch nachgewiesen und quantifiziert werden.

5.1.1 Klonierung einer cDNA für ein Reporterprotein mit der cDNA der α -Sekretase ADAM10 in einen Expressionsvektor

5.1.1.1 Amplifizierung einer kodierenden DNA-Sequenz für die sekretierte alkalische Phosphatase

Der Wildtyp der sekretierten alkalischen Phosphatase aus Plazenta ist über eine der letzten 24 Aminosäuren durch einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden. Um die Freisetzung des Fusionsproteins aus der sekretierten alkalischen Phosphatase und APP₁₁₉ von der Zellmembran zu gewährleisten, muss dieser beseitigt werden. Daher wurde eine um 24 Codons verkürzte cDNA der alkalischen Phosphatase ohne GPI-Ankersequenz amplifiziert. Die Verkürzung der Enzym-cDNA ergab sich durch die bei der PCR verwendeten Primer. Außerdem wurde noch eine *Bsr*GI-Schnittstelle am 3'-Ende des PCR-Produkts eingefügt. Als Matrizen-DNA dienten 10 ng des Plasmids pSBC-2-SEAP. Die PCR erfolgte abweichend von den in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Bedingungen. Der Thermocycler wurde so programmiert, dass die DNA zuerst für 5 min bei 95°C denaturiert und dann in 27 Zyklen amplifiziert wurde. Der hier verwendete Programmzyklus war:

Denaturierung:	1 min bei 95°C
Anlagerung der Primer:	2 min bei 74°C
Polymerisation:	1,5 min bei 72°C

Abschließend erfolgte eine Inkubation für 8 min bei 72°C bevor die Reaktion schließlich durch eine Abkühlung auf 4°C gestoppt wurde. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification kits gereinigt, phosphoryliert und in den mit dem Restriktionsenzym *EcoRV*-geschnittenen und dephosphorylierten pcDNA3-Vektor eingesetzt (Klonierungsschema 7.1.1.1). Nach der Transformation von *E. coli* mit diesem Ligationsansatz wurden die aus den erhaltenen Klonen isolierten Plasmide durch analytische Restriktionen mit den Enzymen *EcoRI*, *EcoRV* und *PvuII* untersucht. Ein als positiv bestätigter Klon wurde für eine Plasmidgroßpräparation verwendet. Die Sequenz der klonierten SEAPs wurde vollständig durch DNA-Sequenzierungen überprüft.

5.1.1.2 Klonierung einer cDNA für ein Reporterprotein aus SEAPs und APP₁₁₉

Die cDNA von APP₁₁₉ in pcDNA3 wurde von Herrn Dr. Rolf Postina (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. In diesen Vektor soll die cDNA der verkürzten alkalischen Phosphatase eingefügt und dabei mit der cDNA von APP₁₁₉ fusioniert werden (Klonierungsschema 7.1.1.2). Da dieser Vektor außerdem die cDNA des grün-fluoreszierenden Proteins enthält, muss diese vor der Ligation des Vektors mit der SEAPs-cDNA entfernt werden. Mit den Restriktionsendonukleasen *XcmI*, *HindIII* und *BsrGI* konnte die cDNA des grün-fluoreszierenden Proteins zerstört und aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Nach der Auftrennung des Restriktionsansatzes in einem Agarosegel wurde das 5726 bp-Fragment des APP₁₁₉-enthaltenden Vektors isoliert.

Durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII* und *BsrGI* konnte die cDNA der verkürzten SEAP ohne Stopp-Codon aus dem Plasmid pcDNA3-SEAPs geschnitten werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der beiden entstandenen DNA-Fragmente konnte das 1588 bp-Fragment der cDNA aus dem Agarosegel isoliert werden. Anschließend erfolgte die Ligation der kohäsiven DNA-Enden des SEAPs-Fragments mit den komplementären DNA-Enden des APP₁₁₉-enthaltenden Vektors. Das entstandene Plasmid enthält die fusionierten cDNAs der verkürzten sekretierten alkalischen Phosphatase und des APP₁₁₉ und wird als pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉ bezeichnet.

Die korrekte Insertion der SEAPs-cDNA und die Integrität der Klonierungsstellen wurde durch Restriktionsanalysen mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII* und *BsrGI* sichergestellt. Im Anschluss daran wurde die Sequenz der fusionierten SEAPs/APP₁₁₉-cDNA durch DNA-Sequenzierungen vollständig überprüft.

5.1.1.3 Klonierung eines Vektors für das Reporterprotein SEAPs/APP₁₁₉ und ADAM10

Um die Proteinase ADAM10 und das SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein im gleichen Verhältnis zueinander exprimieren zu können, wurde die cDNA von HA-Epitop-markiertem ADAM10 in das SEAPs/APP₁₁₉-Plasmid kloniert (Klonierungsschema 7.1.1.3). Die cDNA von ADAM10 wurde mit den Restriktionsenzymen *NruI* und *Tth111I* aus dem pcDNA3-ADAM10-HA-Vektor geschnitten. Die beiden entstehenden Fragmente wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das 4429 bp-ADAM10-HA-Fragment aus dem Gel isoliert. Die durch eine PCI-Extraktion gereinigte ADAM10-cDNA wurde dann mit T4-DNA-Polymerase behandelt, um glatte Enden zu erzeugen und in den mit *NruI* verdauten und dephosphorylierten pcDNA3-SEAP-APP₁₁₉-Vektor einkloniert. Zur Amplifizierung der bei der Ligation entstandenen Plasmide wurden sie in *E. coli* vermehrt und danach durch eine Plasmidschnellpräparation isoliert. Die

Insertion der ADAM10-cDNA konnte durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym *Hind*III bestätigt werden.

5.1.2 Optimierung der Testbedingungen

Zunächst wurden die cDNAs von ADAM10-HA und dem Reporterprotein SEAPs/APP₁₁₉ durch eine Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK293-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3-ADAM10-HA-SEAPs/APP₁₁₉ zur Expression gebracht. Nach Selektion mit G418 wurde ein Mischklon hochgezogen. Die daraus resultierende Zell-Linie exprimiert sowohl ADAM10-HA als auch SEAPs/APP₁₁₉ stabil und wird als HEK293-ADAM10-SEAPs/APP bezeichnet. Ferner wurde als Kontrolle das Fusionsprotein SEAPs/APP₁₁₉ ohne ADAM10 in HEK293-Zellen stabil zur Expression gebracht. Diese Zell-Linie erhielt die Bezeichnung HEK293-SEAPs/APP. Der Nachweis der stabilen Expression des SEAPs/APP-Reporterproteins erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse der Zell-Lysate und der Zellkulturüberstände (Abbildung 5.1).

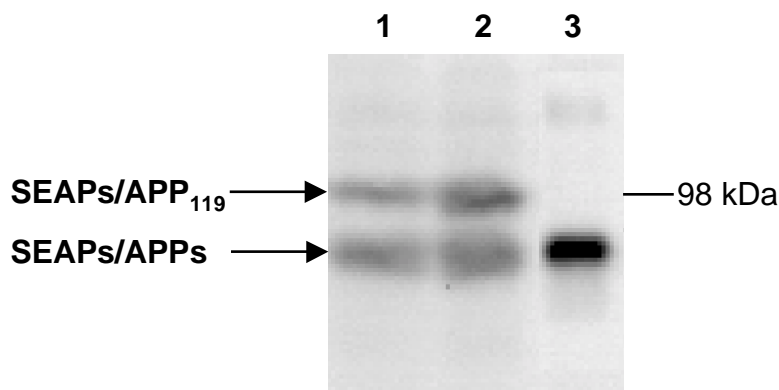


Abbildung 5.1 **Western-Blot-Analyse des stabil exprimierten SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins.** Die Proteinproben wurden in einem 8% (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach der Inkubation der Membran mit dem anti-APP Antikörper 6E10 erfolgte der Nachweis des Primärantikörpers durch Chemilumineszenz mit Hilfe eines alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Maus Antikörpers und des Western-Star Detektionssystems. **Spur 1**, Zell-Lysat von HEK293-SEAPs/APP-Zellen, **Spur 2**, Zell-Lysat von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen, **Spur 3**, Zellkulturüberstand von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen.

Die Proteine der Zell-Lysate und die aus dem Zellkulturmedium gefällten Proteine wurden dazu elektrophoretisch in einem 8% (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese mit dem APPs α -spezifischen

anti-APP-Primärantikörper 6E10 inkubiert. Der Nachweis des Erstantikörpers erfolgte durch einen alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Maus-IgG und dem Detektionssystem Western-Star (Tropix). Nach der Aufnahme des emittierten Lichts mit einer Digitalkamera wurden auf dem Western-Blot zwei Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten sichtbar. Zum Einen ist das unprozessierte, aus 627 Aminosäuren bestehende, SEAPs/APP₁₁₉ mit einem Molekulargewicht von etwa 98 kDa zu erkennen, zum Anderen kann das ins Zellkulturmedium freigesetzte, aus 544 Aminosäuren bestehende, SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 88 kDa identifiziert werden. Dies bestätigt, dass das Fusionsprotein stabil exprimiert und durch eine α -Sekretase-Spaltung ins Medium freigesetzt wird. Eine Freisetzung des Reporterproteins durch andere Proteinasen während des Tests kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Anschließend musste sichergestellt werden, dass die verkürzte sekretierte alkalische Phosphatase (SEAPs) auch als Bestandteil des Fusionsproteins enzymatisch aktiv ist. Als Substrat diente hierbei das schwach-gelbliche 4-Nitrophenylphosphat (NPP), dessen Phosphatgruppe von der alkalischen Phosphatase durch Hydrolyse entfernt wird. Das entstehende Reaktionsprodukt 4-Nitrophenol besitzt eine intensive Gelbfärbung. Die Absorptionzunahme durch die intensivere Färbung verhält sich proportional zur SEAP-Aktivität und kann photometrisch bestimmt werden. Da die Absorptionsmessung im Zellkulturüberstand erfolgen soll und das im Zellkulturmedium vorhandene Phenolrot die Absorption des Reaktionsprodukts 4-Nitrophenol überlagern würde, muss die Kultivierung der Zellen für den Test in Zellkulturmedium ohne Phenolrot erfolgen. Zur Ermittlung des Absorptionsmaximums wurde ein Absorptionsspektrum von 4-Nitrophenol in Zellkulturmedium ohne Phenolrot aufgenommen. Hieraus ergab sich, dass die maximale Absorption des 4-Nitrophenols unter diesen Bedingungen bei einer Wellenlänge von 389,5 nm liegt.

Die katalytische Aktivität des SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins wurde im Zellkulturüberstand von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen nachgewiesen, als Kontrolle diente der Kulturüberstand untransfizierter HEK293-Zellen. Die Zellen wurden über Nacht in Medium ohne Phenolrot kultiviert. Am nächsten Tag wurde dieses abgenommen, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) von eventuell vorhandenen Zellen befreit. 500 μ l des Zellkulturüberstands wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 50 μ l der 0,4% (w/v) NPP-Substratlösung versetzt, um die Reaktion zu starten. Der Reaktionsansatz wurde dann bei 30°C inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung zu erkennen war. Gestoppt werden konnte die Reaktion durch die Zugabe von NaOH. Die photometrische Vermessung der Proben ergab eine deutlich höhere Absorption in den Zellkulturüberständen der HEK293-Zellen, die mit dem

Reporterprotein transfiziert waren. Damit konnte die Freisetzung des SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein ins Zellkulturmedium bestätigt und die katalytische Aktivität der alkalischen Phosphatase als Bestandteil des Reporterproteins bewiesen werden.

5.1.2.1 Einfluss der Temperatur und der Reaktionsdauer

Die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen wird stark von der Temperatur beeinflusst. Einerseits nimmt die Aktivität mit der Temperatur zu, andererseits denaturieren Enzyme bei zu hohen Temperaturen. Durch die Optimierung dieser Parameter bei der Reaktion der alkalischen Phosphatase mit 4-Nitrophenylphosphat soll eine schnelle Durchführung des Tests bei hoher Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit sichergestellt werden.

Für die Ermittlung der geeigneten Reaktionsdauer wurden HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen auf einer 10-cm-Kulturschale über Nacht in Zellkulturmedium ohne Phenolrot kultiviert. Die Phosphatester-Spaltung durch die SEAPs erfolgte mit je 500 μ l des Zellkulturüberstands und 30 μ l 0,8% (w/v) NPP bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Gestoppt wurden die Reaktionen durch die Überführung der Proben auf Eis und die unmittelbare Zugabe von 500 μ l 5 M NaOH zu jedem Ansatz. Anschließend konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 389,5 nm gemessen werden (Abbildung 5.2).

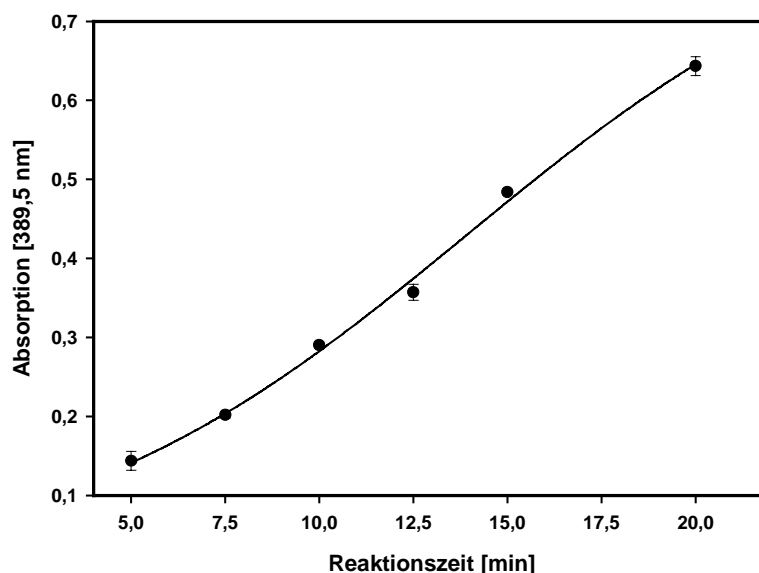


Abbildung 5.2 **Bestimmung der optimalen Reaktionsdauer.** Die Reaktionsansätze wurden für 5 bis 20 min bei 37°C mit 30 μ l 0,8% (w/v) des Substrats 4-Nitrophenylphosphat inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 500 μ l 5 M NaOH auf Eis erfolgte die Messung der Absorption bei 389,5 nm. Alle Daten sind mit Standardabweichung angegeben.

Als Referenz dienten 500 μl des Zellkulturüberstands, denen zuerst NaOH auf Eis zugefügt wurden, um eine Reaktion der SEAPs mit dem Substrat 4-Nitrophenylphosphat zu vermeiden. Zur Vervollständigung der Referenz erfolgte dann die Zugabe von 4-Nitrophenylphosphat, ebenfalls auf Eis. Jedem Messwert liegt grundsätzlich eine Dreifachbestimmung zugrunde.

Aus den Ergebnissen der Absorptionsmessung ist ersichtlich, dass die Messwerte bei kurzen Inkubationszeiten sehr niedrige Absorptionen aufweisen, was die Empfindlichkeit des SEAPs/APPs-Nachweises einschränkt. Wird die Dauer der enzymatischen Reaktion verlängert, so wird mehr Substrat umgesetzt und die Absorption in den Proben erhöht. Gleichzeitig wird die Empfindlichkeit des Tests gesteigert. Bis zu einer Inkubationsdauer von 15 min nimmt die Absorption in den Proben deutlich zu, danach ist die Absorptionzunahme etwas geringer. Um eine möglichst schnelle Durchführung des Enzymtests mit einer hohen Empfindlichkeit sicherzustellen, wurde daher für die weiteren Untersuchungen eine Inkubationsdauer von 15 min gewählt.

Die Bestimmung der geeigneten Reaktionstemperatur erfolgte analog zur Ermittlung der Reaktionsdauer. Hier wurden die Reaktionsansätze für 15 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion erfolgte der Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität durch die Messung der Absorption (Abbildung 5.3).

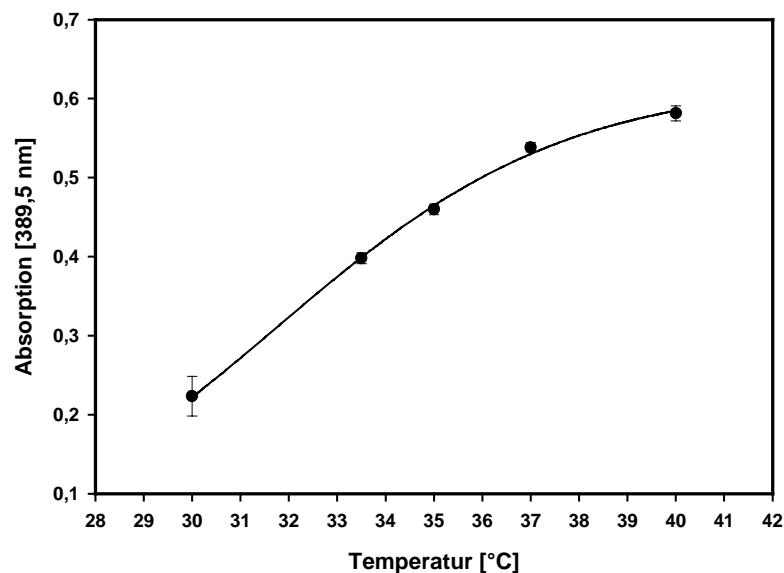


Abbildung 5.3 **Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Bestandteil des Reporterproteins.** Jeweils 500 μl des SEAPs/APPs-haltigen Zellkulturüberstands einer 10-cm-Kulturschale wurden für 15 min bei 30 bis 40°C mit 30 μl 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 μl 5 M NaOH auf Eis gestoppt und die Absorptionzunahme durch das entstandene 4-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 389,5 nm gemessen. Alle Daten sind mit Standardabweichung angegeben.

Eine deutliche Steigung der alkalischen Phosphataseaktivität ist im Temperaturbereich bis 37°C zu verzeichnen, ab dieser Temperatur steigt die Aktivität nur noch unwesentlich an. Nachfolgend wurden alle Reaktionen der sekretierten alkalischen Phosphatase bei 37°C für 15 min durchgeführt.

5.1.2.2 Einfluss des pH-Werts

Die meisten Enzyme sind nur in einem schmalen pH-Bereich aktiv, da im aktiven Zentrum vieler Enzyme ionisierbare Aminosäuren sitzen, deren Ladungszustand sich mit dem pH-Wert ändert. Zudem ändert sich die Konformation der Enzyme mit dem pH-Wert. Das pH-Optimum der sekretierten alkalischen Phosphatase liegt bei pH10, jedoch kann unter den Versuchsbedingungen die Hintergrundaktivität durch endogene alkalische Phosphatasen sehr hoch sein. Um das pH-Optimum für die enzymatische Reaktion der sekretierten alkalischen Phosphatase mit NPP als Substrat im Zellkulturmedium zu ermitteln, wurden die Kulturüberstände von HEK293- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen vor dem Start der enzymatischen Reaktion auf pH-Werte zwischen 2 und 10 eingestellt. Dies erfolgte jeweils mit 25 µl der angegebenen Puffer pro ml des Zellkulturmediums.

<u>pH</u>	<u>Puffer</u>	<u>pH</u>	<u>Puffer</u>
2,0	1 M Citrat	7,0	1 M Tris-HCl
3,0	1 M Citrat	8,0	1 M Tris-HCl
4,0	1 M Citrat	9,0	1 M Tris-HCl
5,0	1 M Acetat	10,0	1 M Caps

In den Zellkulturüberständen von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen ist bei pH-Werten unter 4 keine alkalische Phosphataseaktivität zu verzeichnen (Abbildung 5.4). Erst bei pH5 steigt die Absorption in den Proben mit der sekretierten alkalischen Phosphatase an, erreicht bei pH7 die größte Steigung und nimmt dann langsamer zu bis bei pH10 schließlich das Maximum der alkalischen Phosphataseaktivität erreicht ist.

Demgegenüber steigt die Absorption der Zellkulturüberstände von HEK293-Zellen bis zu pH8 sehr langsam an. Ab pH8 nimmt die Absorption allerdings ebenfalls stark zu und erreicht ebenfalls bei pH10 den Höchstwert. Da die sekretierte alkalische Phosphatase bereits bei pH8 eine sehr hohe Aktivität bei einem merklich geringeren Hintergrund als bei pH10 aufweist, wurden fortan alle weiteren Messungen bei pH8 durchgeführt.

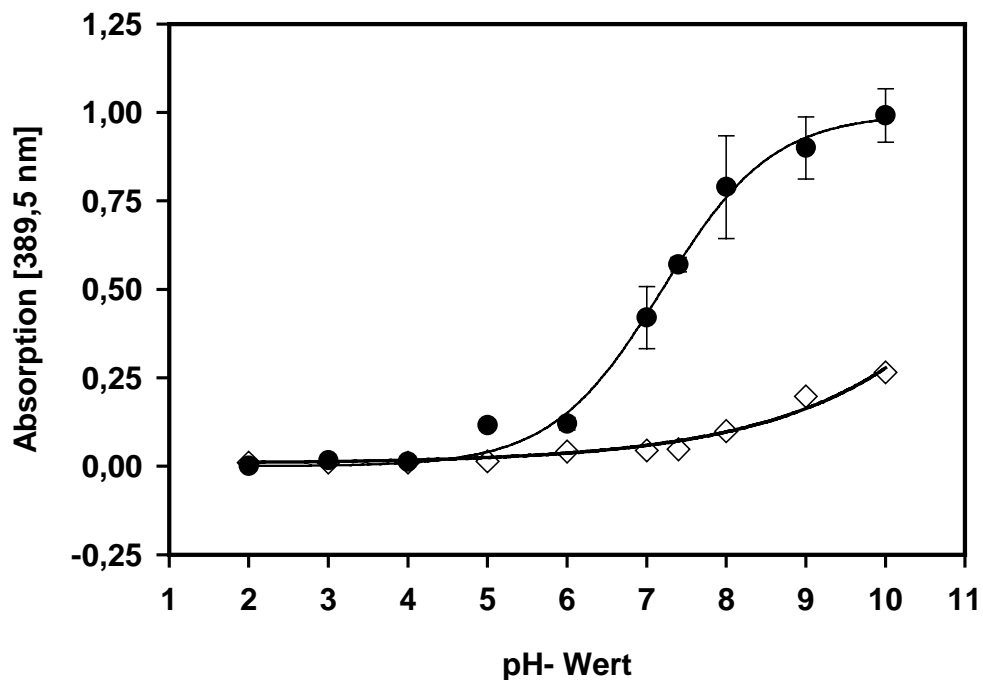


Abbildung 5.4 **Messung der SEAPs-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten des Zellkulturüberstands.** Jeweils 500 μ l des auf den jeweiligen pH-Wert eingestellten Zellkulturüberstands einer 10-cm-Kulturschale wurden für 15 min bei 37°C mit 30 μ l 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 500 μ l 5 M NaOH auf Eis erfolgte die Messung der Absorption bei 389,5 nm. Alle Messwerte sind mit Standardabweichung angegeben. Die Messwerte für HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen werden durch schwarze Kreise dargestellt, die für HEK293-Zellen durch Rauten.

5.1.2.3 Überprüfung der Linearität der enzymatischen Reaktion

Um mit diesem Test vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge der alkalischen Phosphatase und der Menge des umgesetzten Substrats bestehen. Durch die Messung der alkalischen Phosphataseaktivität in verschiedenen Verdünnungen des Zellkulturüberstands von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen wurde untersucht, ob dieser erforderliche lineare Zusammenhang gegeben ist. Dazu wurde eine 10-cm-Kulturschale dieser Zellen über Nacht mit Zellkulturmedium ohne Phenolrot kultiviert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen des Zellkulturüberstands mit Medium ohne Phenolrot hergestellt und die Enzymreaktion durch die Zugabe des Substrats gestartet. Nach Beendigung der Reaktion

erfolgte die Messung der Absorption als Maß der alkalischen Phosphataseaktivität. Durch die Auftragung der Absorption gegen die Verdünnung des eingesetzten Zellkulturüberstands wird der lineare Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reaktion und der Konzentration der sekretierten alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand veranschaulicht (Abbildung 5.5).

