

# **Genomische Struktur und Promotorcharakterisierung des humanen ADAM10-Gens**

**D i s s e r t a t i o n**  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie der  
**Johannes Gutenberg-Universität**  
in Mainz

**Claudia Prinzen**  
geboren in Koblenz

Mainz, 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 3.03.2005

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Die Alzheimer'sche Erkrankung.....	1
1.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) .....	4
1.2.1 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins .....	5
1.2.1.1 Die amyloidogene Prozessierung.....	6
1.2.1.2 Die nicht-amyloidogene Prozessierung.....	9
1.3 Klassifizierung und Struktur von ADAM10 .....	9
1.3.1 Die möglichen biologischen Funktionen der Mitglieder der ADAM-Familie. 12	
1.3.1.1 Die verschiedenen $\alpha$ -Sekretasen .....	13
1.4 Die verschiedenen Kontrollebenen der Genexpression .....	15
1.5 Transkriptionsregulation bei Eukaryoten.....	16
1.6 Prinzipien der Transkriptionsregulation.....	17
1.7 Wichtige Faktoren bei der Alzheimer Demenz.....	21
1.8 Zielsetzung .....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	29
2.1 Chemikalien und Medien .....	29
2.2 Enzyme und Kitsysteme.....	30
2.3 Laborgeräte und Hilfsmittel .....	30
2.4 Stammlösungen, Puffer und Kulturmedien.....	32
2.5 Plasmide und Oligonukleotide .....	36
2.5.1 Plasmide .....	36
2.5.2 Oligonukleotidkonstruktion .....	37
2.5.2.1 Oligonukleotide zur Herstellung der Promotorkonstrukte.....	37
2.5.2.2 Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen .....	38
2.5.2.3 Oligonukleotide für EMSA .....	38
2.5.2.4 Sequenzierprimer .....	39
2.5.2.5 Primer zur Überprüfung der stabilen Expression des Vektors CP56.6 .....	39
2.5.2.6 Primer für 5'-RACE .....	39
2.5.2.7 Primer für die <i>Real Time</i> RT-PCR .....	40
2.5.2.8 Primer für die Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	40
2.5.3 Verwendete Bakterienstämme.....	41
2.6 Molekularbiologische Standardmethoden.....	41

## Inhaltsverzeichnis

---

2.6.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	41
2.6.2	Lagerung von <i>E. coli</i> .....	41
2.6.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	42
2.6.4	Transformation .....	42
2.6.4.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	42
2.6.5	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	43
2.6.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	43
2.6.5.1.1	Plasmid-MINI-Präparation (Schnellmethode) .....	43
2.6.5.1.2	Plasmid-Säulen-Präparation .....	43
2.6.5.1.3	Plasmid-MAXI-Präparation .....	43
2.6.5.1.4	Endotoxinfreie Plasmidpräparation .....	45
2.6.5.2	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen .....	45
2.6.5.3	Isolierung von RNA aus Gewebe .....	45
2.6.5.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	46
2.6.5.5	Reinigung von PCR-Amplifikaten .....	47
2.6.5.6	Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren .....	47
2.6.5.7	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen .....	48
2.6.5.8	Herstellung, Vermehrung und Isolierung rekombinanter DNA .....	49
2.6.5.9	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren .....	49
2.6.5.9.1	Restriktionshydrolyse .....	49
2.6.5.9.2	T4-DNA-Polymerasebehandlung .....	50
2.6.5.9.3	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden .....	50
2.6.5.9.4	Phosphorylierung der 5'-Enden von Oligonukleotiden .....	51
2.6.5.9.5	Kovalente Verknüpfung von DNA-Molekülen (Ligation) .....	51
2.6.5.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	51
2.6.5.11	Punktmutagenese .....	52
2.6.5.12	<i>Real Time</i> RT-PCR .....	53
2.6.5.12.1	Auswertung der <i>Real time</i> RT-CR .....	55
2.6.5.12.2	Erstellung einer Standardkurve .....	57
2.6.5.13	5'-RACE-PCR .....	58
2.6.5.14	EST (expressed sequence tag) Analyse .....	60
2.6.5.15	Charakterisierung transgener Mäuse .....	60
2.7	Zellbiologische Methoden .....	62
2.7.1	Kultivierung und Konservierung von Zellen .....	62

## Inhaltsverzeichnis

---

2.7.1.1	Kulturbedingungen.....	62
2.7.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	62
2.7.1.3	Verwendete Zelllinien.....	63
2.7.2	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	64
2.7.2.1	Calciumphosphat-Methode zur transiente Transfektion von <i>Drosophila</i> Schneider Zellen mit Reportergenkonstrukten.....	64
2.7.2.2	Lipofectamine2000 Transfektion von verschiedenen Zellen mit Reportergenkonstrukten.....	65
2.7.2.3	Herstellung einer stabilen Zelllinie mittels Lipofectamine2000 Transfektion.....	66
2.7.2.4	Behandlung von Zellen bzw. der stabilen Zelllinie mit verschiedenen Substanzen.....	66
2.7.2.5	Dual-Luciferase-Test.....	68
2.7.2.5.1	Präparation der Zellextrakte.....	73
2.7.2.5.2	Messung der Dual-Luciferase-Aktivität an den transient transfizierten Zellen.....	73
2.7.2.5.3	Berechnung vergleichbarer Meßwerte.....	74
2.7.2.6	Normierung der transienten Transfektion bei <i>Drosophila</i> Schneider Insektenzellen mittels $\beta$ -Galaktosidase Test.....	74
2.8	Proteinchemische Methoden.....	75
2.8.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	75
2.8.1.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	75
2.8.1.2	Dot-Blot mit biotinmarkierten Oligonukleotiden.....	76
2.8.1.3	Isolierung von Zellkernproteinen.....	77
2.8.1.4	Quantifizierung von Proteinen.....	78
2.8.1.5	Shift-Assay.....	79
2.8.1.6	Kompetitionstests.....	80
2.8.1.7	Elektrophorese.....	81
2.8.1.8	Protein-DNA-Transfer.....	81
2.8.1.9	Immobilisierung gebundener Oligonukleotide.....	82
2.8.1.10	Detektion.....	82
2.9	Bioinformatik.....	83
2.9.1	Datenbanken in der Genetik.....	83
2.9.1.1	bibliografische Datenbanken.....	83

## Inhaltsverzeichnis

---

2.9.2	Sequenz- und Proteindatenbanken .....	83
2.9.2.1	Sequenzdatenbanken .....	83
2.9.2.2	Proteindatenbanken .....	85
2.9.3	Phylogenetische Untersuchungen .....	85
2.9.4	Computergestützte Sequenzanalyse .....	86
2.9.5	Graphische Auswertung und Statistik .....	86
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>87</b>
3.1	Humane ADAM10-Genomstruktur und Exon/Intron Übergänge.....	87
3.2	Phylogenetische Untersuchungen .....	92
3.3	Transkriptionsstartpunkte des humanen ADAM10-Gens.....	93
3.4	Vergleich der 5'-untranslatierten Regionen der ADAM10-Gene von Mensch, Maus und Ratte.....	95
3.5	Analyse der 5'-untranslatierten Region des humanen ADAM10-Gens.....	98
3.6	Isolation der 5'-untranslatierten Sequenz des humanen ADAM10-Gens.....	100
3.7	Klonierung der Luciferase-Reporterkonstrukte .....	100
3.8	Transiente Transfektionen von unterschiedlichen Zelllinien mit dem ADAM10- Promotorkonstrukt pCP53AB.1 (-2179/-1) .....	103
3.9	Transiente Transfektionen von HEK293-Zellen mit verkürzten ADAM10- Promotorkonstrukten.....	105
3.10	Punktmutationen im ADAM10-Promotorbereich.....	108
3.11	ADAM10-Promotoraktivität nach Einführung von Punktmutationen in konservierten Elementen.....	111
3.12	Versuche an <i>Drosophila</i> Schneider Insektenzellen.....	113
3.12.1	Herstellen der pPac-Expressionsvektoren.....	113
3.12.2	Transiente Transfektionen von <i>Drosophila</i> Schneider Insektenzellen SL2 mit ADAM10-Promotorkonstrukten und pPac-Expressionsvektoren.....	114
3.13	Untersuchungen des ADAM10-Promotors im EMSA ( <i>Elektrophoretic Mobility Shift Assay</i> ) .....	117
3.14	Versuche mit den <u>S</u> terol- <u>R</u> egulatorelement- <u>B</u> indungsproteinen (SREBPs) .....	121
3.14.1	Herstellung der Expressionsvektoren mit den Sterol-Regulatorelement- Bindungsproteinen (SREBPs).....	121
3.14.2	Einfluss von überexprimierten SREBPs auf die ADAM10-Promotor- aktivität.....	122

3.15	Einfluss von chemischen Substanzen auf die Promotoraktivität in transient transfizierten Zellen.....	124
3.15.1	Einfluss des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf die Promotoraktivität.....	124
3.15.2	Einfluss von $\beta$ -Östradiol auf die Promotoraktivität in transient transfizierten SK01 und SKER Zellen.....	125
3.16	Einfluss von chemischen Substanzen auf die Promotoraktivität in stabilen Zelllinien.....	127
3.16.1	Herstellung der stabilen Zelllinien SHY56.6 und SKN56.6.....	127
3.16.2	Einfluss von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA).....	128
3.16.3	Einfluss von <i>brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF).....	128
3.16.4	Einfluss von Bradykinin.....	129
3.16.5	Einfluss von Zaragozicsäure.....	129
3.16.6	Einfluss von <i>caffeic acid phenethyl ester</i> (CAPE).....	130
3.16.7	Einfluss von Lactacystein.....	130
3.16.8	Einfluss von Camptothecin.....	130
3.16.9	Einfluss von Retinolsäure.....	131
3.17	Genotypisierung von transgenen Mäusen.....	132
3.18	<i>Real Time</i> RT-PCR Experimente an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.....	133
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>136</b>
4.1	Das humane ADAM10-Gen.....	136
4.2	Die Promotorregion des humanen ADAM10-Gens.....	137
4.2.1	Transkriptionsstartpunkte des humanen ADAM10.....	137
4.2.2	Ubiquitäre Expression des humanen ADAM10-Gens.....	138
4.2.3	Vergleich der humanen, der Maus und der Ratten ADAM10-Promotorsequenz.....	138
4.2.4	Aktivitätsvergleich von verkürzten ADAM10-Promotorkonstrukten.....	139
4.2.5	ADAM10-Promotoraktivität nach Einführung von Punktmutationen in konservierten Elementen.....	139
4.2.6	Versuche an Schneider <i>Drosophila</i> Insektenzellen.....	140
4.2.7	Untersuchungen des ADAM10-Promotors im EMSA ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ).....	141
4.2.8	Einfluss von überexprimierten SREBPs auf den ADAM10-Promotor.....	142

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.9	Induktion des humanen ADAM10-Promotors durch potentiell transkriptionsfördernde Substanzen an transient transfizierten Zellen.....	143
4.2.9.1	Cholesterinbiosyntheseweg.....	143
4.2.9.2	Östradiolweg.....	143
4.2.10	Induktion des humanen ADAM10-Promotors durch potentiell transkriptionsfördernde Substanzen an stabilen Zelllinien.....	144
4.2.10.1	Einfluss verschiedener potentiell transkriptionsfördernder Substanzen auf die ADAM10-Promotoraktivität.....	144
4.2.10.2	Apoptosesignalwege.....	145
4.2.10.3	Signalwege, die zur Differenzierung der Zellen führen.....	145
4.2.11	Untersuchungen an doppeltransgenen Mäusen.....	146
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>150</b>
6.1	Einklonierung des humanen ADAM10-Promotors in das Plasmid pGL3-Basic...	150
6.2	Phylogenetische Analyse des ADAM10 Proteins.....	151
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>161</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>163</b>
<b>10</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>164</b>



## 1. Einleitung

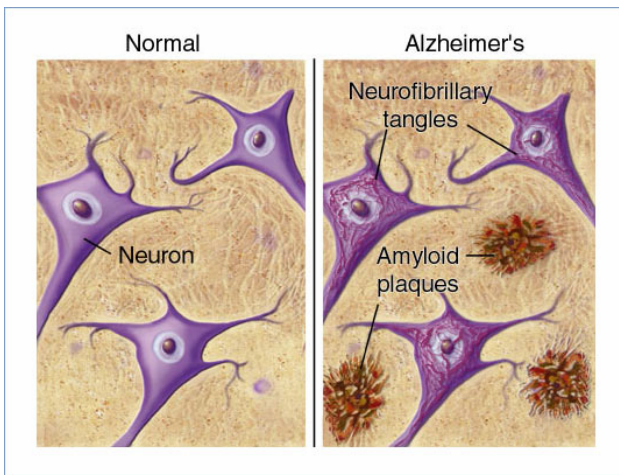
### 1.1 Die Alzheimer'sche Erkrankung

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die mit 72% die häufigste Form der Altersdemenz darstellt (Ott *et al.*, 1995).

Der massive Verlust von Synapsen, Neuronen und Gehirnmasse führt bei den Betroffenen zu der typischen Symptomatik dieser Erkrankung: einem langsamen, progressiven Ausfall aller kognitiven Leistungen. Dies sind Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, Orientierungslosigkeit, Wahrnehmungsschwierigkeiten, Sprachstörungen, psychiatrische Störungen wie Euphorie oder Depression und Persönlichkeitsstörungen, psychotische Störungen wie Wahnvorstellungen, Störungen der komplexen Motorik und schließlich Beeinträchtigungen des Langzeitgedächtnisses bis hin zur Amnesie. Im Endstadium der Erkrankung verlieren die Patienten ihre Persönlichkeit und werden pflegebedürftig. Nach einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von ca. 10 Jahren kommt es schließlich zum Tod des Patienten.

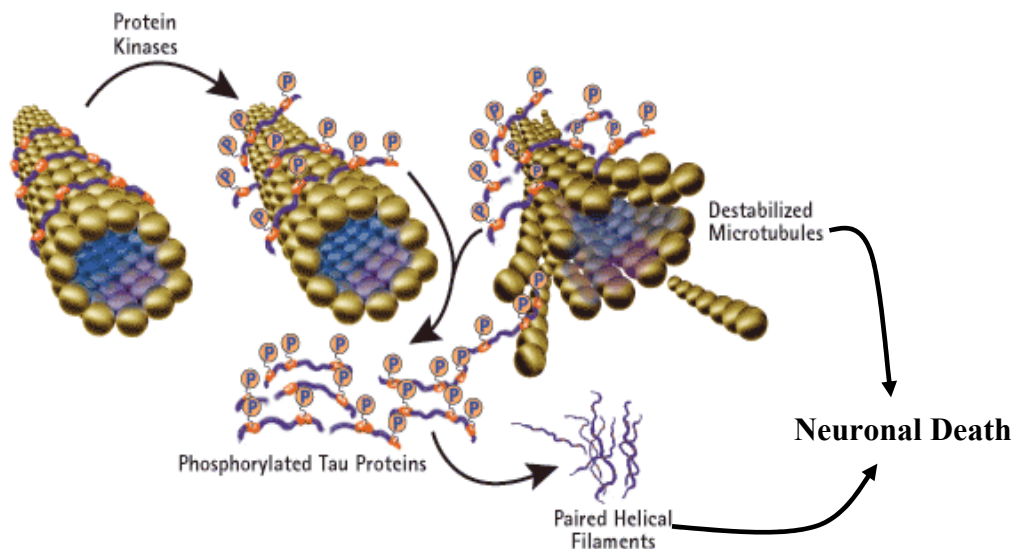
Der Psychiater Alois Alzheimer beschrieb erstmals 1907 das Krankheitsbild. In silbergefärbten Gehirnschnitten seiner Patientin Auguste D. entdeckte er Eiweißablagerungen und „neurofibrilläre Bündel“. Diese beiden pathologischen Merkmale sind auch nach heutigem Stand charakteristisch für die Alzheimer'sche Erkrankung.

Bei den Eiweißablagerungen handelt es sich um extrazelluläre Plaques, die vor allem im Hippocampus und Neokortex zwischen den Neuronen lokalisiert sind. Sie bestehen hauptsächlich aus aggregierten Amyloid- $\beta$ -Peptiden (A $\beta$ ), die als Spaltprodukt des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP) entstehen (Jarrett *et al.*, 1993; Yanker, 1996; Roher *et al.*, 1993; Gravina *et al.*, 1995; Selkoe, 1999). Bei manchen Patienten lagern sich Amyloid- $\beta$ -Peptide auch in der Wand kleiner Blutgefäße ab, wodurch ihre Durchlässigkeit verringert wird und das Gehirn mit weniger Sauerstoff und Energie versorgt werden kann ([www.deutsche-alzheimer.de](http://www.deutsche-alzheimer.de)).



**Abbildung 1.1:** Im Gehirn von Alzheimerpatienten (links) finden sich im Vergleich zum gesunden Menschen (rechts) extrazelluläre Plaques aus aggregierten Amyloid- $\beta$ -Peptiden ( $A\beta$ ) und intrazelluläre Neurofibrillenbündel ([www.ahaf.org](http://www.ahaf.org)).

Außerdem findet man im Hippocampus, cerebralen Kortex und anderen Gehirnregionen intrazelluläre Neurofibrillen. Diese neurofibrillären Bündel bestehen aus gepaarten helikalen Filamenten (PHF), die durch Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein entstehen (Goedert, 1993). Das Tau-Protein ist ein mikrotubulinassoziiertes Protein und natürlicher Bestandteil des Zytoskeletts. Durch die Veränderungen der Fibrillen kommt es zu Störungen von Stabilisierungs- und Transportprozessen in der Zelle und infolgedessen letztlich zur Apoptose. Bisher ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche dieser beiden pathologischen Veränderungen Marker oder Ursachen für die Alzheimer'sche Demenz sind.



**Abbildung 1.2:** Assoziation zwischen Mikrotubuli und Tau-Proteinen. Das Tau-Protein ist ein mikrotubulinassoziiertes Protein und natürlicher Bestandteil des Zytoskeletts. Es kann durch Proteinkinasen phosphoryliert werden. Hyperphosphoryliertes Tau-Protein löst sich von den Mikrotubuli ab und aggregiert zu gepaarten helikalen Filamenten (PHF). Durch die neurofibrillären Bündel und die destabilisierten Mikrotubuli kommt es zur Apoptose der Neuronen. ([http://www.emdbiosciences.com/html/cbc/alzheimers\\_disease\\_tau\\_antibodies\\_proteins.htm](http://www.emdbiosciences.com/html/cbc/alzheimers_disease_tau_antibodies_proteins.htm))

Es werden zwei unterschiedliche Formen der Alzheimer-Demenz unterschieden: Die sporadische Erkrankung (late-onset) und die genetische bedingte Form (early-onset).

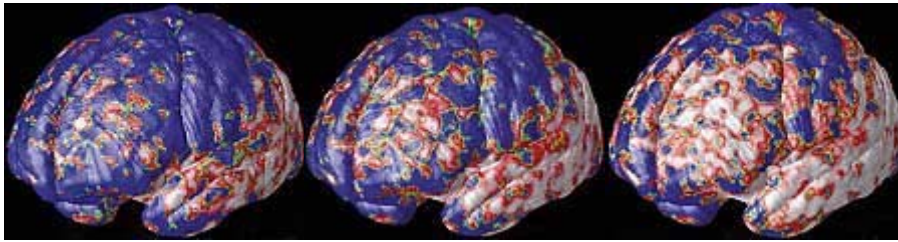
Die Wahrscheinlichkeit an der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz zu erkranken, nimmt mit steigendem Lebensalter zu: 70-Jährige leiden zu 1 % an Alzheimer, 80-Jährige zu 10 % und 90-Jährige zu etwa 30% (Ott *et al.*, 1995).

Anders ist dies bei der genetischen Form der Alzheimer'schen Erkrankung, welche für etwa 10% der Fälle an Alzheimer-Demenz verantwortlich ist. Diese genetisch verursachte Form tritt familiär gehäuft und bereits in früherem Lebensalter zwischen 30 und 50 Jahren auf und nimmt einen rapiden Verlauf ([www.deutsche-alzheimer.de](http://www.deutsche-alzheimer.de)). Bisher sind drei Gene bekannt, die bei autosomal dominant vererbten Formen der Alzheimer Krankheit mutiert sein können. Es handelt sich hierbei um die Gene für Presenilin 1 und 2, welche an der  $\gamma$ -Sekretasespaltung des Amyloid-Vorläuferproteins beteiligt sind und auf den Chromosomen 14 bzw. 1 lokalisiert sind, sowie um das Gen für das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) auf Chromosom 21. Mutationen im Bereich der Preseniline und des APP führen zu einer erhöhten Freisetzung von hydrophobem A $\beta$  (insbesondere des amyloidogeneren A $\beta_{42}$ ) (Hardy und Selkoe, 2002) und dem frühen Auftreten der Alzheimer-Demenz. Menschen mit Downsyndrom, welche ein zusätzliches Chromosom 21 besitzen, bilden wesentlich mehr A $\beta$  und erkranken ausnahmslos bei Erreichung eines Lebensalters von ca. 40 Jahren und damit wesentlich früher als andere Alzheimerpatienten (Lemere *et al.*, 1996).

Als weiterer Risikofaktor wurde die Isoform  $\epsilon 4$  des Apolipoproteins E identifiziert, das als lipidbindendes Protein für den Transport von Cholesterin im Blut zuständig ist. Das ApoE  $\epsilon 4$  bildet mit A $\beta$  stabile Verbindungen, welche das Entstehen von senilen Plaques stark begünstigen (Burns *et al.*, 2003).

Neben diesen genetischen Ursachen gibt es weitere Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Alzheimer-Demenz spielen. So begünstigen ein erhöhter Cholesterinspiegel und hoher Blutdruck das Risiko an Alzheimer zu erkranken (Kivipelto *et al.*, 2002).

Die frühe Differentialdiagnose der Alzheimer-Demenz zur Abgrenzung gegenüber anderen Demenzerkrankungen erfolgt über Gedächtnistests (Mini-Mental-Status-Test; Feldman und Gracon, 1996), ist aber relativ schwierig und oftmals nicht eindeutig. Erst im Spätstadium der Krankheit kommt es zum Schwund bestimmter Gehirnregionen in Kortex und Hippocampus, der sich durch bildgebende Verfahren darstellen lässt (Computertomographie CT, magnetische Resonanztomographie MRT, Positronen-Emissionstomographie PET (Thioflavinmarker an A $\beta$ -Peptiden) und *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT, Isotopenindikatoren gelangen in höherem Maße in gut durchbluteten Regionen des Gehirn und zeigen so die Gehirnaktivität an).



**Abbildung 1.3:** MRT-Bilder des Gehirns auf der Basis der Daten von zwölf Alzheimerpatienten zu Studienbeginn (links), nach zwölf Monaten (Mitte, Rote und graue Felder bedeuten starke Neuronenverluste) und nach 18 Monaten (rechts). Es ist deutlich der Schwund bestimmter Gehirnregionen bei Alzheimerpatienten zu erkennen (<http://www.jesus.ch/index.php/D/article/156/6993>).

Zur Zeit leiden in Deutschland etwa eine Millionen Menschen an Alzheimer-Demenz, weltweit sind es etwa 15 Millionen Menschen. Die Zahl der Patienten wird in den nächsten Jahren aufgrund der längeren Lebenserwartung der Menschen in den Industriestaaten noch zunehmen. Die Kosten dieser sehr pflegeintensiven Erkrankung werden daher in den nächsten Jahren stark zunehmen. Zudem gibt es bisher nur symptombezogene Behandlungen mit Acetylcholinesterase-Hemmern wie Donepezil oder NMDA-Antagonisten wie Memantin. Mit diesen wird versucht, dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten verursacht durch cholinerge und glutamaterge Synapsenverluste entgegenzuwirken. Den mit der Alzheimererkrankung assoziierten Verhaltensstörungen wird mit Psychopharmaka begegnet.

Um den betroffenen Menschen bessere Behandlungsmöglichkeiten zu bieten, ihre Lebensqualität möglichst lange zu erhalten und auch die Kosten der Pflege zu minimieren, ist es dringend erforderlich, die Alzheimer Erkrankung frühzeitig zu erkennen und neue Therapieansätze zur Behandlung zu finden.

### **1.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP)**

Um zu verstehen, wie es zu der Bildung der Amyloid- $\beta$ -Peptide kommt, soll im nun Folgenden näher auf das Ausgangsprodukt, das Amyloid-Vorläuferprotein (APP), eingegangen und seine Prozessierung beschrieben werden.

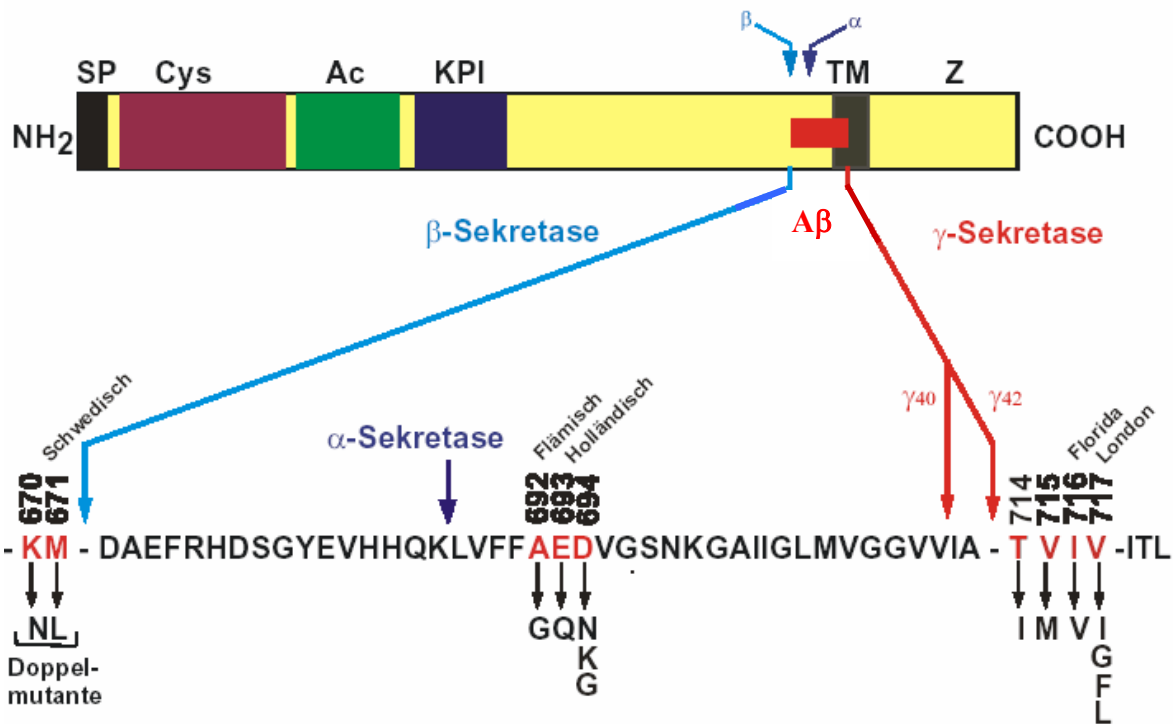
Über die Isolierung des Amyloid- $\beta$ -Peptids konnte das Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) identifiziert und kloniert werden. Der Genort des APP liegt auf Chromosom 21 (Kang *et al.*, 1987). Bei APP handelt es sich um ein Typ I-Transmembranglycoprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Kang *et al.*, 1987). Das Amyloid-Vorläuferprotein kommt in den meisten Zelltypen des Organismus vor.

Die eigentliche biologische Funktion des APP ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch Indizien für eine Beteiligung an der Regulation der Blutgerinnung (Smith *et al.*, 1990) oder an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen sowie an der Regulation des Zellwachstums (Milward *et al.*, 1992, Saitoh *et al.*, 1989; Schubert *et al.*, 1989; Strooper und Annaert, 2000; Zheng *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 1997; Steinbach *et al.*, 1998; Magara *et al.*, 1999). Weiterhin könnte APP für die Kupfer-Homöostase wichtig sein (Multhaup *et al.*, 1996). In homozygot APP-defizienten Mäusen wird die Abwesenheit von APP wahrscheinlich durch die beiden endogen vorkommenden APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 (*amyloid precursor like protein*) kompensiert, so dass keine Beeinträchtigungen bei diesen Mäusen zu erkennen sind (Zheng *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Heber *et al.*, 2000).

Das APP-Gen beinhaltet 19 Exons, von denen Exon 7, Exon 8 und Exon 15 alternativ gespleißt werden können. APP tritt hauptsächlich in folgenden Spleißvarianten auf: APP695, APP751 und APP770 (Kosik, 1993). Von diesen wird APP695 ausschließlich in Neuronen exprimiert (Wertkin *et al.*, 1993), während die beiden anderen Isoformen auch in nichtneuronalen Geweben gebildet werden (Selkoe, D.J., 1996). Das APP-Protein gelangt während der Translation in das endoplasmatische Retikulum und über die Golgivesikel zur Zellmembran. Während seiner Biosynthese wird es durch N- und O-Glycosylierung (Weidemann *et al.*, 1989), Sulphorylierung (Suzuki *et al.*, 1994) und Phosphorylierung (Hung und Selkoe, 1994) modifiziert.

### **1.2.1 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins**

In der Proteinsequenz von APP finden sich Spaltstellen für drei unterschiedliche Enzyme, die als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase bezeichnet werden (Abbildung 1.4) (Nunan und Small, 2000; Sekoe, 2001). Durch die proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins entstehen verschiedene Fragmente, die im Folgenden näher beschrieben werden (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) und seiner Mutationen.

APP ist ein Typ I-Membranprotein. Die Ektodomäne am N-Terminus (NH<sub>2</sub>) mit KPI-Domäne (KPI), saurer Domäne (Ac), cysteinreicher Region (Cys) und Signalpeptid (SP) befindet sich auf der extrazellulären Seite. Ihr angeschlossen ist eine singuläre Transmembranregion (TM), gefolgt vom cytoplasmatischen Abschnitt (Z) am C-Terminus (COOH).

Die Prozessierungsstellen für die α-, β- und γ-Sekretasen sind mit Pfeilen markiert. Durch β- und γ-Sekretasespaltung wird das Amyloid-Peptid (Aβ) gebildet, welches 40 bzw. 42 Aminosäuren umfasst. Die α-Sekretase spaltet innerhalb der Aβ-Region und verhindert somit die Bildung von Amyloid-Peptiden.

Im unteren Bildbereich ist die Aminosäuresequenz der Amyloid-Peptide dargestellt. Rot markiert sind die Aminosäuren, für die Mutationen gefunden wurden, welche zu vererbaren familiären Formen von AD führen (modifiziert nach Selkoe, 2001).

### 1.2.1.1 Die amyloidogene Prozessierung

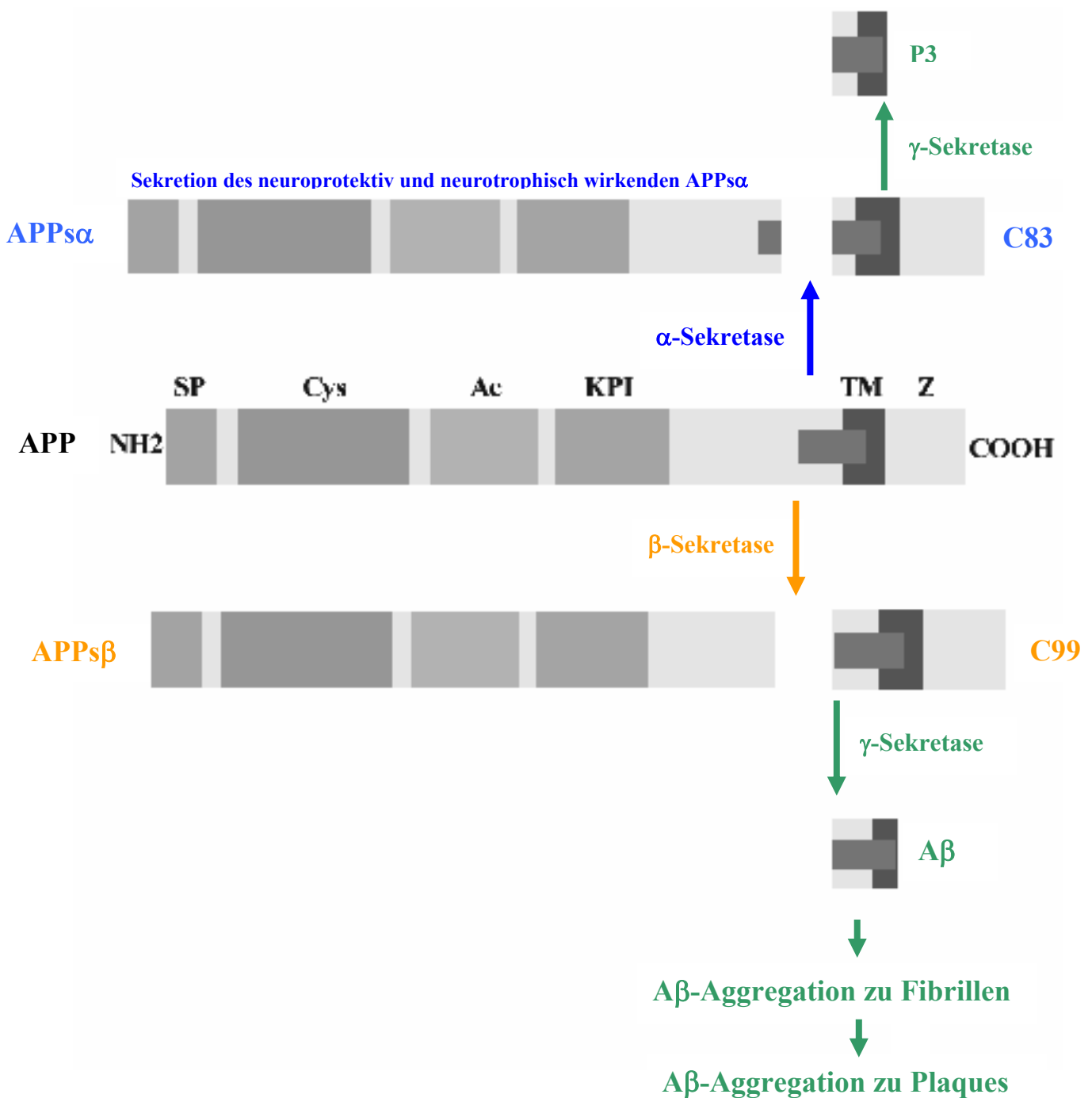
APP wird N-terminal im extrazellulären Bereich durch die β-Sekretase (*beta-site APP-cleaving enzyme*, BACE; Hussian *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999) gespalten. Es entsteht das lösliche APPsβ und ein membranverankertes ca. 12 kDa großes Fragment (C99). Dieses Fragment wird C-terminal in der Transmembranregion durch die γ-Sekretase (Aspartatproteinase-Komplex aus Presenilin-1, Nicastrin, Aph-1 und Pen-1; Edbauer *et al.*, 2003; Haass und Steiner, 2002; Haass, 2004; Wolfe *et al.*, 1999; Haass und Mandelkow, 1999) gespalten. Dabei können unterschiedliche Aβ-Fragmente in einer Größe zwischen 39 und 43 Aminosäuren entstehen, wobei das Aβ<sub>42</sub> die größte Pathogenität aufweist (Citron *et al.*, 1995 und 1996; Nunan und Smale, 2000). Das Aβ-Peptid beinhaltet einen Transmembranbereich von 12-15 Aminosäuren und einen extrazellulären Bereich von 28 Aminosäuren. Die Prozessierung kann während des Transports von APP zur Plasmamembran (endoplasmatisches Retikulum und trans Golgi-Netzwerk) oder in späten Endosomen erfolgen (Haass und Selkoe, 1993; Selkoe, 1999).

Das A $\beta$ -Peptid ist von zentraler Bedeutung für die Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit (Yamamoto, 1999). A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$  sind schlecht löslich, neigen zur Bildung antiparalleler Faltblattstrukturen, interagieren und aggregieren sehr leicht miteinander und bilden zuerst so genannte Fibrillen, bevor sie sich zu neuritischen Plaques zusammenlagern (Glenner *et al.*, 1984; Masters *et al.*, 1985). Das fibrilläre A $\beta$  ist in der Lage, die Ablagerung des hyperphosphorylierten Tau zu induzieren (Götz *et al.*, 2001; Oddo *et al.*, 2004). Es stört die Calciumregulation (Luo *et al.*, 1995; Wolozin *et al.*, 1995) und fördert die Entstehung freier Radikale wie Wasserstoffperoxid (Behl *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1995). Außerdem kann es durch Bindung an das C1q-Protein das Komplementsystem (Jiang *et al.*, 1994) sowie Astrozyten und Mikroglia aktivieren (Small *et al.*, 2001), worauf die in Gehirnen von Alzheimerpatienten gefundenen lokalen Entzündungsreaktionen zurückzuführen sind. Nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese folgt darauf die Veränderung der neuronalen ionischen Homöostase, die Veränderung der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen, welches schließlich zu weit verbreiteten neuronalen Fehlfunktionen führt. Die Apoptose von Zellen führt wiederum zu Transmitterdefiziten (Hardy und Selkoe, 2002), welches die synaptische Effizienz verringert.

Inhibitoren der  $\gamma$ -und  $\beta$ -Sekretase könnten der Entstehung der Alzheimer-Demenz entgegenwirken. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die  $\gamma$ -Sekretase auch weitere Substrate spaltet, insbesondere den Notch-Rezeptor. Ein Inhibitor würde somit in Entwicklungsprozesse eingreifen (Weggen *et al.*, 2001; Petit *et al.*, 2003).

Ein BACE-1 knock out Maus zeigte keinen auffälligen Phänotyp (Luo *et al.*, 2001). Hier könnte jedoch das relativ große und wenig hydrophobe katalytische Zentrum die Suche nach einem selektiven Inhibitor erschweren (Hong *et al.*, 2000).

In einem weiteren Ansatz wurde gezeigt, dass sich durch die Immunisierung mit Epitopen von A $\beta$  die A $\beta$ -Aggregationen und die kognitiven Defekte von APP-transgenen Mäusen aufheben lassen (Schenk *et al.*, 1999). Entsprechende Immunisierungsstudien wurden bei Alzheimerpatienten durchgeführt, mussten jedoch in Phase II wegen auftretender Entzündungsreaktionen im ZNS abgebrochen werden (Check, 2002). Es werden aber weitere Strategien zur Impfung gegen Alzheimer verfolgt. So konnte bei der Gabe von anti-A $\beta$ -Antikörpern im Mausmodellsystem die Menge an A $\beta$  im ZNS verringert werden (DeMattos *et al.*, 2001).



**Abbildung 1.5:** Die proteolytische Prozessierung von APP (nach Citron, 2000).

Die  $\alpha$ -Sekretase spaltet das APP innerhalb der Sequenz des Amyloid-Peptids ( $A\beta$ ). Dabei wird die Ektodomäne  $APPs\alpha$  freigesetzt, welche neuroprotektive und neurotrophische Eigenschaften besitzt. Durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung wird das Amyloid-Peptid generiert, das sich nach Aggregation in Amyloid-Plaques abgelagert, neurotoxisch wirkt und dadurch neuropathologische Veränderungen im Gehirn verursacht.



### **1.2.1.2 Die nicht-amyloidogene Prozessierung**

Neben dem amyloidogenen APP-Prozessierungsweg gibt es noch einen konstitutiv sekretorischen Weg, der 90 % der Prozessierung von APP ausmacht. Die Spaltung erfolgt sowohl im trans-Golgi-Netzwerk als auch an der Zelloberfläche durch eine  $\alpha$ -Sekretase. Diese spaltet das Substrat in einem definierten Abstand von 12-13 Aminosäuren von der Membran innerhalb der A $\beta$ -Sequenz zwischen Lysin (K<sup>16</sup>) und Leucin (L<sup>17</sup>), was die A $\beta$ -Bildung verhindert (Esch *et al.*, 1990; Maruyama *et al.*, 1991; Sisodia, 1992). Stattdessen werden lösliche N-terminale APP-Derivate (APPs $\alpha$ ) mit einem Molekulargewicht zwischen 105 und 125 kDa, abhängig von der Isoform des APP, gebildet. Anschließend werden diese in den extrazellulären Raum freigesetzt (Weideman *et al.*, 1989), wo sie eine neurotrophe und neuroprotektive Wirkung ausüben (Mattson *et al.*, 1993; Araki *et al.*, 1991) und die Gedächtnisleistung im Tiermodell verbessern (Meziane *et al.*, 1998). Das membrangebundene ca. 10 kDa große C-terminale Spaltfragment (C83) besitzt nur noch einen Teil des amyloiden A $\beta$  und kann durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert werden, was zu dem nicht toxischen Peptid p3 führt (Haass *et al.*, 1992).

Lannfelt *et al.* (1995) und Sennvik *et al.* (2000) zeigten hierzu, dass im menschlichen Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten die Menge an APPs $\alpha$  vermindert ist. In Schläfenlappen-Homogenaten von Alzheimerpatienten war die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität um 19% reduziert (Tyler *et al.*, 2002). Die  $\beta$ -Sekretaseaktivität war bei dieser Studie im Vergleich zu Kontrollpersonen fast verdoppelt. Li *et al.* (2004) fand ebenfalls bei der sporadischen Form von Alzheimer eine erhöhte  $\beta$ -Sekretaseaktivität (BACE-1).

Da durch die  $\alpha$ -Sekretase die Möglichkeit besteht, die Bildung des pathogenen Amyloidpeptids zu reduzieren, wurden Untersuchungen angestellt, diese Proteinase zu charakterisieren. Lammich *et al.* (1999) konnten ADAM10 als eine mögliche  $\alpha$ -Sekretase identifizieren.

## **1.3 Klassifizierung und Struktur von ADAM10**

ADAM10 wurde erstmals aus Myelin-Membranpräparationen gereinigt, anschließend wurde dessen cDNA kloniert (Chantry *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 1995). Der Name ADAM leitet sich von der englischen Bezeichnung *a disintegrin and metalloproteinase* ab. Wolfsberg *et al.* (1995) identifizierten eine Familie von Proteinen, die eine Disintegrin- und eine Metalloproteinase-Domäne haben. Die ADAM-Familie gehört zu den Reprolysinen (Adamalysinen) einem Vertreter der Gruppe der „Metzincine“ (Wolfsberg *et al.*, 1995; Stöcker und Bode, 1995; Rawlings und Barret, 1995). Mitglieder der Metzincine gehören zu den Zink-abhängigen Metalloproteinasen, die wiederum in vier Gruppen unterteilt sind: Serralysine, Astacine, Matrixine und

Adamalysine/Reprolysinase. Zu den letzteren gehören die löslichen Metalloproteinasen aus Schlangengiften (SVMP, *snake venom metalloproteinase*) und die Disintegrin-Metalloproteinasen der ADAM-Familie (Bode *et al.*, 1993; Hooper, 1994; Stocker *et al.*, 1995).

Bei ADAM10 handelt es sich um ein Typ I-Membranglycoprotein, das in verschiedenen menschlichen Geweben, dem Gehirn, dem Herz, der Niere, der Leber, der Lunge, der Skelettmuskulatur, der Milz und in verschiedenen Zelllinien, exprimiert wird (Wolfsberg *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1996; Yavari *et al.*, 1998; Karkkainen *et al.*, 2000). Das humane ADAM10 ist eine Disintegrin-Metalloproteinase aus 748 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 90 kDa in unprozessierter Form und von 62 kDa im prozessierten reifen Zustand (Lammich *et al.*, 1999).

Die charakteristische Domänenstruktur der Metzincine besteht aus einer Signalsequenz, einer Prodomäne, einer katalytischen Metalloproteinase-Domäne mit dem Zinkbindungsmotiv HExxHxxGxxH und einer Substratbindungsdomäne (Rawlings und Barrett, 1995; Nagase und Woessner, 1999; Black und White, 1998). Einige Mitglieder der Unterfamilie der Reprolysinase (Adamalysine) haben auch eine Transmembrandomäne (Sato *et al.*, 1994). Mitglieder der ADAM-Familie haben daneben noch eine disintegrinähnliche Domäne, eine cysteinreiche Untereinheit, einen EGF (*epidermal growth factor*) -ähnlichen Bereich und eine cytoplasmatische Domäne (Wolfsberg *et al.*, 1995).

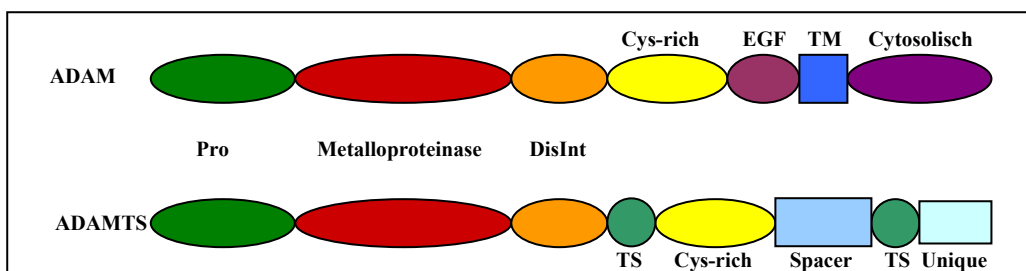


Abbildung 1.6: Domänenstruktur eines ADAM-Proteins.

Vier Domänen sind den ADAM Proteinen gemeinsam: Prodomäne (pro), Metalloproteasedomäne, Disintegrindomäne (DisInt) und cysteinreiche Domäne (Cys-rich). Der Mehrheit der ADAMs sind Typ I-Membranproteine, mit EGF-ähnlichem Motiv, Transmembrandomäne (TM) und intrazellulär lokalisiertem Carboxyterminus. ADAMTS-Proteine sind löslich und beinhalten anstelle einer Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne einen „Abstandhalter“ (*Spacer*) und eine einmalige (*unique*) Region mit ein oder mehreren Kopien von Thrombospondin Typ I (TS) Motiven.

Das humane ADAM10 (Abbildung 1.6) weist N-terminal eine Signalsequenz von 19 Aminosäuren auf, die bei der Translation und Adressierung benötigt wird.

C-terminal zur Signalsequenz folgt die Prodomäne von der 20. bis zur 213. Aminosäure. ADAM10 wird zunächst als inaktives Proenzym synthetisiert. Die Prodomäne von ADAM-Proteinasen hat

wahrscheinlich zwei Funktionen. Zum einen fungiert die Prodomäne z.B. von TACE als intramolekulares Chaperon, welches für die korrekte Proteinfaltung des katalytisch aktiven TACE benötigt wird (Milla *et al.*, 1999). Zum anderen beinhalten Mitglieder der ADAM-Familie einen konservierten Cysteinrest (Cys-173 bei ADAM10) innerhalb der Prodomäne (Howard *et al.*, 1996). Dieser tritt höchstwahrscheinlich in Wechselwirkung mit dem Zinkion des aktiven Zentrums und verhindert, dass das Enzym katalytisch aktiv ist (Springman *et al.*, 1990). Durch Zerstörung des Cystein-Zink-Komplexes (Cystein-Switch) kann dann der aktive Wasser-Zink-Komplex entstehen (Loechel *et al.*, 1998 und 1999).

Zwischen der Prodomäne und der katalytischen Untereinheit hat ADAM10 ein tetrabasisches Erkennungsmotiv RKKR, welches eine Spaltstelle für Furin bzw. Furin-ähnliche Pro-Protein-Konvertasen darstellt (Howard *et al.*, 1996; Pei und Weiss, 1995 und 1996; Lum *et al.*, 1998). Die Überexpression der Pro-Protein-Konvertasen Furin und PC7 resultieren in einer erhöhten proteolytischen Aktivität von ADAM10 (Anders *et al.*, 2001).

Der Bereich von der 214. bis zur 456. Aminosäure umfasst die Metalloproteinase-Domäne mit dem Zinkbindungsmotiv HExxHxxGxxH, wobei x für jede beliebige Aminosäure steht. Die Histidinreste (H) bilden ein Koordinationszentrum für das Zinkion in der katalytischen Domäne und befinden sich an Position 383, 387 und 393 (Schlöndorff und Blobel, 1999; Wu *et al.*, 1997). Das im Zinkbindungsmotiv konservierte Glutamat (E) fördert den nukleophilen Angriff eines gebundenen Wassermoleküls auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung. Es entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand. Innerhalb der erweiterten Konsensussequenz HExxHxxGxxH findet sich zudem ein konservierter Glycinrest (G) (Bode *et al.*, 1993). Er fördert die Bildung einer Haarnadelschleife und bringt dadurch den dritten Histidinrest in die Nähe des aktiven Zentrums. Ein konservierter Methioninrest 8-14 Aminosäuren C-terminal zur eigentlichen Zinkbindungsstelle gibt dem aktiven Zentrum neben anderen Aminosäureseitenketten (Isoleucin, Leucin oder Valin) strukturelle Integrität (Bode *et al.*, 1993; Stöcker *et al.*, 1995). Hinzu kommt bei den Reprolysinen ein konservierter Asparaginrest neben dem dritten Histidinrest (Hooper, 1996). Matrixmetalloproteinasen haben in der katalytischen Domäne ein weiteres Zinkion und 2-3 Calciumionen, die für die strukturelle Stabilität und die katalytische Aktivität benötigt werden (Gomis-Rüth, 2003).

An die Metalloproteinase-Domäne schließt sich die Disintegrin-Untereinheit (Integrinrezeptor-Bindungsdomäne) von der 457. bis zur 554. Aminosäure an.

Ihr folgt die cysteinreiche Domäne mit einem EGF-ähnlichen Bereich. Diese geht bis zur 672. Aminosäure, so dass der extrazelluläre Bereich insgesamt 652 Aminosäuren umfasst.

An diese Region schließt sich die Transmembrandomäne von der 673. bis zur 693. Aminosäure an (Schlöndorff und Blobel, 1999).

Der C-Terminus befindet sich im Cytoplasma und beinhaltet die letzten 54 Aminosäuren (694.-748. Aminosäure). Hierin enthalten ist sowohl eine prolinreiche Sequenz (PKLPPPCKLP), die als SH3-Ligand dienen könnte, als auch eine PKC-Konsensussequenz.

In der Aminosäuresequenz sind potentielle N-Glykosylierungsstellen (267., 278., 439. und 551. Aminosäure) enthalten, von denen zumindest Asn-278 tatsächlich modifiziert vorliegt (Howard *et al.*, 1996).

Yamazaki *et al.* (1997a) konnten durch *in situ* Hybridisierung das humane ADAM10-Gen auf dem Chromosom 15 an der Stelle 15q21.3-q23 und das Maus ADAM10-Gen auf Chromosom 9 lokalisieren (Yamazaki *et al.*, 1997b).

### 1.3.1 Die möglichen biologischen Funktionen der Mitglieder der ADAM-Familie

Mitglieder der ADAM-Familie scheinen eine wichtige Rolle bei Zellfusionsprozessen zu spielen. Über die disintegrinähnliche Domäne könnten Zell-Zell-Kontakte bzw. Kontakte zu Interaktionspartnern aufgenommen werden (Wolfsberg *et al.*, 1995; Wolfsberg und White, 1996; Wu *et al.*, 1997; Blobel, 1997).

So gehen ADAM1 (Fertilin  $\alpha$ ) und ADAM2 (Fertilin  $\beta$ ) Wechselwirkungen mit dem Integrin  $\alpha 6\beta 1$  von unbefruchteten Eizellen ein und leiten dadurch den Fusionsprozeß zwischen Eizelle und Spermium ein (Almeida *et al.*, 1995; Huovila *et al.*, 1996, Bigler *et al.*, 1997; Schlöndorff und Blobel, 1999).

ADAM15 geht Wechselwirkungen mit dem Integrin  $\alpha v\beta 3$  ein (Zhang *et al.*, 1998). Über die Kontakte mit anderen Zellen sind die ADAM-Proteine (ADAM10, ADAM13, ADAM14 und ADAM15) an Zellmigrationsprozessen beteiligt.

Die Zellfusion von Myoblasten zu Myotuben erfolgt über ADAM12 (Melprin  $\alpha$ ) und ist weiterhin an der Muskelbildung beteiligt (Yagami-Hiromasa *et al.*, 1995). Die Zellfusion scheint sowohl die disintegrinähnliche- als auch die cysteinreiche Domäne der Metalloproteinase zu erfordern (Huovilla *et al.*, 1996, Bigler *et al.*, 1997). Daneben könnte die cysteinreiche Domäne auch an der strukturellen Anordnung (Positionierung und Orientierung) der anderer Domänen beteiligt sein (Wu *et al.*, 1997; Schlöndorff und Blobel, 1999; Fox und Bjarnasen, 1996).

Über die cytoplasmatische Domäne mit prolinreicher Sequenz bieten sich eventuell Bindungsstellen für Proteine des Zytoskeletts oder für Signalmoleküle mit SH3-Domänen (Pawson, 1995; Weskamp *et al.*, 1996). Dies wurde z.B. für ADAM9 beschrieben (Yamamoto *et al.*, 1999). Auf diese Weise könnten die Metalloproteinasen an der Signalweiterleitung, der Aktivitätsregulierung und der

Proteinreifung beteiligt sein (Pawson, 1995; Weskamp *et al.*, 1996; Schlöndorff und Blobel, 1999; Dallas *et al.*, 1999).

Mitglieder der ADAM-Familie mit vollständiger Metalloproteinase-Domäne können membranassoziierte Proteine katalytisch spalten. Bei diesem als „Ektodomänen-Shedding“ bezeichneten Prozess wird durch Proteolyse der extrazelluläre Teil eines membranständigen Proteins freigesetzt. So werden die Ektodomänen membranständiger Enzyme, Wachstumsfaktoren, Cytokine und deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Leukozyten-Antigene, bestimmte virale Membranproteine und auch das Amyloid-Vorläuferproteins (APP) proteolytisch freigesetzt (Hooper *et al.*, 1997; Kahn *et al.*, 1994; Brakebusch *et al.*, 1994; Massagué und Pandiella, 1993; Ehlers und Riordan, 1991; Schlöndorff und Blobel, 1999; Lammich *et al.*, 1999; Fahrenholz *et al.*, 2000). Über die Freisetzung dieser extrazellulären Domänen, die wiederum Bestandteil von Signaltransduktionsvorgängen sein können, sind ADAM-Proteinasen auch an der Signalweiterleitung beteiligt.

### **1.3.1.1 Die verschiedenen $\alpha$ -Sekretasen**

Eine  $\alpha$ -Sekretase ist **TACE** (*TNF- $\alpha$  converting enzyme*, ADAM17), das *in vitro* proteolytisch den proinflammatorischen Cytokinvorläufer des Tumornekrosefaktors-alpha spaltet (TNF- $\alpha$ ). Es ist auch an der Freisetzung des transformierenden Wachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), des p75 Tumornekrose-Faktors, des L-Selectins und des Amyloid-Vorläuferproteins beteiligt (Lunn *et al.*, 1997; Rosendahl *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 2001; Black *et al.*, 1997; Peschon *et al.*, 1998; Buxbaum *et al.*, 1998). TACE-defiziente Mäuse weisen eine ganze Reihe von Entwicklungsdefekten auf, was darauf hinweist, das TACE eine bedeutende Rolle in der Entwicklung einnimmt (Peschon *et al.*, 1998).

Eine weitere  $\alpha$ -Sekretase könnte **ADAM9** (MDC9 bzw Meltrin  $\gamma$ ) sein (Koike *et al.*, 1999; Roghani *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 1996), allerdings spaltet es das Substrat APP *in vitro* nicht an der spezifischen  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle. ADAM9 scheint auch für die Freisetzung des löslichen heparinbindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors aus seiner membrangebundenen Vorstufe verantwortlich zu sein (Inzumi *et al.*, 1998).

**Kuzbanian** (KUZ), das Homolog von ADAM10 aus *Drosophila melanogaster*, hat Funktionen bei der Neurogenese und bei der Embryonalentwicklung (Rooke *et al.*, 1996; Fambrough *et al.*, 1996). KUZ soll ebenso wie TACE den für die Embryonalentwicklung wichtigen Notch-Rezeptor extrazellulär spalten und dadurch aktivieren (Pan und Rubin, 1997; Artanavis-Tsakonas *et al.*, 1995 und 1999). Der Notch-Rezeptor spielt eine Rolle bei der Zelldetermination während der Neurogenese

und Myoblastendifferenzierung. Nach Bindung des Liganden Delta an den Notch-Rezeptor wird der Rezeptor durch die Metalloproteinase im extrazellulären Bereich gespalten. Anschließend erfolgt eine durch die  $\gamma$ -Sekretase vermittelte Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch. Dieses Molekülfragment dient dann als Transkriptionsfaktor und wirkt auf Notch-Effektorgene. Bei ADAM10-defizienten Mäusen ist dieser Signalweg gestört, welches zur embryonalen Letalität am Tag 9 führt (Hartmann *et al.*, 2002). Es sind vielfältige Defekte im sich entwickelnden Nervensystem, im Herz-Kreislauf-System und der Somitenbildung zu beobachten (Hartmann *et al.*, 2002).

Schließlich konnte **ADAM10** als eine mögliche  $\alpha$ -Sekretase identifiziert werden (Lammich *et al.*, 1999). Hier von Bedeutung ist, dass ADAM10 *in vitro* auch das Amyloid-Vorläuferprotein APP an der physiologisch richtigen Stelle spaltet und es *in vivo* durch ADAM10 zu einer Freisetzung von APP $\alpha$  kommt. ADAM10 ist als  $\alpha$ -Sekretase an der proteolytischen Prozessierung des APP beteiligt (Lammich *et al.*, 1999; Fahrenholz *et al.*, 2000). Das Enzym ist auch in der Lage bei Labormäusen, also im lebenden Organismus, die Ablagerung von A $\beta$ -Plaques zu verhindern. Zudem verbessert die verstärkte ADAM10-Aktivität auch das räumliche Lern- und Erinnerungsvermögen der Versuchstiere (Postina *et al.*, 2004).