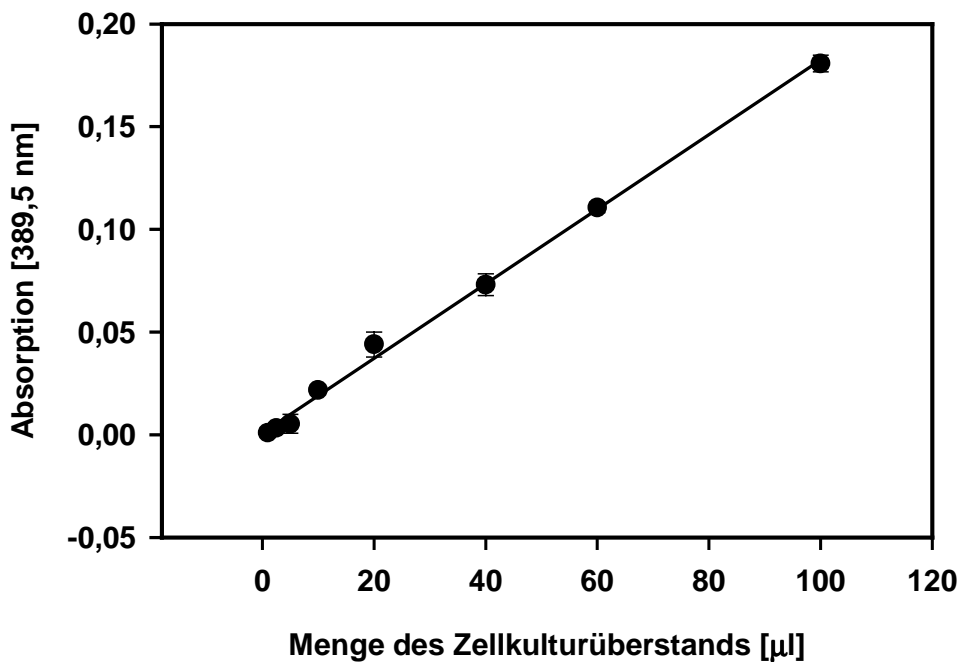


Abbildung 5.5 **Linearität der alkalischen Phosphatase-Reaktion bei niedrigen Enzymkonzentrationen.** 1, 2,5, 5, 10, 20, 40, 60 und 100 μ l des auf pH8,0 eingestellten Zellkulturüberstands von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen wurden auf 500 μ l aufgefüllt und für 15 min bei 37°C mit 30 μ l 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 500 μ l 5 M NaOH auf Eis erfolgte die Messung der Absorption bei 389,5 nm. Alle Messwerte sind mit Standardabweichung angegeben.

Um die Untersuchung auf höhere Konzentrationen der alkalischen Phosphatase auszuweiten wurde die Enzymreaktion mit weniger stark verdünnten Zellkulturüberständen durchgeführt. Nachdem die Reaktion beendet war, erfolgte die Messung der Absorptionen. Sie wurden anschließend gegen die jeweils eingesetzte Menge des Zellkulturüberstands aufgetragen. Daraus geht hervor, dass die enzymatische Reaktion auch in Bereichen höherer Enzymkonzentration linear verläuft (Abbildung 5.6).

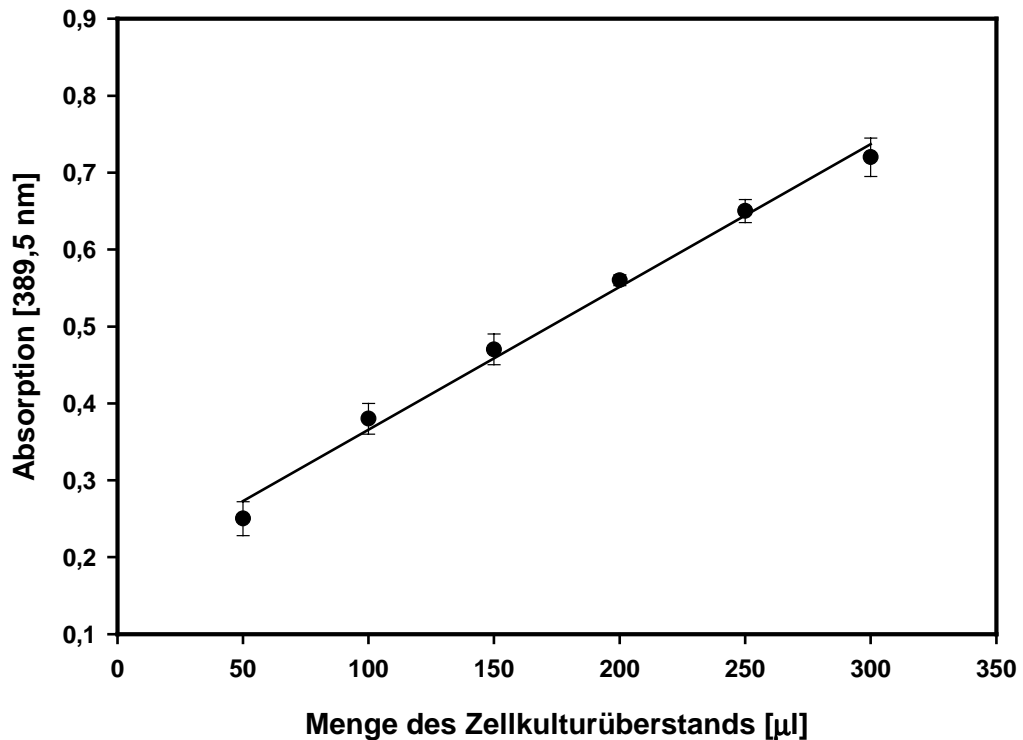


Abbildung 5.6 **Linearität der alkalischen Phosphatase-Reaktion bei höheren Enzymkonzentrationen.** 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 µl des auf pH8,0 eingestellten Zellkulturüberstands von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen wurden auf 500 µl aufgefüllt und für 15 min bei 37°C mit 30 µl 0,8% (w/v) des Substrats 4-Nitrophenylphosphat inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 500 µl 5 M NaOH auf Eis erfolgte die Messung der Absorption bei 389,5 nm. Alle Messwerte sind mit Standardabweichung angegeben.

Daneben muss ebenso eine Linearität zwischen der Zellzahl und der enzymatischen Reaktion bestehen. Um die Abhängigkeit der alkalischen Phosphataseaktivität von der Zellzahl zu untersuchen, wurden verschiedene Zellzahlen auf Poly-L-Lysin-beschichteten 6-cm-Kulturschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen für 4 h in Zellkulturmedium ohne Phenolrot. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Zellkulturüberstands für die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase mit NPP eingesetzt (Abbildung 5.7).

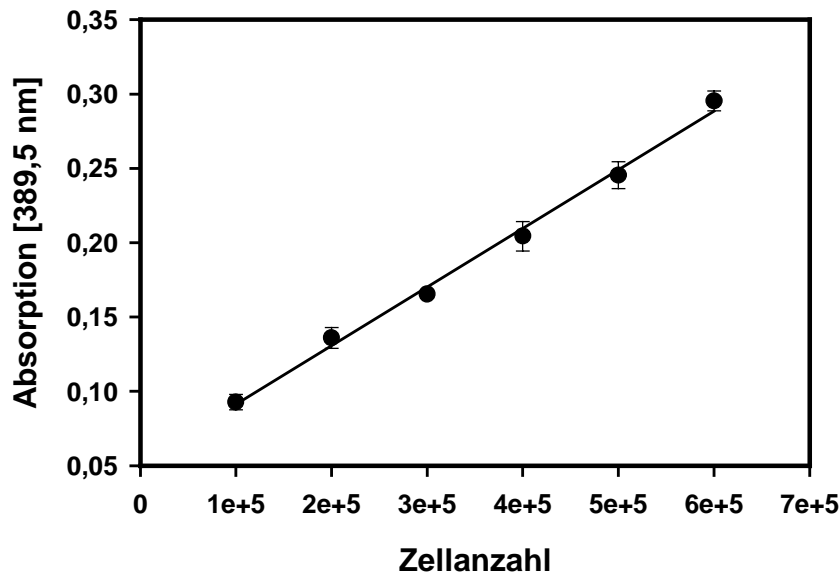


Abbildung 5.7 **Linearität der alkalischen Phosphatase-Reaktion in Abhängigkeit von der Zellzahl.** 100 000, 200 000, 300 000, 400 000, 500 000 und 600 000 HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten 6-cm-Kulturschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Die alkalische Phosphatase-Reaktion erfolgte mit je 500 μ l des auf pH8,0 eingestellten Zellkulturüberstands. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Absorption jedes Ansatzes bei 389,5 nm gemessen. Alle Daten sind mit Standardabweichung dargestellt.

Durch die Auftragung der Zellzahl gegen die Absorption der jeweiligen Probe wird der proportionale Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reaktion und der Anzahl der eingesetzten Zellen veranschaulicht. Die alkalische Phosphatase-Reaktion verläuft somit auch in Bezug auf die Zellzahl linear. Als optimal für die Durchführung des Tests erwies sich die Aussaat von 500 000 Zellen auf 6-cm-Kulturschalen. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und waren am folgenden Tag nahezu konfluent, so dass eine hohe Empfindlichkeit und eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente gegeben war. Um die angegebenen Zellzahlen zu bestätigen wurde nachfolgend Proteinbestimmungen mit den Zellen jeder Kulturschale durchgeführt.

5.1.2.4 Inhibierung der endogenen alkalischen Phosphatase

Um die Hintergrundaktivität zu minimieren und störende Einflüsse durch die endogene alkalische Phosphataseaktivität einzuschränken, soll diese durch die Verwendung des Inhibitors L-Homoarginin oder durch einen Hitzeinaktivierungsschritt unterdrückt werden. Ein Aliquot von 500 μ l des Zellkulturüberstands von HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen

wurde für 15 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Parallel dazu wurde je ein Aliquot von 500 µl des Zellkulturüberstands mit 10 mM L-Homoarginin für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Messung der alkalischen Phosphataseaktivität erfolgte im Anschluss daran (Abbildung 5.8). Alle Werte wurden durch eine Dreifachmessung erfasst.

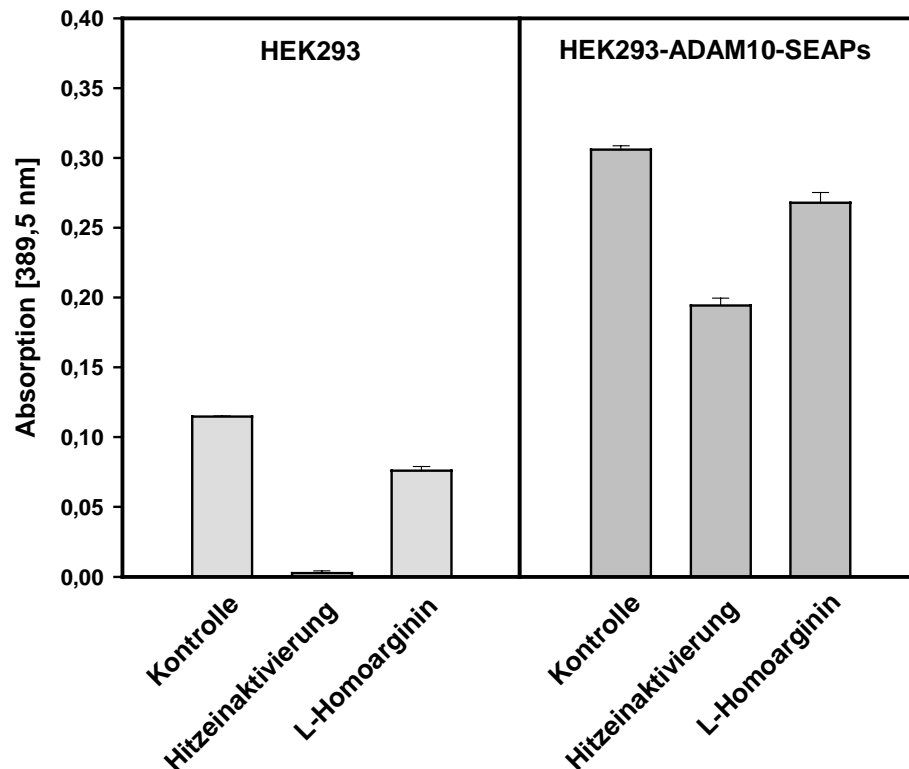


Abbildung 5.8 **Inhibierung der endogenen alkalischen Phosphatase durch Hitze und L-Homoarginin.** Vor der Durchführung der Enzymreaktion erfolgte eine Inkubation der auf pH8,0 eingestellten Zellkulturüberstände von HEK293 und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen für 15 min bei 56°C oder in Gegenwart von 10 mM L-Homoarginin bei 37°C. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase-Reaktion für 15 min bei 37°C durchgeführt und die Absorption des Reaktionsprodukts 4-Nitrophenol bei 389,5 nm gemessen. Alle Daten sind mit Standardabweichung angegeben.

L-Homoarginin unterdrückte die endogene alkalische Phosphataseaktivität in allen untersuchten Zell-Linien nur schwach. Dagegen konnte durch die Hitzeinaktivierung die endogene alkalische Phosphataseaktivität nahezu vollständig gehemmt werden, ohne die Aktivität der sekretierten alkalischen Phosphatase des Fusionsproteins merklich zu beeinträchtigen. Im Folgenden wurde daher die endogene alkalische Phosphataseaktivität der Proben vor jeder Messung durch eine Hitzeinaktivierung (15 min bei 56°C) unterdrückt.

5.1.2.5 Die Freisetzung von APPs in HEK293-SEAPs/APP- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen

Eine erhöhte Expression der α -Sekretase ADAM10 ist sowohl mit einer erhöhten konstitutiven als auch einer erhöhten stimulierten Freisetzung von APPs α verbunden. Durch die Überexpression von ADAM10 zusammen mit dem Reporterprotein sollte daher die Empfindlichkeit des Testverfahrens gesteigert werden können. Vor allem Substanzen, die auf der Proteinebene eine Stimulierung von ADAM10 bewirken, sollten hiermit entscheidend besser identifiziert werden können. Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von ADAM10 auch zu einer erhöhten Freisetzung des Reporterproteins führt, wurden die Zellkulturüberstände von HEK293-SEAPs/APP- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen auf ihre alkalische Phosphataseaktivität hin untersucht (Abbildung 5.9).

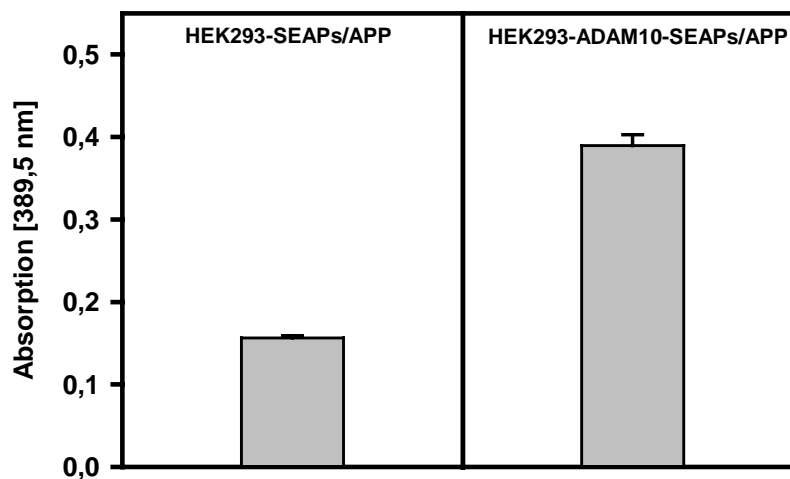


Abbildung 5.9 **Freisetzung des Reporterproteins in HEK293-SEAPs/APP- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen.** Die Zellkulturüberstände der untersuchten Zellen wurden vor der Durchführung der alkalischen Phosphatase-Reaktion auf pH8,0 eingestellt und einer Hitzeinaktivierung unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte die enzymatische Reaktion bei 37°C mit 30 μ l 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat. Nach 15 min wurde sie durch die Zugabe von 500 μ l 5 M NaOH auf Eis gestoppt. Die Messung der Absorptionszunahme erfolgte bei einer Wellenlänge von 389,5 nm. Alle Messwerte wurden durch eine Dreifachbestimmung erfasst und sind mit Standardabweichung dargestellt.

Der Vergleich zeigt, dass die Zellen, die ADAM10 überexprimieren, wie erwartet eine deutlich höhere Sekretion des Reporterproteins besitzen, als die Zellen, die nur das SEAPs-Fusionsprotein exprimieren. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in dem erhöhten Enzym-Substrat-Verhältnis der HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen, könnte

jedoch auch auf Unterschiede in der Expression des Fusionsproteins zurückzuführen sein, da auch eine höhere Expression des Fusionsproteins mit einer erhöhten, konstitutiven Freisetzung verbunden ist.

5.1.3 Die Stimulierbarkeit des SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins

Die APPs-Freisetzung lässt sich in Zellen mit muskarinischen M1-Rezeptoren durch Carbachol stimulieren und deutlich erhöhen (Nitsch *et al.*, 1992). Zudem kann die APPs-Freisetzung auch durch die Aktivierung der Proteinkinase C mit dem Phorbolster PMA erhöht werden. In dem folgenden Experiment soll gezeigt werden, dass sich das SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein genauso wie das native APP verhält und den gleichen Stoffwechselweg durchläuft. Eine durch Carbachol beziehungsweise PMA hervorgerufene vermehrte Freisetzung von SEAPs/APP₁₁₉ wäre ein Hinweis auf einen gemeinsamen Stoffwechselweg von APP und SEAPs/APP₁₁₉. Zu diesem Zweck wurden HEK293-, HEK293-SEAPs/APP- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen zunächst mit 0,1 mM und 1 mM Carbachol für 4 h inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphataseaktivität im Zellkulturüberstand bestimmt (Abbildung 5.10).

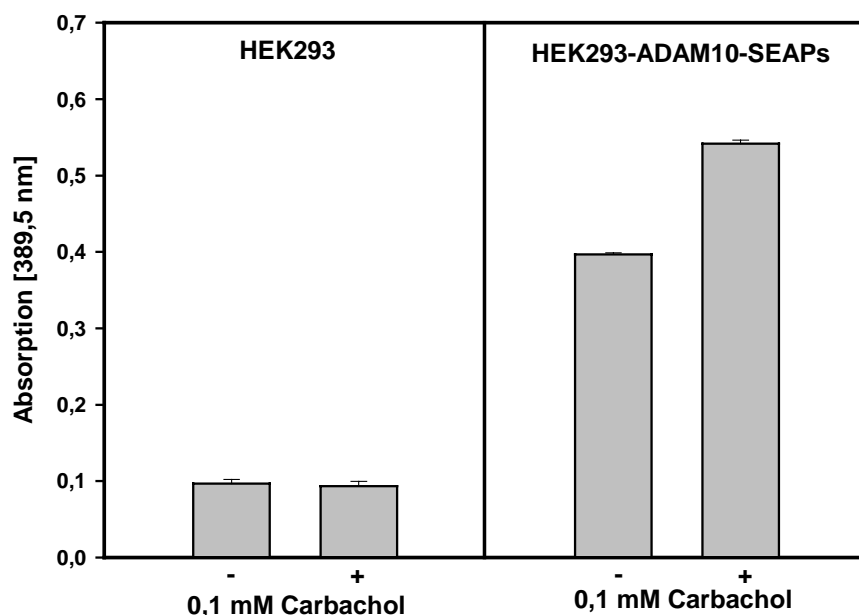


Abbildung 5.10 **Einfluss von Carbachol auf die Freisetzung des SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins.** Bevor die Enzymreaktion durchgeführt wurde, erfolgte eine Hitzeinaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase in den auf pH8,0 eingestellten Zellkulturüberständen für 15 min bei 56°C. Anschließend folgte die alkalische Phosphatase-Reaktion für 15 min bei 37°C mit 30 µl 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat als Substrat. Nachdem die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl 5 M NaOH auf Eis gestoppt worden war, erfolgte die Messung der Absorption bei 389,5 nm.

Gegenüber den nicht-stimulierten Zellen stieg die SEAPs/APP₁₁₉-Freisetzung bei den Carbachol-behandelten Zellen um etwa 25% an.

Analog zur Untersuchung der Carbachol-Stimulierbarkeit des Reporterproteins erfolgte die Ermittlung des Einflusses von PMA auf die SEAPs/APP₁₁₉-Freisetzung. In diesem Experiment wurden HEK293-, HEK293-SEAPs/APP- und HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten 6-cm-Schalen für 4 h mit 1 μ M PMA stimuliert. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der alkalischen Phosphatase im Zellkulturüberstand (Abbildung 5.11).

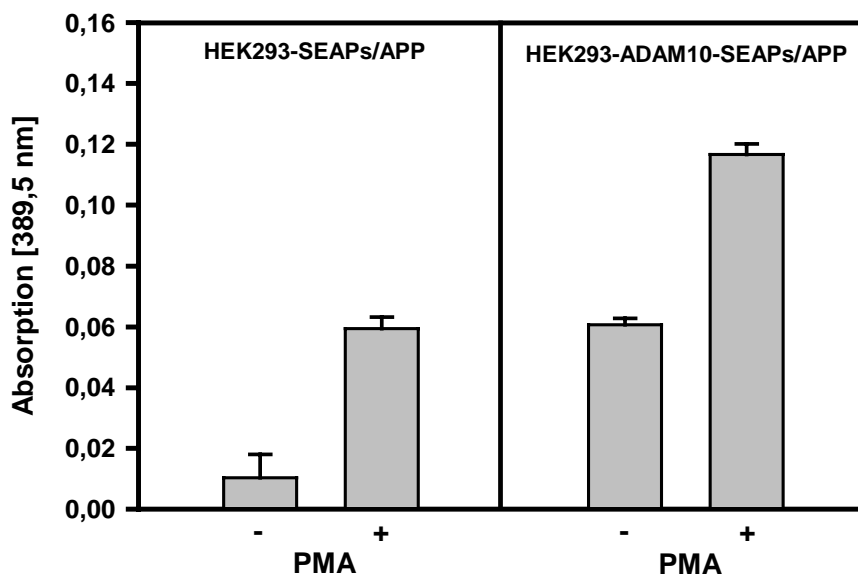


Abbildung 5.11 **Stimulierung der SEAPs/APP₁₁₉-Freisetzung durch PMA.** Vor der Durchführung der Enzymreaktion erfolgte eine Hitzeinaktivierung der auf pH8,0 eingestellten Zellkulturüberstände für 15 min bei 56°C. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase-Reaktion für 15 min bei 37°C mit 30 μ l 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat durchgeführt. Nach dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 500 μ l 5 M NaOH auf Eis erfolgte die Messung der Absorption bei 389,5 nm.

Die Aktivierung der Proteinkinase C mit PMA resultierte in einer erhöhten SEAPs/APP₁₁₉-Sekretion. Bei HEK293-SEAPs/APP-Zellen stieg die Freisetzung um etwa das Vierfache, bei HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen um etwa das Zweieinhalbfache an.

Aus den Untersuchungen der Carbachol- und PMA-Stimulierung ist ersichtlich, dass die Freisetzung des SEAPs/APP₁₁₉-Reporterproteins sowohl durch Carbachol als auch durch PMA induziert werden kann. Die Stimulierbarkeit des Fusionsprotein verhält sich somit in bezug auf die eingesetzten Stimulanzien wie die des endogenen APP.

5.1.4 Kinetik der PMA-Stimulierung

Mit Hilfe dieses Testsystems sollen die Auswirkungen der PMA-Stimulierung auf die α -Sekretase-Spaltung zeitlich aufgelöst und so der Verlauf der APPs-Freisetzung nach Aktivierung der Proteinkinase C untersucht werden. Gleichzeitig sollen Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des Tests überprüft werden.

Für dieses Experiment wurden je 300 000 HEK293-ADAM10-SEAPs/APP-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten 6-cm-Kulturschalen für verschiedene Zeitspannen mit 1 μ M PMA inkubiert. Als Kontrolle diente eine Kulturschale, der kein PMA hinzugefügt wurde. Anschließend wurde die alkalische Phosphataseaktivität im Überstand der Zellen photometrisch quantifiziert. Die Auftragung der Absorption gegen die Dauer der PMA-Einwirkung ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Innerhalb der ersten 60 min ist ein starker, linearer Anstieg der Aktivität zu verzeichnen. Nach etwa 60 min erreicht die SEAPs-Freisetzung etwa die Hälfte des Maximalwerts. Nach diesem Zeitpunkt verläuft die Steigung flacher und nähert sich nach 240 min einem Grenzwert.