Das Enzym befindet sich in seiner aktiven Form an der Zelloberfläche (Lammich *et al.*, 1999). Der größte Anteil an inaktivem Proenzym, d.h. ungespaltenem ADAM10, findet sich im trans-Golgi-Netzwerk (Lammich *et al.*, 1999, Dallas *et al.*, 1999). APP wird sowohl an der Zelloberfläche als auch entlang des sekretorischen Weges, d.h. im Golgi-Apparat gespalten. Teilweise hat ADAM10 katalytische Aktivität im trans-Golgi-Netzwerk (Dallas *et al.*, 1999).

Durch *in situ* Hybridisierungen an menschlichen kortikalen Neuronen und an Gehirnschnitten von Mäusen konnten Marcinkiewicz und Seidah (2000) die Koexpression von ADAM10, BACE und APP nachweisen. Eine Kolokalisierung von TACE mit APP war hingegen nicht nachweisbar. Daher könnte ADAM10 die  $\alpha$ -Sekretase sein, die im Gehirn durch Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins die Bildung von amyloiden Plaques vermindern kann.

Nach und nach wurden für ADAM10 weitere Substrate gefunden: Pro-TNF- $\alpha$  (Lunn *et al.*, 1997; Rosendahl *et al.*, 1997), Notch-Rezeptor (Pan und Rubin, 1997), Notch-Ligand Delta (Qi *et al.*, 1999), Amyloid-Vorläuferprotein APP (Lammich *et al.*, 1999), Ephrin-A2 (Hattori *et al.*, 2000), Adhäsionsprotein L1 (Mechtersheimer *et al.*, 2001), Chemokin Fractalkine CX3CL1 (Hundhausen *et al.*, 2003), CXC Chemokin-Ligand 16 CXCL16, Typ IV Kollagen (Millichip *et al.*, 1998), Transmembran-Kollagen XVII (Franzke *et al.*, 2002), Beta-Cellulin und EGF (Sahin *et al.*, 2004).

## 1.4 Die verschiedenen Kontrollebenen der Genexpression

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur Regulation der Genexpression von ADAM10. Im folgenden Abschnitt werden daher die verschiedenen Ebenen der Expressionskontrolle eukaryotischer Zellen erläutert.

Alle Zellen eines Organismus verfügen über die gleiche genomische Ausstattung. Welche Gene in einer Zelle aktiv sind, hängt von dem jeweiligen Gewebetyp, dem Entwicklungszustand der Zelle und von den von außen auf die Zellen ausgeübten Reize ab (Britten und Davidson, 1969). In einer eukaryotischen Zelle gibt es verschiedene Ebenen der Genregulation, die miteinander verflochten sind, sich gegenseitig beeinflussen und so zu der phänotypischen Vielfalt der verschiedenen Zellarten führen. Die korrekte Aktivierung und Abschaltung von Genen im zeitlichen und räumlichen Maßstab ist sowohl für normale zelluläre Prozesse als auch für abnormale Prozesse, die in Zusammenhang mit der Ausbildung von Krankheiten stehen, von Bedeutung. Die am Ende der Genexpression stehenden Proteine bestimmen die spezifische Aktivität einer Zelle. Sie dienen der molekulare Erkennung, erfüllen Strukturfunktionen oder vermitteln die Expressionsregulation anderer Proteine. Dies geschieht hauptsächlich über Protein-DNA, Protein-Protein oder Protein-RNA-Wechselwirkungen.

Die Proteinmenge, die in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen zur Verfügung steht, wird durch die Zelle selbst festgelegt. Zunächst geschieht dies auf der Ebene der Transkriptionsinitiation, d. h. über Wechselwirkung der RNA-Polymerase II mit einem Promotor. Die Transkription ist der erste Schritt der Genexpression und daher auch die Hauptkontrollebene.

Bei der Transkription wird die Sequenz eines DNA-Stranges durch die RNA-Polymerase II in ein komplementäres Molekül, die Boten-RNA (mRNA), übersetzt. Dem transkribierten Gen vorgeschaltete Regulator-Sequenzen z. B. Verstärker (Enhancer) modulieren die Effizienz dieses Schrittes.

Nach der RNA-Synthese kann das Spleißen der prä-mRNA, der Vorstufe der mRNA, beeinflusst werden. Das primäre Transkript ist im Zellkern mit so genannten „*heterogene nuclear Ribonucleoproteins*“ (hnRNP) assoziiert. Diese Proteine sind neben den so genannten „*small nuclear Ribonucleoproteins*“ (snRNP) am Spleißvorgang beteiligt. Sie helfen bei der Anheftung des Poly-A Endes an das 3'-Ende der mRNA und vermitteln den Transport der reifen mRNA ins Cytoplasma. Aus der prä-mRNA wird die gespleißte reife mRNA mit Kappe (7-Methyl-GTP) am 5'-Ende und Poly-A am 3'-Ende erzeugt.

Die nächste Möglichkeit der Expressionskontrolle liegt in der Transportkontrolle. Hier kann durch Anlagerung von Proteinen an die mRNA oder durch antisense RNA der Vorgang des Ausschleusens der mRNA aus dem Zellkern verhindert werden.

Bei der Übersetzung der Nukleotidsequenz der mRNA in die entsprechende Aminosäuresequenz liegt eine weitere Kontrollebene. Die Translation erfolgt unter Beteiligung von Transfer-RNA (tRNA). Es gibt für jede Aminosäure mindestens eine tRNA mit einem Nukleotidbereich, der komplementär zu den Nukleotiden der codierten Aminosäure auf der mRNA ist (Anticodon). Die Translation findet bei Eukaryoten im Cytoplasma an den Ribosomen statt und kann z. B. durch die Menge an bestimmten Aminoacyl-tRNAs aktiviert oder inaktiviert werden.

Auch die Geschwindigkeit des mRNA-Abbaus kann Einfluss auf die Translationsrate nehmen.

Schließlich kann über die Kontrolle der Proteinaktivität, d. h. durch Aktivierung oder Inaktivierung (posttranslationale Modifizierungen) bzw. die räumliche Begrenzung synthetisierter Proteinmoleküle, Einfluss ausgeübt werden (Alberts *et al.*, 1995).

## 1.5 Transkriptionsregulation bei Eukaryoten

Eukaryotische Gene setzen sich aus Exons und Introns zusammen. Die Exons beinhalten den kodierenden Anteil und liefern die eigentliche Information für die Proteinsequenz. Ihre Länge beträgt in der Regel etwa 50 bis 500 bp. Oft kodieren Exons für funktionell abgrenzbare Proteindomänen bzw. Sekundärstrukturen. Die zwischen den Exons liegenden Introns können eine Länge von mehreren Kilobasen überschreiten. Sie, wie auch Teile der Exons, können an der Transkriptionsregulation beteiligt sein (Sun und Means, 1995).

Mittels Spleißen werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt. An diesem Prozess ist ein Multienzymkomplex beteiligt, das Spleißosom, welches konservierte Bereiche im Intron/Exon-Übergang (GT-AG-Regel) sowie spezielle Sequenzen (*branch site*) im Intron erkennt und die Exons zusammenfügt (Abb.4). Manchmal kommt es auch zum alternativen Spleißen. Dabei werden durch Verwendung unterschiedlicher Spleißorte andere Exons unter Deletion der Introns oder auch dazwischenliegender Exons zusammengefügt und so die Proteinsequenz verändert.

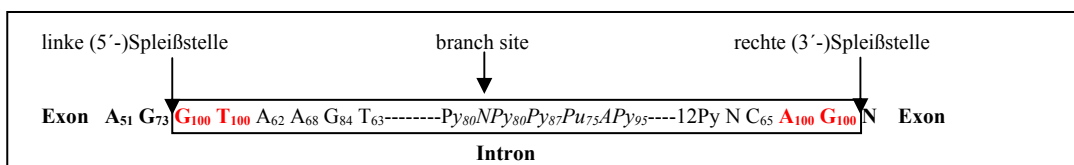


Abbildung 1.7: RNA-Spleißen im Zellkern (nach Lewin, 1998).

Die Enden nukleärer Introns sind durch die GT-AG-Regel definiert. Es handelt sich um konservierte Bereiche im Intron/Exon-Übergang, die ebenso wie die *branch site*, für das Spleißosom als Erkennungssequenzen dienen.

Die tiefgestellten Zahlen geben die prozentuale Häufigkeit wieder, mit der eine bestimmte Base (bzw. Basentyp) an der jeweiligen Konsensusposition vorkommt. Py steht für Pyrimidine und N für jedes beliebige Nukleotid.



## 1.6 Prinzipien der Transkriptionsregulation

Die Transkription von Genen wird durch regulatorische Sequenzen in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes kontrolliert. Dabei handelt es sich um kurze DNA-Konsensussequenzen (*response element, upstream element*), die mit Proteinen, so genannten Transkriptionsfaktoren (TF), interagieren können. Es gibt allgemeine und spezifische Elemente, die in unterschiedlicher Kombination, Orientierung und Entfernung von Transkriptionsstart vorkommen. Die modulierenden Elemente sind in der Regel unabhängig voneinander wirksam. Je nach Art der Interaktion können Gene an- oder abgeschaltet werden oder die Transkriptionsinitiation kann schneller oder häufiger erfolgen.

Die Transkriptionsfaktoren lassen sich anhand ihrer DNA-Bindungsmotive in verschiedene Klassen einteilen (Pabo und Sauer, 1992). Dies sind das Helix-Turn-Helix-Motiv, das Homeodomänen-Motiv, das Zinkfinger-Motiv, das  $\beta$ -Faltblatt-Motiv und das Leucin-Zipper-Motiv. Viele Transkriptionsfaktoren binden in Form von Homo- oder Heterodimeren an die DNA (Alberts *et al.*, 1995). Über direkte oder indirekte Wechselwirkungen mit Komponenten des Transkriptionsapparates beeinflussen sie die Transkriptionsrate.

Als Promotor wird ein bestimmter Sequenzbereich meist stromaufwärts von der codierenden Sequenz eines Gens bezeichnet. Er wird von der RNA-Polymerase II als spezifische Bindungssequenz erkannt und schließt den Transkriptionsstartpunkt mit ein. Ausgehend von diesem Punkt bewegt sich die RNA-Polymerase II entlang der DNA und synthetisiert dabei RNA, bis sie an eine Terminatorsequenz gelangt.

Am Startpunkt selbst besteht keine ausgeprägte Sequenzhomologie. Die erste Base der mRNA ist häufig ein Adenin, das beidseitig von Pyrimidinen umrahmt wird. Dieses als Initiator (Inr) bezeichnete Element umfasst die Positionen von -2 bis +6 und lässt sich in allgemeiner Form als  $\text{PyPy A}_{1+N} \text{T/A PyPy}$  wiedergeben (Weis und Reinberg, 1997; Smale, 1997). Es hat dieselbe Funktion wie die TATA-Box, d. h. sie führt zur Formation des Präinitiationskomplexes und legt den Startpunkt der Transkription fest (Grace 1994; Aso *et al.*, 1994; Kaufmann und Smale, 1994). Auch die Nukleotide rund um die Initiatorsequenz sind für die präzise Positionierung der basalen Transkriptionsmaschine von Bedeutung (Weis und Reinberg, 1997; Smale, 1997). Ein Promotor, der nur aus dem Initiator besteht, hat die einfachste für die RNA-Polymerase II erkennbare Form (Smale, 1994 und 1997). Derzeit werden einige Initiator-Bindungsproteine (IBP) diskutiert: E2F, YY1, USF und TFII-I. Auch Komponenten des TFIID-Komplexes erkennen direkt den Initiator,

möglicherweise mit der Hilfe von TFIIA, TAFs (*TBP associated factor*) und TICs (*TAF- and initiator-dependent cofactor*) (Kaufmann und Smale, 1994; Grace, 1994; Aso *et al.*, 1994; Emami *et al.*, 1997; Weis und Reinberg, 1997; Orphanides *et al.*, 1996; Smale, 1997; Martinez *et al.*, 1998). Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Kofaktoren wie Sp1, YY1 und TAFs beeinflussen die Transkriptionrate (Grace, 1994; Ericsson *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 1999; Zambrano *et al.*, 1997).

Die meisten Promotoren enthalten als Signalstrukturen etwa in Position -25 bis -30 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) die TATA-Box (Konsensussequenz: TATA<sup>A</sup>/<sub>T</sub>A<sup>A</sup>/<sub>T</sub>) (Pugh und Tjian, 1991; Grace, 1994; Orphanides *et al.*, 1996). Dabei handelt es sich um die Erkennungsstelle für das TATA-Box-Bindungsprotein (TBP), welches sich mit TBP assoziierten Faktoren (TAFs) im TFIID Komplex befindet (Hernandez, 1993; Martinez *et al.*, 1994; Goodrich und Tjian, 1994; Burley und Roeder, 1996; Smale, 1997) und die Bindung der RNA-Polymerase II an den basalen Transkriptionsapparat ermöglicht. Manchmal ist die TATA-Box durch eine AT-reiche Sequenz ersetzt, die von der Konsensussequenz abweicht, aber dennoch ein funktionelles Promotorelement darstellt (Aso *et al.*, 1994; Smale, 1994; Wiley *et al.*, 1992).

Zudem findet sich in Promotoren häufig in Position -75 bp die CAAT-Box, die in beiden Orientierungen wirksam sein kann und die Konsensussequenz CCAAT umfasst. Verschiedene Transkriptionsfaktoren können an dieses Sequenzmotiv binden: CTF (*CCAAT-binding transcription factor* oder *nuclear factor-I*, NF-I) und CBF (*CCAAT-box-binding factor* oder *nuclear factor-Y*, NF-Y) (Pugh und Tjian, 1991; Blackwood und Kadonaga, 1998).

In Position -90 kommt häufig die so genannte GC-Box vor. Oft sind in einem Promotor mehrere Kopien davon vorhanden, die unterschiedlich orientiert sein können. Die GC-Box wird durch den Faktor Sp1 erkannt, der dabei einen Bereich von 20 bp auf der DNA abdeckt. Sp1 besitzt ein Zinkfinger-Motiv und wirkt als Transkriptionsaktivator (Briggs *et al.*, 1986). Er ist an der Interaktion mit initiatorbindenden Faktoren wie z. B. TAF II 110 beteiligt (Seto *et al.*, 1993). Die Konsensussequenz lautet CGGGGCCCG (Pugh und Tjian, 1991; Xiong *et al.*, 2000).

Weitere Aktivator- oder Inhibitorproteine binden an cis-regulatorische Elemente (Enhancer, Silencer, *Upstream Control Elements* (UCE), *Hormone Response Elements* (HRE)). Sie können die Transkription aktivieren oder reprimieren (Blackwood und Kadonaga, 1998).

Ein weiteres Kriterium für einen Promotor sind GC-reiche Inseln (Ng und Bird, 1999). Sie enthalten gehäuft das Dinukleotid GC und sind oft in Promotoren konstitutiv exprimierter Gene (Haushaltsgene) zu finden, können aber auch in Promotoren regulierter Gene vorkommen.

Restriktionsanalysen zufolge sind die GC-Inseln unmethyliert. Das Chromatin besitzt an diesen Stellen einen verminderten Gehalt an Histon H1, was auf eine aufgelockerte Chromatinstruktur schließen lässt. Die anderen Histone sind acetyliert, ein Merkmal, das häufig mit Genexpression einhergeht. An diesen Stellen kann die DNaseI, wie man es bei aktiven Promotoren erwartet, die DNA spalten. Das Vorhandensein einer GC-Insel in einem Gen kann man als Zeichen dafür werten, dass das Gen zwar potentiell aktiv ist, aber nicht zwangsläufig auch transkribiert wird.

Bei Eukaryoten kommt es zunächst zur Bildung eines Transkriptionsinitiationskomplexes aus der RNA-Polymerase II und allgemeinen Transkriptionsfaktoren (basaler Transkriptionsapparat). Die RNA-Polymerase II bindet dabei nicht direkt an den Promotor, sondern über Transkriptionsfaktoren, die die RNA-Polymerase II am korrekten Startpunkt positionieren. Zunächst bindet das TBP an die AT-reiche Konsensussequenz (TATA-Box).

Einige Promotoren enthalten jedoch kein TATA-Element (TATA-lose Promotoren), dort kommen jedoch dieselben allgemeinen Faktoren zum Einsatz (Aso *et al.*, 1994). TFDII, E2F, YY1, USF oder TFII-I binden an den als Positionierungselement dienenden Initiator. Der Transkriptionsfaktor USF (*upstream stimulatory factor*) ist ein basisches Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Protein (Watt und Molloy, 1988; Bendall und Molloy, 1994), der den Initiationskomplex stabilisiert (Roy *et al.*, 1991). Mehrere TBP assoziierte Faktoren (TAFs) können ebenfalls stabilisierend wirken oder selbst an die Initiatorsequenz binden und so über Protein-Protein-Interaktion das TBP in die Nähe der -30 bp Region platzieren (Martinez *et al.*, 1994; Weis und Reinberg, 1997; Smale, 1997; Hahn, 1998).

Einigen TATA-losen Promotoren fehlt eine festgelegte Initiatorstelle. In diesem Fall erfolgt die Initiation an einem von mehreren dicht beieinander liegenden Startpunkten (Smale, 1997). Sie haben einen hohen GC-Gehalt und viele Bindungsstellen für den allgemeinen Transkriptionsfaktor Sp1 (Hernandez, 1993; Smale, 1994 und 1997; Weis und Reinberg, 1997). In diesen Promotoren, die oft in „Haushaltsgenen“ (konstitutiv exprimierte Gene) zu finden sind, führt die Bindung von Sp1 - stabilisiert durch TBP und die TAFs im TFIID - direkt zur Bildung des Präinitiationskomplexes (Pugh und Tjian, 1991; Kaufmann und Smale, 1994; Martinez *et al.*, 1994; Goodrich und Tjian, 1994; Emami *et al.*, 1997). Sp1 wird auch mit dem Erhalt unmethylierter GC-Inseln in Verbindung gebracht (Brandeis *et al.*, 1994).

Generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) lagern sich folgendermaßen zum Präinitiationskomplex zusammen (Orphanides *et al.*, 1996): Nach dem Faktor TFIID (>700kDa, TBP mit 38 kDa und

8 TAFs zwischen 20 und 250 kDa; Zhou *et al.*, 1992; Goodrich und Tjian, 1994, Burley und Roeder, 1996; Orphanides *et al.*, 1996) kommen die Faktoren TFIIA, TFIIB, TFIIF mit der RNA-Polymerase II, TFIIE und TFIIH hinzu (Pugh und Tjian, 1991; Hernandez, 1993; Aso *et al.*, 1994; Orphanides *et al.*, 1996; Greenblatt, 1997). Durch die Proteinkinaseaktivität des Faktors TFIIH wird eine Untereinheit der RNA-Polymerase II (*carboxy-terminal heptapeptide repeat domain*, CTD) phosphoryliert und damit die Transkription aktiviert (Orphanides *et al.*, 1996; Greenblatt, 1997). Insgesamt sind am Aufbau des basalen Transkriptionskomplexes mehr als 40 Polypeptide beteiligt. Die Gesamtgröße des Komplexes beträgt ~2500 kDa (Singh, 1998). Die meisten Transkriptionsfaktoren werden freigesetzt, wenn die RNA-Polymerase II mit der Elongation beginnt.

Gleichzeitig bietet dieser Transkriptionsinitiationskomplex weiteren Proteinen Bindungsstellen. Durch spezifische Wechselwirkungen können so auch DNA-Bindungsproteine (upstream- oder induzierbare Faktoren), die in größerer Entfernung zum Promotor liegen, die Transkriptionsrate positiv oder negativ beeinflussen. Solche cis-aktiven Elemente (auf derselben DNA) werden von trans-aktiven Faktoren erkannt, können verschiedene Entfernungen zum Startpunkt einnehmen und beliebig orientiert sein (Blackwood und Kadonaga, 1998). Die Regulatorsequenzen werden von spezifischen Faktoren erkannt, die mit dem basalen Transkriptionskomplex direkt oder über Koaktivatoren indirekt in Wechselwirkung treten können. Die Zielfaktoren sind im basalen Apparat die TAFs (TATA-Bindungsprotein assoziierte Faktoren) von TFIID, TFIIB oder TFIIA. Die Fernwirkung dieser Transkriptionsfaktoren kann durch eine Schleifenbildung in der DNA erklärt werden, durch die die Transkriptionsfaktoren in direkte Nachbarschaft zum Transkriptionsstart gelangen können (Blackwood und Kadonaga, 1998; Alberts *et al.*, 1995).

Daneben können solche Sequenzen auch innerhalb von Introns auftreten, wie z. B. bei der CaM-Kinase IV und dem Immunglobulin H $\mu$  gezeigt (Sun und Means, 1995; Blackwood und Kadonaga, 1998). Schließlich gibt es Regulatorsequenzen, die sich stromabwärts vom Gen befinden, z. B. die so genannte „*locus control region*“ (LCR) in Globinengen (Blackwood und Kadonaga, 1998; Stamatoyannopoulos *et al.*, 1997). Alle durch direkte oder durch Fernwirkung ausgeübten Wechselwirkungen mit dem Promotor ergeben eine bestimmte Transkriptionsaktivität. Dabei summieren sich die aktivierenden und inhibierenden Signale.

Die Anwesenheit bestimmter Elemente im Promotor bedeutet nicht zwangsläufig, dass das betreffende Gen auch tatsächlich durch diesen speziellen Faktor aktiviert wird. Gewöhnlich wird

eine bestimmte Konsensussequenz von einem zugehörigen Transkriptionsfaktor erkannt, doch in manchen Fällen kann die gleiche Sequenz von verschiedenen Proteinen gebunden werden. Es gibt auch den umgekehrten Fall, in dem ein bestimmtes Protein mehr als ein Sequenzelement erkennt.

### 1.7 Wichtige Faktoren bei der Alzheimer-Demenz

Im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Krankheit ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cyclic AMP-response element binding protein* (**CREB**) von Bedeutung. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der bei Stimulation verschiedener Signalkaskaden durch extrazelluläre Botenstoffe und infolge dessen durch Phosphorylierung (posttranslationale Modifikation) in seiner Aktivität moduliert werden kann. CREB ist ein basisches Leucin-Zipper-Protein, das als Homodimer oder Heterodimer mit c-Jun in seiner inaktiven Form an das CRE (*cAMP response element*) mit der Konsensussequenz TGACGTCA binden kann (Benbrook und Jones, 1994). Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors erfolgt dabei folgendermaßen: Wird über einen Rezeptor an der Zelloberfläche ein G-Protein aktiviert, das die Adenylatcyclase stimuliert, so kommt es zu einem Anstieg der cAMP-Menge in der Zelle. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase A, die dann wiederum durch Phosphorylierung CRE-BP1 aktiviert (Parker *et al.*, 1996). Auch durch die Proteinkinase C kann CRE-BP1 phosphoryliert werden. In der aktiven Form kann CREBP über ein CREBP-Bindungsprotein (CBP) in Wechselwirkung mit dem Transkriptionsapparat treten und so die Transkriptionsrate beeinflussen (Kwok *et al.*, 1994). CREBP ist ein wichtiger Faktor für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses, das bei der Alzheimer'schen Demenz verloren geht. Eine Stimulation mit sublethalen Konzentrationen von A $\beta$ <sub>42</sub> führte in neuronalen Rattenembryonalzellen bereits zu einer verminderten CREBP-Phosphorylierung (Tong *et al.*, 2001).

Das verzögerte Ausbrechen der Alzheimer-Demenz und die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten sind durch eine Östrogen-Ersatz-Therapie möglich (Tang *et al.*, 1996; Asthana *et al.*, 2001; Honjo *et al.*, 2003). Es sind verschiedene Mechanismen für **Östrogen** und selektive Östrogen-Rezeptor Modulatoren bekannt: 1) ein genomischer Östrogen-Rezeptor vermittelter Weg, der die Gentranskription beinhaltet, 2) ein nichtgenomischer Signalweg, der die Aktivierung von „mitogen-activated protein kinases“ und/oder „phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B“ beinhaltet und 3) ein nicht durch Rezeptoren vermittelter antioxidativer Mechanismus (Dhandapani und Brann, 2002). Östrogen moduliert den Metabolismus von APP, vermindert die Menge an A $\beta$  (Jaffe A. *et al.*, 1994), aktiviert die  $\alpha$ -Sekretase und schützt die Neuronen vor oxidativen Stress (Behl *et al.*, 1995). Transkriptionsfaktoren wie z. B. die Steroidrezeptoren werden durch

Ligandenbindung aktiviert. Glucocorticoide können über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor zur Bildung eines Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes führen, der dann an eine bestimmte DNA-Konsensussequenz (Glucocorticoid-Response-Element, GRE) bindet und so den Promotor aktiviert. Der Östrogenrezeptor bildet nach Ligandenbindung Homodimere und bindet dann an die Konsensussequenz TGACCT.

Bei der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz gibt es Anhaltspunkte für einen veränderten Transport und eine verminderte Funktion der **Retinoide** (Goodman und Pardee, 2003). Der Retinolsäurerezeptor RAR $\alpha$  und die Retinalaldehyd-Dehydrogenase RALPH-2 sind beide bei Alzheimerpatienten herunterreguliert (Corcoran *et al.*, 2004). Retinolsäuren modulieren eine Vielfalt von biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Sie interagieren mit spezifischen Rezeptoren im Zellkern. Die Retinolsäurerezeptoren RAR bzw. RXR binden in Form von verschiedenartigen Heterodimeren an die Konsensussequenz TGAACxxTGAAC. Diese Rezeptoren werden als ligandengesteuerte Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Sie besitzen eine individuelle N-terminale Region, eine konservierte DNA-bindende Domäne und eine C-terminale Hormonbindungsregion (Lewin, 1990). Retinolsäure reguliert mindestens 532 Gene (Balmer und Blomhoff, 2002), viele dieser Gene werden direkt über ein *DNA responsive element* beeinflusst, andere über Transkriptionsfaktoren, die selbst durch Retinolsäure beeinflusst werden wie z.B. MZF-1 (Hromas *et al.*, 1991).

Der Transkriptionsfaktor **NF $\kappa$ B** ist ein Heterodimer aus p50 und p65 (Rel-A). Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine Rolle bei verschiedenen Reaktionen: er kontrolliert die Expression von mehreren inflammatorischen Cytokinen, von *major histocompatibility complex* (MHC) Genen und von Adhäsionsmolekülen, die in der Tumormetastasierung eine Rolle spielen. Fehlfunktionen des NF $\kappa$ B und seiner abhängigen Gene sind assoziiert mit verschiedenen pathogenen Zuständen. NF $\kappa$ B wird durch den Inhibitor I $\kappa$ B im Cytoplasma zurückgehalten. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B und seine Degradation im Proteasom lässt die Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern zu.

Das Proteasom ist der Ort des Proteinabbaus in der Zelle. Die 26S Untereinheit des Proteasomenkomplexes erkennt Proteine, die mit Ubiquitin markiert wurden. Im Proteasom kommt es unter Freisetzung des Ubiquitins zur Proteolyse der Proteine. Das Ubiquitin-Proteasomen-System reguliert die Menge an vitalen regulatorischen Proteinen, wie Cyclinen, cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren und Transkriptionsfaktoren. Daher ist ein funktionierendes Ubiquitin-Proteasomen-System essentiell für die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen (Hershko und

Ciechanover, 1998; Varshavsky, 1997). Bei der Alzheimer'schen Demenz fand man eine veränderte Ubiquitinform (van Leeuwen *et al.*, 1998, Femke *et al.*, 2001), die zu einer Inhibition des Ubiquitin-Proteasomen-System mit neuropathologische Konsequenzen führt (Lam *et al.*, 2000).

Epidemiologische Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Alzheimer'schen Krankheit und einem erhöhten Cholesterinspiegel hin. Personen, die mit Cholesterinsyntheseblockern behandelt wurden, erkrankten seltener an Alzheimer (Wolozin *et al.*, 2000; Jick *et al.*, 2000; Simons *et al.*, 2002). Die in diesen Studien verwendeten Inhibitoren gehören zur Substanzklasse der Statine, welche die HMG-CoA-Reduktase blockieren und dadurch den Cholesterinspiegel senken.

Kojro *et al.* (2001) fanden eine Zunahme von APPs $\alpha$  in Zellen mit geringerem Cholesteringehalt. Eine Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 könnte für den Anstieg des APPs $\alpha$  verantwortlich sein. Ob dieser Effekt auf der Ebene der Genregulation oder auf der Ebene der Proteinstabilität zu suchen ist, wurde bisher nicht aufgeklärt.