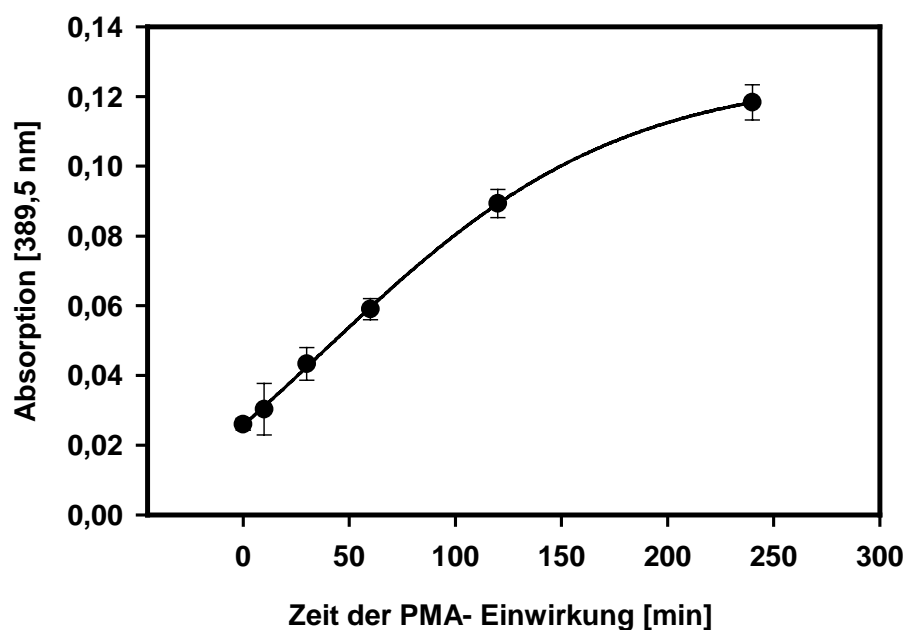


Abbildung 5.12 **Kinetik der PMA-Stimulierung.** Die Zellkulturüberstände der PMA-behandelten Zellen wurden vor der Durchführung der alkalischen Phosphatase-Reaktion auf pH8,0 eingestellt und einer Hitzeinaktivierung unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte die enzymatische Reaktion für 15 min bei 37°C mit 30 μ l 0,8% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat als Substrat. Durch die Zugabe von 500 μ l 5 M NaOH auf Eis wurde die Reaktion gestoppt. Die Messung der Absorptionzunahme durch das entstandene 4-Nitrophenol erfolgte bei einer Wellenlänge von 389,5 nm. Alle Messwerte wurden durch eine Dreifachbestimmung erfasst und sind mit Standardabweichung dargestellt.

5.2 Proteolytische Prozessierung von ADAM10

Die Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin sind an der Prozessierung vieler Vorläuferproteine beteiligt, die eine RX(K/R)R Konsensussequenz besitzen. Außerdem sind sie im *trans*-Golgi-Apparat, in sekretorischen Vesikeln und an der Zelloberfläche aktiv, so dass sie in den gleichen Kompartimenten lokalisiert sind, in denen α -Sekretaseaktivität nachgewiesen wurde. Tatsächlich konnte eine Beteiligung von PC7 an der nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Prozessierung von APP dokumentiert werden (Lopez-Perez *et al.*, 1999). PC7 wird daher als potentielle α -Sekretase in Betracht gezogen. Unwahrscheinlich ist jedoch eine direkte Spaltung von APP durch PC7 oder andere Mitglieder der Proprotein-Konvertasen, da APP an der α -Sekretase-Spaltstelle und auch in unmittelbarer Nähe keine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz aufweist. Eine solche Sequenz ist für die Prozessierung von Vorläuferproteinen durch Proprotein-Konvertasen jedoch unbedingt erforderlich.

Die Disintegrin-Metalloproteinase ADAM10 wird als Zymogen synthetisiert und besitzt sowohl α -Sekretaseaktivität als auch eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RKKR) zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne. Durch N-terminale Sequenzierung von gereinigtem ADAM10 aus Rindernieren konnte belegt werden, dass diese Sequenz als Spaltstelle dient, um die reife, katalytisch aktive Form von ADAM10 zu erzeugen (Lammich *et al.*, 1999). Eine Funktion von PC7 als pro-ADAM10-prozessierender und damit pro- α -Sekretase-aktivierender Konvertase erscheint daher wahrscheinlicher als eine direkte Spaltung des APP durch PC7. Es war deswegen erforderlich, die Prozessierung von ADAM10 in bezug auf eine mögliche Beteiligung von PC7 an diesem Vorgang zu untersuchen. Für die Proprotein-Konvertase Furin konnte ein Mitwirken an der α -Sekretase-Spaltung des APP in früheren Studien zwar nicht festgestellt werden, doch aufgrund der Ähnlichkeit zu PC7, vor allem in Hinblick auf die Substratspezifität, wurde Furin in die Untersuchung einbezogen.

5.2.1 Prozessierung von ADAM10 durch Proprotein-Konvertasen

Der synthetische Inhibitor Decanoyl-RVKR-chloromethylketon (Dec-RVKR-cmk) eröffnet die Möglichkeit, Proprotein-Konvertasen in Zellkulturen selektiv zu hemmen. Durch seine hydrophobe Alkylgruppe ist er in der Lage, in Zellen einzudringen und dort mit intrazellulären Proteinen in Wechselwirkung zu treten. Da er die Aminosäure-Erkennungssequenz von Proprotein-Konvertasen enthält, kann er kovalent an die Substratbindungsstelle binden und so die katalytische Aktivität blockieren (Garten *et al.*, 1989). Damit stellt diese Substanz ein wertvolles Werkzeug dar, um die Möglichkeit einer Prozessierung von endogenem ADAM10 durch Proprotein-Konvertasen zu überprüfen. Im

Falle einer Beteiligung von Proprotein-Konvertasen sollte die Erzeugung von reifem ADAM10 in der Gegenwart des Inhibitors merklich unterdrückt werden.

Um den Einfluss von Dec-RVKR-cmk auf die Reifung von ADAM10 zu ermitteln, wurden untransfizierte HEK293-Zellen für 48 h in der Anwesenheit von 30 μ M des Inhibitors inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Aufgrund der Instabilität von Dec-RVKR-cmk im Zellkulturüberstand war alle 6 bis 8 h ein Wechsel des Zellkulturmediums und eine erneute Zugabe des Inhibitors erforderlich. Zur Analyse der Auswirkung auf die Prodomänen-Abspaltung von ADAM10 wurden die Zell-Lysate anschließend dem Western-Blot-Verfahren unterzogen. Hieraus geht hervor, dass endogenes ADAM10 in untransfizierten HEK293-Zellen hauptsächlich in der reifen Form existiert und die Bildung des reifen Enzyms in der Gegenwart des Inhibitors deutlich verringert wird (Abbildung 5.13).

Die Vermutung, dass Proprotein-Konvertasen an der Prozessierung von ADAM10 partizipieren, wird durch dieses Ergebnis bestätigt.

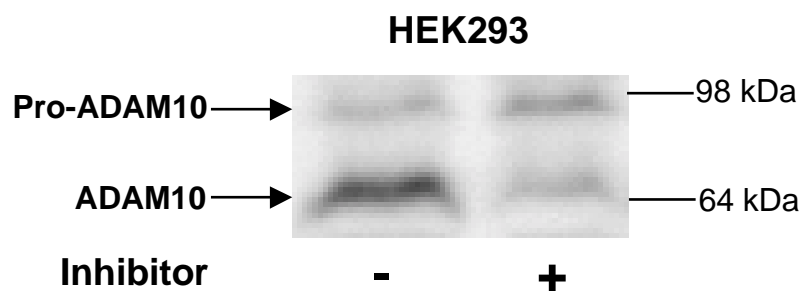


Abbildung 5.13 **Einfluss des Proprotein-Konvertasen-Inhibitors Decanoyl-RVKR-chloromethylketon auf die proteolytische Prozessierung von endogenem ADAM10.** Die Zellkulturüberstände von HEK293-Zellen wurden für 48 h auf eine Konzentration von 30 μ M des Inhibitors eingestellt. Alle 6-8 h erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums und eine erneute Zugabe des Inhibitors. Die Auftrennung der Zell-Lysate erfolgte in einem 10% (w/v) Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Inkubation mit dem Antikörper anti-ADAM10 erfolgte der Nachweis der Primärantikörper durch Chemilumineszenz mit Hilfe eines alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpers und des Western-Star Detektionssystems.

5.2.2 Proteolytische Prozessierung von ADAM10 durch PC7 und Furin

5.2.2.1 PCR-Mutagenese zur Beseitigung der Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle

Um die Sequenzanforderungen der Proteinasen, die für die Abspaltung der Prodomäne von ADAM10 verantwortlich sind, zu untersuchen, wurde die Proprotein-Konvertasen-Konsensussequenz (RKKR) zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne

durch die Aminosäuresequenz NAQA substituiert (Klonierungsschema 7.1.2). Durch diese Mutation wird diese potentielle Spaltstelle zerstört und damit für Proprotein-Konvertasen unbrauchbar.

Die PCR-Mutagenese zur Eliminierung der Erkennungssequenz wurde mit einem mutierten Oligonukleotid als Forward-Primer, einem Reverse-Primer und der cDNA von ADAM10-HA als Matrize durchgeführt. Den dafür benötigten Vektor mit der cDNA von HA-Epitop-markiertem ADAM10 aus Rind (pcDNA3-ADAM10-HA) stellte Herr Dr. Rolf Postina (Universität Mainz) zur Verfügung.

Für die Integration der mutierten ADAM10-Sequenz wurde das Plasmid pcDNA3-ADAM10-HA parallel zur PCR-Mutagenese mit dem Restriktionsenzym *Eco81I* verdaut und nachfolgend mit T4 DNA-Polymerase behandelt, um glatte DNA-Enden zu erzeugen. Durch die anschließende Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *EcoRI* (erzeugt überhängende DNA-Enden) wurde ein ADAM10-DNA-Fragment aus dem Vektor herausgeschnitten. Nach dem Auftrennen des Restriktionsansatzes auf einem 1%igen Agarosegel erfolgte die Isolierung der Vektor-DNA, die somit von der herausgeschnittenen DNA abgetrennt werden konnte. Das dabei entfernte ADAM10-DNA-Fragment konnte dann durch eine Ligation der Vektor-DNA mit dem ebenfalls *EcoRI*-behandelten PCR-Amplifikat in pcDNA3-ADAM10-HA ersetzt werden. Das entstandene Plasmid enthält HA-Epitop-markiertes Rinder-ADAM10 mit einer mutierten Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RKKR → NAQA) und wird als pcDNA3-ADAM10 Δ RKKR-HA bezeichnet.

Neben dem Sequenzaustausch wurde durch das mutierte Oligonukleotid auch eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *Fspl* eingefügt, mit deren Hilfe ein Screening nach dem mutierten Klon möglich war. Als Kontrolle auf die korrekte Insertion der durch die PCR-generierte ADAM10-Sequenz erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII*, *PstI* und *Fspl*. Zusätzlich wurde die Nukleotidsequenz dieser Mutante durch eine DNA-Sequenzierung überprüft.

5.2.2.2 Klonierung der cDNAs von PC7 und Furin in den Expressionsvektor pIRES1_{hyg}

Die cDNAs der Proprotein-Konvertasen PC7 aus Ratte im Vektor pRc/CMV und Furin aus Rind im Vektor pSG5new-bFur wurden von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Die cDNA von Furin wurde von Herrn Dr. Rolf Postina (Universität Mainz) in den Vektor pcDNA3 (pcDNA3-bFur) umkloniert und zur Verfügung gestellt.

Mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* konnte die PC7-cDNA vollständig aus dem Plasmid pRc/CMV herausgeschnitten werden. Der Restriktionsansatz wurde

dann in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, so dass nach der Isolierung aus dem Agarosegel ein 3500 bp-großes Fragment der PC7-cDNA erhalten werden konnte. Dieses wurde mit dem Enzym T4 DNA-Polymerase behandelt, um glatte DNA-Enden zu erzeugen. Zur Integration der cDNA in den pIRES1*hyg*-Vektor wurde dieser mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut und danach ebenfalls mit T4 DNA-Polymerase behandelt. Nach der Dephosphorylierung der Vektor-DNA erfolgte die Ligation mit der PC7-cDNA. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pIRES1*hyg*-rPC7. Die für die Expression benötigte Orientierung der eingefügten cDNA wurde durch Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Stu*I und *Bsp*68I sichergestellt.

Die cDNA von Furin konnte durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Hind*III und *Xho*I aus dem Vektor pcDNA3-bFur herausgeschnitten werden. Nach der Separation der DNA-Fragmente des Restriktionsansatzes in einem 1%igen Agarosegel und der Isolierung des 2881 bp-Fragments der Furin-cDNA erfolgte die Auffüllung überstehender DNA-Enden durch die T4 DNA-Polymerase. Zum Einfügen in den pIRES1*hyg*-Vektor wurde die Vektor-DNA mit dem Enzym *Bam*HI verdaut, mit T4 DNA-Polymerase behandelt und dephosphoryliert. Aus der Ligation mit der Furin-cDNA resultierte das Plasmid pIRES1*hyg*-Furin. Die korrekte Insertion wurde durch eine analytische Restriktion mit *Bam*HI verifiziert.

5.2.2.3 Auswirkung der mutierten Spaltstelle und der Überexpression von PC7 und Furin auf die Prozessierung von ADAM10

Um die Auswirkung der mutierten Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle in ADAM10 auf die proteolytische Entfernung der Prodomäne zu untersuchen, wurde die cDNA von ADAM10 Δ RKKR-HA durch eine Calciumphosphat-vermittelte Transfektion unter Verwendung des Plasmids pcDNA3-ADAM10 Δ RKKR-HA in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Für eine stabile Expression wurden die transfizierten Zellen mit G418 selektioniert. Um die Bedeutung der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin bei der Prozessierung von ADAM10 aufzuklären, wurden HEK293-, HEK293-ADAM10-HA- (Klon D3) und HEK293-ADAM10 Δ RKKR-HA-Zellen mit den cDNAs von PC7, Furin und dem ursprünglichen pIRES1*hyg*-Vektor als Kontrolle transfiziert. Da diese Zell-Linien bereits mit G418 auf eine stabile Expression von ADAM10 selektioniert worden waren, erfolgte für die stabile Expression von PC7 und Furin eine zweite Selektion der Zellen mit Hygromycin B. Aus den überlebenden Zellen der Hygromycin B-resistenten Mischklone mit den Bezeichnungen HEK293, HEK293-PC7, HEK293-ADAM10, HEK293-ADAM10-PC7, HEK293-ADAM10-Furin, HEK293-ADAM10 Δ RKKR, HEK293-ADAM10 Δ RKKR-PC7

wurden Zell-Lysate präpariert, die durch Western-Blot-Analysen auf die Expression von PC7 und Furin untersucht wurden (Abbildung 5.14).

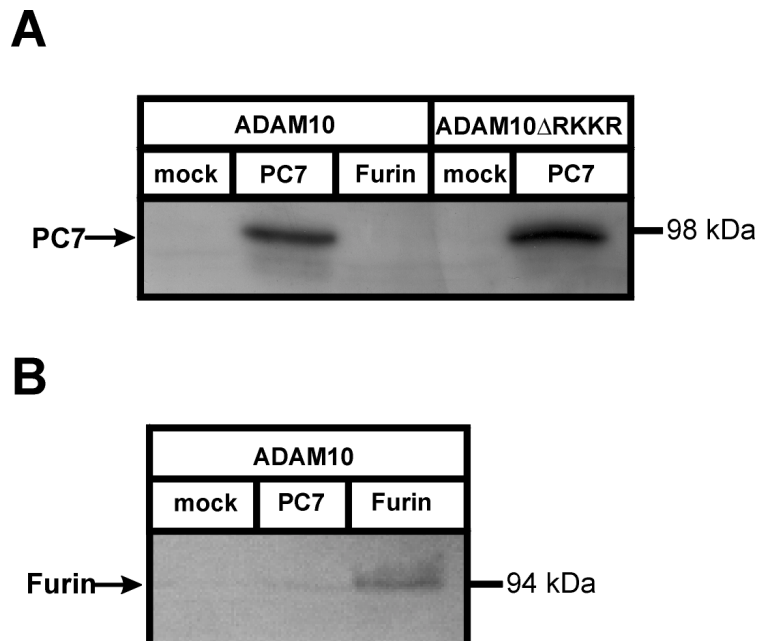


Abbildung 5.14 **Expression der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin in stabil transfizierten Zellen.** Die Zell-Lysate der transfizierten Zellen wurden in einem 10% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. **A**, Immunologischer Nachweis von PC7 mit anti-PC7 Antiserum und **B**, immunologischer Nachweis von Furin mit anti-Furin Antiserum. Der Chemilumineszenz-vermittelte Nachweis der Primärantikörper erfolgte jeweils mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper und dem Western-Star Detektionssystem von Tropix.

Die Auswirkungen der Überexpression von PC7 und Furin sowie der Effekt der mutierten Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle auf die proteolytische Prozessierung von ADAM10 wurden ebenfalls durch Western-Blot-Analysen der Zell-Lysate ermittelt (Abbildung 5.15). In den Proben der HEK293- und HEK293-PC7-Kontrollzellen sind keine Banden sichtbar, da mit dem für die Detektion verwendeten anti-HA Antikörper Y-11 nur HA-Epitop-markiertes ADAM10 nachgewiesen werden kann. Zwei spezifische Banden auf der Höhe der Molekulargewichtsstandards von ca. 90 und 64 kDa sind jedoch in den Zell-Lysaten von HEK293-ADAM10, HEK293-ADAM10-PC7 und HEK293-ADAM10-Furin erkennbar. Die obere der beiden Banden entspricht dem unprozessierten ADAM10 mit Prodomäne, die untere der prozessierten Form, also dem reifen Enzym. Auffällig sind die fehlenden Banden des reifen Enzyms und das Auftreten diffuser Banden in den Zellen, die das mutierte ADAM10 ohne der Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz exprimieren.

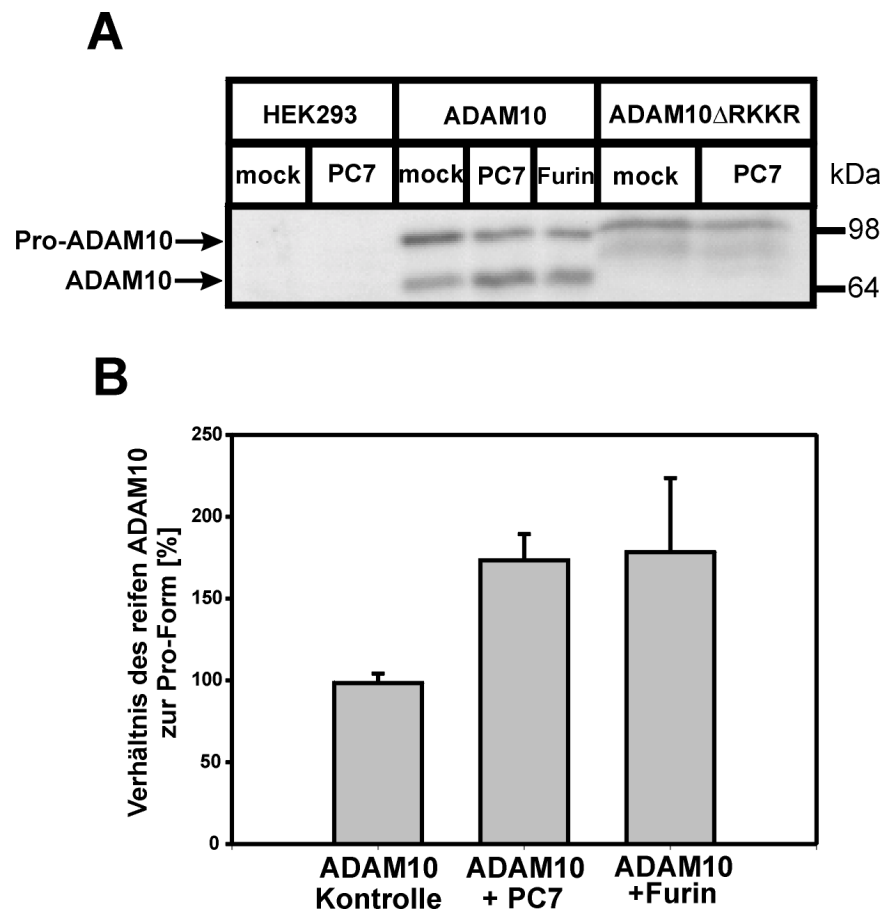


Abbildung 5.15 **Proteolytische Prozessierung von ADAM10.** **A**, Western-Blot-Analyse der Zell-Lysate. Nach dem Auftrennen in einem 10% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis des HA-Epitop-markierten ADAM10 mit dem anti-HA Antikörper Y-11. Der Nachweis des Primärantikörpers erfolgte mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper und dem Western-Star Detektionssystem von Tropix. **B**, Balkendiagramm zur quantitativen Auswertung der ADAM10-Prozessierung. Die Werte wurden durch die densitometrische Analyse der Proteinbanden des Western-Blots unter Verwendung der Software Aida 2.0 erhalten. Unprozessiertes ADAM10 ist in jeder Zell-Linie auf 100% festgelegt. Die prozessierte Form von ADAM10 ist jeweils als Verhältnis zur unprozessierten Form in Prozent angegeben. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel aus drei unabhängigen Experimenten und sind mit Standardabweichung dargestellt.

Die densitometrische Auswertung des Western-Blots offenbart erhöhte Mengen (etwa 180%) der reifen Form von ADAM10 in HEK293-ADAM10-PC7-Zellen und in HEK293-ADAM10-Furin-Zellen im Vergleich zu den HEK293-ADAM10-Kontrollzellen (Abbildung 5.15). Die Koexpression der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin zusammen mit ADAM10 bewirkt somit eine Zunahme der Prodomänen-Abspaltung bei ADAM10. Im Gegensatz dazu ist die reife Form von ADAM10 in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen nicht nachweisbar, was ein Beleg dafür ist, dass die RKKR-Erkennungssequenz für die korrekte Prozessierung des Zymogens essentiell ist. Sowohl in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-

als auch in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-PC7-Zellen können zwar schwache, diffuse Banden entdeckt werden, sie weisen allerdings ein höheres Molekulargewicht, als die prozessierte Form der Wildtyp-Proteinase, auf. Diese Banden sind daher auf verkürzte Formen des mutierten Enzyms zurückzuführen, die jedoch nicht die reife Form des Enzyms darstellen. Der Übergang der unreifen Form von ADAM10 Δ RKKR zum reifen Enzym ist somit vollständig blockiert, selbst bei einer Überexpression von PC7. In Western-Blot-Studien lässt die obere Bande der Proform von ADAM10 Δ RKKR ein etwas höheres Molekulargewicht als die Proform der Wildtyp-Proteinase erkennen. Diese Änderung des Laufverhaltens bei der Gelelektrophorese ist sehr wahrscheinlich auf die Entfernung der vier basischen Aminosäurereste zurückzuführen.

Um sicherzustellen, dass die ADAM10 Δ RKKR-Mutante den sekretorischen Weg korrekt durchläuft und die Zelloberfläche erreicht, wurden die Zelloberflächenproteine von HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen mit Biotin markiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation der HA-Epitop-markierten Mutante ADAM10 Δ RKKR-HA unter Verwendung des anti-HA-spezifischen Antikörpers 16B12. Nach der Elution der Proteine von der Protein A-Sepharose konnten die biotinylierten Proteine mit Streptavidin-Sepharose isoliert und mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens analysiert werden (Abbildung 5.16).

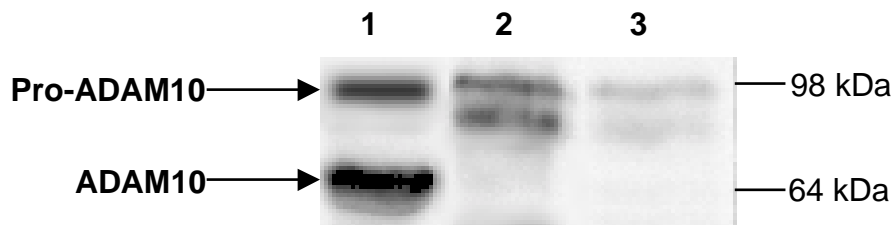


Abbildung 5.16 **Zelloberflächenlokalisierung der ADAM10 Δ RKKR-Mutante.** Die Zelloberflächenproteine von HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen wurden zunächst mit Biotin markiert und anschließend lysiert. HA-Epitop-markiertes ADAM10 Δ RKKR konnte mit Hilfe des anti-HA Antikörpers 16B12 immunpräzipitiert werden. Nach der Elution von der Protein A-Sepharose konnten die biotinylierten Proteine mit Streptavidin-Sepharose isoliert und vier Fünftel der Probe nachfolgend in einem 10% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden (Spur 3). Ein Fünftel wurde direkt nach der Elution von der Protein A-Sepharose auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Spur 2). Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit dem anti-HA Antikörper Y-11, gefolgt von einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG-Antikörper, inkubiert. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit dem Western-Star Detektionssystem von Tropix.