Weiterhin konnten Fassbender *et al.* (2001) zeigen, dass eine Abnahme des cerebralen A $\beta$  in Meerschweinchen zu beobachten ist, die mit der Substanz Simvastatin behandelt worden waren. Die Verringerung von A $\beta$  könnte durch die Konkurrenz der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 mit der  $\beta$ -Sekretase BACE um das Substrat APP hervorgerufen werden oder auf eine schwächere  $\beta$ -Sekretase-Aktivität (BACE) zurückzuführen zu sein. In APP überexprimierenden Mäusen kam es nach cholesterinreicher Ernährung zu einem Anstieg von A $\beta$ , der Ausbildung neuritischer Plaques und zu einer Abnahme von APPs $\alpha$  (Refolo *et al.*, 2000).

Da andere cholesterinabhängige Enzyme des Cholesterin-, des Fettsäurestoffwechsels und der Glykolyse durch die Transkriptionsfaktoren **SREBPs** (*sterol regulatory element binding protein*) reguliert werden (Brown und Goldstein, 1997), wird im Folgenden näher auf diese Transkriptionsfaktoren eingegangen. Es gibt drei verschiedene SREBPs, SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993). Die SREBP-Isoformen kommen in verschiedenen Geweben und Organen in unterschiedlichen Verhältnissen vor.

Alle SREBPs haben eine gemeinsame Struktur, die unprozessierten Proteine haben ein Molekulargewicht von ~125 kDa und bestehen aus ~1150 Aminosäuren. Es gibt eine N-terminale Transkriptionsaktivator-Domäne mit ~480 Aminosäuren, eine mittlere hydrophobe Region mit ~80 Aminosäuren, die zwei Transmembransegmente enthält, und eine C-terminale Regulator-Domäne mit ~590 Aminosäuren (Hua *et al.*, 1996). Die N-terminale Domäne mit ~480 Aminosäuren ist der

eigentliche Transkriptionsfaktor. Er gehört zur basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Familie (bHLH-Zip). Im Zellkern binden SREBPs möglicherweise als Dimer an eine Wiederholungssequenz aus 5'-PyCAPy-3' bzw. 5'-**TCACNCCAC**-3' (Magana und Osborne, 1996; N steht dabei für eine beliebige Base). So findet sich im Promotor des LDL-Rezeptorgens die Erkennungssequenz 5'-A**TCACCCCAC**-3', die als *sterol regulatory elements* (SRE-1) bezeichnet wird (Yokoyama *et al.*, 1993).

SREBPs sind zunächst in die Membran des ER integriert, wobei der N- und der C-Terminus ins Cytoplasma reichen und sich die hydrophile Schleife im ER-Lumen befindet (Hua *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1997). Der N-Terminus der SREBPs muss durch Proteolyse der membranständigen Proteine abgetrennt werden, um anschließend als aktiver Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandern zu können. Die Proteolyse findet als Zweistufenprozess statt (Wang *et al.*, 1994; Hua *et al.*, 1996; Sakai *et al.*, 1996). Die SREBPs bilden einen Komplex mit dem Membranprotein SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) (Sakai *et al.*, 1997 und 1998), welches mit acht membrandurchspannenden Helices ebenfalls im ER verankert ist (Hua *et al.*, 1996). SCAP tritt möglicherweise mit seiner im C-Terminus enthaltenen WD40-Domäne in Wechselwirkung mit dem C-Terminus von SREBP (Neer *et al.*, 1994; Nohturfft *et al.*, 1998). Die Spaltung der SREBPs durch die S1P-Proteinase wird durch Cholesterin reguliert (Wang *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1996). Geringe Mengen an Cholesterin steigern die SREBP-Proteolyse und dadurch die Verfügbarkeit seiner transkriptionsaktivierenden Domäne, hohe Cholesterinmengen hemmen die SREBP-Proteolyse. SCAP könnte über seinen N-Terminus als Cholesterinsensor fungieren und indirekt die Spaltung der SREBPs durch die S1P-Proteinase regulieren (Hua *et al.*, 1996; Nohturfft *et al.*, 1996, 1998 und 1999; Rawson *et al.*, 1998). SCAP transportiert möglicherweise die SREBPs bei Cholesterinmangel zur S1P-Proteinase, einer membrangebundenen Serin-Proteinase (Sakai *et al.*, 1998). S1P befindet sich in seiner aktiven Form entweder im späten ER oder im Golgi-Apparat und kann dort die SREBPs in der Mitte der hydrophilen Schleife (site-1) spalten (Duncan *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000). So werden beide Transmembran-Domänen voneinander getrennt, verbleiben aber in der Membran. Eine zweite Proteinase S2P, eine Zink-Metalloproteinase, spaltet SREBP N-terminal in der Transmembrandomäne (site-2) (Sakai *et al.*, 1996; Rawson *et al.*, 1997). Die N-terminale Domäne von ~68 kDa verlässt die Membran und kann in den Zellkern einwandern. Dadurch, dass der erste Proteolyseschritt von der Cholesterinmenge in der Zelle abhängig ist und der zweite Schritt erst erfolgen kann, wenn die SREBPs an der Site-1 getrennt wurden, ist auch die Spaltung durch die S2P-Zink-Metalloproteinase indirekt vom Cholesterinspiegel abhängig.

Viele Transkriptionsfaktoren wie auch die SREBP kommen nicht alleine im Zellkern vor, sondern wirken zusammen mit anderen Koaktivatoren. Für SREBP-1a fanden sich Interaktionen mit so



genannten „*CREB-binding proteins*“ (CBP) und P300 (Osborne, 2000). Im Promotor der Fettsäuresynthase wirken die Kofaktoren Sp1, NF-Y und SREBPs zusammen (Xiong *et al.*, 2000). Beim LDL-Rezeptor scheinen SREBP-2, Sp1 und NF-Y positiv auf die Transkription zu wirken, YY1 allerdings hemmt die Interaktion zwischen SREBP-1a und Sp1 und damit die Expression des Rezeptors (Bennett *et al.*, 1999; Yieh *et al.*, 1995).

Eine weitere Möglichkeit die APP-Prozessierung zu regulieren, ist durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die die Phospholipasen C und A2 (PLC und PLA2), MAPK und PKC Aktivierung zu induzieren. Zu diesen Rezeptoren gehören z.B. der muskarinische **Acetylcholinrezeptor** (mAChR) (Nitsch *et al.*, 1992 und 2000), der metabotrophe **Glutamatrezeptor** und der **Serotoninrezeptor** (5-HT-R). Die Stimulation des M1- und M3-AChR führt zur Aktivierung der MAPK und gleichzeitig der PKC. Die gemeinsame Aktivierung dieser Kinasen führt zu einer Erhöhung der  $\alpha$ -sekretorischen Prozessierung des APP (Haring *et al.*, 1998). Bei der Alzheimer-Demenz kommt es zu einer Verminderung der Aktivität der Cholin-Acetyl-Transferase, die Acetylcholin synthetisiert (Bartus *et al.*, 1982; Feldman und Gracon, 1996; Lopez und DeKosky, 2003). Die Zahl an cholinergen Neuronen ist ebenso reduziert (Whitehouse *et al.*, 1982) wie die Anzahl der nicotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Nordberg *et al.*, 1988). Mit Acetylcholinesterase-Hemmern wie Donepezil und NMDA-Antagonisten wie Memantin soll den Verlusten an kognitiven Fähigkeiten an cholinergen und glutamatergen Synapsen entgegengewirkt werden.

Weiterhin zeigen verschiedene Studien, dass Personen, die regelmäßig nicht-steroidale **Entzündungshemmer** zu sich nehmen, seltener an Alzheimer erkranken (Rogers *et al.*, 1993; Breitner *et al.*, 1995). Neben ihren entzündungshemmenden Eigenschaften, welche durch eine Inhibierung der Cyclooxygenase bedingt werden, scheinen einige dieser Antiphlogistika auch die Bildung der neurotoxischen A $\beta$ -Peptide zu unterdrücken (Weggen *et al.*, 2001; Erikson *et al.*, 2003).

Zur Verminderung des oxidativen Stresses könnten **Vitamin E** ( $\alpha$ -Tocophenol) oder Selegilin, ein selektiver Monoaminoxidase-Inhibitor, verwendet werden. Beide Substanzen bewirkten während einer 2-jährigen klinischen Studie eine Verlangsamung der Entwicklung der Alzheimer-Demenz (Sano *et al.*, 1997).

Durch die **Komplexierung von Kupfer- und Eisenionen**, welche normalerweise durch ihre Bindung an A $\beta$ -Peptide die Produktion von Wasserstoffperoxid induzieren, soll dem oxidativem Stress entgegengewirkt werden (Bush, 2002).

## 1.8 Zielsetzung

Die Aktivitätsförderung der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 scheint ein viel versprechender Weg zu sein, den nicht-amyloidogenen Weg bei der Prozessierung des APP zu forcieren. Darüber hinaus wird die charakteristische Plauebildung, die bei Alzheimerpatienten auftritt, durch eine verminderte A $\beta$ -Bildung verringert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Kenntnisse über die Organisation des humanen ADAM10-Gens, d.h. über die Länge und die Abfolge der Exons und Introns, vertieft werden. Vor allem sollte die Expression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 auf Ebene der transkriptionellen Regulation analysiert werden. Hierzu sollte die Promotorregion des humanen ADAM10-Gens isoliert werden. Durch Verwendung von verschiedenen Programmen galt es, an dieser Promotorsequenz potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen bzw. deren Konsensussequenzen zu ermitteln.

Durch 5'- und 3'-Deletionen an der Promotorsequenz sollte der „Minimalpromotor“, d.h. die kürzest mögliche Sequenz, an der die RNA-Polymerase II noch die Transkription initiieren kann, bestimmt werden. Dieser „Minimalpromotor“ sollte dann mit der Promotorsequenz der Maus und der Ratte verglichen werden, um auf diese Weise konservierte Regionen innerhalb des humanen ADAM10-Promotors zu identifizieren. Die Bedeutung der einzelnen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sollten dann im Weiteren durch Punktmutation, durch die Überexpression von Transkriptionsfaktoren in Insektenzellen und durch *electrophoretic shift assays* (EMSA) überprüft werden.

Schließlich war beabsichtigt, durch Stimulationsversuche am humanen ADAM10-Promotor Substanzen zu ermitteln, die in die Transkriptionsregulation dieses Enzyms eingreifen. Hierzu sollte eine stabile Zelllinie hergestellt werden, die sowohl den humanen ADAM10-Promotor als auch nachgeschaltet das Firefly-Luciferasegen enthält. Mit dieser Zelllinie könnten dann verschiedene Substanzen, die im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung stehen, getestet werden. Hierzu zählt das Östradiol, das zu einer vermehrten Freisetzung von APPs $\alpha$  führt. Auch ein verminderter Cholesteringehalt erhöht die Menge an APPs $\alpha$ . In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss der Überexpression von transkriptionell aktiven SREBPs untersucht werden, ebenso sollten Cholesterinbiosynthese-Hemmer wie Statine (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) und Zaragozicsäure (Squalensynthese-Inhibitor) zum Einsatz kommen. Durch die Behandlung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) galt es den Einfluss der Proteinkinase-C-vermittelten Signalkaskade auf die Promotoraktivität überprüft werden. In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Wirkung verschiedener apoptoseauslösender Substanzen auf die Promotoraktivität der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 untersucht werden.

Substanzen, die aktivierend auf die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 wirken, könnten bei der Entwicklung von Pharmaka zur Behandlung der Alzheimer-Demenz hilfreich sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Medien

#### Allgemeine Laborchemikalien

	Roth, Karlsruhe
	Merck, Darmstadt
	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
ATP	Pharmacia, Freiburg
Bactoagar	AppliChem, Darmstadt
Bacto-Trypton	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Roth, Karlsruhe
cAMP	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
complete™ Protease-Inhibitoren	Boehringer, Mannheim
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DMEM	PAA, Linz, Österreich
	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
FCS (fetal calf serum)	PAA, Linz, Österreich
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418)	PAA, Linz, Österreich
Glucose	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen
RNaseA-Lösung	Sigma, Deisenhofen
SDS	BioRad, München
Serum Plus™	JHR Bioscience, USA
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	PAA, Linz, Österreich

## 2.2 Enzyme und Kitsysteme

Enzyme für molekulargenetisches Arbeiten	NEB, Bad Schwalbach Amersham, Braunschweig Gibco BRL, Eggenstein MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmid Midi/Mini Kit, QIAquick Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

## 2.3 Laborgeräte und Hilfsmittel

ABI PRISM® 7000	Applied Biosystem, Darmstadt
Acryl-Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Analysenwaage	Mettler-Toledo GMBH, Gießen
Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fuji)	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen
Brandel Cell Harvester	Brandel, Gaithersburg (USA)
CCD-Kamera	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer, Norwalk, CT (USA)
Doppelstrahlphotometer Hitachi U-200	Colora Meßtechnik GmbH, Lorch

### Elektrophoreseapparaturen:

Flachbettgelapparatur für DNA	Eigenbau
Protean-II slab cell	Bio-Rad, München
Minigel-Elektrophorese	Biometra, Göttingen
Filterpapier (3-MM)	Whatman, Springfield (Großbritannien)
Fluo Star Optima Chemiluminometer	BMG, Heidelberg
Gelschneideapparatur	Bio-Rad, München
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
GF/C-Glasfaserfilter	Whatman, Bender & Hobein, Bruchsal
Glaspotter (Homogenisatoren)	GLW, Würzburg
Glaszentrifugenröhrchen	DuPont, Bad Homburg
Heizblock Bioblock	Scientific, Illkirch Cedex (F)
Inkubationsschüttler MULTITRON	Infors GmbH, Einsbach
Kunststoffspritzen (10 und 50 ml)	Braun, Melsungen
Kunststoffzentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Lysozymlösung	Sigma, Deisenhofen
Mikrofilter (0,2 und 0,4 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	peq Lab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Phasenkontrast-Mikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Polystyrolküvetten	Sarstedt, Nürnberg
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Scanner BAS-1800	Fujifilm, Düsseldorf
Schüttelmixer	Laborfachhandel
Semi-Dry-Blotapparatur	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Power-All	Serva, Heidelberg
Sterilwerkbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge: Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

Transilluminator 4000	Stratagene, Heidelberg
Überkopftrotierer	Fröbel Labortechnik, Lindau
Vortexer	Janke und Kunkel, Heitersheim
Wasserbad	BFL, Burgwedel
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Zellkulturmaterialien	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenbecher (50 und 250 ml)	Beckmann, München
Zentrifugenrotoren JA14 und JA20	Beckmann, München

## **2.4 Stammlösungen, Puffer und Kulturmedien**

### **Antibiotika-Stammlösungen**

100 mg/ml Ampicillin in H<sub>2</sub>O

20 mg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol

Lagerung bei -20°C

### **DMEM**

high modified, 4,5 g/l Glucose, ohne weitere Zusätze

### **DMEM-Komplettmedium**

DMEM Flüssigmedium

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 mg/ml Streptomycin

10 % (v/v) FCS (fetal calf serum)

1 mM Natriumpyruvat

### **DNA-Probenauftragspuffer**

50% (v/v) Glycerin

0,2% (v/v) SDS

0,05% Bromphenolblau

0,05% Xylencyanol

10 mM EDTA (Sigma, Deisenhofen)



**Ethidiumbromid-Stammlösung**

10 mg/ml Ethidiumbromid

lichtgeschützt bei 4°C lagern

**LB-Medium**

10 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

in H<sub>2</sub>O

mit 2 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt

autoklavieren (121°C, 20 min)

**LB-Agar-Platten**

LB-Medium mit 1,5% Bactoagar

**LB-Selektionsmedien**

Zusatz von:

100 µg/ml Ampicillin bzw.

20 µg/ml Chloramphenicol

**LB-Medium mit 20mM Glucose**

1 g Bacto-Trypton

0,5 g Hefeextrakt

1 g NaCl

98 ml H<sub>2</sub>O

autoklavieren

anschließend 2 ml 1 M Glucose-Lösung zugeben

**Lösung P1**

50 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA

**Lösung P2**

0,2 M NaOH

1 % SDS

**Lösung P3**

3 M Kaliumacetat pH 4,8

**MEM-Medium**

2 mM Glutamin

7 % Serum Plus<sup>TM</sup>

in MEM

**PBS**

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

in H<sub>2</sub>O

pH 7,4 mit 2 M NaOH eingestellt

**PCI**

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1 (v/v/v)

**SOB-Medium**

20 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

0,6 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert (121°C, 20 min), abgekühlt, steril zugegeben:

10 ml/l 1 M MgSO<sub>4</sub>

10 ml/l 1 M MgCl<sub>2</sub>

**SOC-Medium**

SOB-Medium mit 20 mM Glucose

**STET-Puffer**

8 % (w/v) Saccharose

5 % (w/v) Triton X-100

50 mM EDTA

50 mM Tris-HCl pH 8,0

**50x TAE-Puffer**

2 M Tris

1 M Essigsäure

50 mM EDTA

pH 8,4

**Trypsin/EDTA**

0,05 % (w/v) Trypsin

0,54 mM EDTA

in PBS

## 2.5 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.5.1 Plasmide

Als Klonierungsvektoren und Referenzplasmide dienen sowohl Standard-Plasmide als auch selbst hergestellte Vektoren.

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide

Plasmide	Hersteller/Herkunft	Charakterisierung
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe	eukaryontischer Expressionsvektor für Säugerzellen, trägt den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, der eine hohe transiente und stabile Expression von Genen in vielen eukaryontischen Zellen ermöglicht, trägt außerdem den SV40-Origin, ein Polyadenylierungssignal und enthält ein Ampicillin- und ein Neomycinresistenz-Gen (Selektion von Transformanten mit Geneticin (G418))
pUC57T	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot	Klonierungsplasmid für PCR-Produkte, die mit Taq-DNA-Polymerase erzeugt wurden, <i>EcoRV</i> geschnitten, Thymin angehängt, enthält ein Ampicillinresistenz-Gen
pGL3-Basic	Von Arbeitsgruppe Dr. Reske-Kunz, Universität Mainz	Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid, enthält Ampicillinresistenz-Gen
pRL-SV40	Promega, Mannheim	<i>Renilla</i> -Reporter-Gen-Plasmid, enthält Ampicillinresistenz-Gen
pCMV-SREBP-1a-460	Gefriergetrocknete <i>E. coli</i> Kultur von der Firma ATCC, Manassas, USA (ATCC-Nr.: 99637)	Expressionsplasmid für Säugerzellen, die humane SREBP-1a-460-cDNA-Teilsequenz enthält ein Ampicillinresistenz-Gen und ein Neomycinresistenz-Gen
pCMV-SREBP-1c-436	Gefriergetrocknete <i>E. coli</i> Kultur von der Firma ATCC, Manassas, USA (ATCC-Nr.: 99636)	Expressionsplasmid für Säugerzellen, enthält die humane SREBP-1c-436-cDNA-Teilsequenz und ein Ampicillinresistenz-Gen sowie ein Neomycinresistenz-Gen
pPacSp1	Von Prof. Dr. Suske, Universität Marburg	Expressionsplasmid für Insektenzellen, welches die humane Sp1-cDNA-Teilsequenz enthält
pPacSp3	Von Prof. Dr. Suske, Universität Marburg	Expressionsplasmid für Insektenzellen, welches die humane Sp3-cDNA-Teilsequenz enthält
pPacUSp3	Von Prof. Dr. Suske, Universität Marburg	Expressionsplasmid für Insektenzellen, welches die humane USp3-cDNA-Teilsequenz enthält
P97b	Von Prof. Dr. Suske, Universität Marburg	Expressionsplasmid für Insektenzellen, welches das $\beta$ -Galaktosidasegen enthält

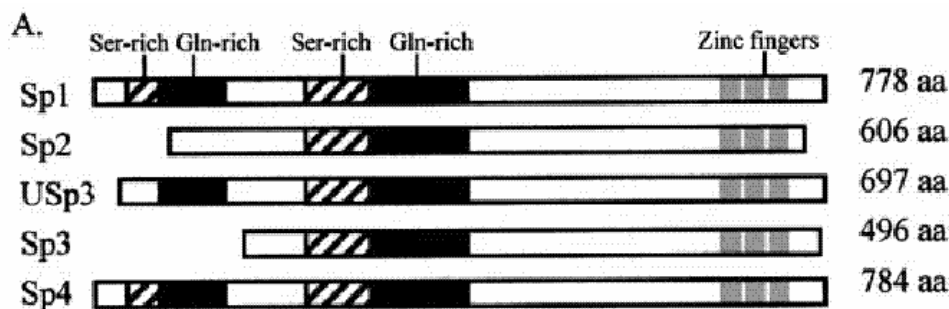


Abbildung 2.1: Schematischer Strukturvergleich von den Sp-Familienmitgliedern (Zhang *et al.*, 2003).

Für jeden Transkriptionsfaktor ist die Anzahl der Aminosäuren (aa) wiedergegeben. Sp1 und USp3 können als Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen anschalten, dazu ist Sp3 aufgrund der fehlenden Aktivatorregion nicht in der Lage. Sp3 dient als Negativkontrolle.

## 2.5.2 Oligonukleotidkonstruktion

Beim Entwurf von Oligonukleotiden (Primern) wurden folgende Faktoren berücksichtigt:

- Mindestlänge von 17 Nukleotiden
- Ausgeglichener G/C- zu A/T-Gehalt
- Möglichst gleiche Annealingtemperatur für beide Oligonukleotide einer PCR
- Keine Sekundärstruktur durch palindromische Sequenz
- Keine komplementären Primer (Verhinderung der Dimerbildung)
- Möglichst keine PolyA, PolyT, PolyG, PolyC- oder lange G/C-Abschnitte

Die Berechnung der Schmelztemperatur  $T_m$  und der Annealingtemperatur  $T_a$  erfolgte nach einer Formel der Firma MWG-Biotech:

$$T_m: 69,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC}\% - 650/\text{Primerlänge}$$

$$T_a: T_m - 3^{\circ}\text{C}$$

Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung aufgeführt. Nukleotide, die sich von der Originalsequenz unterscheiden, sind rot markiert. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die über die Primer eingeführt wurden, sind unterstrichen. Die Oligonukleotide waren von den Firmen Operon, Sigma ARK bzw. Eurogentec. Die Oligonukleotide wurden entschützt und entsalzt geliefert und nicht weiter aufbereitet.

### 2.5.2.1 Oligonukleotide zur Herstellung der Promotorkonstrukte

Tabelle 2.2: Verwendete Primer für die Herstellung der Promotorkonstrukte.

Primerbezeichnung (Länge) Hersteller	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	Konz. (mol/μl)
<b>hAd10Profor1</b> (30mer) ARK	5'-TTCTGGTACCTCTTTCAGGATCGGATCGTTG-3' <i>KpnI</i>	62,4	50
<b>hAd10Profor2</b> (29mer) ARK	5'-ACGAGGTACCCGCGGCGGCAGGCCTAGCAG-3' <i>KpnI</i>	72,4	50
<b>hAd10Profor4</b> (21mer) ARK	5'-CGTCGAACTTATCGCTGTCTT-3'	55,6	50
<b>hAd10Profor6</b> (30mer) ARK	5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' <i>BamHI</i>	62,4	50
<b>hAd10Profor7</b> (31mer) ARK	5'-GTTGGGATCCCGAGACCAGCCTAACCAACAT-3' <i>BamHI</i>	66,3	50
<b>hAd10Profor8</b> (29mer) ARK	5'-CACAGGATCCCTAATTCGGCTTGAGTTGG-3' <i>BamHI</i>	63,9	50
<b>hAd10Profor9</b> (29mer) ARK	5'-TGGCGGATCCGCGGAGACCTGTCTTTAG-3' <i>BamHI</i>	66,7	50
<b>hAd10Profor10</b> (30mer) Sigma/ARK	5'-TGATGGATCCTGTAATGTCTGCAGGTAAC-3' <i>BamHI</i>	61	50
<b>hAd10Profor11</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-TGGAGGATCCAGACAGTCTGGTTCAGGTT-3' <i>BamHI</i>	63,9	50
<b>hAd10Profor12</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-TTGAGGATCCTTGCATTATGTTCGCATC-3' <i>BamHI</i>	59,6	50
<b>hAd10Profor13</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-CTTGGGATCCGTTGGTGCACCAAGAGAGGC-3' <i>BamHI</i>	68,1	50
<b>hAd10Profor14</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-GAAAGGATCCCTGCTTACATCTTCCACGG-3' <i>BamHI</i>	63,9	50
<b>hAd10Profor15</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-CTCAGGATCCCTAACACGTAGCGGAGCAC-3' <i>BamHI</i>	66,7	50
<b>hAd10Profor16</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-CCCCGGATCCAGGACAAACCCCGCTCCC-3' <i>BamHI</i>	72,4	50
<b>hAd10Profor17a</b> (44mer) Sigma/ARK	5'- <u>GATCTAG</u> ACCAGCTCTCCGCCGGCAGGAAGCGGCG <u>GCAGA</u> -3' <i>BglII XbaI HindIII</i>	76,5	50
<b>hAd10Profor18</b> (29mer) Sigma/ARK	5'-AGCCGGATCCAGCTCTCCGCCGGCAG-3' <i>BamHI</i>	73,8	50

## Material und Methoden

**Tabelle 2.3:** Verwendete Primer für die Herstellung der Promotorkonstrukte.

Primerbezeichnung (Länge) Hersteller	Sequenz	Tm (°C)	Konz. (mol/µl)
hAD10_Pro_for19 (36mer) Operon	5'-GACAGGATCCGGCGGCAGGCCTAGCAGCACGGGAAC-3' <i>Bam</i> HI		100
hAD10_Pro_for20 (32mer) Operon	5'-GCGGGGATCCGCCTAGCAGCACGGGAACCGTC-3' <i>Bam</i> HI	78,7	100
hAD10_Pro_for21 (29mer) Operon	5'-GTGAGGATCCAGGCGGAGGTCTGAGTTTC-3' <i>Bam</i> HI	71,7	100
hAD10_Pro_for22 (18mer) Operon	5'-GGGAGGCTGAGGCAGGAG-3'	66,7	100
hAD10_Pro_for23 (18mer) Operon	5'-GGGAGAAGATGTGCGTGG-3'	62,2	100
Ad10Prorev (19mer) ARK	5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3'	66	50
hAD10Prorev2 (21mer) MWG	5'-ACACTCTCAGCAACACCATCT-3'	57,9	100
hAD10Prorev5 (21mer) ARK	5'-AACAGCAGCACATCGATCCGG-3'	59,5	50
hAD10Prorev7 (20mer) ARK	5'-CTGCCGCCGCTTCTGTCCG-3'	65,7	50
hAD10Prorev8 (21mer) Sigma/ARK	5'-GATCCGGAGGGAGAAGCTGGA-3'	59,5	50
hAD10Prorev8a (44mer) Sigma/ARK	5'AGCTTCTGCCGCCGCTTCTGTCCGCCGGCGGAGAGCTGGTC-3'	76,5	50
hAD10_Pro_rev9 (30mer, Operon)	5'-CAACACAAGCTTCCGCTGCCGCTGCCGCCG-3' <i>Hind</i> III	76,4	100
hAD10_Pro_rev10 (30mer, Operon)	5'-TCTCAGCAACACAAGCTTCCGCTGCCGCTG-3' <i>Hind</i> III	72,3	100
hAD10_Pro_rev11 (28mer, Operon)	5'-CTAGGCCTGCCGAAGCTTCTGTCCGCC-3' <i>Hind</i> III	74,9	100
hAD10_Pro_rev12 (22mer, Operon)	5'-CCTGTCCGCCGGCGGAGAGCTG-3'	73,9	100

### 2.5.2.2 Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen

**Tabelle 2.4:** Verwendete Primer für die Einführung von Punktmutationen.

Transkriptionsfaktorbindungsstelle	Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
Mutierte GC-box/Sp1-Stelle	hAD10_Pro_for25 (25mer, Tm 74,42°C) hAD10_Pro_rev14 (25mer, Tm 74,42°C)	5'-CGCTCCCCTTCCGGTTGGGGACCAG-3' 5'-CTGGTCCC <b>CA</b> ACCGGA <b>AG</b> GGGAGCG-3'
Mutierte CAAT-Box	hAD10_Pro_for26 (18mer, Tm 60,5°C) hAD10_Pro_rev15 (18mer, Tm 60,5°C)	5'-CCCAAGCCT <b>C</b> ATCCCAGC-3' 5'-GCTGGGAT <b>G</b> AGGCTTGGG-3'
Mutierte Sp1-Stelle	hAD10Profor28 (30mer, Tm °C) hAD10Prorev17 (30mer, Tm 66°C)	5'-GGACGGGTAGG <b>T</b> GGGGAGGTAGGGGCGCG-3' 5'-CGCGCCCTACCT <b>CCCA</b> ACCTACCCGTCC-3'
Mutierte USF-Stelle	hAD10_Pro_for24 (23mer, Tm 69,9°C) hAD10_Pro_rev13 (23mer, Tm 69,9°C)	5'-CCGCGCGT <b>CAGTT</b> GGTGAGGAAG-3' 5'-CTTCTCACC <b>CAACTG</b> ACGCGCGG-3'

### 2.5.2.3 Oligonukleotide für EMSA

**Tabelle 2.5:** Oligonukleotide, die für EMSA Versuche verwendet wurden.

Transkriptionsfaktorbindungsstelle	Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
GC-box/Sp1-Stelle (-521)	GC_for GC_rev	5'-CGCTCCC <b>G</b> CCCCGGGGCGGGACCAG-3' 5'-CTGGTCCC <b>G</b> CCCCGGGGCGGGAGCG-3'
Mutierte GC-box/Sp1-Stelle (-521)	hAD10_Pro_for25 (25mer, Tm 74,42°C) hAD10_Pro_rev14 (25mer, Tm 74,42°C)	5'-CGCTCCCCTTCCGGTTGGGGACCAG-3' 5'-CTGGTCCC <b>CA</b> ACCGGA <b>AG</b> GGGAGCG-3'
Sp1-Stelle (-366)	Sp1-for Sp1-rev	5'-GGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCG-3' 5'-CGCGCCCTACCTCCCGCCCTACCCGTCC-3'
Mutierte Sp1-Stelle (-366)	hAD10Profor28 (30mer, Tm °C) hAD10Prorev17 (30mer, Tm 66°C)	5'-GGACGGGTAGG <b>T</b> GGGGAGGTAGGGGCGCG-3' 5'-CGCGCCCTACCT <b>CCCA</b> ACCTACCCGTCC-3'
USF-Stelle (-317)	hAD10_Pro_for24A (22mer, Tm 70,13°C) hAD10_Pro_rev13A (23mer, Tm 71,68°C)	5'-CGCGCGTCACGTGGTGAGGAAG-3' 5'-CTTCTCACCACGTGACGCGCGG-3'
Mutierte USF-Stelle (-317)	hAD10_Pro_for24 (23mer, Tm 69,9°C) hAD10_Pro_rev13 (23mer, Tm 69,9°C)	5'-CCGCGCGT <b>CAGTT</b> GGTGAGGAAG-3' 5'-CTTCTCACC <b>CAACTG</b> ACGCGCGG-3'
RXR-Stelle (-203)	RXR2 for RXR2 rev	5'-GGGGGAGGGAGGTCCCTGTTTTG-3' 5'-CAAAACAGGGACCTCCCTCCCC-3'

### 2.5.2.4 Sequenzierprimer

Tabelle 2.6: Verwendete Sequenzierprimer

Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
GL_for (20mer)	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3'
GL_rev (20mer)	5'-GGATAGAATGGCGCCGGGC-3'
GL_rev2 (21mer)	5'-GATGAGATGTGACGAACGTGT-3'
IRES_for (17mer)	5'-CTGGCTAACTAGAGAAC-3'
IRES_rev (17mer)	5'-TACTCACCCCAACAGCT-3'
IRES_rev2 (17mer) ARK	5'-TGACAATCTTAGCGCAG-3'
pcDNA3Seq (21mer)	5'-AGCAGAGCTCTCTGGCTA-3'
pcDNA3Seq_rev (22mer)	5'-ACTAGAAGGCACAGTCGAGGCT-3'
RPos2 (20mer)	5'-GGGTCTGTTATTGATGGAAG-3'
SREBP1a_for3 (20mer)	5'-TGAGCTCAAGGATCTGGTGG-3'
USF_for (16mer)	5'-CTGGATCGTCAGCTC-3'
USF1_rev (15mer)	5'-GGATAGAATCCCACC-3'

### 2.5.2.5 Primer zur Überprüfung der stabilen Expression des Vektors pCP56.6

Tabelle 2.7: Für die Überprüfung der stabilen Expression des Vektors pCP56.6 verwendete Primer.

Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
hAd10Profor6 (30mer, T <sub>m</sub> 62,4°C) ARK	5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' BamHI
Luc_rev (19mer, T <sub>m</sub> 59°C) Operon	5'-AGCGGTTCCATCTTCCAGC-3'

### 2.5.2.6 Primer für 5'-RACE

Tabelle 2.8: Verwendete Primer für die 5'-RACE.

Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
RPos6 (19mer, T <sub>m</sub> 55°C)	5'-CTTGAGGTGTCTGTGTTAC-3'
SMART II (30mer)	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'
SMART II_for (33mer, T <sub>m</sub> 60,6°C)	<i>Bgl</i> II 5'-AAACAGATCTAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3' kompatibel zu <i>Pme</i> I kompatibel zu SMART II
hAD10RACE_for2 (35 mer, T <sub>m</sub> 80°C)	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> HI 5'-CGGGGTACGCCGGGATCCGCGGGIGGGIIGGGIIG-3' mit Deoxyinosinen kompatibel zu PolyC
hAD10_RACE_rev3 (23mer, T <sub>m</sub> 67°C)	5'-GATCTGCACAGCCCCCTGAGGA-3'

### 2.5.2.7 *Primer für die Real Time RT-PCR*

**Tabelle 2.9:** Für die *Real time* RT-PCR verwendete Primer.

Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
<b>hADAM_Reti_for</b> (21mer, Tm 60,61°C) <b>hADAM_Reti_rev_r</b> (22mer, Tm 64,54°C)	5'-CTGGCCAACCTATTTGTGGAA-3' 5'-GACCTTGACTTGGACTGCACTG-3' Primer für humane RNA; passt auch an bovine mRNA
<b>hApoE_Reti_for</b> (20 mer, Tm 59°C, 55% GC) <b>hApoE_Reti_rev</b> (19mer, Tm 58°C, 58% GC)	5'-GGGTCGCTTTTGGGATTACC-3' 5'-ATCAGCGCCCTCAGTTCCT-3' Primer für humane RNA
<b>hBACE_Reti_for</b> (24mer, Tm 59°C) <b>hBACE_Reti_rev</b> (20mer, Tm 59°C)	5'-GTTATCATGGAGGGCTTCTACGTT-3' 5'-GCTGCCGTCCTGAACTCATC-3' Primer für humane RNA
<b>mBACE_RTPCR_for</b> (20mer, Tm 57,3°C) <b>mBACE_RTPCR_rev</b> (19mer, Tm 61°C)	5'-TTGCTGCCATCACTGAATCG-3' 5'-GGCTCCAAAGAGTCGTCGG-3' Primer für Maus-RNA
<b>SREBP1_Reti_for</b> (19mer, Tm 61°C) <b>SREBP1_Reti_rev</b> (23mer, Tm 59°C)	5'-ACAGCCCACAACGCCATTG-3' 5'-TGTGTTGCAGAAAGCGAATGTAG-3' Primer für humane RNA
<b>SREBP2_Reti_for</b> (24mer, Tm 59°C) <b>SREBP2_Reti_rev</b> (19mer, Tm 60°C)	5'-CCAGAATGCAGCTACTAGCTTICA-3' 5'-CCATTGGCCGTTTGTGTC-3' Primer für humane RNA
<b>hAPP695_RT_for</b> (21mer, Tm 59,8°C) <b>hAPP695_RT_rev</b> (21mer, Tm 59,8°C)	5'-GGAGAGGATGGATGTTTGCGA-3' 5'-GCAACATGCCGTAGTCATGCA-3' Primer für Maus-RNA
<b>mADR_for</b> (20mer, Tm 64,5°C) <b>mADR_rev</b> (20mer, Tm 60,4°C)	5'-CTGGCCAGCCTATCTGTGGA-3' 5'-GTTGGCATCGAAGCAGCAAT-3' Primer für Maus-RNA
<b>GAPDH_for</b> (24mer) <b>GAPDH_rev</b> (24mer)	5'-GAAGGGCTCATGACCACAGTCCAT-3' 5'-TCATTGTCGTACCAGGAAATGAGCTT-3'

### 2.5.2.8 *Primer für die Genotypisierung der transgenen Mäuse*

**Tabelle 2.10:** Primer, die für die Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendet wurden.

Primerbezeichnung (Länge)	Sequenz
<b>Thy1_for2</b> (19mer, Tm 58°C) <b>Protease5_rev</b> (20mer, Tm 58°C)	5'-GGTATTCAGTCATGTGCTC-3' Primer für den Maus Thy1-Promotor 5'-GAAGTATCCCTCTTCATTCG-3' Primer für bovines ADAM10 Amplifikat von 403bp
<b>P2</b> (24mer, Tm 65°C) <b>P3</b> (22mer, Tm 63°C)	5'-CCGATGGGTAGTGAAGCAATGGTT-3' 5'-TGTGCCAGCCAACACAGAAAAC-3' Primer für humanes APP Amplifikat von ca. 500 bp



### 2.5.3 Verwendete Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

***E. coli* DH5 $\alpha$ :**  $\phi$ 80 $\delta$  (*lacZ* $\Delta$ M15), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ( $r_k^- m_k^+$ ), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$  (*lacZYA-argFV169*), F<sup>-</sup>,  $\lambda^-$ ; von Clontech, Heidelberg.

Bei diesem Stamm handelt es sich um einen Abkömmling des *E. coli* K12, einem Sicherheitsstamm, dem die für die Pathogenität verantwortlichen Gene (Adhäsionsfaktoren, Invasionsfaktoren, Toxine etc.) fehlen.

***E. coli* SCS110:** *rpsL* (Str<sup>r</sup>) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44* $\Delta$  (*lac-proAB*) [F' *traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15], von Stratagene, Amsterdam.

Dieser Bakterienstamm zeichnet sich durch seine Methylierungsdefizienz aus. Er wurde bei Transfektionen verwendet, bei denen die Plasmid-DNA später durch methylierungssensitive Restriktionsenzyme überprüft werden sollte.

Beide Stämme dienen zur Transformation und Isolierung von Plasmiden.

**Tabelle 2.11:** Für die Isolierung der ADAM10-Promotorregion relevanter BAC-Klon.

BAC-Klone	Kürzel	Quelle	Charakterisierung
BAC RPC I 11 123 C 21	123C21	Children's Hospital Oakland-BACPAC Resoures, Oakland, CA, USA	ADAM10-Gen mit Promotor

## 2.6 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.6.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte in autoklaviertem LB-Medium, die von transformiertem *E. coli* erfolgte in dem entsprechenden antibiotikahaltigen Medium. Die Kultivierung zur Vereinzelung der Bakterienklone und für die Plasmidpräparation erfolgt für ca. 15 h bei 37°C im Brutschrank (Hareus, Hanau) auf LB-Agar-Platten.

### 2.6.2 Lagerung von *E. coli*

Für die langfristige Aufbewahrung von *E. coli* DH5 $\alpha$  oder von Transformanden wurde der entsprechende Klon in antibiotikahaltigem LB-Medium herangezogen (5 h; 37°C; 120 rpm Inkubationsschüttler). 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden zu 500  $\mu$ l sterilem Glycerin gegeben,

gut durchmischt und zunächst bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.6.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* (Dagert und Ehrlich, 1974; Ausubel *et al.*, 1995)**

Die Kultivierung zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte in SOC-Medium. Die Bakterien wurden hierfür zunächst auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und 15 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Mit einem Bakterienklon wurden 4 ml SOC-Medium angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln (120 rpm) inkubiert. 1 ml dieser Lösung wurde dann in 400 ml SOC-Medium gegeben und so lange inkubiert, bis eine Trübung erreicht wurde, die einer optischen Dichte von 0,5-0,6 bei 600 nm entsprach. Die Messung der OD600 wurde in einem Doppelstrahlphotometer (HITACHI U-1100) in Polystyrolküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 wurde das Wachstum der Bakterien sofort gestoppt, indem die Suspension auf Eis abgekühlt wurde. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert (Beckmann JA-20, 6000 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), anschließend in 100 ml sterilem eiskalten 50 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abermals durch Zentrifugation (s.o.) sedimentiert und anschließend in 20 ml 50 mM  $\text{CaCl}_2$ /10% (v/v) Glycerin wieder aufgenommen. Die Bakterien wurden dann 4 h auf Eis inkubiert, bevor sie aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die endgültige Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.6.4 Transformation**

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterienzellen. Durch die Replikation und Expression der eingebrachten DNA weisen die Bakterien neue, selektionierbare Eigenschaften auf.

#### **2.6.4.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli***

Zur Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  der chemisch kompetenten *E. coli* (2.6.3) langsam auf Eis aufgetaut. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz bzw. 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA ( $\sim 100$  ng) gegeben. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Mischen wurde für 90 s ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Bakterien wurden 3 min auf Eis abgekühlt, bevor sie in 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium/20 mM Glukose aufgenommen wurden. Zur Regeneration der rekombinanten Bakterien wurden sie für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Bakterienrührer (120 rpm; Infors,

Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Danach wurden 200-400 µl der Flüssigkultur auf entsprechende LB-Agar-Selektionsplatten ausplattiert und 15 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Da die Plasmide Resistenzgene für bestimmte Antibiotika tragen, sind die Bakterien nach einer erfolgreichen Aufnahme des Plasmids in der Lage, auf entsprechenden Selektionsplatten zu wachsen. Diese Resistenz erlaubt somit die Selektion rekombinanter Bakterienklone.

## **2.6.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **2.6.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

#### **2.6.5.1.1 Plasmid-MINI-Präparation (Schnellmethode)**

Bei dieser Präparationsmethode (Schnellmethode; Holmes und Quigley, 1981) wird die Bakterienzellwand durch Lysozym zerstört und nach kurzer Inkubationszeit die Zellmembran durch Hitzeeinwirkung aufgelöst.

Dazu wurden nach der Transformation erhaltene Einzelklone zur Vermehrung auf einer LB-Selektionsplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C über Nacht herangezogen. Mit einer sterilen Impföse wurde der Bakterienrasen eines Klons geerntet und in 350 µl STET-Puffer überführt. Zur Suspendierung wurden die Zellen gevortext. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min erfolgte der Zellaufschluss durch Erhitzen für 50 s im kochenden Wasserbad. Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Zelldebris mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 38 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 und 400 µl Isopropanol aus der Lösung ausgefällt. Die DNA wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm sedimentiert und der Pellet durch Überschichten mit 70% wässrigem Ethanol und nochmaligem Zentrifugieren von Salzen befreit. Das DNA-Präzipitat wurde unter der Sterilbank ca. 30 min getrocknet und in 30-50 µl H<sub>2</sub>O mit 1 µl RNase-Lösung (1 mg/ml) gelöst. 1-3 µl dieser DNA-Lösung wurde für die analytische Restriktion der Plasmid-DNA eingesetzt.

#### **2.6.5.1.2 Plasmid-Säulen-Präparation**

Um besonders reine und salzarme DNA zu erhalten (z.B. für eine Sequenzierung), wurde die Präparation mit Hilfe einer DNA-bindenden Säule (QIAquick Spin Miniprep Kit von der Firma QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.6.5.1.3 Plasmid-MAXI-Präparation**

Zur quantitativen Gewinnung von Plasmid-DNA wurde zunächst eine Vorkultur (5 ml) mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über 5 h in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann zu 400 ml LB-Selektionsmedium (2.4) gegeben und über Nacht im

Bakterienschüttler bei 37°C weiter inkubiert. Die Bakterien wurden dann in der Kühlzentrifuge J2-21 (Beckmann, München) bei 4 °C mit dem Rotor JA 16 für 20 min bei 5000 rpm sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 8 ml Lösung P1 resuspendiert, die Suspension in JA 20-Plastikröhrchen überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien durch Zugabe von 8 ml Lösung P2. Die Lösung wurde vorsichtig invertiert und nochmals 7 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um das Natriumhydroxid zu neutralisieren und das Detergens SDS zu entfernen, wurde als letztes 8 ml eiskalte Lösung P3 hinzugegeben und gut gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das Bakterienlysat zur Abtrennung der Zelltrümmer und der chromosomalen DNA 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in neue Plastikröhrchen überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe und Untermischen von jeweils ca. 17 ml Isopropanol (0,7 Volumeneinheiten) ausgefällt. Nach 10 min wurde die Plasmid-DNA und die RNA durch Zentrifugation (15000 rpm, 20 min, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 3 ml 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert.

Als nächstes erfolgte die Ammoniumacetatfällung der RNA. Nachdem das Nukleinsäure-Pellet in 6 ml Wasser aufgelöst worden war, wurden 5 ml 10 M Ammoniumacetat zugeben, die Lösung geschüttelt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Sedimentation der RNA erfolgte durch Zentrifugation im Rotor JA 20 (15000 rpm, 20 min, 4°C). Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in Beckman-Röhrchen aus Glas überführt.

Nun erfolgte die Isopropanolfällung der Plasmid-DNA durch Zugabe von 7 ml Isopropanol (0,6 Volumeneinheiten). Die Probe wurde gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 11000 rpm über 20 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 3 ml 75%iges Ethanol gewaschen und nochmals bei 11000 rpm 5 min zentrifugiert. Dann wurde das Pellet unter der Sterilbank getrocknet.

Um die restliche RNA zu entfernen, wurde das Pellet in 800 µl H<sub>2</sub>O aufgelöst und 6 µl RNaseA (10 mg/ml) zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Schüttler bei 37°C für mindestens eine halbe Stunde. Anschließend wurden die Proben in neue Reaktionsgefäße (2 ml) überführt.

Es folgte die Phenolextraktion der DNA-Lösung. Dazu wurde die DNA-Lösung einmal mit 600 µl Phenol (TE-gesättigt) und viermal mit je 600 µl PCI (2.4) extrahiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben jeweils für 3 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Es wurde jeweils die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) überführt. Zum Abschluss erfolgte eine zweimalige Extraktion mit je 1 ml wassergesättigtem Diethylether. Da sich die DNA hier in der unteren wässrigen Phase befindet, wurde nach der Zentrifugation jeweils die obere Etherphase abgenommen. Nach der letzten Etherextraktion wurde die DNA-Lösung zum Abdampfen des

restlichen Ethers unter die Sterilbank gestellt. Dann wurde jeweils 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat pH 4,8 und 3 Volumen 100%iges Ethanol zu der DNA-Lösung gegeben. Die Proben wurden geschüttelt und zur Ausfällung der Plasmid-DNA über Nacht bei -20°C inkubiert. Durch Zentrifugation (14000 rpm, Raumtemperatur, 30 min) in der Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) wurde die gefällte Plasmid-DNA pelletiert. Nach dem Waschen mit 75%igem Alkohol (Entfernen des eingesetzten Kaliumacetats) und Trocknen wurde die Plasmid-DNA schließlich in 1000 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zum Schluss erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA-Lösung (2.6.5.4). Außerdem wurde die Plasmid-DNA einer Test-Restriktion unterzogen (2.6.5.9.1).

### **2.6.5.1.4 Endotoxinfreie Plasmidpräparation**

Um endotoxinfreie DNA für die Transfektion von eukaryotischen Zellen zu erhalten, wurde die Präparation mit Hilfe einer DNA-bindenden Säule (QIAquick Spin Miniprep Kit von der Firma Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.6.5.2 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen**

Für die Gewinnung der gesamten RNA aus eukaryotischen Zellen wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Protokollangaben des Herstellers. Die wässrige RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

### **2.6.5.3 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Bei der Isolierung von RNA aus Gewebe muss zunächst berücksichtigt werden, dass sich die RNA-Zusammensetzung sehr schnell verändern kann. Das Gewebe muss so schnell wie möglich bearbeitet und in RNAlater (Qiagen) überführt werden (10 µl RNAlater pro 1 mg Gewebe). Die RNAlater-Lösung dringt durch ihre hohe Salzkonzentration schnell ins Gewebe ein. Die Gewebestücke dürfen maximal 0,5 cm Durchmesser haben, ansonsten muss das Gewebe zerkleinert werden, um eine bessere Durchsetzung mit dem Reagenz zu gewährleisten. Zum Einwirken des Reagenz muss das Gewebe über Nacht in RNAlater bei 4°C gelagert werden. Anschließend erfolgt die langfristige Lagerung bei -20°C.

Das Gewebe wurde zur RNA-Isolierung aus der RNAlater-Lösung genommen und in ein sauberes Röhrchen überführt. Von der Menge an isoliertem Gewebe hängt es ab, welches Säulenmaterial für die RNA-Isolierung verwendet werden muss:

<b>Säulengröße</b>	<b>Ausgangsmaterial</b>	<b>erwartete RNA-Menge</b>
Mini:	30 mg Gewebe 10 mg Gehirn	100 µg 8 µg
Midi:	20-250 mg Gewebe 100 mg Gehirn	1 mg 100 µg
Maxi:	0,15-1,0 g Gewebe 500 mg Gehirn	6 mg 600 µg

Mit einem RNeasy Starterkit (Qiagen) wurde überprüft, welche Säulen sich für die RNA-Isolierung aus Gehirngewebe eignen. Später wurde der RNeasy Maxi Kit (Qiagen) für 150-200 mg Gehirngewebe verwendet.

Das aufgetaute Gehirngewebe wurde zunächst in 7,5 ml RLT Puffer, der mit 75 µl β-Mercaptoethanol versetzt worden war, gegeben. In diesem Puffer erfolgte auf Eis die Homogenisierung im Glaspotter (Homogenisator, GLW, Würzburg) (650 rpm, ca. 1 min). Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 5000 g abzentrifugiert und der Überstand mit 7,5 ml 75% Ethanol vermischt. Dieses Gemisch wurde anschließend auf die RNeasy MAXI Säule gegeben und die RNA während eines Zentrifugationsschrittes (10 min bei 5000 g) an die Säule gebunden. Um restliche DNA zu entfernen, wurde die Säule zunächst mit 7,5 ml RW1 Puffer gewaschen (10 min bei 5000 g). Anschließend wurden 30 µl DNaseI Stocklösung in 210 µl Puffer RDD gelöst und dieser Mix für 15 min bei RT auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule nochmals mit 7,5 ml Puffer RW1 gewaschen (10 min bei 5000 g). Vor der Elution der RNA erfolgten noch zwei Waschschrte mit 10 ml Ethanol-haltigem RPE Puffer. Zunächst wurde bei 5000 g 2 min und dann bei 5000 g 10 min zentrifugiert, um ein vollständiges Abzentrifugieren des Ethanol-haltigen Puffers zu gewährleisten. Die RNA konnte dann mit 2x 400 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert werden (3 min bei 5000 g). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in 10 mM Tris/HCl pH 7,0 am Photometer (2.6.5.4). Die Reinheit der RNA lag bei 1,9 bis 2,0 (Quotient aus E260/E280). Zur Kontrolle der Qualität der Präparation und eventueller Degradation der RNA wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA im 1% igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und qualitativ beurteilt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### **2.6.5.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde zum einen durch Vergleich mit DNA-Lösungen bekannter Konzentration nach deren Auftrennung im Agarosegel abgeschätzt und zum anderen photometrisch (Photometer HITACHI U-1100) bestimmt.

Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm gemessen. Als Referenz diente das Lösungsmittel (H<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer). Für die Messung wurden Quarzküvetten verwendet, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Bei 280 nm absorbieren die in Proteinen vorkommenden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan.

Die Nukleinsäurelösung wurde in einer geeigneten Verdünnung (z.B. 1:100) 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 µg/ml und für einzelsträngige RNA einer Konzentration von 40 µg/ml.

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.

Die DNA-Konzentration wurde nach der folgenden Formel bestimmt (Maniatis et al., 1989):

$$A_{260} \times V \times OD = \mu\text{g}/\mu\text{l Nukleinsäure}$$

A<sub>260</sub>: Absorption bei 260 nm  
V: Verdünnungsfaktor der eingesetzten Nukleinsäuren  
OD: optische Dichte

Die optische Dichte wird folgendermaßen definiert:

1 OD = 50 µg/ml doppelsträngige DNA

1 OD = 40 µg/ml einzelsträngige DNA bzw. RNA

### **2.6.5.5 *Reinigung von PCR-Amplifikaten***

Die Reinigung von Amplifikaten aus PCR-Ansätzen erfolgte entweder über die gelelektrophoretische Trennung und anschließende Reinigung aus dem Gel (2.6.5.7) oder mit Hilfe des PCR Purification Kits nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden).

### **2.6.5.6 *Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren***

Lineare DNA-Moleküle, wie PCR-Amplifikate oder geschnittene Plasmide und superhelikale Plasmide können in Agarosegelen mittels Elektrophorese aufgetrennt und so auf ihre Größe hin überprüft werden. Die Elektrophorese kann auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet werden. Die Agarose (Sigma, Deisenhofen) bildet hierbei eine Netzstruktur, durch





Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt ebenso wie die Aufarbeitung von DNA nach der Hydrolyse oder anderen enzymatischen Modifikationen über einen QIAquick PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

PCR-Amplifikate die kleiner als 100 bp waren, wurden über eine PCI-Extraktion (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1), Chloroform-Extraktion und anschließend durch eine Ethanol-fällung unter Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat pH 4,8 und dem dreifachen Volumen 100%igem Ethanol isoliert. Zwischen den Extraktionsschritten wurden die Proben für 3 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Ethanol-fällung der DNA erfolgte für mindestens 2 h bei -20°C. Anschließend wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation (20 min bei 14000 rpm) sedimentiert und mit 75%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung der DNA unter der Sterilbank wurde sie in H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.6.5.8 Herstellung, Vermehrung und Isolierung rekombinanter DNA**

Zur Vermehrung von cDNA- oder genomischen Sequenzen mussten diese in Plasmid-Klonierungsvektoren eingebunden werden.

#### **2.6.5.9 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren**

Enzymatische Modifikationen sollten nach Möglichkeit unter optimalen Bedingungen (Salzkonzentration, pH-Wert, Temperatur) durchgeführt werden, um Nebenprodukte zu vermeiden. Um Enzymreste, Salze etc. zu entfernen, erfolgte nach der enzymatischen Reaktion immer eine Aufreinigung der DNA über eine Säule (2.6.5.5), bevor mit dem nächsten Enzym weitergearbeitet wurde.

Die Reaktionsoptima der Enzyme sind den Angaben der Hersteller zu entnehmen.

##### **2.6.5.9.1 Restriktionshydrolyse**

Als Restriktionsendonukleasen bezeichnet man eine Gruppe von Nukleinsäurehydrolasen, die doppelsträngige DNA spalten können. Sie erkennen in der Regel innerhalb einer DNA-Doppelhelix spezifische 4 bis 8 Basenpaare lange palindromische Sequenzen und hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen. Dabei können 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*) entstehen (Maniatis et al., 1989).

Die Restriktionsanalyse wurde zur Charakterisierung und Identifizierung der entstehenden Klonierungsprodukte und zur Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente verwendet.

Die Hydrolyse der DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach Angaben des jeweiligen Herstellers (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; NewEngland Biolabs, Schwalbach; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Dabei gilt: 1 Unit Enzym spaltet 1 µg DNA in einer Stunde.

Für Test-Hydrolysen zur Überprüfung von Klonierungen wurden 2-3 µl Plasmid-DNA aus der Plasmid-MINI-Präparation (2.6.5.1.1), 1,5-2 µl 10x Restriktionspuffer und 2-5 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Ansätze wurden anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 15-20 µl aufgefüllt. Die Spaltungsreaktion lief je nach Restriktionsenzym über 1-2 h bei 20-55°C, meist jedoch bei 37°C, ab.

Die Restriktion von Vektoren bzw. Inserts, die für eine anschließende Klonierung vorgesehen waren, wurde in einem Volumen von 100 µl (~10 µg DNA) durchgeführt. Da es hierbei auf die vollständige Spaltung der eingesetzten DNA ankommt, inkubiert man die Reaktion über mindestens zwei Stunden.

Die Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen erfolgte nur dann gleichzeitig, wenn die Puffer- und Reaktionsoptima vollständig übereinstimmten. Andernfalls wurden mehrere Restriktionsschnitte hintereinander durchgeführt, zwischen denen die DNA mittels Qiagen-Säulen aufgereinigt wurde (2.6.5.5).

### **2.6.5.9.2 T4-DNA-Polymerasebehandlung**

Zum Auffüllen von 3'-zurückstehenden und zum Abbau von 3'-überhängenden Enden wurde die T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Bad Schwalbach) verwendet. Es wurden ca. 10 µg aufgereinigte und in H<sub>2</sub>O gelöste DNA mit 7 µl 10x Reaktionspuffer, 2,5 µl dNTPs (2 mM jedes Nukleotid) und 5 U Enzym zusammengegeben und mit Wasser auf 70 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde der Ansatz über eine Qiagen-Säule gereinigt (2.6.5.5).

### **2.6.5.9.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Um die Religation von Vektoren zu verhindern, die nur mit einem einzigen Restriktionsenzym linearisiert wurden, musste eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase erfolgen. Durch diese Reaktion kommt es zur Hydrolyse der Phosphatgruppen an den 5'-DNA-Enden, wodurch die DNA-Ligase diese 5'-Enden nicht mehr mit den 3'-Enden kovalent verbinden kann.

Die Dephosphorylierung von 5'-Enden hydrolisierter Plasmid-DNA erfolgte im vorgesehenen Puffer des Enzym-Herstellers. Es wurden 10 µg DNA mit 1 U CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in einem 70 µl-Ansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgte zunächst 15 min bei 37°C, dann 15 min bei 56°C. Daraufhin wurde nochmals

1 U CIAP zugegeben und die oben beschriebenen Inkubationen wiederholt. Vor einer weiteren Modifikation wurde der Ansatz über eine Qiagen-Säule (2.6.5.5) aufgereinigt.