Spur 1: Protein A-Sepharose-Eluat von HEK293-ADAM10-Zellen als Kontrolle

Spur 2: Protein A-Sepharose-Eluat von HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen

Spur 3: Streptavidin-Sepharose-Eluat von HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen

Hierdurch kann sowohl die Proform als auch die verkürzten Formen des mutierten ADAM10 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die Oberflächenlokalisierung dieser Mutante lässt vermuten, dass sie den sekretorischen Weg in der gleichen Weise wie die Wildtyp-Proteinase durchläuft und die veränderte Prozessierung somit nicht auf eine falsche Lokalisierung des Proteins zurückzuführen ist.

5.2.3 Prozessierung von ADAM10 in Furin-defizienten LoVo-Zellen

Die humane Karzinom-Zell-Linie LoVo ist durch jeweils eine Mutation in den beiden Allelen des Furin-Gens gekennzeichnet und exprimiert nur die Proprotein-Konvertasen PACE4 und PC7 funktionell, jedoch kein funktionsfähiges, katalytisch-aktives Furin (Seidah *et al.*, 1994, Seidah *et al.*, 1996 und Takahashi *et al.*, 1993). Sie ermöglicht somit die Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von endogenem ADAM10 in der Abwesenheit von katalytisch-aktivem Furin.

Durch die Western-Blot-Analyse des Zell-Lysats dieser Zellen konnten die Auswirkungen der Furin-Defizienz auf die Entfernung der Prodomäne von ADAM10 sichtbar gemacht werden (Abbildung 5.17). Die Detektion des endogenen ADAM10 der LoVo-Zellen erfolgte mit dem Erstantikörper anti-ADAM10. Sowohl die reife, prozessierte Form als auch die unprozessierte Form von ADAM10 sind im Zell-Lysat nachweisbar. Dies bedeutet, dass Furin für die proteolytische Entfernung der Prodomäne nicht unbedingt erforderlich ist und durch PC7 ersetzt werden kann. Ein Beitrag von PACE4 zur Reifung von ADAM10 kann mit diesem experimentellen Ansatz jedoch nicht ausgeschlossen werden.

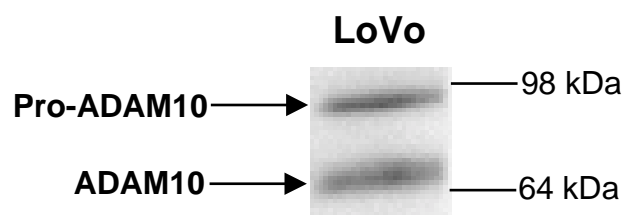


Abbildung 5.17 **Western-Blot-Analyse des endogenen ADAM10 in LoVo-Zellen.** Die Auftrennung des Zell-Lysats erfolgte in einem 10% (w/v) Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Inkubation mit dem anti-ADAM10 Antikörper erfolgte der Nachweis des Primärantikörpers durch Chemilumineszenz mit Hilfe eines alkalischen Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG-Antikörpers und des Western-Star Detektionssystems.

5.2.4 Zusammenhang zwischen der Prozessierung von ADAM10 und der APPs α -Sekretion

Durch die Überexpression der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin in HEK293-ADAM10-Zellen wird die Menge der reifen Form von ADAM10 deutlich erhöht, wogegen die Mutation der Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle in ADAM10 die Entstehung des reifen Enzyms vollständig verhindert. Um die Auswirkungen der veränderten ADAM10-Prozessierungen auf die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins zu ermitteln, wurde das freigesetzte APPs α in den Zellkulturüberständen der in Kapitel 5.2.2.3 beschriebenen Zell-Linien durch eine Western-Blot-Analyse detektiert und anschließend densitometrisch quantifiziert (Abbildung 5.18). Hierfür wurden gleiche Zellzahlen jeder Zell-Linie ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Sekretion von Zellproteinen in das Kulturmedium wurde am nächsten Tag über einen Zeitraum von 4 h verfolgt.

In HEK293-Zellen bewirkte die Überexpression von PC7 eine um etwa 50% erhöhte Sekretion von APPs α gegenüber den untransfizierten Kontrollzellen (Abbildung 5.18, Balken 1 und 2). HEK293-ADAM10-PC7- und HEK293-ADAM10-Furin-Zellen, die sowohl ADAM10 als auch PC7 beziehungsweise Furin, überexprimieren und im Vergleich zu HEK293-ADAM10-Zellen, die nur ADAM10 überexprimieren, größere Mengen an prozessiertem ADAM10 aufweisen, sekretierten etwa doppelt soviel APPs α (Balken 4 und 5) wie die HEK293-ADAM10-Zellen (Balken 3), in denen die ADAM10-Prozessierung unverändert ist. Diese Befunde dokumentieren, dass eine erhöhte Menge an prozessiertem ADAM10 eine gesteigerte APPs α -Sekretion bewirkt. Darüber hinaus sekretierten HEK293-ADAM10-PC7-Zellen (Balken 4) ungefähr dreimal mehr APPs α als HEK293-PC7-Zellen (Balken 2), was eindeutig belegt, dass PC7 seinen α -Sekretaseverstärkenden Effekt durch die Prozessierung von ADAM10 vermittelt. Daneben war in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen - diese Zellen exprimieren mutiertes ADAM10 ohne Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle - die α -Sekretaseaktivität deutlich geringer (Balken 6) als in Wildtyp-ADAM10-überexprimierenden Zellen (Balken 3). Dass diese Zellen größere Mengen an APPs α freisetzen als untransfizierte HEK293-Zellen ist vermutlich auf die noch vorhandene katalytische Aktivität der verkürzten Formen von ADAM10, die einzig in diesen Zellen zu finden sind, zurückzuführen. Im Gegensatz zu HEK293-ADAM10-Zellen resultierte in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen die Überexpression von PC7 jedoch nur in einer geringfügigen Zunahme der APPs α -Sekretion (Balken 7). Dieser Effekt ist unbedeutend im Vergleich zu dem von PC7 auf Wildtyp-ADAM10 und reflektiert nur die Auswirkung der PC7-Überexpression auf das in den Zellen vorhandene endogene ADAM10. Damit belegt dieses Ergebnis, dass die α -Sekretaseaktivität von mutiertem ADAM10 ohne Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle durch PC7 nicht mehr erhöht werden kann.

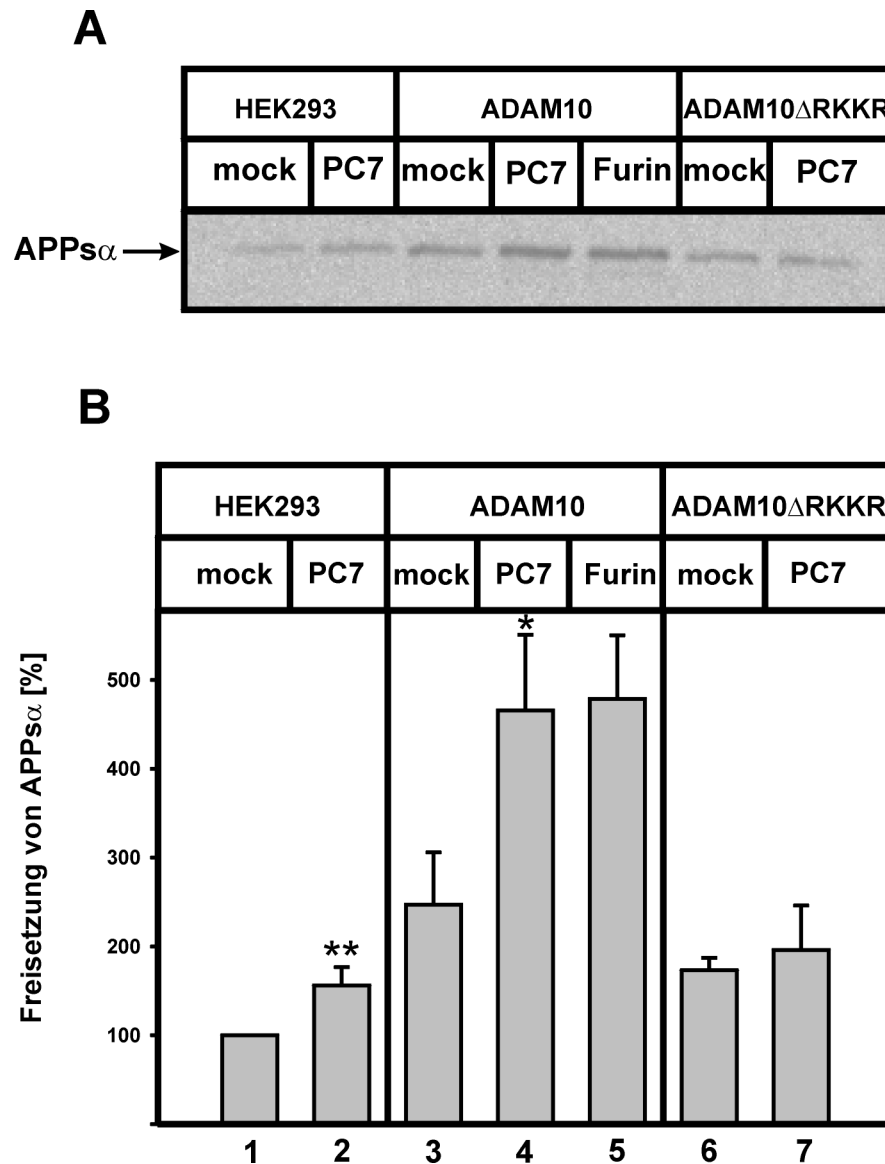


Abbildung 5.18 Darstellung der APPs α -Sekretion von PC7- oder Furin-überexprimierenden Zellen in der Western-Blot-Analyse (A) und im Balkendiagramm (B). A, Die stabil transfizierten Zellen wurden für 4 h in Zellkulturmedium inkubiert, das anstelle des FCS fettsäurefreies BSA enthielt. In diesem Zeitraum erfolgte die Sekretion der Zellproteine, die anschließend aus dem Zellkulturüberstand gefällt und in einem 8% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran und der Inkubation mit dem anti-APP Antikörper 6E10 gefolgt von einem ³⁵S-markierten anti-Maus IgG-Antikörper wurde die Radioaktivität der Membran mit einer Autoradiographieplatte aufgenommen. Die Detektion der radioaktiv-markierten Proteinbanden erfolgte mit dem Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fuji), der die quantitative Auswertung der Signale mit dem Programm Aida Version 2.0 ermöglichte. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot aus drei unabhängigen Experimenten. B, Balkendiagramm zur Darstellung der quantitativen Auswertung der APPs α -Sekretion. Die APPs α -Sekretion von HEK293-Zellen ist mit 100% festgelegt, die Ergebnisse sind als Prozentsatz der APPs α -Sekretion dieser Kontrollzellen dargestellt. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel aus drei unabhängigen Experimenten und sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz zwischen HEK293-Kontrollzellen und HEK293-PC7-Zellen, zwischen HEK293-ADAM10- und HEK293-ADAM10-PC7-Zellen und zwischen HEK293-ADAM10 Δ RKKR- und HEK293-ADAM10 Δ RKKR-PC7-Zellen wurde mit dem „Student’s unpaired *t* test“ ermittelt (**P* < 0,05, ***P* < 0,001).

5.2.5 Proteolytische Prozessierung von ADAM10 im sekretorischen Weg

Asparagin-gekoppelte Glykoproteine werden im endoplasmatischen Retikulum gebildet und im Golgi-Apparat weiter prozessiert. Die Modifikation der Kohlenhydrateinheiten findet in jedem der Kompartimente des Golgi-Apparats statt, die jeweils einen anderen Satz von Glykoprotein-prozessierenden Enzymen enthalten. Während ein Glykoprotein den Golgi-Komplex vom *cis*- über das *mediale*- zum *trans*-Kompartiment durchwandert, werden Mannose-Reste abgespaltet, N-Ace-tylglucosamin-, Galactose-, Fucose- und Sialinsäure-Reste angefügt. Durch das Anfügen der Sialinsäure-Reste im *trans*-Golgi-Apparat wird die terminale Glykosylierung abgeschlossen.

Sowohl mannosereiche als auch komplex-glykosylierte Proteine sind sensitiv gegen den Abbau durch die N-Glykosidase F. Dagegen spaltet die Endoglykosidase H (Endo H) vorwiegend an mannosereichen N-Glycanen. Diese werden jedoch nach dem Anfügen der Sialinsäure im *trans*-Golgi-Kompartiment resistent gegen den Abbau durch Endo H. Glykoproteine, die von der Endoglykosidase H nicht deglykosyliert werden, haben somit das *mediale*-Golgi-Kompartiment bereits durchlaufen und sind im *trans*-Golgi-Kompartiment sialyliert worden. Der Ort der Prodomänen-Abspaltung von ADAM10 kann daher durch Deglykosylierungen mit diesen beiden Enzymen näher bestimmt werden.

Die Versuche zur Deglykosylierung von ADAM10 wurden zunächst an den Lysaten von HEK293-ADAM10-Zellen (Klon D3) einer fast konfluenten 10-cm-Kulturschale durchgeführt, die mit 40 µl 1% (w/v) SDS/2% (v/v) Mercaptoethanol bei 95°C im Heizblock denaturiert und dann für die Deglykosylierungsreaktion auf 0,1% (v/v) SDS verdünnt wurden. Mit Hilfe der jeweiligen Puffer für die N-Glykosidase F und die Endoglykosidase H (siehe 3.3), die zur Deglykosylierung von ADAM10 eingesetzt wurden, konnten die optimalen Reaktionsbedingungen für beide Enzyme sichergestellt werden. Die Reaktion verlief in einem Gesamtvolumen von 100 µl über Nacht bei 37°C im Wasserbad mit 5 U der N-Glykosidase F oder 10 mU der Endoglykosidase H. 30 µl jedes Ansatzes wurden am nächsten Tag mit 5 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 8% (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis von ADAM10 mit dem anti-HA Antikörper Y-11. Aufgrund der geringen Menge des in den Ansätzen vorhandenen ADAM10 waren auf dem Western-Blot nur sehr schwache Banden zu erkennen, die im Vergleich zu den Banden der als Kontrolle dienenden, unbehandelten Lysate keine Veränderungen im Molekulargewicht aufwiesen. Die Deglykosylierung fand vermutlich aufgrund der hohen SDS-Konzentration und der hohen Gesamtproteinmenge in den Proben nicht statt. Die Konzentration an SDS stellt bei der Deglykosylierung von Proteinen ein Problem dar, da dieses Detergens einerseits notwendig ist, um die Proteine der Proben zu denaturieren und so einen effektiven Reaktionsverlauf zu gewährleisten, andererseits besteht die Gefahr, dass die

zur Deglykosylierung eingesetzten Enzyme ebenfalls denaturiert werden. Die zur Denaturierung der Proteinprobe eingestellte SDS-Konzentration von 1% (w/v) muss daher soweit verdünnt werden, dass die Aktivität der Enzyme nicht gefährdet wird, jedoch muss für den immunologischen Nachweis eine ausreichende Menge des zu untersuchenden Proteins im Ansatz vorhanden sein. Zusätzlich kann die Deglykosylierung des zu untersuchenden Proteins durch eine hohe Gesamtproteinmenge beeinträchtigt werden. Für den folgenden Versuch wurde ADAM10 daher durch eine Immunpräzipitation aus HEK293-ADAM10-Zellen präpariert. Das an die Protein A-Sepharose gebundene Enzym konnte mit 40 µl 1% (w/v) SDS/ 2% (v/v) Mercaptoethanol bei 95°C im Heizblock eluiert und dabei gleichzeitig denaturiert werden. Die Deglykosylierungsreaktion erfolgte mit den auf 0,02% (w/v) SDS verdünnten Proben in einem Gesamtvolumen von 100 µl über Nacht bei 37°C in der Anwesenheit von 5 U der N-Glykosidase F oder 10 mU der Endoglykosidase H. Am darauffolgenden Tag wurden 30 µl jedes Ansatzes mit 5 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Da nur geringfügige Änderungen im Molekulargewicht zu erwarten waren, die in einem 8% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel nur unzureichend aufgelöst werden können, erfolgte die Gelelektrophorese mit einem NuPAGE (4-12%) Gradientengel. Auch hier waren nach der Western-Blot-Analyse nur relativ schwache Banden der prozessierten und unprozessierten Form von ADAM10 detektierbar, was darin begründet war, dass die Proben verdünnt werden mussten und außerdem nicht vollständig auf das Gel aufgetragen wurden. Zwar wiesen hier die Banden des unreifen Enzyms sowohl in den N-Glykosidase F- als auch in den Endoglykosidase H-behandelten Proben erniedrigte Molekulargewichte auf, jedoch schien dies durch das ungewöhnliche Laufverhalten der Deglykosylierungsansätze verursacht worden zu sein. So war die Erniedrigung der Molekulargewichte in der Mitte des Gels am stärksten ausgeprägt und beschränkte sich ausnahmslos auf die Banden der unprozessierten Form. Dagegen konnte bei den Banden des prozessierten Proteins weder bei den N-Glykosidase F- noch bei den Endoglykosidase H-behandelten Proben eine Veränderung des Molekulargewichts im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.

Um ausschließen zu können, dass die fehlgeschlagenen Deglykosylierungs-Versuche auf störende Substanzen aus dem bei der Immunpräzipitation verwendeten Imidazol-Lysispuffer zurückzuführen sind, erfolgte zum Erlangen der Proteinprobe für die nachfolgenden Deglykosylierungen eine Membranpräparation von HEK293-ADAM10-Zellen. Die nach der Deglykosylierungsreaktion durchgeführte Chloroform-Methanol-Fällung diente zur Aufkonzentrierung der Proteinproben und zur Abtrennung der Deglykosylierungspuffer, deren Bestandteile - zum Beispiel das Detergens Nonidet-P40 -

bei der anschließenden Gelelektrophorese stören könnten. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse dieser Ansätze ist in Abbildung 5.19 dargestellt.

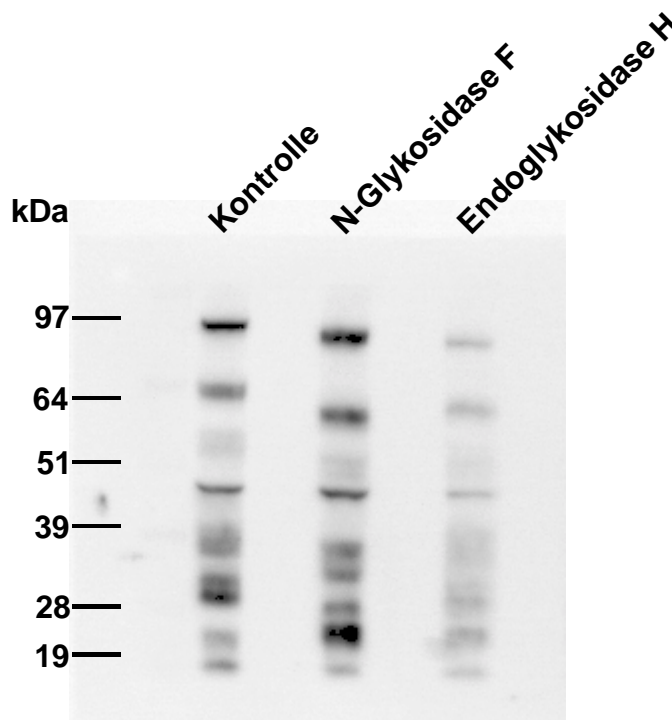


Abbildung 5.19 **Western-Blot-Analyse der Deglykosylierungsansätze von ADAM10.** Die aufkonzentrierten Proteine der Deglykosylierungsansätze wurden in einem NuPAGE (4-12%) Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Nach der Inkubation mit dem anti-HA Antikörper Y-11 erfolgte der Nachweis des Primärantikörpers durch Chemilumineszenz mit Hilfe eines alkalische Phosphatasegekoppelten anti-Kaninchen IgG-Antikörpers und des Western-Star Detektionssystems von Tropix.

In der Membranproteinprobe, die mit der N-Glykosidase F behandelt wurde, ist eine Erniedrigung der Molekulargewichte im Vergleich zur Kontrolle, sowohl von der unprozessierten als auch der prozessierten Form von ADAM10, zu verzeichnen. Die Probe des Endoglykosidase H-behandelten Ansatzes weist eine deutliche Molekulargewichtsänderung der unprozessierten Form auf, die mit der Änderung in der N-Glykosidase F-behandelten Probe übereinstimmt. Dagegen ist bei der Bande der prozessierten Form nur eine unwesentliche Verringerung des Molekulargewichts erkennbar. Die Abnahme der Molekulargewichte in dem N-Glykosidase F-behandelten Ansatz ist auf die enzymatische Entfernung der Oligosaccharide durch die N-Glykosidase F zurückzuführen. Diese Glykosidase spaltet sowohl mannosereiche als auch komplex-glykosylierte Proteine und entfernt daher die N-Glycane der reifen und der unreifen Form von ADAM10, was mit einer Verringerung der Molekulargewichte verbunden ist. Dagegen spaltet die

Endoglykosidase H vorwiegend an mannosereichen Kohlenhydrat-Seitenketten, die nach dem Anfügen der Sialinsäure im *trans*-Golgi-Kompartiment resistent gegen den Abbau durch Endo H werden. Das nur unwesentlich erniedrigte Molekulargewicht der prozessierten Form von ADAM10 deutet darauf hin, dass keine Deglykosylierung durch Endo H erfolgt ist. Die reife Form von ADAM10 hat somit das *mediale*-Golgi-Kompartiment bereits durchlaufen und ist im *trans*-Golgi-Kompartiment sialyliert worden. Die Ergebnisse der Deglykosylierungsexperimente favorisieren somit eine Prodomänen-Abspaltung im *trans*-Golgi-Apparat oder einem späteren Kompartiment und schließen eine Prozessierung im *cis*- und *medialen*-Golgi-Kompartiment aus.

5.3 Proteolytische Prozessierung von TACE

Die Disintegrin-Metalloproteinase TACE wird ebenfalls als inaktives Zymogen synthetisiert. Erst durch die Entfernung der Prodomäne wird die katalytisch aktive Form der Proteinase erhalten. Die dafür notwendige proteolytische Abspaltung der Domäne findet innerhalb des sekretorischen Wegs in einem späten Golgi-Kompartiment statt. Dies und das Vorhandensein einer potentiellen Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RVKR) zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne deuten auf eine Beteiligung von Proprotein-Konvertasen bei diesem Vorgang hin. Daher sollte untersucht werden, ob Proprotein-Konvertasen durch die Prozessierung von TACE einen Beitrag zur Entfaltung der proteolytischen Eigenschaften leisten.

5.3.1 Die Auswirkung der Inhibierung von Proprotein-Konvertasen auf die Prozessierung von TACE

Mit Hilfe des Proprotein-Konvertasen-Inhibitors Dec-RVKR-cmk sollte die Bedeutung dieser Proteine bei der proteolytischen Entfernung der Prodomäne von TACE aufgeklärt werden. Bei einer Beteiligung von Mitgliedern dieser Konvertasen-Familie an der proteolytischen Aktivierung des TACE-Zymogens sollte dieser Inhibitor die Erzeugung des reifen Enzyms signifikant unterdrücken.

Zur Untersuchung des Einflusses von Dec-RVKR-cmk auf die TACE-Prozessierung wurden, wie bei der Untersuchung der Auswirkung von Dec-RVKR-cmk auf die Prozessierung von ADAM10, untransfizierte HEK293-Zellen für 48 h mit dem Inhibitor behandelt. Anschließend wurden die Zell-Lysate mit dem Western-Blot-Verfahren analysiert. Der immunologische Nachweis von TACE erfolgte mit dem Antikörper anti-TACE gegen das in den HEK293-Zellen vorhandene endogene Enzym. Hierbei wird das unprozessierte Zymogen mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa sowie das prozessierte und katalytisch aktive Enzym ohne Prodomäne mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa sichtbar (Abbildung 5.20).

Die Zell-Lysate von Zellen die mit dem Proprotein-Konvertasen-Inhibitor inkubiert wurden, weisen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen deutlich verringerte Mengen an prozessiertem TACE auf. Dies stimmt mit der erwarteten Inhibitorwirkung bei einer Beteiligung von Proprotein-Konvertasen an der TACE-Prozessierung überein und belegt damit, dass diesen Konvertasen bei der Entfernung der Prodomäne von TACE eine wesentliche Bedeutung zukommt.

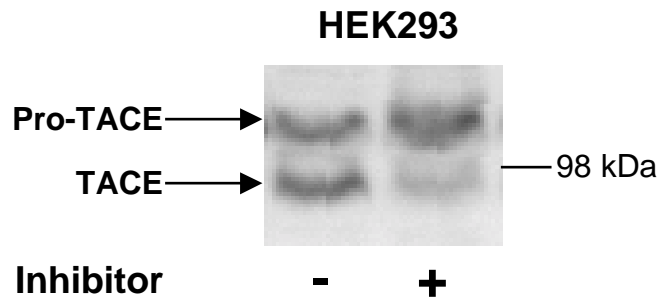


Abbildung 5.20 **Einfluss des Proprotein-Konvertasen-Inhibitors Decanoyl-RVKR-chloromethylketon auf die proteolytische Prozessierung von endogenem TACE in HEK293-Zellen.** Die Auftrennung der Zell-Lysate erfolgte in einem 8% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Inkubation mit dem Antikörper anti-TACE erfolgte der Nachweis der Primärantikörper durch Chemilumineszenz mit Hilfe eines alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpers und des Western-Star Detektionssystems.

5.3.2 Proteolytische Prozessierung von TACE durch PC7 und Furin

Als katalytisch aktives Mitglied der Disintegrin-Metalloproteinasen besitzt TACE, wie auch ADAM10, eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz. Da die Aktivierung der α -Sekretase ADAM10 durch die Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin erfolgt und TACE ebenfalls eine α -Sekretaseaktivität besitzt, sollte untersucht werden, ob die Überführung des TACE-Zymogens in die katalytisch aktive Form auch durch diese beiden Konvertasen vermittelt wird. Zu diesem Zweck sollte die Auswirkung der Überexpression von PC7 und Furin auf die Entfernung der Prodomäne von endogenem TACE aufgeklärt werden.

Unter Verwendung der Calciumphosphat-vermittelten Transfektion mit den Plasmiden pIRES1hyg-PC7 oder pIRES1hyg-Furin wurden die cDNAs von PC7 oder Furin in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Durch eine Selektion mit Hygromycin B als Zusatz im Zellkulturmedium konnte die stabile Expression dieser Proprotein-Konvertasen erreicht werden. Die resultierenden Zell-Linien erhielten die Bezeichnungen HEK293-PC7 und HEK293-Furin.

Die Western-Blot-Analyse der Zell-Lysate zeigt nach der Detektion des endogenen TACE mit dem Antikörper anti-TACE die spezifischen Banden der unreifen 120 kDa-Form und der reifen 100 kDa-Form des Proteins (Abbildung 5.21 A). Zur Ermittlung der Effekte der Konvertasenüberexpression erfolgte eine densitometrische Auswertung der Proteinbanden. In Abbildung 5.21 B ist das Ergebnis dieser Quantifizierung in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Hieraus geht hervor, dass erhöhte Mengen der prozessierten Form von TACE sowohl in den PC7- als auch in den Furin-überexprimierenden HEK293-

Zellen vorzufinden sind. TACE wird demnach sowohl von PC7 als auch von Furin prozessiert, wobei HEK293-Furin-Zellen größere Mengen des reifen Enzyms aufweisen, als HEK-PC7-Zellen.

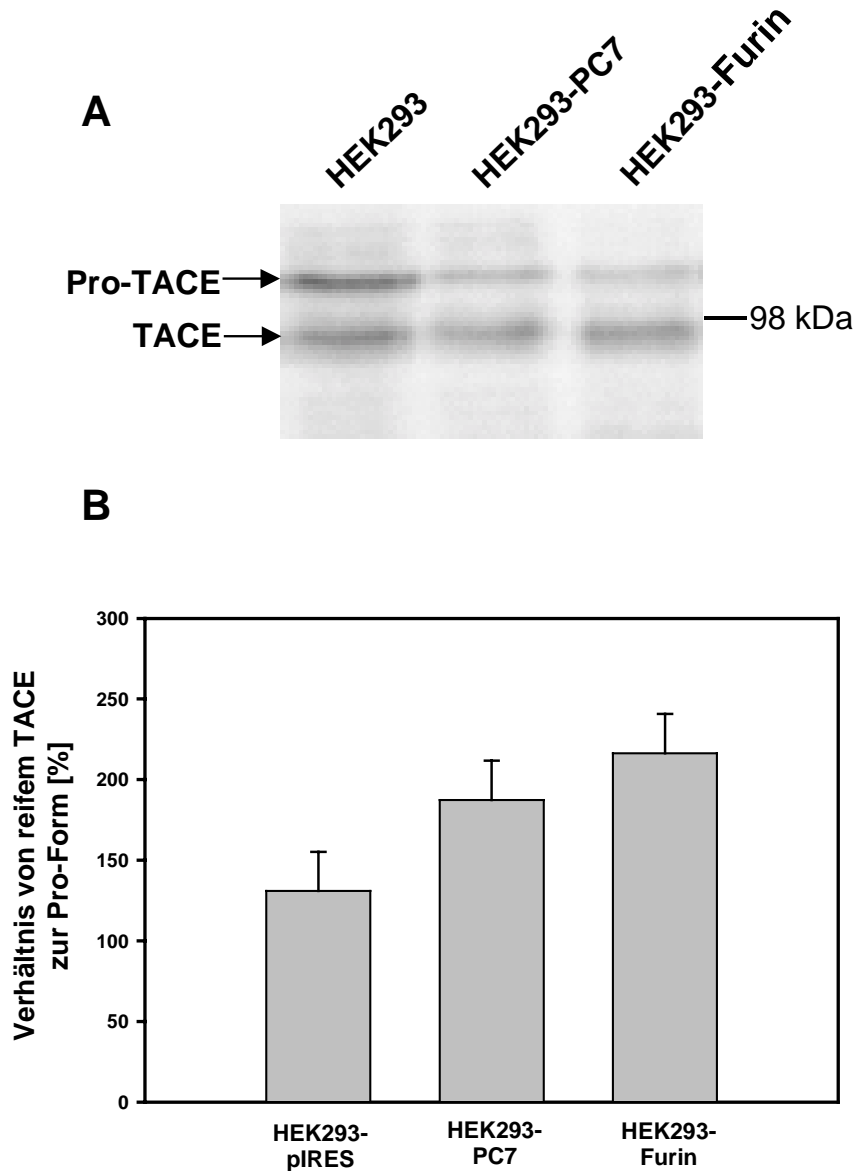


Abbildung 5.21 **Proteolytische Prozessierung von endogenem TACE in PC7- oder Furin-überexprimierenden HEK293-Zellen.** **A**, Western-Blot-Analyse der Zell-Lysate. Nach dem Auftrennen in einem 8% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis des endogenen TACE mit dem anti-TACE Antikörper. Der Nachweis des Primäntikörpers erfolgte mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper und dem Western-Star Detektionssystem von Tropix. **B**, Balkendiagramm zur quantitativen Auswertung der TACE-Prozessierung. Die Werte wurden durch die densitometrische Analyse der Proteinbanden des Western-Blots unter Verwendung der Software Aida 2.0 erhalten. Unprozessiertes TACE ist in jeder Zell-Linie auf 100% festgelegt. Die prozessierte Form von TACE ist jeweils als Verhältnis zur unprozessierten Form in Prozent angegeben. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel aus drei unabhängigen Experimenten und sind mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt.

5.3.3 Proteolytische Prozessierung von TACE in der Abwesenheit von Furin

Aufgrund der größeren Mengen an prozessiertem TACE in HEK293-Furin-Zellen im Vergleich zu HEK293-PC7-Zellen ist es vorstellbar, dass Furin bei der Aktivierung von TACE eine größere Bedeutung zukommt als PC7. Da die Zell-Linie LoVo kein katalytisch aktives Furin exprimiert, ermöglicht sie die Untersuchung der TACE-Prozessierung in dessen Abwesenheit. Zu diesem Zweck wurden die Zell-Lysate von LoVo-Zellen einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Der immunologische Nachweis des endogenen TACE erfolgte dabei mit Hilfe des Antikörpers anti-TACE.

Der in Abbildung 5.22 gezeigte Western-Blot lässt sowohl die unreife als auch die reife Form von TACE erkennen, was bedeutet, dass die Prodomäne von TACE trotz der Furin-Defizienz proteolytisch entfernt wird. Da TACE demzufolge auch ohne das Mitwirken von Furin prozessiert wird, ist die Anwesenheit von Furin bei der Reifung von TACE nicht unbedingt erforderlich. Die Prozessierung von TACE wird in LoVo-Zellen daher vermutlich durch die Proprotein-Konvertase PC7 ausgeführt. Da in diesen Zellen jedoch auch die Proprotein-Konvertase PACE4 zugegen ist, könnte auch sie zur Reifung von TACE beitragen.

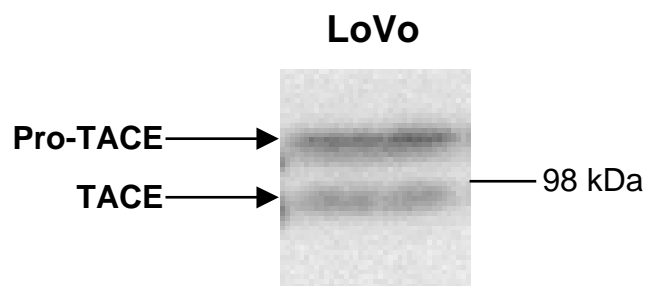


Abbildung 5.22 **Western-Blot-Analyse des endogenen TACE in LoVo-Zellen.** Die Auftrennung des Zell-Lysats erfolgte in einem 8% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Inkubation mit dem Antikörper anti-TACE erfolgte der Nachweis des Primärantikörpers durch Chemilumineszenz mit Hilfe eines alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG-Antikörpers und des Western-Star Detektionssystems.

6 DISKUSSION

6.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Reihenuntersuchung α -Sekretase-stimulierender Substanzen

Die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins unterliegt im Verlauf des nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Wegs einer Regulation durch Aktivatoren der Protein-kinase C-gekoppelten Signalkaskade (Caporaso *et al.*, 1992, Buxbaum *et al.*, 1993). Daneben lässt sich die APPs α -Freisetzung durch Agonisten muskarinischer Acetylcholin-rezeptoren, wie beispielsweise Carbachol, erhöhen (Nitsch *et al.*, 1992). Durch die Stimulierung der α -Sekretase ADAM10 könnte somit ein Ungleichgewicht zwischen der α - und der β -Sekretase zu Gunsten der nicht-amyloidogenen Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins erreicht werden. Eine Reihe von Befunden deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Cholesteringehalt der Zellmembranen von Neuronen und der Alzheimer-Krankheit hin (Dartigues und Letenneur, 2000). So wird infolge einer Cholesterin-Abreicherung aus der Zellmembran von Neuronen des Hippocampus die Entstehung der A β -Peptide reduziert (Simons *et al.*, 1998). Auch die Behandlung von Zellen mit Lovastatin, einem Inhibitor der Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA-Reduktase, resultiert höchstwahrscheinlich infolge einer erhöhten ADAM10-Expression in einer verstärkten α -Sekretaseaktivität (Kojro *et al.*, 2001). Eine übermäßige Produktion der A β -Peptide ließe sich auf diesem Weg vermeiden. Substanzen, die aktivierend auf die α -Sekretase ADAM10 wirken, könnten somit zu der Entwicklung von Pharmazeutika zur Behandlung der Alzheimer-Demenz beitragen.

Das hier entwickelte Testsystem zum Auffinden ADAM10-stimulierender Substanzen beruht auf der Fusion der 119 C-terminalen Aminosäuren des Amyloid-Vorläuferproteins mit der als Reporterprotein fungierenden sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) aus der menschlichen Plazenta. Dieses Fusionsprotein deckt den C-terminalen Bereich des APP einschließlich der Transmembrandomäne und der Sequenz des A β -Peptids ab. Durch die Koexpression dieses Reporterproteins zusammen mit der α -Sekretase ADAM10, ist es mit diesem Testverfahren daher möglich, ADAM10-stimulierende Substanzen schnell und mit einer hohen Empfindlichkeit zu ermitteln.

6.1.1 Etablierung und Optimierung des Testsystems

Das Reporterprotein wird nach der stabilen Transfektion von HEK293-Zellen exprimiert und durch eine α -Sekretase-Spaltung in das Zellkulturmedium sezerniert. Die sekretierte alkalische Phosphatase ist als Bestandteil des SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsproteins katalytisch aktiv, wobei ein linearer Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reaktion und der Menge der alkalischen Phosphatase, die als Komponente des Reporterproteins in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurde, besteht. Ein linearer Zusammenhang ist hier unbedingt erforderlich, um Auswirkungen auf die α -Sekretase-Spaltung exakt quantifizieren zu können. Daneben besteht ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der eingesetzten Zellen und der enzymatischen Reaktion des Fusionsproteins im Zellkulturüberstand. Die Aussaat von 500 000 Zellen auf 6-cm-Kulturschalen erwies sich bei der Etablierung des Tests als optimal. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und waren am nächsten Tag nahezu konfluent, so dass eine hohe Empfindlichkeit und eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente gegeben war.

Die Überprüfung der enzymatischen Reaktion der alkalischen Phosphatase bei verschiedenen pH-Werten ergab ein Aktivitätsmaximum bei pH10. Da die alkalische Phosphatase bereits bei pH8 eine sehr hohe Aktivität bei einem merklich geringeren Hintergrund durch endogene alkalische Phosphatasen als bei pH10 aufweist, wurden alle weiteren Messungen bei pH8 durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Testoptimierung konnte jedoch die endogene alkalische Phosphataseaktivität durch eine Hitzeinaktivierung fast vollständig gehemmt werden, ohne die Aktivität der sekretierten alkalischen Phosphatase des Fusionsproteins merklich zu beeinträchtigen. Hierdurch konnte die Hintergrundaktivität erheblich reduziert werden. Unter diesen Bedingungen kann die Durchführung der Enzymreaktion bei pH10 die Empfindlichkeit des Tests voraussichtlich weiter heraufsetzen.

Die Freisetzung des SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsproteins erfolgt konstitutiv und kann durch die Stimulierung muskarinischer Rezeptoren mit Carbachol oder durch die Aktivierung der Proteinkinase C mit PMA erhöht werden. In gleicher Weise erfolgt die Freisetzung des endogenen Amyloid-Vorläuferproteins von der Zellmembran. Daher eignet sich das erzeugte Reporterprotein zur Analyse unbekannter Substanzen auf ihre Fähigkeit, die Sekretion des Amyloid-Vorläuferproteins zu stimulieren. Mit diesem Verfahren kann jedoch nicht unterschieden werden, ob das nachgewiesene SEAPs/APP₁₁₉ durch eine α - oder β -Sekretase-Spaltung ins Zellkulturmedium freigesetzt worden ist. Im Fall einer stimulierten Sekretion durch eine getestete Substanz muss die α -Sekretase-Spaltung des Reporterproteins aus diesem Grund anschließend durch andere Methoden verifiziert werden. Da jedoch bei der Verwendung von Reporterproteinen die erhaltenen Befunde

ohnehin am endogenen Protein überprüft werden müssen, stellt dieser Aspekt keinen Nachteil des Testsystems dar.

Eine andere Möglichkeit zur Verifizierung der α -Sekretase-Spaltung stellt die Mutagenese der β -Sekretase-Spaltstelle des Reporterproteins dar. Durch das Einfügen einer Punktmutation an der β -Sekretase-Spaltstelle (KMDA in KVDA) könnte die Prozessierung des Fusionsproteins durch die β -Sekretase fast vollständig unterdrückt werden (Vassar *et al.*, 1999). Bei der Analyse der Zellkulturüberstände wäre durch die Messung der Absorption des umgesetzten Substrats nur noch das α -Sekretase-gespaltene Reporterprotein nachweisbar. Andererseits könnten mit einer solchen Mutante eventuell vorhandene Auswirkungen auf die β -Sekretase-Spaltung nicht mehr erfasst werden.

6.2 Proteolytische Prozessierung von ADAM10

Das Amyloid-Vorläuferprotein durchläuft nach seiner Synthese den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche, wobei es durch die α -, β - und γ -Sekretasen prozessiert werden kann (Reiner und Mills, 1999, Nunan und Small, 2000). Der größte Teil der neurotoxischen A β -Peptide wird im *trans*-Golgi-Netzwerk generiert (Xu *et al.*, 1997), das somit einen elementaren Ort der β -Sekretaseaktivität darstellt. Daneben wird APP im Verlauf des nicht-amyloidogenen Wegs innerhalb der A β -Sequenz durch die α -Sekretase prozessiert (Esch *et al.*, 1990), wobei die A β -Bildung verhindert wird (Nitsch und Growdon, 1994, Checler, 1995). Die Aktivität der α -Sekretase besitzt sowohl eine konstitutive als auch eine regulierte Komponente. Durch die Untersuchung der zellulären Lokalisierung der α -Sekretaseaktivität konnte eine räumliche Trennung der beiden Komponenten entdeckt werden. So findet die konstitutive α -Sekretase-Spaltung an der Zelloberfläche statt (Parvathy *et al.*, 1999), während die regulierte im *trans*-Golgi Netzwerk erfolgt (Skovronsky *et al.*, 2000). Enzyme die innerhalb des *trans*-Golgi-Apparats lokalisiert sind besitzen somit eine entscheidende Bedeutung für die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins. In diesem Zusammenhang wurden die Mitglieder der Proprotein-Konvertasen-Familie als mögliche Kandidaten für die APP-Prozessierung in Betracht gezogen, da viele von ihnen im sekretorischen Weg, insbesondere in den Kompartimenten des Golgi-Apparats, an der Spaltung von Vorläuferproteinen beteiligt sind (DeStrooper *et al.*, 1995, Lopez-Perez *et al.*, 1999).

Nach der transienten Überexpression der Proprotein-Konvertasen Furin, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE4 und PC5/PC6 in PK-Zellen konnte jedoch kein Effekt auf die APP α -Produktion festgestellt werden (DeStrooper *et al.*, 1995). Demgegenüber konnte nach der

stabilen Überexpression von PC7 in HEK293-Zellen ein Beitrag dieser Proprotein-Konvertase am konstitutiven α -Sekretase-Weg entdeckt werden. Infolge der Überexpression wurde die APPs α -Sekretion erhöht und gleichzeitig wurde die Bildung von A β 40 und A β 42 verringert (Lopez-Perez *et al.*, 1999). Durch die Inhibierung mit dem überexprimierten Proprotein-Konvertasen-Inhibitor α 1-PDX (Anderson *et al.*, 1993, Benjannet *et al.*, 1997, Jean *et al.*, 1998) konnten beide Effekte umgekehrt werden (Lopez-Perez *et al.*, 1999). Eine direkte Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch PC7 wurde jedoch nicht untersucht und daher ist eine α -Sekretaseaktivität von PC7 nicht erwiesen. Aufgrund der fehlenden Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz an der α -Sekretase-Spaltstelle ist eine direkte Prozessierung von APP durch PC7 sehr unwahrscheinlich. Da auch keine Untersuchungen zur Prozessierung der α -Sekretasen ADAM10 und TACE durch PC7 durchgeführt wurden, blieb der Zusammenhang zwischen der Überexpression von PC7 und der erhöhten APPs α -Sekretion unklar. Dennoch wurde die Proprotein-Konvertase PC7 als mögliche α -Sekretase in Betracht gezogen (Lopez-Perez *et al.*, 1999, 2001, Nunan und Small, 2000).

Die Disintegrin-Metalloproteinase ADAM10 besitzt sowohl eine konstitutive als auch eine regulierte α -Sekretaseaktivität und eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne (Lammich *et al.*, 1999). Dass die Abspaltung der Prodomäne an dieser Sequenz erfolgt, konnte durch eine N-terminale Sequenzierung von aus Rindernieren gereinigtem ADAM10 bestätigt werden. Um die Bedeutung von Proprotein-Konvertasen bei der α -Sekretase-Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins aufzuklären wurde die Möglichkeit, dass PC7 und Furin als pro-ADAM10-prozessierende und damit als pro- α -Sekretase-aktivierende Konvertasen fungieren, untersucht.

Zunächst konnte mit Hilfe des synthetischen Inhibitors Decanoyl-RVKR-chloromethylketon gezeigt werden, dass Proprotein-Konvertasen an der Prozessierung des ADAM10-Zymogens beteiligt sind. Dieser Inhibitor ist in der Lage, Proprotein-Konvertasen in Zellkulturen selektiv zu hemmen (Garten *et al.*, 1989). Durch die Inkubation von HEK293-Zellen mit diesem Inhibitor konnte dessen Auswirkung auf die Prozessierung von ADAM10 ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass endogenes ADAM10 in unbehandelten HEK293-Zellen überwiegend in der prozessierten Form vorliegt und dass, infolge der Inhibierung der Proprotein-Konvertasen, die proteolytische Prozessierung von ADAM10 deutlich verringert wird, was ein Mitwirken von Proprotein-Konvertasen bei der Entfernung der Prodomäne von ADAM10 bestätigt.

Um die Sequenzanforderungen bei der Entfernung der Prodomäne zu ermitteln, wurde die Aminosäuresequenz der mutmaßlichen Spaltstelle (RKKR) infolge einer Mutagenese durch die Sequenz NAQA substituiert. Da Proprotein-Konvertasen an Sequenzen des

Typs R X (R/K) R spalten (Steiner *et al.*, 1998) ist nach der Mutation dieser Sequenz eine Spaltung durch Proprotein-Konvertasen, insbesondere durch PC7 und Furin, nicht mehr möglich (van de Loo *et al.*, 1997, Munzer *et al.*, 1997). Bei einer Beteiligung von Proprotein-Konvertasen an der ADAM10-Spaltung kann eine Überführung des ADAM10 Δ RKKR-Zymogens in die reife Form somit nicht mehr stattfinden.

Die Bedeutung der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin bei der ADAM10-Prozessierung konnte durch deren Überexpression in HEK293-Zellen aufgeklärt werden. Hierfür wurde der pIRES1*hyg*-Vektor verwendet. Dieser eukaryontische Expressionsvektor ist so beschaffen, dass bei der Transkription sowohl das einklonierte Gen als auch das Hygromycin B-Resistenzgen auf eine mRNA übertragen werden. Die enthaltene interne Ribosomen-Eintrittsstelle zwischen den beiden Genen ermöglicht schließlich die Translation beider Gene dieser mRNA. Nach Selektion mit Hygromycin B exprimieren daher nahezu alle überlebenden Zellen das einklonierte Gen stabil. Durch die Verwendung dieses Expressionsvektors konnte daher eine deutliche Überexpression der untersuchten Proprotein-Konvertasen in den stabil transfizierten HEK293- und HEK293-ADAM10-Zellen erreicht und damit eine merkliche Auswirkung auf die Proteolyse ihrer Substratproteine sichergestellt werden.

Die Ergebnisse der Überexpression von PC7 und Furin in HEK293- und HEK293-ADAM10-Zellen belegen eindeutig, dass sowohl PC7 als auch Furin an der ADAM10-Reifung mitwirken, indem sie die Prodomäne an der vorhergesagten Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle proteolytisch entfernen und so zur Entfaltung der katalytischen Aktivität von ADAM10 beitragen. Durch die Überexpression von PC7, beziehungsweise Furin, wird ADAM10 in einem größeren Umfang prozessiert, so dass mehr reifes ADAM10 entsteht, welches wiederum größere Mengen des neuroprotektiven APPs α von der Zellmembran freisetzt. Im Gegensatz dazu ist die Reifung von mutiertem ADAM10 ohne Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle vollständig blockiert. Dies bestätigt zum Einen, dass diese Spaltstelle für die Reifung absolut notwendig ist, zum Anderen, dass Proprotein-Konvertasen bei der Reifung von ADAM10 eine wesentliche Bedeutung zukommt und schließlich, dass eine blockierte Reifung mit einer verringerten α -Sekretaseaktivität verbunden ist. Da die α -Sekretaseaktivität in den HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen höher war als in untransfizierten HEK293-Zellen, aber niedriger als in HEK293-ADAM10-Zellen, ist die Beseitigung der Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle offenbar nicht ausreichend, um die α -Sekretaseaktivität von überexprimiertem ADAM10 Δ RKKR vollständig zu hemmen. Die Aktivierung von ADAM10 wird, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, durch die Abspaltung der Prodomäne erreicht. Nach Dissoziation der Prodomäne von der reifen Proteinase wird das katalytische Zentrum für Substrate zugänglich. Im Fall der ADAM10 Δ RKKR-Mutante scheint ADAM10 an anderen, in der Prodomäne vorhandenen,

Spaltstellen prozessiert zu werden, was die im Western-Blot sichtbaren verkürzten Formen von ADAM10 Δ RKKR belegen. Diese verkürzten Formen besitzen ein etwas höheres Molekulargewicht als die reife Wildtyp-Proteinase und es ist wahrscheinlich, dass die teilweise vorhandene α -Sekretaseaktivität dieser ADAM10-Mutante auf diese verkürzten Formen zurückzuführen ist.

In HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen führt überexprimiertes PC7 nicht zu einer erhöhten Prozessierung des ADAM10-Zymogens und damit auch nicht zu einer größeren Menge an katalytisch aktivem Enzym. Damit übereinstimmend ist die α -Sekretaseaktivität in diesen Zellen, verglichen mit den Zellen, die die Wildtyp-Proteinase exprimieren, nur unwesentlich erhöht. Da diese Erhöhung der APPs α -Freisetzung in der gleichen Größenordnung liegt wie die APPs α -Freisetzung in HEK-PC7-Zellen, ist sie sehr wahrscheinlich auf das in den ADAM10 Δ RKKR-Zellen vorhandene, endogene ADAM10 zurückzuführen. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass die Überexpression von PC7 nicht zu einem verstärkten Auftreten der verkürzten Formen von ADAM10 Δ RKKR führt. Dies legt nahe, dass diese verkürzten Formen nicht durch Proprotein-Konvertasen erzeugt werden.

Aufgrund der Aminosäuresequenz an der α -Sekretase-Spaltstelle (⁻⁶E ⁻⁵V ⁻⁴H ⁻³H ⁻²Q ⁻¹K ↓) ist eine direkte Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch PC7 oder Furin sehr unwahrscheinlich, da es weder an noch in der Nähe der α -Sekretase-Spaltstelle eine entsprechende Erkennungssequenz aufweist. Zwar ist an der Spaltstelle ein Lysin in der Position -1 vorhanden, doch weder in Position -4 noch in Position -6 ist ein Arginin oder Lysin vorhanden. Dies wäre jedoch erforderlich, da die in den Positionen -3 und -4 auftretenden Histidin-Reste das fehlende Arginin nicht ersetzen können (van de Loo *et al.*, 1997 und Munzer *et al.*, 1997). Vorläuferproteine, denen genau wie dem Amyloid-Vorläuferprotein ein basischer Rest in Position -2 fehlt, können zwar von Furin gespalten werden, allerdings mit einer etwa zehnfach geringeren Effizienz und nur dann, wenn auch ein Arginin in Position -4 vorhanden ist, was beim APP nicht der Fall ist. Ferner kann eine Spaltung von Substraten, die wie das APP ein Lysin in Position -1 besitzen, nur dann durch Furin erfolgen, wenn gleichzeitig ein basischer Rest in Position -2 vorhanden ist. Dieser fehlt jedoch im Motiv der α -Sekretase-Spaltstelle des Amyloid-Vorläuferproteins. Eine Spaltung durch PC7 kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden, da PC7 nicht in der Lage ist, an monobasischen Resten zu spalten. Darüber hinaus benötigt PC7 unbedingt ein Arginin in Position -1, das selbst von Lysin nicht ersetzt werden kann. Die Sequenz der α -Sekretase-Spaltstelle im Amyloid-Vorläuferprotein stellt somit weder für PC7 noch für Furin eine Erkennungssequenz beziehungsweise Spaltstelle dar. Demgegenüber wird die α -Sekretase ADAM10 als Zymogen mit einer Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz zwischen der Prodomäne und katalytischen Domäne

synthetisiert. Außerdem weisen HEK293-ADAM10-PC7-Zellen infolge der Überexpression von PC7 deutlich erhöhte Mengen der reifen, katalytisch aktiven Form von ADAM10 auf und sekretieren als Konsequenz davon erhöhte Mengen an APPs α . Bei HEK293-Zellen, die nur das endogene ADAM10 besitzen, jedoch vergleichbare Mengen an PC7 überexprimieren, ist die APPs α -Sekretion demzufolge weniger stark erhöht, als in HEK293-ADAM10-PC7-Zellen. Daneben ist die Überführung des ADAM10-Zymogens in die reife Form in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen vollständig blockiert und dementsprechend resultiert die Überexpression von PC7 in diesen Zellen nicht in einer erhöhten Menge an reifem ADAM10. Daher folgt aus der Überexpression von PC7 in HEK293-ADAM10 Δ RKKR-Zellen im Vergleich zu HEK293-ADAM10-PC7-Zellen nur eine unwesentliche Erhöhung der APPs α -Freisetzung, die nur die Auswirkung des PC7 auf das endogene ADAM10 widerspiegelt. Diese Befunde verdeutlichen damit eine Funktion von PC7 als α -Sekretase-aktivierender Konvertase und schließen eine direkte Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch PC7 aus. Hierdurch wird die Bedeutung von PC7 bei der α -Sekretase-Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins klar: PC7 fungiert nicht selbst als α -Sekretase, sondern trägt vielmehr durch die Aktivierung der α -Sekretase ADAM10 zu einer erhöhten α -Sekretase-Prozessierung bei.

Sowohl PC7 als auch ADAM10 partizipieren in Furin-defizienten LoVo-Zellen am konstitutiven α -Sekretase-Weg (Lopez-Perez *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit diesem Befund findet in LoVo-Zellen eine proteolytische Prozessierung des endogenen ADAM10 statt. Hierdurch wird außerdem verdeutlicht, dass Furin für die Prozessierung von ADAM10 nicht unbedingt erforderlich ist und durch das in LoVo-Zellen vorhandene PC7 ersetzt werden kann. Da in LoVo-Zellen jedoch auch die Proprotein-Konvertase PACE4 exprimiert wird, kann eine Prozessierung von ADAM10 durch diese nicht ausgeschlossen werden. Verglichen mit der proteolytischen Entfernung der Prodomäne von endogenem ADAM10 in untransfizierten HEK293-Zellen findet dies in LoVo-Zellen in geringeren Maße statt, was möglicherweise auf das fehlende Furin zurückzuführen ist.

Aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung stellt die Entfernung der Prodomäne einen wichtigen Schritt für die Aktivierung des ADAM10-Zymogens dar. Die inhibitorische Funktion konnte durch die Koexpression der Prodomäne als unabhängiges Polypeptid zusammen mit Wildtyp-ADAM10 beobachtet werden (Anders *et al.*, 2001). Zusätzlich scheint sie die korrekte Faltung von ADAM10 zu vermitteln und somit als intramolekulares Chaperon zu fungieren. So besitzt eine Deletions-Mutante von ADAM10, die ohne Prodomäne exprimiert wird, keine katalytische Aktivität, jedoch konnte durch eine Koexpression der separierten Prodomäne *in trans* die katalytische Aktivität des Prodomänen-deletierten ADAM10 wiederhergestellt werden (Anders *et al.*, 2001).

Eine Funktion der Prodomäne ist es daher, ADAM10 bis zur Aktivierung durch PC7 oder Furin in einem inaktiven Zustand zu halten. Durch die Deglykosylierung von ADAM10 konnte das zelluläre Kompartiment, in dem die Entfernung der Prodomäne erfolgt, näher bestimmt werden. Dabei wurden die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden eingesetzten Glykosidasen ausgenutzt. So bleiben asparagingebundene Glycane gegenüber einer Deglykosylierung durch die N-Glykosidase F sensitiv, werden jedoch nach ihrer Modifikation im *trans*-Golgi-Kompartiment resistent gegenüber einer Deglykosylierung durch die Endoglykosidase H. Um einen effektiven Reaktionsverlauf sicherzustellen mussten die Proteinproben zunächst mit SDS denaturiert und anschließend soweit verdünnt werden, dass die eingesetzten Enzyme während der Deglykosylierungsreaktion nicht denaturieren. Mit Hilfe der Chloroform-Methanol-Fällung konnten die Proben anschließend wieder aufkonzentriert werden, so dass für den immunologischen Nachweis eine ausreichende Menge des untersuchten Proteins auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden konnte. Gleichzeitig wurden störende Bestandteile der Deglykosylierungspuffer aus den Ansätzen entfernt. Andernfalls würden Pufferzusätze, wie zum Beispiel das Detergens Nonidet-P40, den Verlauf der Gelelektrophorese stark beeinträchtigen. Infolge der Deglykosylierung wird das Molekulargewicht von ADAM10 nur geringfügig verringert. In einem 8% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel konnten diese Änderungen im Molekulargewicht daher nicht aufgelöst werden. Erst durch die Verwendung eines NuPAGE (4-12%) Gradientengels werden die vorhandenen Unterschiede in den Molekulargewichten sichtbar.

Dem Deglykosylierungsmuster von ADAM10 zufolge wird die Prodomäne im *trans*-Golgi-Apparat oder in nachfolgenden Kompartimenten entfernt. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Beteiligung der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin an diesem Vorgang überein, da sie in genau diesen Zellkompartimenten katalytisch aktiv sind.

ADAM10 wird weit verbreitet in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben exprimiert (Yavari *et al.*, 1998). Ähnlich wie ADAM10 kommen PC7 und Furin ubiquitär in den Geweben vor und auch im Gehirn sind sie weit verbreitet (Seidah *et al.*, 1994 und 1996). Dort können die höchsten Expressionsraten von PC7 im Bereich des Hippocampus entdeckt werden, also dem Bereich, der in frühen Phasen der Alzheimer-Krankheit betroffen ist. Furin ist ebenfalls im Hippocampus nachweisbar, besitzt jedoch die höchste Expression im Plexus Chorioidei (Day *et al.*, 1992), einem Adergeflecht, das als Teil der Blut-Hirn-Schranke eine Barriere zwischen dem Blut und der Gehirnflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) bildet. Diese Expressionsmuster deuten somit auf eine physiologische Funktion von PC7 und Furin als ADAM10-aktivierende Enzyme hin. Die Bedeutung der redundanten ADAM10-Prozessierung ist unklar, jedoch ist die Prozessierung eines Vorläuferproteins durch mehrere Proprotein-Konvertasen nicht ungewöhnlich. Im Hinblick

auf die wichtigen biologischen Funktionen vieler Substrate der Proprotein-Konvertasen wäre es möglich, dass eine ausreichende Prozessierung bestimmter Vorläuferproteine durch redundante Enzymaktivitäten sichergestellt wird (Seidah *et al.*, 1994). Dies würde auch erklären, warum die meisten Gewebe sowohl Furin als auch PC7 exprimieren. Darüber hinaus könnte eine Regulation der Vorläuferprotein-Prozessierung auch durch eine regulierte Genexpression der entsprechenden Proprotein-Konvertasen erfolgen. So werden sowohl die Transkription als auch die Translation der mRNAs von PC1/PC3 und von PC2 in neuroendokrinen Zellen durch Glukose beziehungsweise durch second Messenger reguliert, gewöhnlich parallel zu den Änderungen in der Prohormon-Expression (Mania-Farnell *et al.*, 1996, Dong *et al.*, 1997). Auch die Stimulierung von adrenokortikalen Y1-Zellen mit ACTH führt zu einer Erhöhung der PC5-mRNA-Menge, die wahrscheinlich durch den second Messenger cAMP vermittelt wird und keine Änderungen der mRNA-Mengen von endogenem Furin und PC2 zur Folge hat (Lusson *et al.*, 1993). Die Expression des FUR-Gens wird durch drei alternative Promotoren geregelt. Zwei von ihnen sind sogenannte „housekeeping“-Promotoren (GC-reich) für eine konstitutive Genexpression, während der Dritte einen regulierbaren Promotor (mit TATA-Box) darstellt. Der TATA-Box-enhaltende Promotor kann durch den Transkriptionsfaktor C/EBPb, jedoch nicht durch die Transkriptionsfaktoren C/EBPa und C/EBPd, transaktiviert werden. Durch die alternative Nutzung dieser Promotoren könnte eine Regulation der exprimierten Furin-Menge erfolgen (Ayoubi *et al.*, 1994). Dies wird als Ursache für die unterschiedliche Expression des Furins und die hohen Expressionsraten in einigen Geweben in Betracht gezogen (Van de Ven *et al.*, 1993). Ein ähnlicher Mechanismus für die Regulation der PC7-Expression ist vorstellbar. Diese Befunde veranschaulichen, dass eine gezielte Erhöhung der Genexpression einer bestimmten Proprotein-Konvertase durch entsprechende Stimulanzen möglich ist.

Die β -Sekretase BACE wird, wie ADAM10, als Vorläuferprotein mit einer Prodomäne und einer Furin-Erkennungssequenz (RLPR) an der Grenze zur katalytischen Domäne synthetisiert. Diese wird durch eine Proprotein-Konvertase entfernt, nachdem BACE das endoplasmatische Retikulum verlassen hat (Capell *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu ADAM10 erfolgt die Prozessierung von BACE im *trans*-Golgi-Apparat durch Furin jedoch nicht durch PC7 (Bennet *et al.*, 2000, Benjannet *et al.*, 2001, Creemers *et al.*, 2000). Darauf beruhend lässt sich das in Abbildung 6.1 dargestellte hypothetische Modell der Aktivierung von ADAM10 und BACE mit den Auswirkungen auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins ableiten.

Da BACE nur durch Furin, nicht aber durch PC7 aktiviert werden kann (Bennet *et al.*, 2000, Benjannet *et al.*, 2001, Creemers *et al.*, 2000), und eine Aktivierung von ADAM10 sowohl durch PC7 als auch durch Furin erfolgt, könnte die Konkurrenz zwischen der

β -Sekretase BACE und der α -Sekretase ADAM10 im Hinblick auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins durch eine gezielte Erhöhung der PC7-Genexprsion und/oder durch eine Inhibierung von Furin, und folglich der β -Sekretase BACE, möglicherweise zum nicht-amyloidogenen Weg verschoben werden. Die Entstehung der neurotoxischen A β -Peptide könnte auf diesem Weg reduziert werden, was bei der Behandlung der Alzheimer-Demenz von Nutzen wäre.

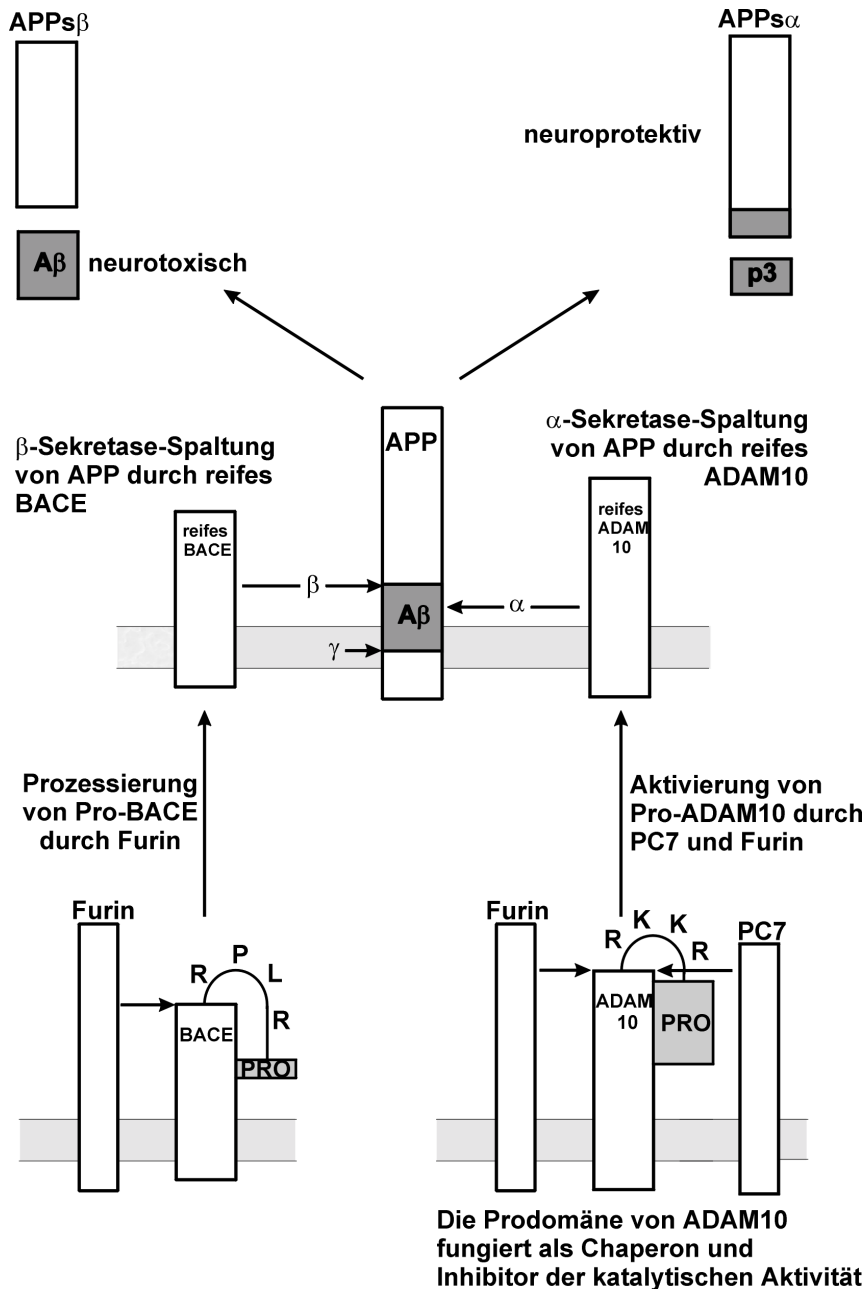


Abbildung 6.1 **Model zur Regulation der APP-Prozessierung durch die proteolytische Aktivierung der α -Sekretase ADAM10 und der β -Sekretase BACE.** Die Prodomäne von ADAM10 erleichtert die korrekte Faltung und hält das Enzym in einem inaktiven Zustand. Erst nach der Entfernung der Prodomäne durch die Proprotein-Konvertasen Furin oder PC7 wird die katalytisch aktive Protease erhalten. Im Gegensatz dazu wird die Prodomäne von BACE ausschließlich durch Furin und nicht durch PC7 entfernt.

6.3 Proteolytische Prozessierung von TACE

Ein essentieller Schritt zur Erzeugung von katalytisch aktivem TACE ist die proteolytische Entfernung der Prodomäne. Sie besitzt eine starke inhibitorische Wirkung (Milla *et al.*, 1999), die vermutlich durch die Komplexierung des Zink-Ions im aktiven Zentrum des Enzyms über einen Cystein-Rest in der Prodomäne vermittelt wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die Quecksilberverbindung APMA die Dissoziation des Komplexes effizient vermittelt. Daneben kann eine Inhibierung der katalytischen Aktivität von TACE mit Peptiden, die aus der Sequenz der Cystein-Switch-Region der Prodomäne abgeleitet wurden, erreicht werden (Roghani *et al.*, 1999). Doch die Prodomäne von TACE fungiert nicht nur als Autoinhibitor der katalytischen Aktivität, sie scheint auch die Faltung des Enzyms zu erleichtern und somit Eigenschaften eines intramolekularen Chaperons zu besitzen (Milla *et al.*, 1999).

TACE besitzt genau wie ADAM10 eine α -Sekretaseaktivität und eine Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz (RVKR). Zudem erfolgt die proteolytische Entfernung der Prodomäne, wie bei ADAM10, in einem späten Golgi-Kompartiment innerhalb des sekretorischen Wegs (Schlöndorff *et al.*, 2000). Eine Beteiligung von Proprotein-Konvertasen bei der Prozessierung von TACE ist daher sehr wahrscheinlich. In der Sequenz der Proprotein-Konvertasen-Spaltstelle bestehen jedoch Unterschiede zwischen den α -Sekretasen ADAM10 (RKKR) und TACE (RVKR).

Aufgrund der weitreichenden Substratspezifität der Proprotein-Konvertasen und ihrer überlappenden Expression in verschiedenen Geweben ist es möglich, dass mehr als eine Konvertase an der Endoproteolyse eines bestimmten Substrats beteiligt ist. Ebenso ist es möglich, dass ein Substrat, dessen Spaltstelle die Sequenzanforderungen für eine Proteolyse durch mehrere Proprotein-Konvertasen erfüllt, nur von einer bestimmten Konvertase, beziehungsweise nicht von allen in Frage kommenden Konvertasen, prozessiert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Prozessierung der Pro- α -Untereinheit der Integrine (Lissitzky *et al.*, 2000). Dies könnte darin begründet sein, dass das *trans*-Golgi Netzwerk möglicherweise in verschiedene funktionelle Mikrokompartimente untergliedert ist, oder dass die Prozessierung in post-Golgi-Vesikeln erfolgt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Unterschiede in der Lokalisierung der Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin in post-Golgi-vesikulären Kompartimenten beobachtet werden (Wouters *et al.*, 1998).

Da die Prozessierung durch Proprotein-Konvertasen von der Sequenz der Spaltstelle und der intrazellulären Lokalisierung abhängt, könnte es Unterschiede in der Entfernung der Prodomäne und somit in der Aktivierung von ADAM10 und TACE geben. Daher wurde die Bedeutung von Proprotein-Konvertasen, insbesondere von PC7 und Furin, bei der Entfaltung der katalytischen Aktivität von TACE aufgeklärt.

Nach der Inkubation von HEK293-Zellen mit dem Proprotein-Konvertasen-Inhibitor Dec-RVKR-cmk konnte infolge der Inhibierung der Proprotein-Konvertasen eine deutliche Abnahme der Prodomänen-Abspaltung von TACE beobachtet werden. Dieses Ergebnis entspricht der erwarteten Inhibitor-Wirkung bei einer Beteiligung von Proprotein-Konvertasen an der TACE-Prozessierung. Zudem resultiert sowohl die Überexpression von PC7 als auch die von Furin in HEK293-Zellen in einer erhöhten Menge der prozessierten Form von endogenem TACE. Demzufolge wird TACE von beiden Proprotein-Konvertasen in die aktive Form überführt. Allerdings weisen HEK293-Furin-Zellen größere Mengen des reifen Enzyms auf als HEK-PC7-Zellen. Ein Grund hierfür könnten Unterschiede in den Expressionsraten von Furin und PC7 sein. Da PC7 und Furin jedoch mit unterschiedlichen Antikörpern nachgewiesen werden müssen, ist ein quantitativer Vergleich ihrer Expression nicht möglich. Ferner könnte die Ursache auch in der intrazellulären Lokalisierung liegen, da eine gemeinsame Lokalisierung von TACE und Furin in definierten Zellkompartimenten möglicherweise eher besteht als zwischen TACE und PC7. Schließlich wäre es ebenfalls möglich, dass TACE ein besseres Substrat für Furin als für PC7 darstellt und deswegen größere Mengen an prozessiertem TACE in HEK293-Furin-Zellen vorliegen. Jedoch auch in Furin-defizienten LoVo-Zellen findet eine proteolytische Entfernung der TACE-Prodomäne statt. TACE kann folglich auch in Abwesenheit von Furin prozessiert werden. Vermutlich wird die fehlende Furin-Aktivität hier durch die Proprotein-Konvertase PC7 kompensiert, doch auch die in LoVo-Zellen exprimierte Proprotein-Konvertase PACE4 könnte zur Reifung von TACE beitragen.

Obwohl in der Proprotein-Konvertasen-Erkennungssequenz der Disintegrin-Metalloproteinasen ADAM10 und TACE ein geringer Unterschied besteht, konnte bei der Untersuchung ihrer Aktivierung kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. So erfolgt die Entfernung der Prodomäne von ADAM10 genau wie die Entfernung der Prodomäne von TACE im *trans*-Golgi-Apparat durch eine von Proprotein-Konvertasen vermittelte proteolytische Prozessierung. Daneben können beide Disintegrin-Metalloproteinasen sowohl durch PC7 als auch durch Furin aktiviert werden. Hierbei scheint TACE weniger effektiv durch PC7 prozessiert zu werden, jedoch könnte dieser Befund auch auf andere Ursachen zurückzuführen sein. Die Aktivierung dieser beiden Enzyme erfolgt somit in sehr ähnlicher Weise.

In Furin-defizienten LoVo-Zellen konnte nach der Überexpression von TACE weder eine konstitutive noch eine PMA-stimulierte α -Sekretaseaktivität nachgewiesen werden (Lopez-Perez *et al.*, 2001), was nach Meinung der Autoren auf eine blockierte Prozessierung des TACE-Zymogens infolge der fehlenden Furin-Aktivität zurückzuführen sein könnte. Im Widerspruch dazu besitzt TACE in HEK293-Zellen sowohl eine konstitutive als auch eine PMA-stimulierbare α -Sekretaseaktivität (Slack *et al.*, 2001, Buxbaum *et al.*,

1998) und wird in LoVo-Zellen proteolytisch prozessiert, so dass auch in dieser Zell-Linie eine beträchtliche Menge von endogenem TACE in der reifen, katalytisch aktiven Form vorliegt. Demzufolge sollte die konstitutive und die regulierte α -Sekretaseaktivität von TACE auch in LoVo-Zellen nachweisbar sein. Da das TACE-Zymogen von Furin sehr effektiv in die reife Form überführt wird und das fehlende Furin in LoVo-Zellen durch PC7 kompensiert werden muss, könnte eine Überexpression von TACE möglicherweise dazu führen, dass die Furin-Defizienz nicht länger durch PC7 ausgeglichen werden kann. Dies würde das Verhältnis von Pro-TACE zur prozessierten Form zugunsten des katalytisch inaktiven Zymogens verändern und somit in einer deutlich erhöhten Menge von Pro-TACE resultieren. Die konstitutive und die PMA-stimulierbare α -Sekretaseaktivität wäre in diesem Fall unter Umständen nicht mehr nachweisbar.