#### **2.6.5.9.4 Phosphorylierung der 5'-Enden von Oligonukleotiden**

Die 5'-Enden synthetischer Oligonukleotide und die mit ihrer Hilfe erzeugten PCR-Produkte besitzen keine Phosphatgruppen an den 5'-Enden. Dadurch wird die Klonierung von PCR-Produkten uneffizient, in dephosphorylierte Plasmide sogar unmöglich.

Die Phosphorylierung wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) im vorgesehenen Puffer nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C erfolgte die sofortige Aufreinigung über eine Qiagen-Säule (2.6.5.5).

#### **2.6.5.9.5 Kovalente Verknüpfung von DNA-Molekülen (Ligation)**

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) werden sowohl komplementär überstehende (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*) doppelsträngiger DNA-Moleküle unter ATP-Verbrauch verestert, d. h. die 5'-phosphorylierten und 3'-hydroxylierten DNA-Enden werden kovalent miteinander verknüpft.

Ligationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 16-20 µl durchgeführt. Vom Vektor wurden 200 ng eingesetzt. Das Insert wurde mit dreifachem molarem Überschuss in den Ansatz gegeben. Dazu kamen 1,6-2 µl 10 x Ligasepuffer. Für die Ligation von glatten Enden wurde 1 µl T4-DNA-Ligase (30 U/µl), für die Ligation von überhängenden Enden wurde 1 µl T4-DNA-Ligase (1-5 U/µl) eingesetzt. Die Proben wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 16-20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 14°C für 15 h.

#### **2.6.5.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Für die *in vitro*-Amplifikation von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) verwendet. Mit sequenzspezifischen Primern (ca. 18-32 Nukleotide lang) in Anwesenheit aller vier Nukleotide (dNTPs) wird die Nukleotidzielsequenz während 30-40 Zyklen amplifiziert. Das PCR-Programm ist in mehrere Schritte untergliedert. Zunächst wird das Ausgangsmaterial (cDNA oder genomische DNA) bei 95°C hitzedenaturiert. In sich wiederholenden Zyklen kommt es wiederum durch Denaturierung bei 95°C zur DNA-Einzelstrangbildung. Dann folgt die Hybridisierung der Startermoleküle (Annealing der Primer) bei spezifischer Temperatur (45-70°C), d. h. die sequenzspezifischen Primer lagern sich an die komplementären einzelsträngigen DNA-Sequenzen an, die den jeweils interessierenden DNA-Abschnitt von beiden Seiten begrenzen. Im letzten Schritt kommt es zur Polymerasereaktion in 5' → 3'-Richtung. Dabei dient der DNA-Polymerase der Primer als Startpunkt für die Synthese des

komplementären DNA-Stranges. Diese Reaktion erfolgt bei 72°C. Die hierbei genutzten DNA-Polymerasen stammen aus thermophilen Bakterien und können Temperaturen bis zu 98°C tolerieren.

Mit Hilfe der PCR können auch gezielt Mutationen eingefügt werden, indem die ausgewählten Primer neben komplementären Bereichen auch veränderte Nukleotide enthalten, z. B. zum Einfügen einer Schnittstelle.

Als DNA-Polymerasen wurden die Pfu-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität (*proof-reading*-Aktivität, falsch eingebaute Nukleotide werden ausgetauscht) (Promega, Mannheim) und die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega, Mannheim) verwendet.

PCR-Reaktionsgefäße (peqLab, Erlangen)

Pipettierschema: 10-100 ng Plasmid-DNA oder cDNA  
1 µl forward-Primer (50 pmol/µl)  
1 µl revers-Primer (50 pmol/µl)  
5 µl dNTPs (2 mM)  
5 µl 10x Puffer  
3 µl MgCl<sub>2</sub> (nur bei Taq-Polymerase)  
1 µl DNA-Polymerase (abhängig von der Polymerase 2-5 Units)  
auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt

Die PCR wurde im Thermocycler T-Gradient der Firma Biometra (Göttingen) mit folgendem Programmzyklus durchgeführt:

I. initiale Denaturierung		1 min	95°C
II. 30-40 Zyklen mit je	Denaturierung:	1 min	95°C
	Anlagerung der Primer:	1 min	46-70°C
	Polymerisation:	1 bis 3 min	72°C
III. abschließende Extension		10 min	72°C

#### **2.6.5.11 Punktmutagenese**

Die *in vitro*-Mutagenese wurde mittels Fusions-PCR durchgeführt. Hierbei entstehen ausgehend von einem DNA-Plasmid durch zwei PCRs ein vorderes und ein hinteres DNA-Fragment. Der

Austausch einzelner Nukleotide (Punktmutationen) wurde über Oligonukleotide in die Promotorsequenz eingebracht. Die Einführung der Mutation wurde durch Sequenzierung (Genterprise) überprüft. Für die Sequenzierung wurde das betreffende Plasmid isoliert und die DNA-Konzentration in einem Gel abgeschätzt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der unter 2.5.2.4 angegebenen Sequenzierprimer.

### **2.6.5.12 Real time RT-PCR**

Bei der *Real time* RT-PCR geht es um die Quantifizierung der mRNA in einem Gewebe oder in Zellen. Der verwendete *Real time* RT-PCR Cycler ABI Prism 7000 (Applied Biosystem, Darmstadt) zeichnet den Verlauf einer PCR in Echtzeit auf und erlaubt so die genaue Eingrenzung der exponentiellen Amplifizierungsphase. In dieser Phase besteht ein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge der Zielsequenz und der amplifizierten Produktmenge.

Da die PCR-Reaktion dabei so reproduzierbar wie möglich ablaufen muss, sind verschiedene Punkte zu beachten.

Bei der Suche nach einem geeigneten Primerpaar wurde das Programm „Primer Express“ (Applied Biosystem, Darmstadt) verwendet. Die sequenzspezifischen Primer (Tabelle 2.5.2.7) wurden unter Berücksichtigung folgenden Kriterien ausgewählt:

- übereinstimmende  $T_m$  bei 58-60°C
- 50-60% GC-Gehalt
- max. 3 identische Basen hintereinander (keine Gs)
- mindestens 18 Nukleotide lang
- Amplifikatlänge von 100-150 Basenpaaren
- C's und G's an Primerenden, nicht mehr als 2 bei den letzten 5 Basen am 3' Ende
- keine Primerdimerisierung
- über Exon/Intron-Strukturen hinweg (keine genomische DNA als Matrize)

Um die Bedingungen für die *Real time* RT-PCR zu optimieren, wurden mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) an Gesamt-RNA die RT-PCR Bedingungen optimiert. Der Vorteil eines One Step Kits liegt in der Reduktion von Pipettierfehlern und Kontaminationen.

Beim OneStep RT-PCR Kit wurde mit denselben spezifischen Primern gearbeitet, wie sie auch später in der *Real time* RT-PCR zum Einsatz kamen. Die reverse Transkription und die PCR liefen ebenfalls in einem Röhrchen direkt hintereinander ab, wobei die Transkriptase durch Erhitzen inaktiviert und die Polymerase aktiviert wurde. Nachdem hier ein einzelnes Amplifikat ohne Nebenprodukte erstellt werden konnte und auch die Kontrollreaktion negativ ausfiel, wurde mit dem QuantiTect SYBR Green I One Step RT-PCR-Kit (Qiagen) weitergearbeitet. Der Farbstoff

SYBR-Green sollte sich in das jeweilige PCR-Produkt einlagern. Die Zunahme des PCR-Produkts während der PCR entspricht dabei der Zunahme der Fluoreszenz.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden in 96-well Platten (Applied Biosystems, Darmstadt; ABgene, Hamburg) in einem Endvolumen von 25 µl angesetzt:

- RNase freiem H<sub>2</sub>O
- 12,5 µl 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix mit
  - 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
  - HotStarTaq DNA-Polymerase
  - ROX (5'-Nuklease unabh. Kontroll-Floureszenz als passive Referenz, kompensiert kleine Pipettierfehler, FAM/ROX-Wert=Rn-Wert)
  - dNTPs
- 0,5 µM Forward Primer
- 0,5 µM Reverse Primer
- 0,25 µl QuantiTect RT Mix mit
  - Sensiscript (>50 ng RNA)/Omniscript (<50 ng RNA)
- max. 500 ng RNA zusammengestellt.

Das *Real Time* RT-PCR -Programm setzte sich wie folgt zusammen:

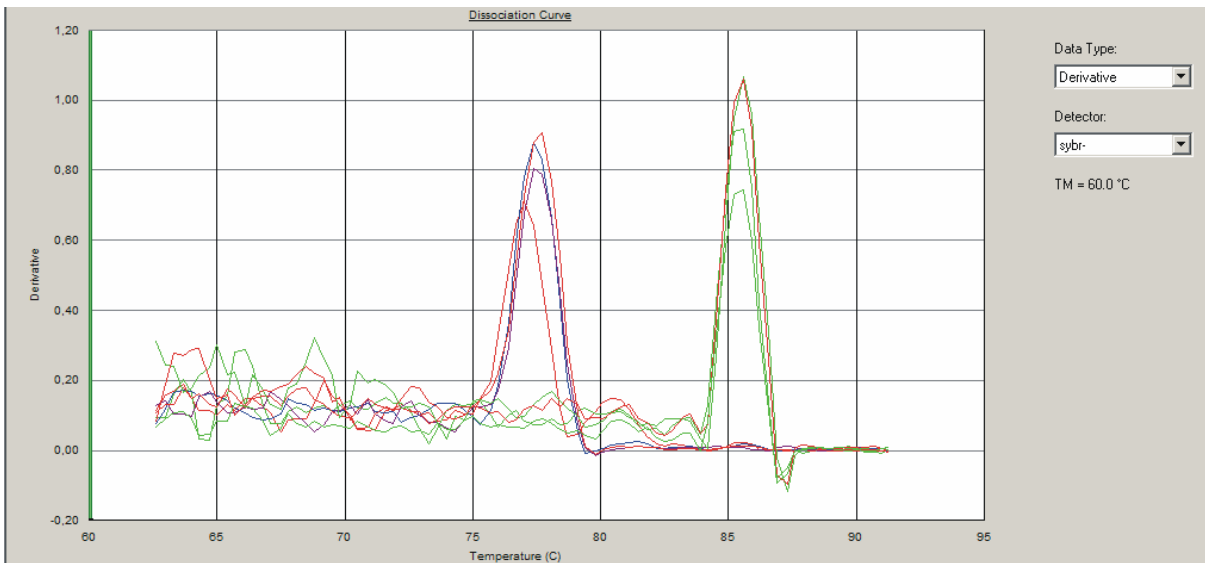
- 30 min bei 50°C für die Reverse Transkription
- 15 min bei 95°C zur Inaktivierung der Omniscript und Sensiscript Reversen Transkriptasen und zur Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase
- 40 Zyklen:

Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	62°C	30 s
Extension	72°C	30 s
Messung		

Es wurde immer eine Negativkontrollen (H<sub>2</sub>O), eine Standardreihe (RNA in unterschiedlichen Verdünnungen, die die gleiche Amplifikationseffizienz wie die Zielsequenz aufweisen sollte) und Gesamt-RNA in unterschiedlichen Konzentrationen als Zielsequenz eingesetzt, wobei diese Proben durch Mehrfachbestimmungen abgesichert wurden.

Die Quantifizierung bei der *Real time* RT-PCR beruht auf der Detektion der Extinktion des Farbstoffes SYBR Green I. Dieser Farbstoff wirkt als Interkalator, der in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Die Fluoreszenzmessung erfolgt daher in der exponentiellen Phase nach dem Polymerisationsschritt (72°C) und vor dem nächsten Denaturierungsschritt (95°C), bei einer Temperatur, die empirisch oberhalb der Schmelztemperatur der meist kürzeren Nebenprodukte und unterhalb der Schmelztemperatur der gewünschten PCR-Produkte liegt (ca. 80°C). Von einer 96 Wellplatte wird jedes Well einzeln vermessen.

Nachträglich erfolgte eine Spezifitätskontrolle der PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird die Temperatur von 60°C langsam auf 95°C erhöht. Bei niedrigen Temperaturen liegen alle PCR-Produkte doppelsträngig vor, so das SYBR Green binden kann und ein Fluoreszenzsignal messbar ist. Bei hohen Temperaturen werden die PCR-Produkte denaturiert, der Farbstoff kann nicht mehr binden und die Fluoreszenz sinkt rapide ab. So zeigt sich bei einer Schmelzkurvenanalyse das jeweilige Hauptprodukt bei etwa 85°C. Die Nebenprodukte denaturieren bei niedrigeren Temperaturen.



**Abbildung 2.2:** DNA-Schmelzkurve (DNA-Dissoziationskurve)

Darstellung der Schmelzpunkte unspezifischer Nebenprodukte (z. B. Primerdimere) vor 80°C und des spezifischen Hauptproduktes bei ca. 85°C (hADAM10).

Zusätzlich wurden die Proben in einem Agarosegel aufgetrennt, um die *Real time* RT-PCR auf Verunreinigungen hin zu untersuchen.

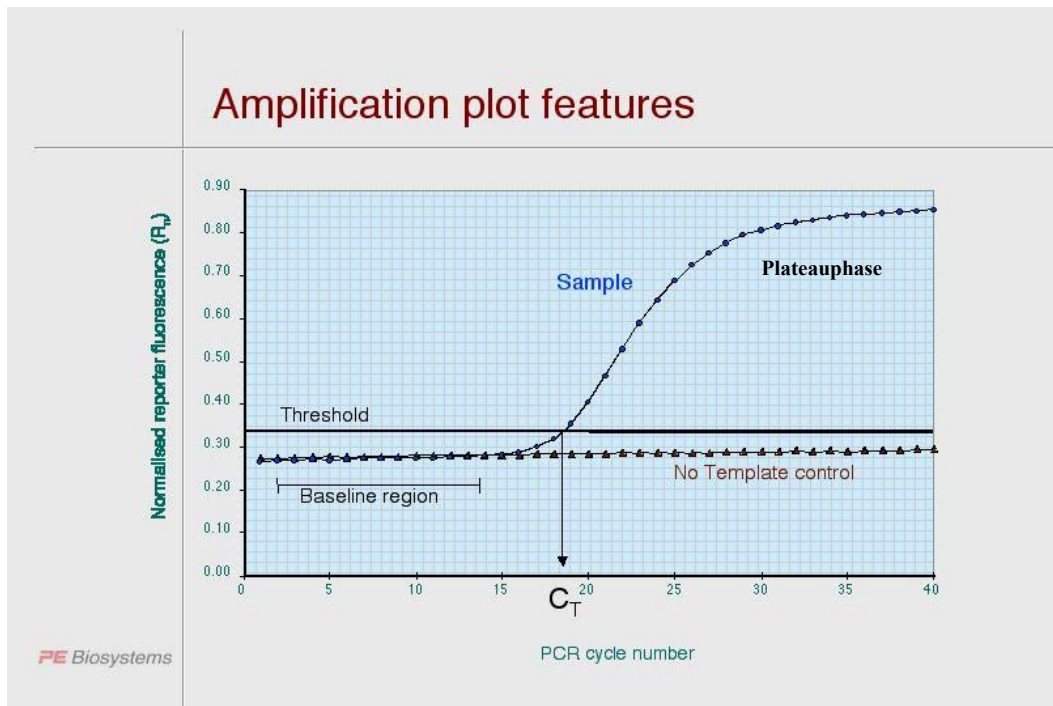
### 2.6.5.12.1 Auswertung der *Real time* RT-PCR

Die Primäranalyse der Daten erfolgte mit dem ABI PRISM® 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystem, Darmstadt). Die Erstellung von Regressionsgeraden zur Kalibrierung und die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der GraphPad PRISM® Software (Applied Biosystem, Darmstadt).

Bei der **absoluten Quantifizierung** (exponentielle Phase) wird die absolute Menge, die Kopienzahl eines Gens ermittelt. Hierzu wird zur Erstellung einer Regressionsgeraden ein genauer Standard benötigt (Plasmid-DNA des entsprechenden Gens).

Bei der **relativen Quantifizierung** (exponentielle Phase) wird der Anstieg bzw. Abfall des Zielgens im Bezug auf ein Referenzgen ermittelt. Das Haushaltsgen, das zur Normierung der Daten

verwendet wird, sollte daher nicht reguliert werden (konstantes Expressionsniveau in verschiedenen Geweben, Stadien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen). Die Voraussetzung zur Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass die Ziel- und Referenzgen-PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen zeigen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass unter den verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Referenzgene zum Einsatz kommen können. 18s mRNA,  $\beta$ -Aktin oder GAPDH sind keine universellen Referenzgene.



**Abbildung 2.3:** PCR-Amplifikationskurve (Applied Biosystem)

Graphische Darstellung eines PCR-Verlaufes mit Basislinie (meist PCR Zyklenzahl 3-15, dieser Hintergrund wird von dem Fluoreszenzsignal der Proben abgezogen), Threshold (exponentielle Phase), ct-Wert (Kreuzungspunkt zwischen Fluoreszenzsignal der Probe und Threshold) und Plateauphase. Daneben ist der PCR-Verlauf einer Negativkontrolle zu sehen.

Der Signalanstieg in der exponentiellen Phase ist proportional zur Menge der eingesetzten Zielmoleküle und gibt die Zunahme der Amplifikate wieder. Gemessen wird der Threshold (Schwellenwert) bzw. der ct-Wert. Dieser Wert wird an die Stelle gesetzt, an der die geringste Replikatstreuung beim Standard auftritt. Gleichzeitig sollten an dieser Stelle die Standardkurven parallel verlaufen. Die Schnittstelle mit der x-Achse (Zyklenzahl) ist umso kleiner, je mehr Ausgangsmaterial vorliegt. Aus den ermittelten Werten einer Standardverdünnungsreihe wird eine Regressionsgerade gebildet. Anhand dieser Kalibrierungsgeraden und dem Threshold der unbekannt Probe kann jeweils die Ausgangskonzentration der RNA berechnet werden.



## Relative Quantifizierung der RNA durch die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode

Berechnung:  $\Delta\Delta\text{ct}$

**Schritt 1** (Normalisierung auf die endogene Kontrolle):

$$\text{ct Zielgen} - \text{ct endogene Kontrolle} = \Delta\text{ct}$$

**Schritt 2** (Normalisierung auf den Kalibrator):

$$\Delta\text{ct Probe} - \Delta\text{ct Kalibrator} = \Delta\Delta\text{ct}$$

**Schritt 3:** Berechnung des Ergebnisses mit

$$2^{-\Delta\Delta\text{ct}} = \text{absoluter Wert}$$

Beispiel:  $\text{ct ADAM10} - \text{ct GAPDH} = \Delta\text{ct Probe (mit Lovastatin)}$

$$\text{ct } 20 - \text{ct } 15 = 5$$

$\text{ct ADAM10} - \text{ct GAPDH} = \Delta\text{ct Kalibrator (ohne Lovastatin)}$

$$\text{ct } 20 - \text{ct } 15 = 5$$

$$\Delta\text{ct Probe} - \Delta\text{ct Kalibrator} = \Delta\Delta\text{ct}$$

$$5 - 5 = 0$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{ct}} = \text{absoluter Wert}$$

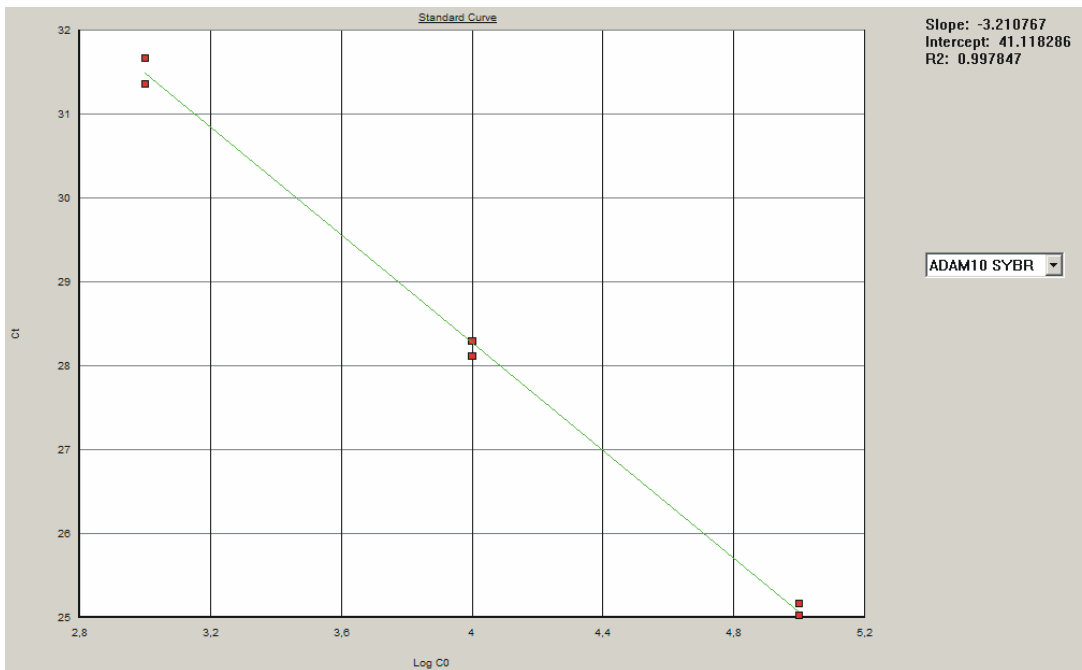
$$2^{-0} = 1$$

Der Wert 1 bedeutet, dass sich die Menge an ADAM10-RNA durch die Behandlung nicht verändert hat. Ein Wert  $> 2$  bedeutet eine Erhöhung der Expressionsrate, ein Wert  $< 0,5$  eine Verminderung der Expressionsrate.

### 2.6.5.12.2 *Erstellung einer Standardkurve*

Die Überprüfung der Reaktionseffizienz geschieht mit Hilfe einer Standardkurve, die zuvor über unterschiedliche DNA- bzw. RNA-Konzentrationen erstellt worden ist. Hierbei wird der Threshold (ct-Wert) gegen den Logarithmus der Standardmenge aufgetragen. Bei der seriellen Verdünnung von mind. 3 verschiedenen Standardkonzentrationen entsteht so eine Regressionsgerade. Die Steigung einer Reaktion wird für die Bestimmung der Reaktionseffizienz verwendet. Im Idealfall beträgt die Steigung der Standardkurve -3,322.

Die erwartete RNA-Menge sollte in den Bereich der Standardkonzentrationen fallen.



**Abbildung 2.4:** Standardkurve von hADAM10

Die ct-Werte (y-Achse) werden gegen den Logarithmus der mRNA-Menge (x-Achse) aufgetragen. Die Steigung der Geraden (*Slope*) zeigt die Reaktionseffizienz und sollte im Idealfall -3,322 betragen.

### 2.6.5.13 5'-RACE-PCR

Mit der 5'-RACE-Technik (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) in Anlehnung an den SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Heidelberg) sollte versucht werden, den bisher unbekanntem Transkriptionsstartpunkt des ADAM10-Gens zu finden.

Als Ausgangsmaterial diente mRNA aus HEK293-Zellen, die zunächst über Oligo-dT Beads isoliert wurde (GenElute mRNA Miniprep Kit, Sigma, Deisenhofen). Hierzu wurden 250 µl Gesamt-RNA-Lösung (~ 500 µg) mit 250 µl 2x Bindungslösung und 15 µl Oligo-dT Beads zusammengegeben und stark gevortext. Der Ansatz wurde 3 min bei 70°C, dann bei RT weitere 10 min inkubiert und ab und zu invertiert. Die mRNA Oligo-dT Komplexe wurden durch Zentrifugation bei RT über 2 min bei 14000 rpm pelletiert. Nun wurden 500 µl Waschlösung zum Pellet gegeben und gut gevortext. Erneut wurde der Ansatz bei RT über 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch zweimal mit der Waschlösung gereinigt. Nach der letzten Waschung wurde die Waschlösung vollständig entfernt und 40 µl Elutionspuffer, der zuvor auf 70°C vorgewärmt wurde, zum Pellet gegeben. Diese Lösung wurde gevortext und weitere 5 min bei 70°C inkubiert bevor eine Zentrifugation bei RT über 3 min bei 14000 rpm erfolgte. Der Überstand enthält die mRNA und wird in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde nochmals unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Anschließend wurden die Eluate vereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer.

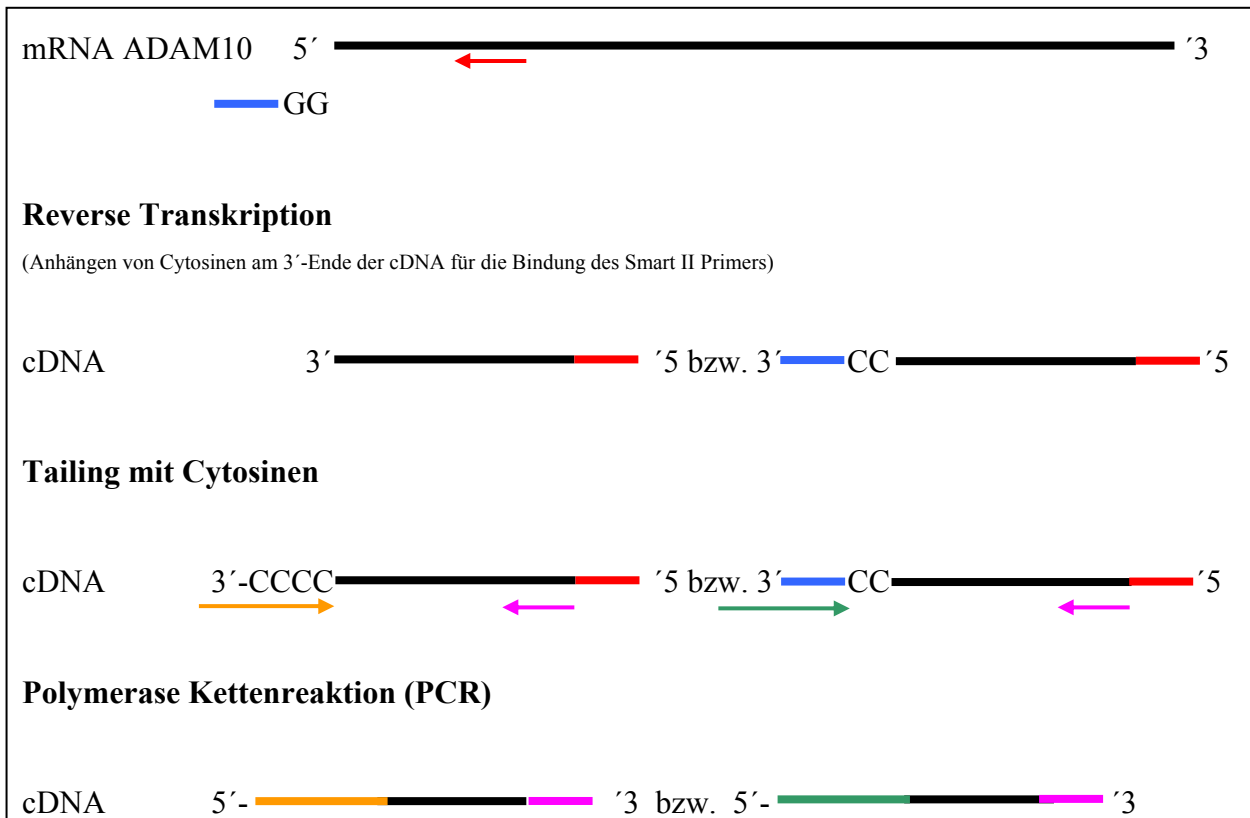


Abbildung 2.5: Kurze schematische Darstellung der 5'-RACE-Technik.

Der nächste Schritt war die Erststrangsynthese bzw. reverse Transkription an der mRNA mit unterschiedlichen Enzymen (one step RT-PCR Kit, Qiagen; SuperscriptII, Invitrogen; Sensiscript, Qiagen) nach Angaben der Hersteller. Beispielhaft ist hier das Protokoll mit der SuperscriptII wiedergegeben. Dabei wurden 1 µl RPos6 (2.5.2.6) mit bzw. ohne 1 µl SMART II Primer (2.5.2.6) mit 1 µg mRNA, 5 µl RNase freies Wasser, 5 µl Q-Solution und 1 µl 10 mM dNTP zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 65°C erhitzt und dann direkt auf Eis gestellt. Anschließend wurden 5 µl 5x Puffer und 3 µl 0,1 M DTT hinzugegeben. Jetzt wurde der Ansatz im Thermocycler auf 42°C erhitzt und 1 µl SuperscriptII zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte nun bei 42°C über 50 min, wurde kurz für die Zugabe von 1 µl 10 mM dCTP unterbrochen und dann 15 min fortgeführt. Zur Unterbrechung der enzymatischen Tätigkeit wurde der Ansatz nun 15 min auf 70°C erhitzt.

Der cDNA Ansatz wurde anschließend über den PCR-Purification Kit gereinigt, um so den vorher verwendeten Primer und das Enzym zu entfernen.

Nun folgte das *Tailing* der cDNA (Ansatz RPos6 ohne SMART II) mit Cytosinnukleotiden. Dazu wurden 10 µl des cDNA Ansatzes mit 6,5 µl RNase-freiem Wasser, 5 µl 5x Puffer und 2,5 µl 2 mM dCTP zusammengegeben. Der Ansatz wurde für 3 min auf 94°C erhitzt, dann 1 min auf Eis gestellt

bevor 1 U TdT (Terminaler Transferase, Amersham) zugefügt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C über 30 min bevor sie bei 65°C über 10 min abgebrochen wurde.

Die dC-getailten cDNAs wurden dann in einer PCR als Matrizen-DNA eingesetzt. Hierzu wurden die Primer SMART II for bzw. hAD10RACE\_for2 mit hAD10RACE\_rev3 verwendet (2.5.2.6). Leider entstand kein Amplifikat, so dass auf die EST-Analyse bei der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes zurückgegriffen werden musste.

#### **2.6.5.14 EST (expressed sequence tag) Analyse**

Die ersten 444 bp, die direkt vor dem Translationsstartpunkt liegen, wurden in einer BLAST Suche gegen die EST-Datenbank eingesetzt. Es wurden ESTs mit unterschiedlich langen 5'-UTRs ermittelt. Die meisten und längsten ESTs begannen 200 bp stromaufwärts vom ATG. Hier könnte ein Startpunkt für die Transkription des humanen ADAM10-Gens liegen. Im Vergleich zu den ESTs ist die humane ADAM10-cDNA Sequenz (NM 001110, AF009615) ein ganzes Stück länger und zeugt von einem weiteren Transkriptionstartpunkt bei -444.

#### **2.6.5.15 Charakterisierung transgener Mäuse**

##### **Benötigte Lösungen:**

**Proteinase K** (50 µg/ml)

##### **PBND-Puffer**

50 mM KCl

10 mM Tris-HCl (pH 8.3)

2.5 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O

0.45 % v/v Nonidet P40 (NP40)

0.45 % v/v Tween 20

Autoklaviert

Lagerung bei -20°C

In unserer Arbeitsgruppe wurden transgene Mäuse unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten. Dabei handelte es sich um Tiere, die das C-terminal HA-getaggte bovine ADAM10 überexprimieren. Daneben wurden Tiere gezüchtet, die die dominant-negative ADAM10-Form, ADAM10-E384A-HA (ADAM10-dn), überexprimieren. Beide überexprimierten ADAM10-Gene stehen unter der Kontrolle eines neuronspezifischen Maus *thyl* Promotors, der uns

von Herman van der Putten (Novartis AG, Basel, Switzerland) zur Verfügung gestellt wurde. Die DNA wurde in den Vorkern von Embryonen superovulatierender *FVB/N* Weibchen mikroinjiziert. Die so generierten Mäuse und deren Nachkommen müssen über PCR auf ihre Transgenität hin überprüft werden. Dazu wurden die Primer Thy1\_for2 und Protease5\_rev verwendet.

Daneben wurden einzeltransgene *APP[V717I]* Mäuse (Stamm *FVB/N*) gezüchtet. Bei diesen Tieren wurde die Transgenität mit den Primern P2 und P3 überprüft.

Aus den einzeltransgenen *APP[V717I]* Mäusen und den einzeltransgenen *ADAM10* bzw. *ADAM10-dn* Mäusen wurden doppeltransgene Mäuse gezüchtet. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte hier mit beiden Primerpaaren.

**Tabelle 2.12:** Alle gezüchteten transgenen Mäuse mit ihrer Kurzbezeichnung und ihrem jeweiligen Genotyp.

Kurzbezeichnung	Bezeichnung Genotyp
A	ADAM10 (medium)
B	ADAM10 (medium)
hzB	ADAM10 (medium homozygot), hervorgegangen aus Linie B
C	ADAM10 (low)
D	ADAM10 (high)
E	ADAM10 (high) x APP/London
F	ADAM10 (high) x APP/London
G	APP/London
H	ADAM10 dominant negativ
I	ADAM10 dominant negativ
K	dnADAM10xAPP/London
M	dnADAM10xAPP/London

Zur Identifizierung transgener Nachkommen wurden Ohrbiopsien von den Tieren angefertigt. Zu einer solchen Biopsie wurden 35 µl PBNB Puffer und 1,5 µl Proteinase K gegeben. Dieser Ansatz wurde gevortext, dann zur Freisetzung der chromosomalen DNA 2 h bei 56°C inkubiert und die Reaktion 30 min bei 95°C abgebrochen. Als Ausgangsmatrize wurden 2,5 µl dieser Lösung für eine PCR verwendet. Durch Verwendung der transgenspezifischen Primer konnten transgene Tiere durch ein entstehendes Amplifikat identifiziert werden.

Für die PCR wurde der 1.1x ReddyMix PCR Master Mix (ABgene, Hamburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR wurde im Thermocycler T-Gradient der Firma Biometra (Göttingen) mit folgendem Programmzyklus durchgeführt:

I. initiale Denaturierung		5 min	95°C
II. 40 Zyklen mit je	Denaturierung:	1 min	95°C
	Anlagerung der Primer:	1 min	46°C
	Polymerisation:	1 min	72°C
III. abschließende Extension		8 min	72°C

## **2.7 Zellbiologische Methoden**

### **2.7.1 Kultivierung und Konservierung von Zellen**

#### **2.7.1.1 Kulturbedingungen**

Die Arbeiten mit den verschiedenen Zelllinien wurden an Sterilbänken (Hera Safe HS 12, Heraeus, Hanau) ausgeübt. Alle Glas- und Metallgeräte, Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht) und Eppendorfgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) sowie Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die verwendeten Zellkulturschalen ( $\varnothing$  3 und  $\varnothing$  10 cm; Sarstedt, Nümbrecht), Kunststoffzentrifugenröhrchen (15 und 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht) und Plastikpipetten wurden bereits steril geliefert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Vor dem Einbringen unter die Sterilbank wurden alle verwendeten Materialien mit 80% (v/v) Ethanol desinfiziert.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren (Sanyo Industries Deutschland, Nördlingen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre.

Eingefrorene Zellen wurden schnell auf 37°C gebracht, dann sofort in einem großen Volumen DMEM-Komplettmedium ausgesät, um das für die Zellen schädliche Dimethylsulfoxid (DMSO) schnellstmöglich zu verdünnen. Je nach Dichte der Zellen, spätestens nach 5 Tagen, wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Zellen wurden in bestimmten Abständen, spätestens bei Konfluenz, auf neue Kulturschalen umgesetzt. Auf diese Weise wurde verhindert, dass es durch Dichtearretierung zum Absterben der Zellen kam. Dazu wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann mit Kulturmedium verdünnt und die Zellen durch Zentrifugation (5 min, RT, 800 g) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in geeigneten Verdünnungen auf neuen Kulturschalen verteilt.

HEK293, HepG2, SKMNC und IMR32 Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium kultiviert, SHSY5Y Zellen in DMEM nutrient mixture F-12 ebenfalls mit 10% FCS (*fetal calf serum*), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin.

*Drosophila* Schneider Zellen SL2 wurden in Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen) mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin kultiviert.

#### **2.7.1.2 Kryokonservierung von Zellen**

Um Zellkulturen zu lagern, können sie eingefroren und über lange Zeit in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Dazu wurden die Zellen nach der Trypsinbehandlung in DMEM-Komplettmedium suspendiert. Diese Suspension wurde durch Zugabe von DMSO auf 10% (v/v)

DMSO eingestellt, in 2 ml-Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt, auf Eis gestellt, zunächst bei -20°C und dann bei -80°C eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

### 2.7.1.3 *Verwendete Zelllinien*

**Tabelle 2.13:** Liste der verwendeten Zelllinien, ihre Quelle und eine kurze Charakterisierung.

Zelllinie	Quelle	Charakterisierung
HEK293	ATCC (Manassas, USA)	Humane embryonale Nierenzelllinie MD 20852-1776 Katalognummer CRL-1573
SHSY5Y	ATCC (Manassas, USA)	Humane Neuroblastomazelllinie Katalognummer CRL-2266
HepG2	ATCC (Manassas, USA)	Humane Leberzelllinie
SHY56.6	Selbst hergestellt	Humane SHSY5Y Zellen, die stabil mit dem Plasmid CP56.6 (ADAM10-Promotor aus CP53AB.1 vor dem <i>Firefly</i> -Luciferasegen in pcDNA3) transfiziert sind.
SKN56.6	Selbst hergestellt	Humane SKNMC Zellen, die stabil mit dem Plasmid CP56.6 (ADAM10-Promotor aus CP53AB.1 vor dem <i>Firefly</i> -Luciferasegen in pcDNA3) transfiziert sind.
IMR32	Überlassen von Herrn Prof. Behl, Universität Mainz	Humane Neuroblastomazelllinie mit <i>Corticotropin-Releasing Hormone-Receptor Type 1</i> (CRH-R1) Katalognummer CCL-127
SKNMC	ATCC (Manassas, USA)	Humane Neuroepitheliomazelllinie Katalognummer HTB-10
SK Eα9	Überlassen von Herrn Prof. Behl, Universität Mainz	Humane SK-N-MC-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pIRES-ERα transfiziert sind.
SK 01	Überlassen von Herrn Prof. Behl, Universität Mainz	Humane SK-N-MC-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pIRES transfiziert sind.
<i>Drosophila</i> Schneider Zellen SL2	Überlassen von Herrn Prof. Suske, Universität Marburg	<i>Drosophila</i> Schneider Zelllinie, stammt aus <i>Drosophila</i> Embryonen, exprimieren keine humanen Transkriptions-faktoren der Sp1-Familie
Hybridomazellen	ATCC (Manassas, USA)	Katalognummer CRL-2121 (SREBP-1a) Katalognummer CRL-2198 (SREBP-2)

### **2.7.2 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Als Transfektion bezeichnet die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Zellen. Man unterscheidet zwischen dem stabilen Gentransfer und der transienten Expression der Fremd-DNA. Beim transienten Gentransfer nehmen die transfizierten Zellen vorübergehend die Fremd-DNA auf, ohne sie stabil ins Genom zu integrieren. Dieser Expressionszeitraum kann zur Untersuchung von Regulationsmechanismen der Expression der eingeschleusten Gene genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die transiente Transfektion verwendet, um die Aktivität des humanen ADAM 10-Promotors sowohl in verschiedenen Zelllinien als auch unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu analysieren. Dazu wurden Luciferase-Reporterplasmide verwendet. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde ein *Renilla*-Reportergenplasmid genutzt. Die Messwerte wurden anhand des Kontrollvektors normalisiert.

Die vier gängigsten Transfektionstechniken sind die Calciumphosphat-, die DEAE-Dextran-Transfektion, die Elektroporation und die Lipofektion. Hier wurde die Calciumphosphat- und die Lipofectamine2000 vermittelte Transfektion angewandt. Man nimmt an, dass bei diesen Transfektionstechniken die DNA über Endocytose in den Zellkern gelangt. Die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion wurde bei den *Drosophila* Schneider Zellen verwendet. Die Lipofectamine-Methode wurde verwendet, um die Transfektionseffizienz und die Reproduzierbarkeit bei den Experimenten zu erhöhen. Der stabile Gentransfer von Fremd-DNA in das Genom von Zellen erfolgte ebenfalls mittels der Lipofectamine-Methode.

#### **2.7.2.1 Calciumphosphat-Methode zur transienten Transfektion von *Drosophila* Schneider Zellen mit Reportergenkonstrukten**

##### **Benötigte Lösung:**

##### **2x HEPES-buffered saline (2xHeBS)**

42 mM HEPES, pH 7,1

274 mM NaCl

9,4 mM KCl

2,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2 % Dextrose

in H<sub>2</sub>O

pH 7,1 mit 5 M NaOH eingestellt, sterilfiltriert



Die Zellen wurden so auf die 24 well Kulturplatten ausgesät, dass sie am Transfektionstag ca. 70 %ige Konfluenz besaßen. Das Medium auf den Zellen wurden durch 500 µl Schneider's *Drosophila* Medium ohne Zusätze ersetzt. Dann wurde ein DNA-Mix für ein 24er well zusammengestellt aus:

- 6,25 µl 1M CaCl<sub>2</sub>
- 0,4 µg p97b (internes Kontrollplasmid, *Drosophila* Promotor mit β-Galaktosidasegen)
- 0,4 µg CP53AB.1 (Luciferase-ADAM10-Promotorkonstrukt)
- 0,33 µg pPacLeer bzw. pPacSp1 bzw. pPacSp3 bzw. pPacUSp3 bzw. pPacUSF (Expressionsvektoren für die verschiedenen humanen Transkriptionsfaktoren).

Zu diesem Ansatz wurde 1 Volumen 2x HeBS gegeben, das Ganze gut gemischt und 30 min stehen gelassen, bevor es anschließend in das Medium der Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden bei 27°C in einem Brutschrank für 24 h inkubiert. Dann wurde der Transfektionsmix vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit frischem Schneider's *Drosophila* Kulturmedium für weitere 2 Tage kultiviert.

### 2.7.2.2 *Lipofectamine2000 Transfektion von verschiedenen Zellen mit Reportergenkonstrukten*

#### **Benötigte Lösung:**

#### **Lipofectamine2000 (Invitrogen)**

#### **MEM**

Minimal Essential Medium

2 mM L-Glutamin

7% Serum Plus<sup>TM</sup> (JHR Bioscience, USA)

Für die Lipofectamine2000 Transfektion wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 24 Well Kulturplatten umgesetzt, so dass sie am Transfektionstag 70% konfluent waren. Am Tag der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch 500 µl MEM-Medium ersetzt. Zunächst wurde ein Mix aus Lipofectamine2000 (2 µl pro Well) und Minimal Essential Medium ohne Zusätze (50 µl pro Well) hergestellt. Dieser Ansatz wurde 5 min stehen gelassen bevor er zu einem DNA-Mix gegeben wurde, der sich aus 10 Teilen Reportergenkonstrukt (1 µg pro Well, pGL3-Basic als Negativkontrolle bzw. ADAM10-Promotorkonstrukte) und 1 Teil phRL-

SV40 (0,1 µg pro Well, interne Transfektionskontrolle) gelöst in Minimal Essential Medium ohne Zusätze zusammensetzt. Der DNA-Lipofectamine2000-Mix wurde weitere 20 min inkubiert, bevor er auf die Zellen gegeben wurde. Nach 24 h wurde der Transfektionsmix abgesaugt und die Zellen in neuem Kulturmedium für weitere 48 h bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **2.7.2.3 Herstellung einer stabilen Zelllinie mittels Lipofectamine2000 Transfektion**

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die Zellen nach der Transfektion mit Lipofectamine2000 zunächst weiterkultiviert, bis sie konfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden passagiert und in G418 (Geneticin) haltigem Komplettmedium (250 µg/ml) weiter kultiviert. Diese Substanz wurde verwendet, da der zur Transfektion verwendete Expressionsvektor pcDNA3 (mit ADAM10-Promotor vor dem *Firefly*-Luciferasegen) ein Geneticin-Resistenzgen enthält. Nur Zellen mit dieser Geneticin-Resistenz sollten in dem Selektionsmedium heranwachsen können. Als die ersten Klone nach einer Absterbephase heranwachsen, wurde die Konzentration von G418 auf 500 µg/ml erhöht und mit diesem Selektionsmedium ein stabiler Mischklon herangezogen.

### **2.7.2.4 Behandlung von Zellen bzw. der stabilen Zelllinie mit verschiedenen Substanzen**

#### **Benötigte Lösungen:**

**LDS-Medium:** DMEM-Flüssigmedium (Roth, Deisenhofen) mit 2 mM L-Glutamin (200mM, PAA, Linz, Österreich), 100 U/ml Penicillin (10000 U/ml, Sigma, Deisenhofen), 100 U/ml Streptomycin (10000U/ml, Sigma, Deisenhofen) und 10% (v/v) LDS (Lipoprotein defizientes Serum).

Für Stimulierungsversuche mit β-Östradiol wurde farbloses, d. h. Phenolrot-freies DMEM-Flüssigmedium verwendet, um einen Effekt durch den Farbindikator ausschließen zu können.

Die Promotoraktivität und die Expression von Genen wird durch das Zusammenwirken verschiedener Transkriptionsfaktoren, die an den Promotor binden, beeinflusst (1.6). Einige Substanzen können in Signaltransduktionswege eingreifen und so Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität beeinträchtigen. Ergibt sich bei Verwendung bestimmter Substanzen eine Beeinflussung der Genexpression, so ist diese auf eine veränderte Promotoraktivität zurückzuführen. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, welche Substanzen eine Rolle bei der ADAM10-Genexpression spielen.

Bei den Stimulationsversuchen wurden nahezu konfluent gewachsene stabil transfizierte Zellen mit verschiedenen Substanzen bzw. äquivalenten Mengen an Lösungsmitteln behandelt (Tabelle 2.14). Anstelle von FCS-haltigem DMEM-Komplettmedium wurde bei der Stimulierung mit unterschiedlichen Statinen LDS-haltiges Medium verwendet. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und lysiert, um dann die Promotoraktivität über den Dual-Luciferase-Test (2.7.2.5) zu bestimmen.

**Tabelle 2.14a:** Liste der Substanzen, die in den Stimulationsversuchen eingesetzt wurden. Die Tabelle 2.14 beinhaltet alle Substanzen, die in den Stimulationsversuchen eingesetzt wurden. Daneben wird kurz der Effekt dieser Substanzen auf die Zellen, die verwendete Konzentration und die Dauer der Inkubationszeit beschrieben.

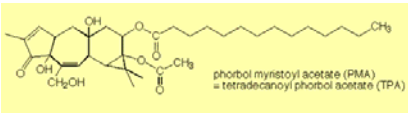
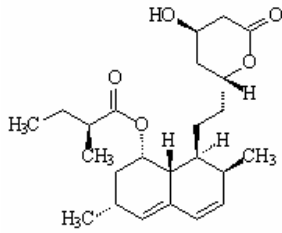
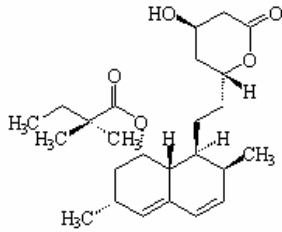
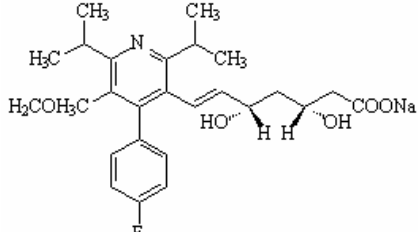
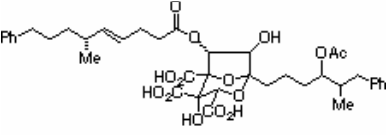
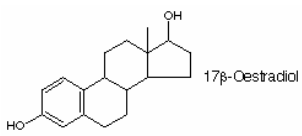
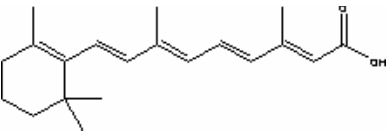
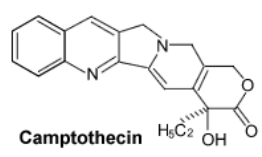
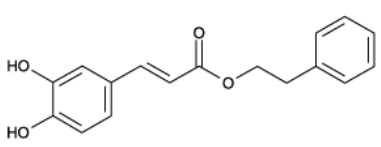
Substanz	Effekte auf Zellen	Konzentration	Inkubationszeit
<b>Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)</b> in DMSO  <p>phorbol myristoyl acetate (PMA) = tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)</p>	Phorbol-ester, aktiviert die Proteinkinase C, die weitere Proteine phosphoryliert.	1 µM/ml	3 und 6 h
<b>Statine</b> in wässriger Lösung  <p>Lovastatin</p>  <p>Simvastatin</p>  <p>Cerivastatin</p>	Hemmen die HMG-CoA-Reduktase, so dass weniger Cholesterin in der Zelle gebildet wird.	1-2 µM/ml	20-24 h in LDS-Medium
<b>Zaragozic Säure</b> in DMSO  <p>Zaragozic Acid C</p>	Hemmt die Squalen-Synthese, so dass weniger Cholesterin in der Zelle gebildet wird.	50 µM/ml	3 h, 6 h, 24 h in LDS-Medium

Tabelle 2.14b: Liste der Substanzen, die in den Stimulationsversuchen eingesetzt wurden.

Substanz	Effekte auf Zellen	Konzentration	Inkubationszeit
<b><math>\beta</math>-Östradiol</b> in Ethanol 	Östrogenhormon, bindet an nukleäre Rezeptoren.	1 $\mu$ M/ml	½-4 h
<b>All-trans Retinolsäure</b> in DMSO 	Bindet an RXRs (Steroidrezeptor), Vitamin A-Säure.	1 $\mu$ M/ml	4 Tage in phenolrotfreiem Medium
<b>BDNF</b> in H <sub>2</sub> O	Wachstumsfaktor	50 pg/ml	3 h, 6 h, 24 h, 30 h
<b>Bradykinin</b> in H <sub>2</sub> O	Steroid	300 $\mu$ M/ml	3 h, 6 h, 24 h, 30 h
<b>Camptothecin</b> in DMSO 	Hemmt Topoisomerase I, <i>anti-cancer</i> , <i>anti-HIV</i> , <i>anti-cell-differentiation</i>	2 $\mu$ M/ml	6h
<b>Lactacystein</b> in DMSO		5 $\mu$ M/ml	4h, 6h
<b>Caffeic acid phenylethyl ester (CAPE)</b> in 50% EtOH 	Apoptose induzierend, Hemmung NFkB	25 $\mu$ g/ml	4h
<b>SREBPs</b> in pIRES1hyg-Vektor	Binden an so genannte „ <i>sterol regulator elements</i> “ (SRE).	kotransfiziert	Gesamte Versuchsdauer

### 2.7.2.5 Dual-Luciferase-Test

Promotoren lassen sich anhand ihrer Fähigkeit eingrenzen, in geeigneten Testsystemen die Transkription zu initiieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Dual-Luciferase-System der Firma Promega (Mannheim) verwendet.

Um die Aktivität bestimmter Promotoren nach Transfektion von Zellen zu untersuchen, setzt man in einem geeigneten Vektor ein Reportergen unter die Kontrolle des betreffenden Promotors. Als Reportergene verwendet man meistens Gene, die für leicht nachweisbare Enzyme, wie die Luciferase, die bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) oder die  $\beta$ -Galaktosidase, kodieren. Die Menge des gebildeten Enzyms bzw. die Enzymaktivität gilt dann als Maß für die Fähigkeit des Promotors bzw. des cis-regulatorischen Elementes die Transkription zu aktivieren bzw. zu regulieren.

Das verwendete Luciferase-System ermöglicht die Klonierung einer Promotorsequenz vor ein Luciferase-Reportergen. Luciferase bietet sich vor allem aus folgenden Gründen als Reporter an: Erstens kommt dieses Protein in Säugerzellen normalerweise nicht vor, so dass es bei der Messung keine Hintergrundaktivität gibt.

Zweitens sind die Bestimmungsmethoden für dieses Enzym äußerst sensitiv - es können bereits Femtogrammengen an Luciferase nachgewiesen werden.

Die Expression des *Firefly*-Luciferase-Reporters kann im Luminometer anhand der Substratumsetzung gemessen werden und ist ein Maß für die Promotoraktivität. Die Transfektionseffizienz wird über die Aktivität der *Renilla*-Luciferase (kotransfizierter „Kontroll-Reporter“) bestimmt, gleichzeitig wird deren Aktivität zur Normierung der Aktivität der *Firefly*-Luciferase („Reporter-Vektor“) verwendet:

$$\text{Normierte Lumineszenz} = \frac{\text{Firefly-Luciferase (RLU)}}{\text{Renilla-Luciferase (RLU)}}$$

Die Luciferaseaktivität ist linear bis zu 200 µg Protein im Zellextrakt. Insgesamt handelt es sich um eine schnelle, leicht durchzuführende und nicht gesundheitsschädliche Methode zur Bestimmung der Promotoraktivität.

Das Enzym *Firefly*-Luciferase wurde ursprünglich aus *Photinus pyralis*, dem gemeinen Glühwürmchen, isoliert. Dieses 62 kDa große Protein katalysiert in biolumineszenten Organismen die Produktion von Licht und benötigt dafür Luciferin, ATP und molekularen Sauerstoff als Substrate:

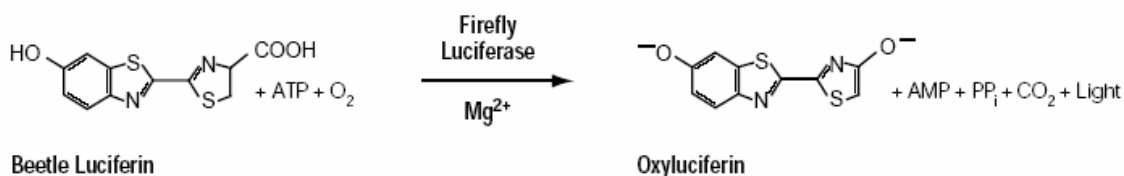


Abbildung 2.6: Biolumineszenzreaktion der *Firefly*-Luciferase (Promega)

In der ersten Reaktion wird unter Verbrauch von ATP und der damit verbundenen Produktion von Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) das Luciferyl-AMP als Zwischenprodukt gebildet, das im zweiten Schritt oxidativ zu Oxyluciferin decarboxyliert wird. Dabei werden Kohlendioxid, AMP und Licht (hν) freigesetzt. Das Enzym benötigt Mg<sup>2+</sup> als Kofaktor. Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons.

Das Enzym *Renilla*-Luciferase wurde ursprünglich aus *Sea Pansy*, der Seeanemone, isoliert. Dieses 36 kDa große Protein katalysiert in biolumineszenten Organismen die Produktion von Licht und benötigt dafür Coelenterazin und molekularen Sauerstoff als Substrate:

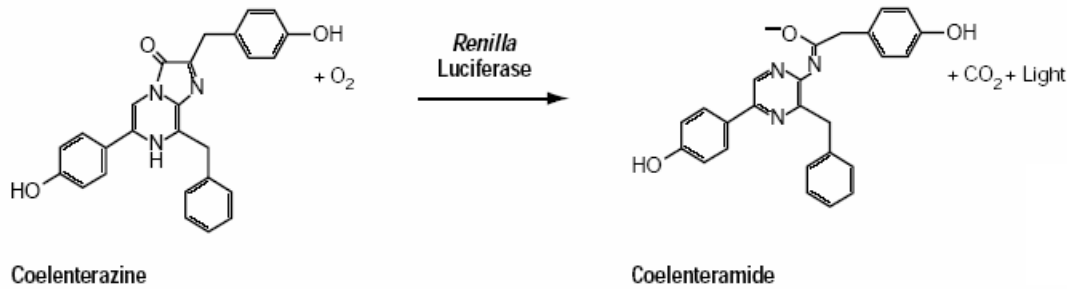


Abbildung 2.7: Biolumineszenzreaktion der *Renilla*-Luciferase (Promega)

Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid unter Freisetzung eines Photons.

Die verschiedenen Luciferaseaktivitäten wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Dual-Luciferase-Testsystem von Promega (Kat.-Nr. E1910, Mannheim) bestimmt. Zur Analyse wurde der Chemiluminometer Fluo Star Optima (BMG) verwendet.

Die Reporter-genvektoren enthalten einen bakteriellen Replikationsstartpunkt (*ori*), ein Antibiotikaresistenzgen für die Selektion des rekombinanten Plasmids in Bakterien (z.B. Ampicillin) sowie Restriktionsschnittstellen für die Integration der fremden DNA-Sequenz (Polylinker, Abbildung 2.8). Zudem enthalten diese Vektoren die cDNA für das Reporter-gen (z. B. Luciferase), sowie Polyadenylierungssignale, welche die RNA-Prozessierung effizienter machen und die Stabilität der Transkripte innerhalb der transfizierten Zellen erhöhen (Abbildung 2.8).