Durch eine *in situ*-Hybridisierung konnte in erwachsenen menschlichen Gehirnen und in den Gehirnen erwachsener Mäuse eine Koexpression von ADAM10, BACE und APP entdeckt werden, wogegen die Expressionsmuster von BACE2 und TACE nur teilweise mit dem von APP überlappten (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Dies deutet darauf hin, dass ADAM10 und nicht TACE die physiologisch relevante α -Sekretase darstellt. Für die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins haben die Ergebnisse der TACE-Aktivierung somit wohl nur eine untergeordnete Bedeutung, doch sie tragen entscheidend dazu bei, die Mechanismen, durch die die Freisetzung von Zelloberflächenproteinen reguliert wird, aufzuklären und besser zu verstehen.

6.4 Ausblick

Die bedeutende Funktion von Furin bei der proteolytischen Reifung vieler Proprotein-Substrate, einschließlich der Aktivierung einiger pathogener Moleküle, wie z.B. viraler Glykoproteine und bakterieller Toxine, hat diese Endoproteinase zu einem Ziel für die Entwicklung von starken und selektiven Inhibitoren gemacht. Im Gegensatz zur Aktivierung der α -Sekretase ADAM10, die durch die Proprotein-Konvertasen Furin und PC7 vermittelt wird, erfolgt die Prodomänen-Abspaltung der β -Sekretase BACE ausschließlich durch Furin, nicht aber durch PC7. Eine selektive Inhibierung von Furin könnte daher die Prozessierung von BACE hemmen und so möglicherweise die Aktivität von BACE verringern. Gleichzeitig sollte infolge der eingeschränkten BACE-Reifung eine deutliche Reduzierung der A β -Peptid-Produktion erzielt werden können. Da Furin für die Aktivierung von ADAM10 in der Gegenwart von PC7 nicht unbedingt erforderlich ist, sollte der nicht-amyloidogene Weg dabei nicht, oder nur geringfügig, betroffen werden.

Eine selektive Inhibierung von Furin ist mit Hilfe des α 1-PDX-Inhibitors möglich (Benjannet *et al.*, 1997, Jean *et al.*, 1998, Jean *et al.*, 2000). Dieser Furin-spezifische Inhibitor entstand durch eine zweifache Mutation von menschlichem α 1-Antitrypsin (α 1-AT), einem aus 394 Aminosäuren bestehenden Protein, das einen physiologischen Inhibitor der neutrophilen Elastase darstellt (Kurachi *et al.*, 1981). Eine natürlich vorkommende Mutante von α 1-AT weist eine Punktmutation im reaktiven Zentrum auf (AIPM³⁵⁸ substituiert durch AIPR³⁵⁸). Hierdurch wird die Spezifität dieses Inhibitors verändert, der nun nicht mehr die neutrophile Elastase hemmt, sondern als Thrombin-spezifischer Inhibitor fungiert und als α 1-AT-Pittsburgh bezeichnet wird (Owen *et al.*, 1983). Übereinstimmend mit der entscheidenden Bedeutung von Arginin-Resten in den Positionen -1 und -4 der Spaltstelle von Substraten, die durch Furin prozessiert werden, resultiert eine zweite Punktmutation in α 1-AT-Pittsburgh in einer Sequenz, die der minimalen Furin-Erkennungssequenz entspricht (RIPR³⁵⁸). Diese Mutante stellt einen potenten Inhibitor für Furin dar und wird als α 1-AT-Portland (α 1-PDX) bezeichnet. Im Vergleich zu anderen Furin-Inhibitoren ist α 1-PDX bei geringen Konzentrationen hochselektiv für Furin und zeigt in Zellkulturexperimenten keine erkennbare Toxizität.

Die Verwendung dieses Inhibitors für therapeutische Zwecke erfordert eine indirekte Inhibierung von BACE durch das rekombinante, extrazellulär verabreichte Protein. Tatsächlich wird extrazellulär verabreichtes α 1-PDX von menschlichen Astrocyten (U-373 MG) durch Furin aufgenommen und vermittelt anschließend dessen Abbau. Das Ausbleiben der α 1-PDX-Aufnahme in LoVo-Zellen, die kein funktionelles Furin exprimieren, deutet darauf hin, dass dieser Inhibitor auf der Zelloberfläche an Furin bindet. Dabei werden offenbar SDS-stabile Komplexe gebildet, die nach Aufnahme intrazellulär abgebaut werden (Jean *et al.*, 2000). Durch die Überexpression von Furin, nicht aber durch die Überexpression von PC7 oder PC5/PC6B, kann die α 1-PDX-Aufnahme in LoVo-Zellen wiederhergestellt werden. Daher könnte die gezielte Manipulation der Furin-Menge durch α 1-PDX indirekt zu einer Inhibierung der β -Sekretase BACE und damit zu einer verringerten A β -Entstehung führen. Dies könnte entweder allein durch α 1-PDX oder durch die Kombination mit anderen therapeutisch wirksamen Substanzen erfolgen.

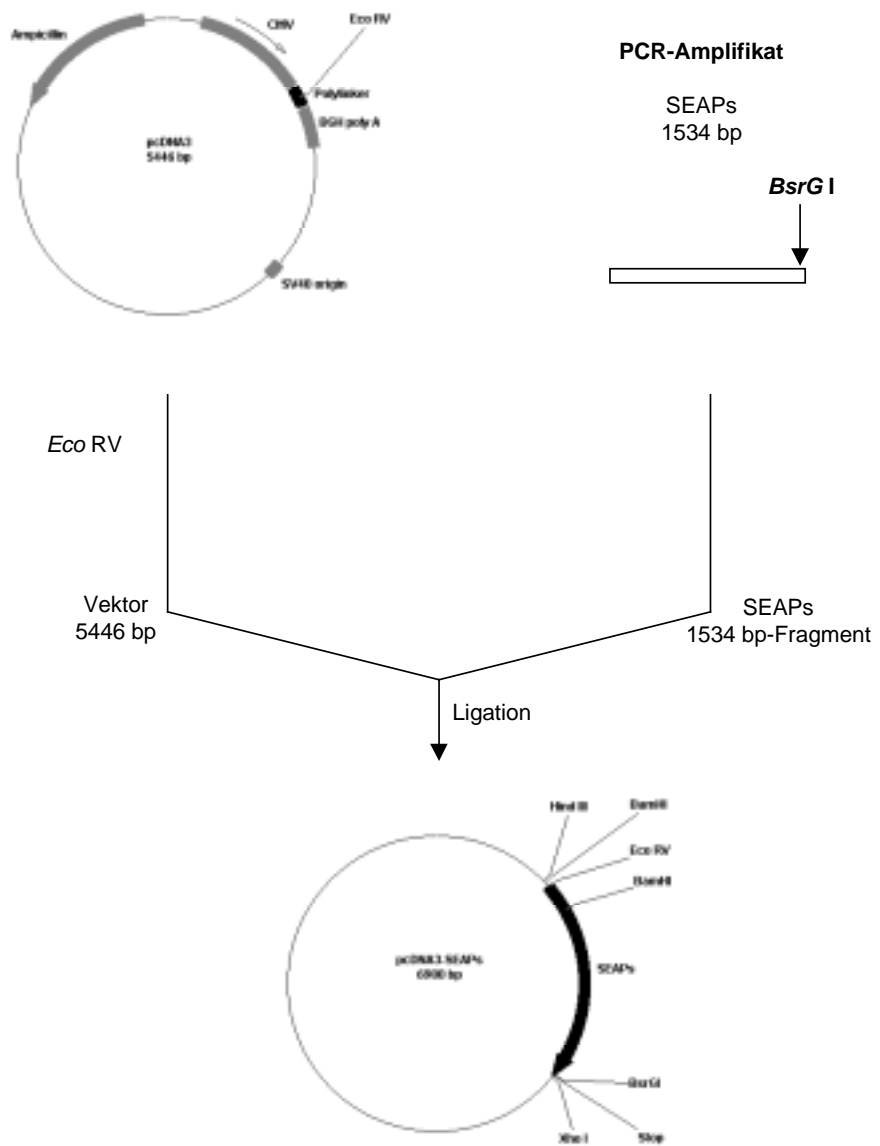
Um diese Möglichkeit einer indirekten BACE-Inhibierung zu überprüfen, muss nach der Reinigung des rekombinanten α 1-PDX die Auswirkung verschiedener Inhibitor-Konzentrationen auf die Reifung von ADAM10 und BACE, sowie die resultierenden Effekte auf die Produktion der A β -Peptide und der APPs α -Freisetzung in Zellkulturexperimenten untersucht werden.

7 ANHANG

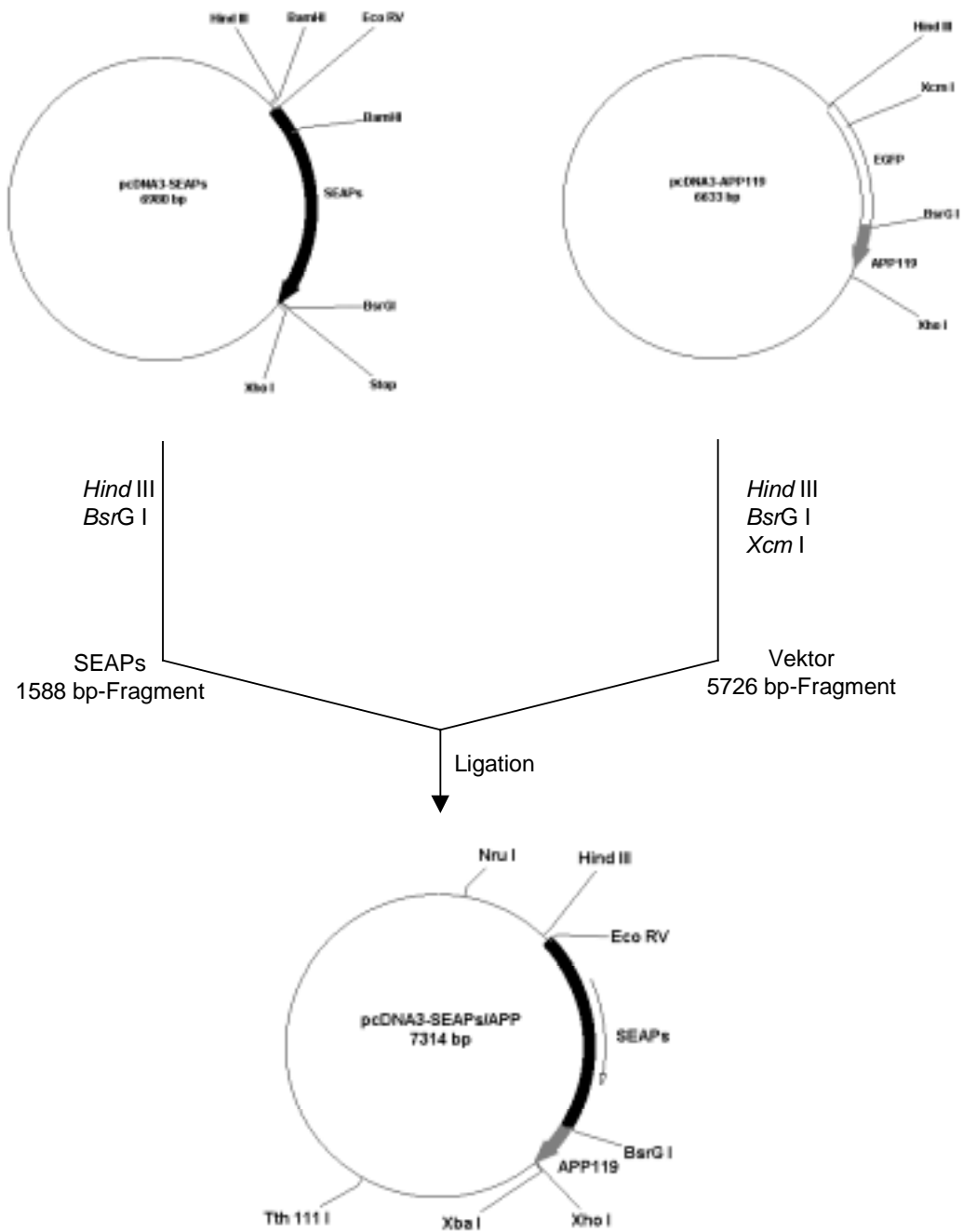
7.1 Klonierungsschemata

7.1.1 Klonierung einer cDNA für ein Reporterprotein mit der cDNA der α -Sekretase ADAM10 in einen Expressionsvektor

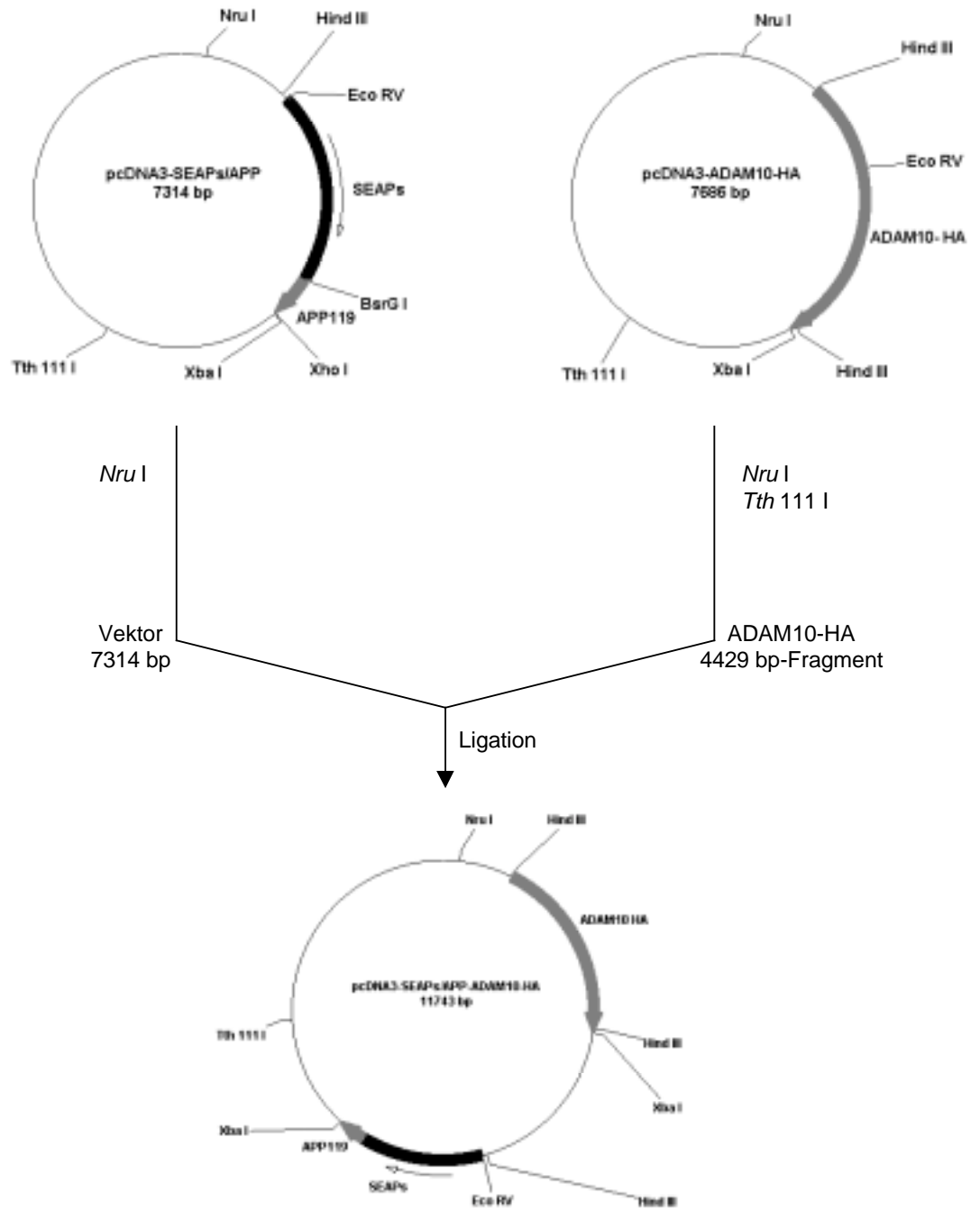
7.1.1.1 Klonierung einer verkürzten alkalischen Phosphatase in den Expressionsvektor pcDNA3



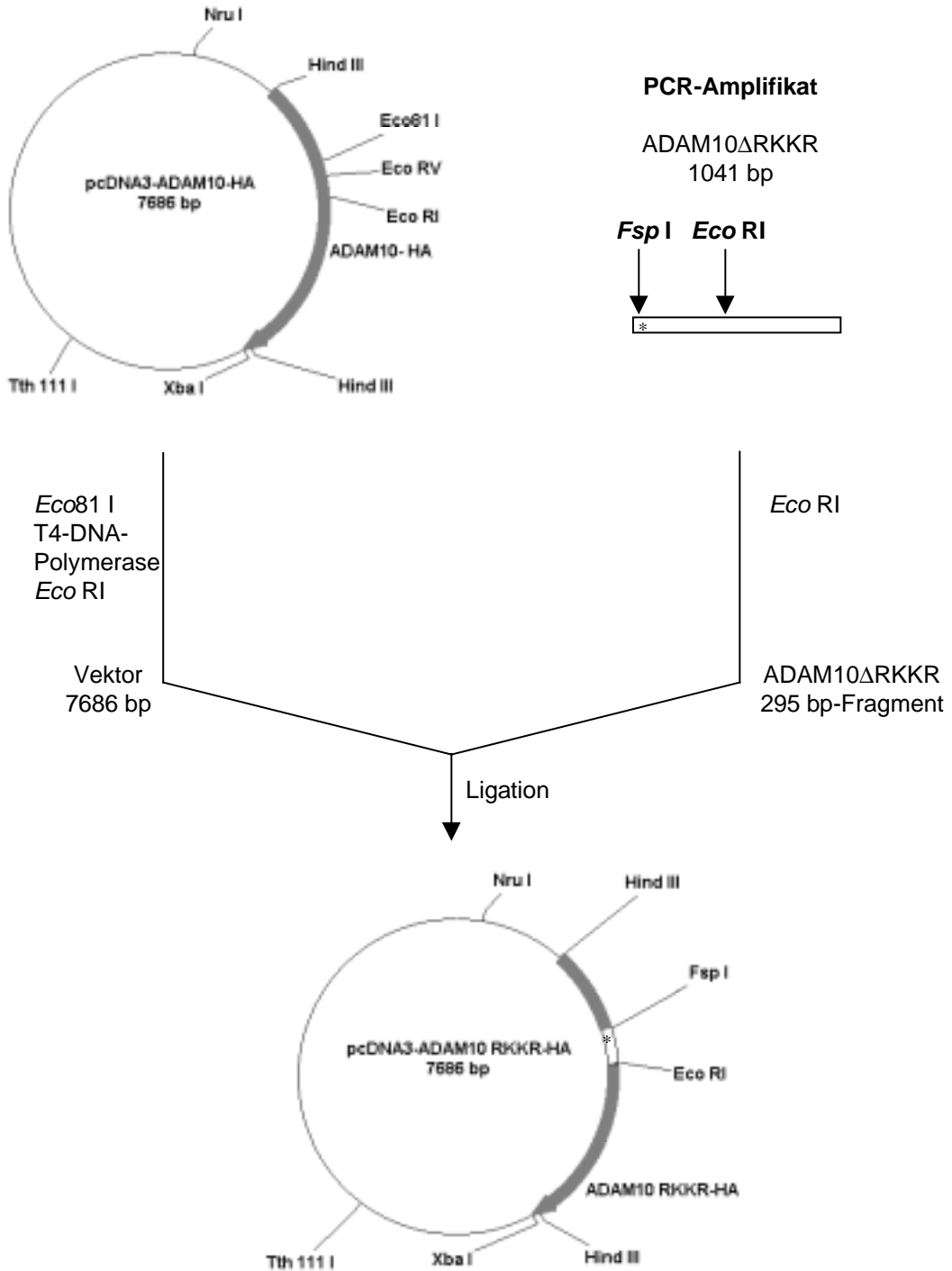
7.1.1.2 Klonierung eines Reporterproteins aus der verkürzten alkalischen Phosphatase und APP₁₁₉



7.1.1.3 Klonierung des Reporterproteins SEAPs/APP₁₁₉ und ADAM10 in einen Vektor



7.1.2 Klonierung der kodierenden Sequenz für die ADAM10 Δ RKKR-Mutante in den Expressionsvektor pcDNA3



7.2 Proteinsequenz des SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsproteins

```

MLLLLLLLLGL RLQLSLGIIP VEEENPDFWN REAAEALGAA KKLQPAQTAA
KNLIIFLGDG MGVSTVTAAR ILKGQKKDKL GPEIPLAMDR FPYVALSKTY
NVDKHVPDSG ATATAYLCGV KGNFQTIGLS AAARFNQCNT TRGNEVISVM
NRAKKAGKSV GVVTTTRVQH ASPAGTYAHT VNRNWYSAD VPASARQEGC
QDIATQLISN MDIDVILGGG RKYMFRMGTP DPEYPDDYSQ GGTRLDGKNL
VQEWLAKRQG ARYVWNRTEL MQASLDPSVT HLMGLFEPGD MKYEIHRDST
LDPSLMEMTE AALRLLSRNP RGFFLFVEGG RIDHGHESR AYRALTETIM
FDDAIERAGQ LTSEEDTSL VTADHSHVFS FGGYPLRGSS IFGLAPGKAR
DRKAYTVLLY GNGPGYVLKD GARPDVTESE SGSPEYRQOS AVPLDEETHA
GEDVAVFARG PQAHLVHGVO EQTFIAHVMA FAACLEPYTA CDLAPPAGTT
DAAHPGVYTR PGSGLTNIKT EEISEVKMDA EFRHDSGYEV HHQKLVFFAE
                                     ↑β-Sekretase      ↑α-Sekretase
DVGSNKGAI GLMVGGVVIA TVIVITLVML KKKQYTSIHH GVVEVDAAVT
                               ↑ ↑γ-Sekretase
PEERHLSKMQ QNGYENPTYK FFEQMQN

```

Die Proteinsequenz wird vom Vektor pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉ codiert. Die Teilsequenz des APP im Fusionsprotein ist fett gedruckt, die Spaltstellen der Sekretasen sind durch Pfeile angeführt und die Transmembrandomäne des APP ist unterstrichen.

7.3 Interne Bezeichnungen der hergestellten und verwendeten Plasmide

pcDNA3-ADAM10-HA.....	116.1
pcDNA3-APP ₁₁₉	131b.1
pcDNA3-SEAPs.....	135.1
pcDNA3-SEAPs/APP ₁₁₉	136.1
pcDNA3-SEAPs/APP ₁₁₉ -ADAM10-HA.....	137.11
pcDNA3-bFur.....	148.1
pcDNA3-ADAM10ΔRKKR-HA.....	160.4
pIRES1 _{hyg} -PC7.....	pA3.2
pIRES1 _{hyg} -Furin.....	pA5.7

8 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A β	β -Amyloidpeptid
ADAM	<i>A disintegrin and Metalloproteinase</i> (Disintegrin-Metalloproteinase)
APMA	<i>4-aminophenylmercuric acetate</i> (4-Aminophenylquecksilberacetat)
APP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
APP α	α -Sekretase- gespaltenes, lösliches APP
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	<i>β-site APP cleaving enzyme</i>
BBS	<i>BES buffered saline</i> (BES-gepufferte Kochsalzlösung)
Bp	Basenpaar
BES	N,N,-Bis-(2-hydroxyethyl)-aminoethansulfonsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
dec-RVKR-cmk	Decanoyl-RVKR-chloromethylketon
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraacetat
Endo H	Endoglykosidase H

ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
K	Lysin
k	Kilo
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPC	<i>lymphoma proprotein convertase</i>
μ	mikro
m	milli
M	mol/l
mA	Milliampere
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
min	Minute
n	nano
NPP	4-Nitrophenylphosphat
PACE	<i>paired aminoacid cleaving enzyme</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PC	<i>proprotein convertase</i> (Proprotein-Konvertase)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
Pro	Prodomäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Arginin
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten RNA)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SEAP	sekretierte alkalische Phosphatase
SEAPs	verkürzte sekretierte alkalische Phosphatase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Signalpeptid
STET	Saccharose-Tris-EDTA-Triton X-100
SV40	Simian-Virus 40
SVMP	<i>snake venom metalloproteinase</i> (Schlangengift-Metalloproteinase)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TACE	<i>TNFα-converting enzyme</i> (TNF α -konvertierendes Enzym)
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris- gepufferte Kochsalzlösung)
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF α	<i>transforming growth factor-α</i> (Transformierender Wachstums-Faktor- α)
TNF α	<i>tumor necrosis factor-α</i> (Tumor Nekrose-Faktor- α)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

9 LITERATUR

- Adler, M., Lazarus, R. A., Dennis, M. S. und Wagner, G. (1991) Solution Structure of Kistrin, a Potent Platelet Aggregation Inhibitor and GP IIb-IIIa Antagonist. *Science* **253**, 445-448.
- Almeida, E. A. C., Huovila, A.-P. J., Sutherland, A. E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D. G. und White, J. M. (1995) Mouse Egg Integrin $\alpha 6\beta 1$ Functions as a Sperm Receptor. *Cell* **81**, 1095-1104.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. und Fahrenholz, F. (27. Juni 2001) Regulation of the ADAM10 α -secretase activity by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.*, 10.1096/fj.00-0007.fje.
- Anderson, J. P., Esch, F. S., Keim, P. S., Sambamurti, K., Lieberburg, I. und Robakis, N. K. (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci. Lett.* **128**, 126-128.
- Anderson, J. P., Chen, Y., Kim, K. S. und Robakis, N. K. (1992) An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein containing a potentially amyloidogenic sequence. *J. Neurochem.* **59**, 2328-2331.
- Anderson, E. D., Thomas, L., Hayflick, J. S. und Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J. Biol. Chem.* **268**, 24887-24891.
- Anderson, E. D., VanSlyke, J. K., Thulin, C. D., Jean, F. und Thomas, G. (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* **16**, 1508-1518.
- Araki, W., Kitaguchi, N., Tokushima, Y., Ishii, K., Aratake, H., Shimohama, S., Nakamura, S. und Kimura, J. (1991) Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 265-271.

- Arribas, J. und Massague, J. (1995) Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism. *J. Cell Biol.* **128**, 433-441.
- Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T. K., Rose-John, S. und Massagué, J. (1996) Diverse Cell Surface Protein Ectodomains Are Shed by a System Sensitive to Metalloprotease Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **271**, 11376-11382.
- Ayoubi, T. A., Creemers, J. W., Roebroek, A. J. und Van de Ven, W. J. (1994) Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J. Biol. Chem.* **269**, 9298-9303.
- Baker, D., Shiau, A. K. und Agard, D. A. (1993) The role of pro regions in protein folding. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 966-970.
- Barelli, H., Lebeau, A., Vizzavona, J., Delaere, P., Chevallier, N., Drouot, C., Marambaud, P., Ancolio, K., Buxbaum, J. D., Khorkova, O., Heroux, J., Sahasrabudhe, S., Martinez, J., Warter, J. M., Mohr, M. und Checler, F. (1997) Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid beta peptides: their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mol. Med.* **3**, 695-707.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. und Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817-827.
- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J. S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. und Seidah, N. G. (1997) α 1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 26210-26218.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M. und Seidah, N. G. (2001) Post-translational processing of β -secretase (BACE) and its ectodomain shedding: the pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid A β production. *J. Biol. Chem.* **276**, 10879-10887.

- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J.-C., Citron, M. und Vassar, R. (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's β -secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 37712-37717.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Bolani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davies, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. und Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729733.
- Black, R. A. und White, J. M. (1998) ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 654-659.
- Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D. G., Primakoff, P. und White, J. M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248-252.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X. und Stockler, W. (1993) Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134-140.
- Bruzzaniti, A., Goadge, K., Jay, P., Taviaux, S. A., Lam, M. H., Berta, P., Martin, T. J., Moseley, J. M. und Gillespie, M. T. (1996) PC8 [corrected], a new member of the convertase family. *Biochem. J.* **314**, 727-731.
- Buxbaum, J. D., Koo, E. H. und Greengard, P. (1993) Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9195-9198.
- Buxbaum, J. D., Liu, K.-N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. und Black, R. A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 27765-27767.
- Cai, X. D., Golde, T. E. und Younkin, S. G. (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* **259**, 514-516.

- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G. und Haass, C. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 30849-30854.
- Caporaso, G. L., Gandy, S. E., Buxbaum, J. D., Ramabhadran, T. V. und Greengard, P. (1992) Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3055-3059.
- Chantry, A., Earl, C., Groome, N. und Glynn, P. (1988) Metalloendoprotease cleavage of 18.2- and 14.1-kilodalton basic proteins dissociating from rodent myelin membranes generates 10.0- and 5.9-kilodalton C-terminal fragments. *J. Neurochem.* **50**, 688-694.
- Chantry, A., Gregson, N. A. und Glynn, P. (1989) A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **264**, 21603-21607.
- Checler, F. (1995) Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **65**, 1431-1444.
- Cho, C., O'Dell Bunch, D., Faure, J.-E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P. und Myles, D. G. (1998) Fertilization Defects in Sperm from Mice Lacking Fertilin β . *Science* **281**, 1857-1859.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. und Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360**, 672-674.
- Citron, M., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1995) Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* **14**, 661-670.
- Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P. und Selkoe, D. J. (1996) Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13170-13175.

- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St. George Hyslop, P. und Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* **3**, 67-72.
- Citron, M. (2000) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular medicine Today* **6**, 392-397.
- Constam, D. B., Calfon, M. und Robertson, E. J. (1996) SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **134**, 181-191.
- Cook, D. G., Forman, M. S., Sung, J. C., Leight, S., Kolson, D. L., Iwatsubo, T., Lee, V. M. und Doms, R. W. (1997) Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* **3**, 1021-1023.
- Creemers, J. W. M., Siezen, R. J., Roebroek, A. J., Ayoubi, T. A., Huylebroeck, D. und Van de Ven, W. J. (1993) Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 21826-21834.
- Creemers, J. W. M., Dominguez, D. I., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W. und De Strooper, B. (2000) Processing of β -secretase (Bace) by furin and other members of the proprotein convertase family. *J. Biol. Chem.* **276**, 4211-4217.
- Dartigues, J. F. und Letenneur, L. (2000) Genetic epidemiology of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurol.* **13**, 385-389.
- Day, R., Schäfer, M. K.-H., Cullinan, W. E., Watson, S. J., Chretien, M. und Seidah, N. G. (1993) Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **149**, 27-30.
- De Strooper, B., Umans, L., Van Leuven, F. und Van Den Berghe, H. (1993) Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor

protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 295-304.

De Strooper, B., Creemers, J. W. M., Moechars, D., Huylebroeck, D., Van de Ven, W. J. M., Van Leuven, F. und Van de Berghe, H. (1995) Amyloid precursor protein is not processed by furin, PACE 4, PC1/3, PC2, PC4, und PC5/6 of the furin family of proprotein processing enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1246**, 185-188.

Dittie, A. S., Thomas, L., Thomas, G. und Tooze, S.A. (1997) Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **16**, 4859-4870.

Doedens, J. R. und Black, R. A. (2000) Stimulation-induced Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14598-14607.

Dong, W., Seidel, B., Marcinkiewicz, M., Chretien, M., Seidah, N. G. und Day, R. (1997) Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. *J. Neurosci.* **17**, 563-575.

Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J. M., Lemaire, H. G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer`s disease. *EMBO J.* **7**, 949-957.

Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D. und Ward, P. J. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122-1124.

Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G. M. und Goodman, C. S. (1996) The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13233-13238.

Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D. und Choe, H. (2000) BACE2, a beta-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9712-9717.

- Fox, J. W. und Bjarnason, J. B. (1996) The reprotolysins: a family of metalloproteinases defined by snake venom and mammalian metalloproteinases, Zinc Metalloproteinases in Health And Disease 1-21, *Hersg. Hooper, N. M., Taylor & Francis London*.
- Furukawa, K., Barger, S.W., Blalock, E.M. und Mattson, M.P. (1996) Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* **379**, 74-78.
- Garten, W., Stieneke, A., Shaw, E., Wikstrom, P. und Klenk, H.-D. (1989) Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* **172**, 25-31.
- Goedert, M. (1987) Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease. *EMBO J.* **6**, 3627-3632.
- Gould, R. J., Polokoff, M. A. und Friedman, P. A. (1990). Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **195**, 168-171.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L. F., Moroder, L. und Bode, W. (1993) Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* **335**, 76-80.
- Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L. Jr., Younkin, L. H., Suzuki, N. und Younkin, S. G. (1995) Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J. Biol. Chem.* **270**, 7013-7016.
- Gray, G. E., Mann, R. S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M.-L., Banks, A., Leiman, J., Ward, D., Ish-Horowitz, D. und Artavanis-Tsakonas, S. (1999) Human Ligands of the Notch Receptor. *Am. J. Pathol.* **154**, 785-794.
- Haass, C. und Selkoe, D. J. (1993) Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* **75**, 1039-1042.
- Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. und Selkoe, D. J. (1992) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* **357**, 500-503.

- Harris, M. E., Carney, J. M., Cole, P. S., Hensley, K., Howard, B. J., Martin, L., Bummer, P., Wang, Y., Pedigo, N. W. Jrs. und Butterfield, D.A. (1995) beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport*. **6**, 1875-1879.
- Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K. und Beyreuther, K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* **3**, 1016-1020.
- Hooper, N. M. (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1-6.
- Howard, L. und Glynn, P. (1995) Membrane-Associated Metalloproteinase Recognized by Characteristic Cleavage of Myelin Basic Protein: Assay and Isolation. *Methods Enzymol.* **248**, 388-395.
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S. und Glynn, P. (1996) Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochemistry* **317**, 45-50.
- Huang, T. F., Holt, J. C., Lukasiewicz, H. und Niewiarowski, S. (1987) Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* **262**, 16157-16163.
- Hung, A. Y., Haass, C., Nitsch, R. M., Qiu, W. Q., Citron, M., Wurtman, R. J., Growdon, J. H. und Selkoe, D. J. (1993) Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 22959-22962.
- Huovila, A.-P. J., Almeida, E. A. C. und White J. M. (1996) ADAMs and cell fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 692-699.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. und Doms, R. W. (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33729-33737.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L.,

- Walsh, F. S., Dingwall, C. und Christie, G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.* **14**, 419-427.
- Ikezu, T., Trapp, B. D., Song, K. S., Schlegel, A., Lisanti, M. P. und Okamoto, T. (1998) Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 10485-10495.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. und Lansbury, P. T. Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-4697.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A. H. und Thomas, G. (1998) α 1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7293-7298.
- Jean, F., Thomas, L., Molloy, S. S., Liu, G., Jarvis, M. A., Nelson, J. A. und Thomas, G. (2000) A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2864-2869.
- Jones, B. G., Thomas, L., Molloy, S. S., Thulin, C. D., Fry, M. D., Walsh, K. A. und Thomas, G. (1995) Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* **14**, 5869-5883.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. und Ito, H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* **331**, 530-532.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. und Ishiura, S. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* **343**, 371-375.

- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. und Fahrenholz, F. (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5815-5820.
- Krätschmar, J., Lum, L. und Blobel, C. P. (1996) *Metargidin, a Membrane-anchored Metalloprotease-disintegrin Protein with an RGD Integrin Binding Sequenze*. *J. Biol. Chem.* **271**, 4593-4596.
- Kuentzel, S. L., Ali, S. M., Altman, R. A., Greenberg, B. D. und Raub, T. J. (1993) The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem. J.* **295**, 367-378.
- Kurachi, K., Chandra, T., Degen, S. J., White, T. T., Marchioro, T. L., Woo, S. L. und Davie, E. W. (1981) Cloning and sequence of cDNA coding for alpha 1-antitrypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6826-6830.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. und Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3922-3927.
- LeBlanc, A. C., Chen, H. Y., Autilio-Gambetti, L. und Gambetti, P. (1991) Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures. *FEBS Lett.* **292**, 171-178.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. und Tang, J. (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1456-1460.
- Lissitzky, J. C., Luis, J., Munzer, J. S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J. und Seidah, N. G. (2000) Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem. J.* **346**, 133-138.

- Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R. und Wewer, U. M. (1998) Human ADAM 12 (Meltrin α) Is an Active Metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **273**, 16993-16997.
- Loechel, F., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Albrechtsen, R. und Wewer, U. M. (1999) Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. *J. Biol. Chem.* **274**, 13427-13433.
- Lopez-Perez, E., Seidah, N. G. und Checler, F. (1999) Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J. Neurochem.* **73**, 2056-2062.
- Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S. J., Creemers, J., Seidah, N. G. und Checler, F. (2001) Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J. Neurochem.* **76**, 1532-1539.
- Lum, L., Reid, M. S. und Blobel, C. P. (1998) Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**, 26236-26247.
- Luo, Y. Q., Hirashima, N., Li, Y. H., Alkon, D. L., Sunderland, T., Etcheberrigaray, R. und Wolozin, B. (1995) Physiological levels of beta-amyloid increase tyrosine phosphorylation and cytosolic calcium. *Brain Res.* **681**, 65-74.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M. und Seidah, N. G. (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6691-6695.
- Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E. (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 425-427.
- Mania-Farnell, B. L., Botros, I., Day, R. und Davis, T. P. (1996) Differential modulation of prohormone convertase mRNA by second messenger activators in two cholecystokinin-producing cell lines. *Peptides* **17**, 47-54.

- Marcinkiewicz, M. und Seidah, N. G. (2000) Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.* **75**, 2133-2143.
- Maruyama, K., Kametani, F., Usami, M., Yamao-Harigaya, W. und Tanaka, K. (1991) "Secretase," Alzheimer amyloid protein precursor secreting enzyme is not sequence-specific. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1670-1676.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I. und Rydel, R.E. (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta amyloid precursor protein. *Neuron* **10**, 243-254.
- McGeer, P. .L und McGeer, E. G. (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **21**, 195-218.
- Meerabux, J., Yaspo, M. .L, Roebroek, A. J., Van de Ven, W. J., Lister, T. A. und Young, B. D. (1996) A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res.* **56**, 448-451.
- Merlos-Suárez, A., Fernández-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J. und Arribas, A. (1998) Pro-tumor necrosis factor- α processing activity is tightly controlled by a component that does not affect Notch processing. *J. Biol. Chem.* **273**, 24955-24962.
- Milla, M. E., Leesnitzer, M. A., Moss, M. L., Clay, W. C., Carter, H. L., Miller, A. B., Su, J.-L., Lambert, M. H., Willard, D. H., Sheeley, D. M., Kost, T. A., Burkhart, W., Moyer, M., Blackburn, R. K., Pahel, G. L., Mitchell, J. L., Hoffman, C. R. und Becherer, J. D. (1999) Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* **274**, 30563-30570.
- Mills, J. und Reiner, P. B. (1999) Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J. Neurochem.* **72**, 443-460.

- Molloy, S. S., Thomas, L., VanSlyke, J. K., Stenberg, P. E. und Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* **13**, 18-33.
- Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F. und Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* **9**, 28-35.
- Morimoto, T., Ohsawa, I., Takamura, C., Ishiguro, M. und Kohsaka, S. (1998) Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci Res.* **51**, 185-195.
- Moss, M. L., Jin, S.-L. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W.-J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocquell, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.-L., Warner, J., Willard, D. und Becherer, J. D. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor- α . *Nature* **385**, 733-736.
- Muga, A., Neugebauer, W., Hiramata, T. und Surewicz, W. K. (1994) Membrane Interaction and Conformational Properties of the Putative Fusion Peptide of PH-30, a Protein Active in Sperm-Egg Fusion. *Biochemistry* **33**, 4444-4448.
- Munzer, J. S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Benjannet, S., Chretien, M. und Seidah, N. G. (1997) In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J. Biol. Chem.* **272**, 19672-19681.
- Myles, D. G., Kimmel, L. H., Blobel, C. P., White, J. M. und Primakoff, P. (1994) Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4195-4198.
- Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327**, 625-635.
- Niewiarowski, S., McLane, M. A., Kloczewiak, M. und Stewart, G. J. (1994) Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin. Hematol.* **31**, 289-300.

- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J. und Growdon, J. H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**, 304-307.
- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Farber, S. A., Schulz, J. G., Deng, M., Kim, C., Borghesani, P. R., Korver, W., Wurtman, R. J. und Growdon, J. H. (1994) Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer's disease in transfected cell lines and in brain slices. *J. Neural. Transm. Suppl.* **44**, 21-27.
- Nitsch, R. M. und Growdon, J. H. (1994) Role of neurotransmission in the regulation of amyloid beta-protein precursor processing. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1275-1284.
- Nunan, J. und Small, D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -Secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6-10.
- Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H. und Carrell, R. W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N. Engl. J. Med.* **309**, 694-698.
- Pan, D. und Rubin, G. M. (1997) Kuzbanian Controls Proteolytic Processing of Notch and Mediates Lateral Inhibition during Drosophila and Vertebrate Neurogenesis. *Cell* **90**, 271-280.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. und Hooper, N. M. (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* **38**, 9728-9734.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J. und Black, R. A. (1998) An Essential Role for Ectodomain Shedding in mammalian Development. *Science* **282**, 1281-1284.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., Fuller, F. und Cordell, B. (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine protease inhibitors. *Nature* **331**, 525-527.

- Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580.
- Rawlings, N. D. und Barrett, A. J. (1995) Evolutionary Families of Metallopeptidases. *Meth. Enzymol.* **248**, 183-228.
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Pescon, J. J. und Black, R. A. (2000) Functional Analysis of the Domain Structure of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14608-14614.
- Roebroek, A. J., Schalken, J. A., Bussemakers, M. J., van Heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F. M., Bloemers, H. P. und Van de Ven, W. J. (1986) Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol. Biol. Rep.* **11**, 117-125.
- Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P. und Blobel, C. P. (1999) Metalloprotease-Disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 3531-3540.
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E. und Ball, M. J. (1993) beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10836-10840.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T. und Rubin, G. M. (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science* **273**, 1227-1231.
- Sambamurti, K., Shioi, J., Anderson, J. P., Pappolla, M. A. und Robakis, N. K. (1992) Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **33**, 319-329.
- Savage, M. J., Trusko, S. P., Howland, D. S., Pinsker, L. R., Mistretta, S., Reaume, A. G., Greenberg, B. D., Siman, R. und Scott, R. W. (1998) Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J. Neurosci.* **18**, 1743-1752.

- Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M. L., Kern, H. F., Klenk, H.-D. und Garten, W. (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmatic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* **14**, 2424-2435.
- Schlöndorff, J., Becherer, J. D. und Blobel, C. P. (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem. J.* **347**, 131-138.
- Seidah, N. G., Chretien, M. und Day, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like proprotein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* **76**, 197-209.
- Seidah, N. G., Hamelin, H., Mamarbachi, M., Dong, W., Tadros, H., Mbikay, M., Chretien, M. und Day, R. (1996) cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3388-3393.
- Seidah, N. G. und Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**, 45-62.
- Selkoe, D. J. (1996) Amyloid β -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **271**, 18295-18298.
- Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, 23-31.
- Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**, 741-766.
- Shi, X. P., Chen, E., Yin, K. C., Na, S., Garsky, V. M., Lai, M. T., Li, Y. M., Platchek, M., Register, R. B., Sardana, M. K., Tang, M. J., Thiebeau, J., Wood, T., Shafer, J. A. und Gardell, S. J. (2001) The pro domain of beta-secretase does not confer strict zymogen-like properties but does assist proper folding of the protease domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 10366-10373.

- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. *et al.* (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129.
- Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A. und Dijkstra, B. W. (1991) Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng.* **4**, 719-737.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G. und Simons, K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6460-6464.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. und John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-540.
- Sisodia, S. S. (1992) β -Amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6075-6079.
- Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W. und Lee, V. M.-Y. (2000) Protein Kinase C-dependent α -secretase competes with β -secretase for cleavage of amyloid- β precursor protein in the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* **275**, 2568-2575.
- Slack, B. E., Ma, L. K. und Seah, C. C. (2001) Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem. J.* **357**, 787-794.
- Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K. und Masters, C.L. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* **14**, 2117-2127.

- Solomon, K. A., Covington, M. B., DeCicco, C. P. und Newton, R. C. (1997) The fate of pro-TNF-alpha following inhibition of metalloprotease-dependent processing to soluble TNF-alpha in human monocytes. *J. Immunol.* **159**, 4524-4531.
- Steiner, D. F. (1998) The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 31-39.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B. und Bode, W. (1995) The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823-840.
- Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K. und Nakayama, K. (1993) A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 1019-1026.
- Teuchert, M., Berghofer, S., Klenk, H. D. und Garten, W. (1999) Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J. Biol. Chem.* **274**, 36781-36789.
- Teuchert, M., Schafer, W., Berghofer, S., Hoflack, B., Klenk, H. D., Garten, W. (1999) Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 8199-8207.
- Tomita, S., Kirino, Y. und Suzuki, T. (1998) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J. Biol. Chem.* **273**, 6277-6284.
- van de Loo, J. W., Creemers, J. W., Bright, N. A., Young, B. D., Roebroek, A. J. und Van de Ven, W. J. (1997) Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase. *J. Biol. Chem.* **272**, 27116-27123.

- van de Loo, J. W., Teuchert, M., Pauli, I., Plets, E., Van de Ven, W. J. und Creemers, J. W. (2000) Dynamic palmitoylation of lymphoma proprotein convertase prolongs its half-life, but is not essential for trans-Golgi network localization. *Biochem. J.* **352**, 827-833.
- van den Ouweland, A. M., van Duijnhoven, H. L., Keizer, G. D., Dorssers, C. und Van de Ven, W. J. (1990) Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res.* **18**, 664.
- van de Ven, W. J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A. M., van Duijnhoven, H. L., Roebroek, A. J. und Siezen, R. J. (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **14**, 265-275.
- Van de Ven, W. J., Roebroek, A. J. und Van Duijnhoven, H. L. (1993) Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Crit. Rev. Oncog.* **4**, 115-136.
- Van Wart, H. E. und Birkedal-Hansen, H. (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5578-5582.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. und Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.
- Vey, M., Schafer, W., Berghofer, S., Klenk, H. D. und Garten, W. (1994) Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J. Cell Biol.* **127**, 1829-1842.
- Vidricaire, G., Denault, J. B. und Leduc, R. (1993) Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1011-1018.

- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G. und Haass, C. (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **276**, 14634-14641.
- Wang, R., Meschia, J. F., Cotter, R. J. und Sisodia, S. S. (1991) Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 16960-16964.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-126.
- Weninger, S. C. und Yankner, B.A. (2001) Inflammation and Alzheimer disease: the good, the bad, and the ugly. *Nat. Med.* **7**, 527-528.
- Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y. und Haass, C. (1997) Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* **272**, 16085-16088.
- Wolfsberg, T. G., Bazan, J. F., Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P. und White, J. M. (1993) The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional, and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10783-10787.
- Wolfsberg, T. G., Primakoff, P., Myles, D. G. und White, J. M. (1995) ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. *J. Cell Biol.* **131**, 275-278.
- Wolfsberg, T. G. und White, J. M. (1996) ADAMs in Fertilization and Development. *Dev. Biol.* **180**, 389-401.
- Wolozin, B., Hirashima, N., Luo, Y., Li, Y. H., Alkon, D. L., Etcheberrigaray, R. und Sunderland, T. (1995) Transforming growth factor beta induces a beta-responsive calcium fluxes in neurons. *Neuroreport* **6**, 1429-1433.

- Wouters, S., Leruth, M., Decroly, E., Vandenbranden, M., Creemers, J. W. M., van de Loo, J.-W. H. P., Ruyschaert, J.-M. und Courtoy, P. J. (1998) Furin and proprotein convertase 7 (PC7)/lymphoma PC endogenously expressed in rat liver can be resolved into distinct post-Golgi compartments. *Biochem. J.* **336**, 311-316.
- Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A. C., Sisodia, S. S., Greengard, P. und Gandy, S. (1997) Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3748-3752.
- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y.-I. und Fujisawa-Sehara (1995) A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* **377**, 652-656.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L. und Gurney, M. E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533-537.
- Yankner, B. A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* **16**, 921-932.
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M. und Xu, T. (1998) Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1161-1167.
- Zhang, X. P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W. und Takada, Y. (1998) Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin $\alpha v \beta 3$. *J. Biol. Chem.* **273**, 7345-7350.
- Zhang, Y., Jiang, J., Black, R. A., Baumann, G. und Frank, S. J. (2000) Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE) Is a Growth Hormone Binding Protein (GHBP) Sheddase: The Metalloprotease TACE/ ADAM-17 Is Critical for (PMA-Induced) GH-Receptor Proteolysis and GHBP Generation. *Endocrinology* **141**, 4342-4348.

Zhou, A., Webb, G., Zhu, X. und Steiner, D. F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748.

Zhou, M., Graham, R., Russel, I G. und Croucher, P. I. (2001) MDC-9 (ADAM-9/Meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha(v)beta(5) integrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 574-580.

Wissenschaftliche Veröffentlichung

Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. und Fahrenholz, F. (2001) Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 10.1096/fj.01-0007fje.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Mainz, den 10.10.2001

Andreas Anders