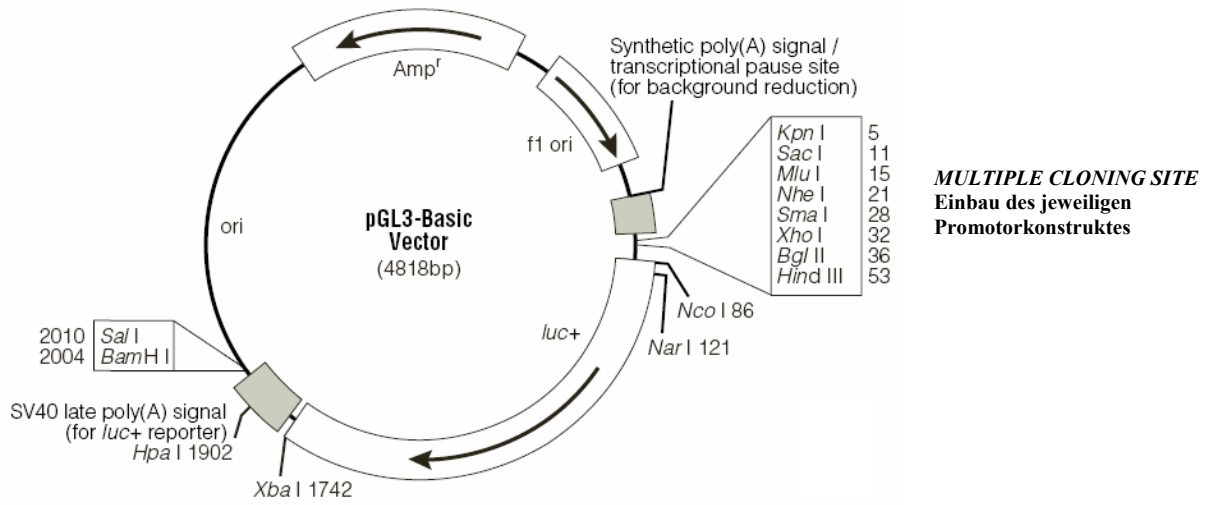


Abbildung 2.8: pGL3-Basic Vektor (Promega)

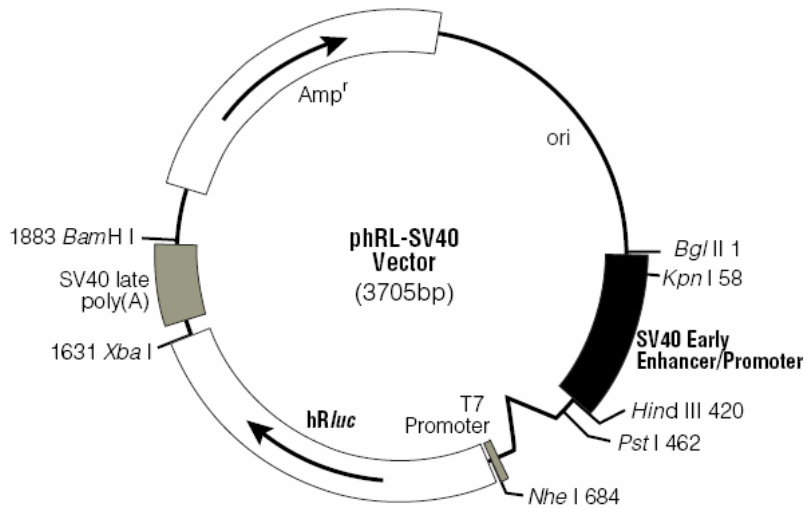
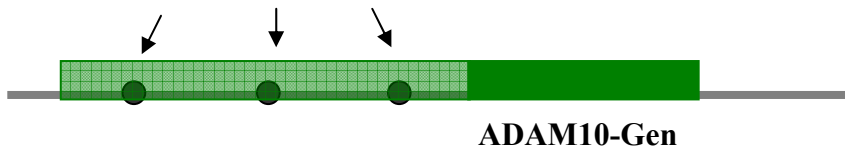


Abbildung 2.9: phRL-SV40 Vektor (Promega)

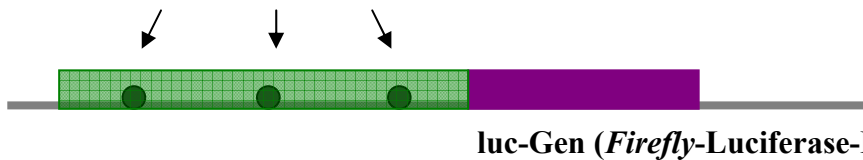
**Ausgangsgen:**

Promotor von ADAM10  
Potentielle Regulationssequenzen



**Transfektion von Zellen mit pGL3-Basic und ADAM10-Promotor (Kontrolle nur mit pGL3-Basic):**

Promotor von ADAM10  
Potentielle Regulationssequenzen

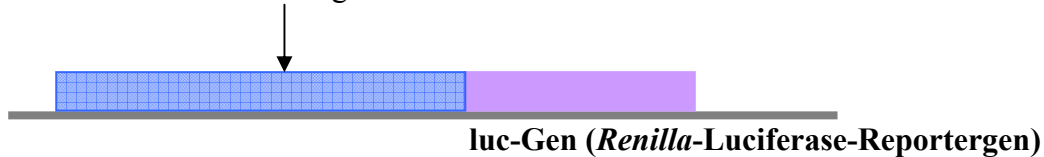


Expression der Luciferase aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*, 61 kDa, Monomer)



**Kotransfektion der Zellen mit pRL-SV40 zur Normierung der Expressionsstärke:**

SV40 Promotor  
konstitutiv abgelesen



Expression der Luciferase aus der Seeanemone (*Renilla reniformis*, 36 kDa, Monomer)



Abbildung 2.10: Überblick zum Dual-Luciferase-Test



In der vorliegenden Arbeit wurde zur Klonierung von Promotorsequenzen der Luciferase-Basisvektor pGL3-Basic (Promega, Mannheim) und als Kontrollvektor phRL-SV40 (Promega, Mannheim) verwendet (Abbildungen 2.8 und 2.9). Der Basisvektor (pGL3-Basic) enthält keine eukaryotischen Promotor- und Enhancerelemente und eignet sich daher zur funktionellen Analyse von Promotoren, die stromaufwärts der Luciferase-Reporter-cDNA eingebaut werden. Der Kontrollvektor (phRL-SV40) hingegen enthält einen SV40-Promotor, der der cDNA von *Renilla*-Luciferase vorgeschaltet ist. Dieser Vektor sollte bei transienten Transfektionen immer eine starke Reporterogenaktivität vermitteln. Die Zellen wurden stets mit beiden Plasmiden kotransfiziert (Abbildung 2.10). Die konstitutive Aktivität des *Renilla*-Kontrollenzym wurde im selben Ansatz wie die Luciferaseaktivität des zu untersuchenden Promotorkonstrukts bestimmt. Somit wurde die Transfektionseffizienz bei der Auswertung der Messergebnisse immer berücksichtigt.

### 2.7.2.5.1 *Präparation der Zellextrakte*

Zur Auswertung der Reporterogenaktivität wurde das Nährmedium von den transfizierten Zellen abgesaugt und diese, um das  $\text{Ca}^{2+}$  zu entfernen, zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen in 1x Passive Lysis Puffer (Promega, Mannheim). Die Zellen wurden auf der Platte lysiert und die Platten bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.7.2.5.2 *Messung der Dual-Luciferase-Aktivität an den transient transfizierten Zellen*

Zur Messung der Luciferaseaktivitäten wurden  $5\ \mu\text{l}$  des Zellextraktes (2.7.2.5.1) in eine 96 well Platte pipettiert. Die Messung erfolgte in einem Chemiluminometer (Fluo Star Optima, BMG) bei Raumtemperatur. Dieses Gerät verfügt über zwei Injektoren. Nacheinander werden einmal  $40\ \mu\text{l}$  Luciferase-LARII-Puffer (Promega, Mannheim) zum Lysat gepumpt, gerüttelt und nach der Luciferasemessung werden  $40\ \mu\text{l}$  Stop and Glo Puffer (Promega, Mannheim) zu der Mischung gepumpt, wieder gerüttelt und der *Renilla*-Wert gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem leeren, promotorlosen Vektor (pGL3-Basic) transfiziert waren. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte anhand der *Renilla*-Aktivität normalisiert, indem der Luciferasewert durch den *Renilla*-Wert geteilt wurde.

Von jedem Reportergenkonstrukt wurden 3 Transfektionsansätze erstellt und 3 Tage nach der Transfektion auf die beschriebene Weise dem Dual-Luciferase-Test unterzogen.

**2.7.2.5.3 Berechnung vergleichbarer Messwerte**

Alle ermittelten *Firefly*-Luciferase- und *Renilla*-Luciferasewerte eines Wells (Mehrfachmessung im Gerät) wurden gemittelt. Anschließend wurde der gemittelte Luciferasewert durch den gemittelten *Renilla*-Wert geteilt ( $RLU = \text{Luc}/\text{Ren}$ ). Die relativen Luciferaseaktivitäten (RLUs) einer Transfektion bzw. die RLUs von gleichen Transfektionen wurden wiederum gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Die Endwerte wurden in einem Excel-Diagramm vergleichend dargestellt (2.9.5).

**2.7.2.6 Normierung der transienten Transfektion bei *Drosophila Schneider* Insektenzellen mittels  $\beta$ -Galaktosidase Test**

**Benötigte Lösung:**

**Z-Puffer (100 ml)**

1,0679 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,55196 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,07456 g KCl

0,02465 g  $\text{MgSO}_4$

0,39065 g  $\beta$ -Mercaptoethanol

auf 90 ml auffüllen

pH-Wert testen pH 7,0

dann auf 100ml auffüllen und sterilfiltrieren

**0,1 M Natriumphosphatpuffer**

0,082 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,016 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

pH-Wert auf 7,0 einstellen

sterilfiltrieren

**O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG)-Lösung**

4 mg/ml in Natriumphosphatpuffer

**1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$**

Von den Zelllysaten wurden 80 µl (entspricht 80 % der Gesamtmenge) verwendet, als Negativkontrolle dienten 80 µl 1x Lysispuffer. Dazu wurden 224 µl Z-Puffer und 66 µl ONPG-Lösung gegeben. Die Lösungen wurden so lange bei 37°C stehen gelassen, bis sich die Proben gelb färbten (Umsatz von O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid zu Nitrophenol). Dann wurde die Reaktion mit 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt (Alkalisierung, Dissoziation des Protons, Erweiterung des Systems delokalisierte Elektronen). Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 420 nm im Photometer. Als Positivtest wurde der Negativkontrolle etwas β-Galaktosidase (Sigma) zugesetzt. Der Ansatz muss sich sofort intensiv gelb färben.

Die ermittelten Werte wurden als Normierungswerte bei der transienten Transfektion der Insektenzellen an Stelle des *Renilla*-Wertes bei den transient transfizierten humanen Zellen verwendet, da kein geeignetes *Renilla*-Luciferase-Expressionsplasmid für Insektenzellen zur Verfügung stand.

## 2.8 Proteinchemische Methoden

### 2.8.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) kann gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen binden. biotinmarkierte Oligonukleotiddoppelstränge mit den entsprechenden Bindungssequenzen wandern nach Inkubation mit Kernextrakten im nativen Polyacrylamidgel aufgrund von Proteinbindung langsamer als proteinungebundene Oligonukleotiddoppelstränge. Um die Spezifität einer solchen Bandenverschiebung (*shift*) nachzuweisen, kann der detektierbare Komplex durch Zugabe von nichtmarkierten Oligonukleotiddoppelsträngen abgeschwächt werden (Kompetition).

#### 2.8.1.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

##### Benötigte Lösungen:

##### 10x Annealing Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7,6

10 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM NaCl

**Oligonukleotide mit und ohne Biotin markiert, sowie mutierte Oligonukleotide für bestimmte Bindungsstellen** (siehe Tabelle 2.5.2.3)

Um den proteinbindungsfähigen DNA-Doppelstrang mit dem gewünschten Bindungsmotiv zu generieren, wurden die beiden komplementären Oligonukleotiden (300  $\mu\text{M}$  bzw. 100 $\mu\text{M}$ ) hybridisiert. Hierzu wurden jeweils 22,5  $\mu\text{l}$  der 300  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  Lösungen der beiden einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide zu 5  $\mu\text{l}$  10x Annealing Puffer pipettiert, 5 min auf 95°C erhitzt, eine halbe Stunde bei 60°C und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Oligonukleotiddoppelstränge auf eine Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  verdünnt (1:100 bzw. 1:33) und bei -20°C gelagert.

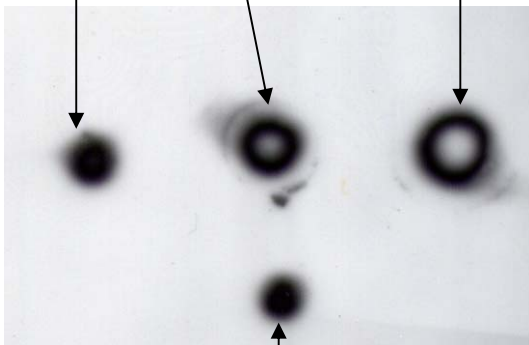
Vollständiges Annealing wurde auf einem 10%igen Polyacrylamidgel mit Ethidiumbromid überprüft.

### 2.8.1.2 *Dot-Blot mit biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelsträngen*

Um die Eignung der biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelstränge zur Detektion im Western-Blot zu überprüfen, wurden unterschiedliche Konzentrationen von biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelsträngen auf die Hybond-N-Membran getupft, fixiert (UV-Crosslinker) und anschließend mittels Streptavidin-HRP-Antikörper detektiert. Hier wurde nach dem Protokoll des Panomics EMSA Kit vorgegangen. Der Dot-Blot wurde für 15 min mit 1x Blocklösung inkubiert. Diese Lösung wurde durch 1x Blocklösung mit Streptavidin-HRP-Antikörper (1:1000) ersetzt. Nach 15 min Inkubation wurde der Blot 3x mit 1x Waschpuffer für jeweils 8 min gewaschen. Dann wurde der Blot 5 min mit 1x Detektionspuffer inkubiert, bevor die Substratlösung für 5 min auf den Blot gegeben wurde. Die Detektion erfolgte in einer Digitalkamera.

Fusionierte biotinmarkierte Oligonukleotide

1  $\mu\text{l}$  (25 ng) 5  $\mu\text{l}$  (125 ng) 10  $\mu\text{l}$  (250 ng)



TF Probe aus dem Kit der Firma Panomics (AY 1053-PA)

1  $\mu\text{l}$  (10 ng)

Mit den Substanzen aus dem Panomics-EMSA-Kit sind alle Tupfen sehr gut zu erkennen, das heißt alle biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelstränge müssten auch im EMSA gut nachweisbar sein.

### **2.8.1.3      *Isolierung von Zellkernproteinen***

#### **Benötigte Lösungen:**

##### **10x Puffer A**

100 mM HEPES, pH 7,9

100 mM KCl

100 mM EDTA

Lagerung bei 4°C

##### **5x Puffer B**

100 mM HEPES, pH 7,9

2 M NaCl

5 mM EDTA

50% Glycerin

Lagerung bei 4°C

#### **Protease-Inhibitoren-Cocktail (Roche)**

Die Präparation von Zellkernextrakten für EMSA-Experimente wurde nach einem Protokoll von der Firma Panomics durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis, im Kühlraum und in gekühlten Zentrifugen durchgeführt.

Zunächst wurde ein Puffer-A-Gemisch aus 1 ml 1x Puffer A, 10 µl 100 mM DTT, 10 µl Protease Inhibitor Cocktail und 40 µl 10% IGEPAL und ein Puffer-B-Gemisch aus 147 µl 1x Puffer B, 1,5 µl Protease Inhibitor Cocktail und 1,5 µl 100 mM DTT hergestellt und bei 4°C gelagert.

Eine konfluente 10 cm Kulturschale wurde 2x mit kaltem PBS gewaschen bevor auf die Zellen 1 ml 1x Puffer-A-Gemisch gegeben wurde. Nach kurzem Schwenken der Kulturschale wurde diese auf Eis gestellt und im Kühlraum für 20 min auf eine Wippe gestellt (150 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellscraper von der Kulturschale abgeschabt und mit einer Pipette Zellklumpen zerstört. Dann folgte eine Zentrifugation bei 15000\*g, 3 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 150 µl Puffer-B-Gemisch resuspendiert und für 10 s stark gevortext. Dieser Ansatz wurde 2 h im Kühlraum bei 200 rpm geschüttelt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 15000\*g, 5 min bei 4°C. Der Überstand enthält die Kernproteine und wurde für

die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in  $20\ \mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1977) im UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von  $595\ \text{nm}$  bestimmt. Dies ist für das später einzusetzende Verhältnis von Protein zu DNA wichtig.

#### 2.8.1.4 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1977) ermittelt, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau durch Bindung an Proteine beruht. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels einer mit Rinderserumalbumin (BSA) (Roth, Karlsruhe) generierten Kalibrierungskennlinie (BSA im Bereich von  $2$  bis  $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) bestimmt. Dazu wurde von einer BSA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt (Tab.3).

**Tabelle 2.15:** BSA-Eichreihe für die Proteinbestimmung.  
Die Tabelle 2.15 beinhaltet das Pipettierschema für die Herstellung einer BSA-Eichreihe.

Protein im Test [ $\mu\text{g}$ ]	BSA (0,5mg/ml) [ $\mu\text{l}$ ]	H <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]	100% Ameisensäure [ $\mu\text{l}$ ]	1:5 verdünntes Bradford-Reagenz [ $\mu\text{l}$ ]
0	0	50	50	900
2	4	46	50	900
4	8	42	50	900
6	12	38	50	900
8	16	34	50	900
10	20	30	50	900

Gleichzeitig wurden zur Proteinbestimmung unterschiedliche Mengen an Lysat bzw. Kernextrakt in  $50\%$  Ameisensäure (AmpliChem, Darmstadt) gegeben, die Proben wurden gevortext und mindestens  $20\ \text{min}$  bei Raumtemperatur inkubiert (Endvolumen  $100\ \mu\text{l}$ ). Dann wurde in alle Ansätze  $900\ \mu\text{l}$   $1:5$  verdünntes Bradford-Reagenz (Bradford-Protein-Test-Kit, Roth, Karlsruhe) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwanzig Minuten wurde die Absorption bei  $595\ \text{nm}$  in Polystyrolküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) an einem Photometer (HITACHI U-2000) gemessen. Zuvor wurden der Standard-Blindwert und die Standardreihe in aufsteigender Konzentration gemessen. Anhand der BSA-Kalibrierungslinie wurde die Proteinkonzentration der Extrakte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

### 2.8.1.5 *Shift-Assay*

#### **Benötigte Lösungen:**

#### **5x Bindungspuffer bzw. Bindungspuffer aus dem Panomics Kit AY1000**

20%Glycerin

5 mM MgCl<sub>2</sub>

2,5 mM EDTA

2,5 mM DTT

250 mM NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

in H<sub>2</sub>O

Lagerung bei -20°C

#### **10x TBE**

1M Tris Base

0,9 M Borsäure

0,01M Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O

final pH 8,3

nicht länger als 1 Monat nutzen

#### **10x Ladepuffer**

250 mM Tris-HCl, pH 7,5

0,2% Bromphenolblau

40% Glycerin

in H<sub>2</sub>O

#### **Benötigte Materialien:**

#### **1 mg Poly(dI-dC)\*Poly(dI-dC) (Roche) bzw. aus dem Panomics Kit AY1000**

in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst

5 min bei 95°C, 30 min bei 60°C und 30 min bei 37°C

Lagerung bei -20°C

### **Hybond-N-Nylon-Membran**

positiv geladen, bindet auch negativ geladenen Proteine

Für jeden zu untersuchenden Oligonukleotiddoppelstrang wurden 4 unterschiedliche Reaktionsansätze auf Eis zusammenpipettiert.

Ansatz 1: Negativkontrolle ohne Zellkernproteine

2 µl Poly(dI-dC)

4 µl 5xBindungspuffer

H<sub>2</sub>O

Ansatz 2: Positivkontrolle mit Zellkernprotein

2µl Poly(dI-dC)

4 µl 5xBinding Buffer

10 µg Zellkernproteine

H<sub>2</sub>O

Ansatz 2: Konkurrenz mit gleichem unmarkiertem Oligonukleotiddoppelstrang

2µl Poly(dI-dC)

4 µl 5xBinding Buffer

10 µg Zellkernproteine

H<sub>2</sub>O

Ansatz 2: Konkurrenz mit ungleichem unmarkiertem Oligonukleotiddoppelstrang

2µl Poly(dI-dC)

4 µl 5xBinding Buffer

10 µg Zellkernproteine

9 µl H<sub>2</sub>O

Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde allen 4 Ansätzen je 1µl desselben mit biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelstrangs (entsprechend 5 ng) zugefügt und die Inkubation für 20 min fortgesetzt. Anschließend wurden die Proben mit 10x DNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) vermischt und auf ein 6%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen (2.8.1.7).

#### **2.8.1.6 *Kompetitionstests***

Um die Sequenzspezifität derjenigen Proteine zu überprüfen, die im Zuge des EMSA an die untersuchten Oligonukleotiddoppelstränge binden, wurde sowohl ein Konkurrenztest mit



spezifischem als auch mit einem unspezifischem Kompetitor durchgeführt. Die Ansätze 3 und 4 für beide Tests glichen dem Ansatz 2 der zuvor beschriebenen EMSA-Ansätze, jedoch wurden für die spezifische Konkurrenz jeweils dieselben aber unmarkierten Oligonukleotiddoppelstränge in 50fachem molarem Überschuss gegenüber dem markierten Oligonukleotiddoppelstrang zugegeben, für die unspezifische Konkurrenz entsprechend ein Oligonukleotiddoppelstrang mit einer anderen Sequenz. Auch die Konkurrenztests wurden mit 10x DNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) vermischt und neben den entsprechenden EMSA-Ansätzen 1 und 2 auf einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### **2.8.1.7      *Elektrophorese***

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Proteinkomplexe wurde ein 6%iges natives Polyacrylamidgel genutzt.

#### **6%iges natives Polyacrylamidgel**

250 µl 10x TBE

2 ml 37,5 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid

7,64 ml H<sub>2</sub>O

10 µl TEMED

100 µl 10 % APS

Nach 1 h Polymerisationszeit wurde das Gel in eine mit kaltem 0,25x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Multigel: Biometra, Göttingen) überführt. Es erfolgte ein Vorlauf im Kühlraum (1 h mit 120 V). Nach dem Auftragen der EMSA-Proben wurde eine ca. 1,5 h Elektrophorese bei 120 V im Kühlraum durchgeführt.

#### **2.8.1.8      *Protein-DNA-Transfer***

Beim Protein-DNA-Transfer wurden die aufgetrennten Proteine-DNA-Komplexe vom nativen Polyacrylamidgel mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotapparates auf eine Hybond-N-Membran (Nylon) übertragen. Der Blot wurde als „Sandwich“, bestehend von unten nach oben aus 2 Whatman-Papieren (3MM-Filterpapier, Whatman, Springfield, England; getränkt in 0,25x TBE Puffer), der Hybond-N-Nylonmembran (in 0,25x TBE Puffer getränkt), dem Polyacrylamidgel und 2 weiteren Lagen Whatman-Papier (getränkt in 0,25x TBE Puffer) aufgebaut.

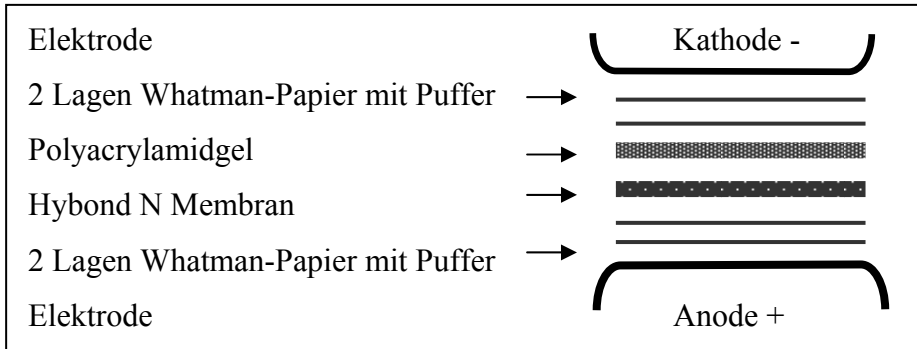


Abbildung 2.11: Aufbau des Semidry-Blots

Mit einer Glaspipette wurden alle Luftblasen herausgedrückt, die Semidry-Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) geschlossen und mit ca. 2 kg beschwert. Das Blotten erfolgte über 1,5 h bei 200 mA (Spannungsquelle: Power-All 3000 V/200mA, Serva, Heidelberg).

#### 2.8.1.9 *Immobilisierung gebundener Oligonukleotide*

Zum Fixieren der Oligonukleotide wurde die Membran nach dem Blotten 3 min im UV-Stratalinker (Transilluminator 4000, Stratagene) bestrahlt.

#### 2.8.1.10 *Detektion*

Für die Detektion der biotinmarkierten Oligonukleotide wurden Bestandteile des Kits von der Firma Panomics (AY 1053-PA bzw. AY 1000) verwendet.

Zum Abblocken der noch freien Bindungsstellen wurde die Membran 15 min bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler (Heidolph DUMAX 2030) mit 1x Blocklösung inkubiert. Dann wurde der Puffer ausgetauscht und in diesen eine 1:1000 Verdünnung des Streptavidin-HRP Antikörpers gegeben. Die Inkubation erfolgte 15 min auf dem Kippschüttler. Anschließend wurde die Membran 3x 5 min mit 1x Waschpuffer gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit 20 ml 1x Detektionspuffer. Anschließend wurde der Blot auf eine Folie gelegt und mit 2 ml Substratlösung (200 µl Lösung I, 200 µl Lösung II und 1600 µl Lösung III) behandelt, eine weitere Folie aufgelegt, 5 min inkubiert, dann das Substrat entfernt. Die Chemilumineszenz wurde in einer Digitalkamera detektiert.

## 2.9 Bioinformatik

### 2.9.1 Datenbanken in der Genetik

#### 2.9.1.1 *Bibliografische Datenbanken*

Folgende bibliografischen Datenbanken wurden bei der Arbeit verwendet:

[www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)

[www.biosis.org](http://www.biosis.org)

### 2.9.2 Sequenz- und Proteindatenbanken

#### 2.9.2.1 *Sequenzdatenbanken*

Die "EMBL *Nucleotide Sequence Database*" ist eine zusammenfassende Datenbank von DNA- und RNA-Sequenzen aus Literatur, Patenten und direkten Beiträgen. Die Datenbank wird in Zusammenarbeit mit GenBank und der DNA Database of Japan (DDBJ) gepflegt. Jede der drei Gruppen sammelt einen Teil der weltweit erarbeiteten Sequenzdaten. Die Informationen werden täglich aktualisiert.

[www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)

**GDB** (*Genom Data Base*) ist die offizielle zentrale Sammelstelle für die Daten, die im Rahmen des Human Genome Projects gesammelt werden. Zunehmend rücken hier neben dem "Mapping" von Genen, d.h. ihrer räumlichen Lokalisation, und ihrer Sequenzierung die Variabilität von Sequenzen sowie die funktionelle Analyse in den Vordergrund.

<http://gdbwww.gdb.org>

Die NCBI-Genbank ist die Datenbank genetischer Sequenzen des NIH (*National Institute of Health*), in der alle öffentlich zugänglichen DNA-Sequenzen gesammelt werden. Die Genbank ist Teil der "*International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC)", die aus der "*DNA DataBank of Japan* (DDBJ)", dem "*European Molecular Biology Laboratory* (EMBL)" und GenBank besteht.

**BLAST®** (*Basic Local Alignment Search Tool*) ist ein Suchprogramm, das entworfen wurde, um nach Proteinen oder DNA (auch EST) in allen vorhandenen Datenbanken zu suchen. Die BLAST-Programme sind schnell, zuverlässig und liefern eine gut definierte statistische Deutung.

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

**SPIDEY** ist ein Programm, das zur Überprüfung der Exon-Intron-Struktur anhand der mRNA und der genomischen Sequenz des humanen und des murinen ADAM10 genutzt wurde (NCBI).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>

**TRANSFAC** wurde an der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) mitentwickelt und beschreibt alle bekannten Transkriptionsfaktoren als Grundbausteine der Genregulation. Neben den Transkriptionsfaktoren werden auch die Zusammenhänge zu Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Genen behandelt. Bindungsstellen werden durch Matrizen modelliert, die in fremden DNA-Sequenzen die zur Zeit genaueste Suche ermöglichen (Heinemeyer *et al.*, 1998)

<http://transfac.gbf.de>

**TRRD** (*transcription regulatory regions database*) enthält Informationen über die strukturelle und funktionale Organisation der die Transkription betreffenden regulativen DNA-Regionen, basierend auf Transkriptionsfaktoren. Das entwickelte Modell integriert die bekannten experimentellen Erkenntnisse zur Genregulation auf DNA-Ebene in hierarchischer Struktur. So werden auf der obersten Ebene Genregionen modelliert, dann Promotoren, Enhancer und Silencer als regulative Einheiten, welche anschließend bis auf die Ebene der Transkriptionsfaktoren aufgeschlüsselt werden. Verbindungen zu anderen Datenbanken wie EMBL, EPD (*eucaryotic promoter database*) und TRANSFAC sind gegeben.

[www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru)

Für die Vorhersage der Promotorregion und der Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurde das Programm **MatInspector** von Genomatix verwendet (Quandt *et al.*, 1995).

[www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)

CpG Inseln wurden mit dem Programm **ITBA-CNR** (Italy, D'Angelo Dino, Milanesi Luciano, Feature View V 2.0; <http://www.itba.mi.cnr.it/webgene>) bestimmt.

Das Programm **MultiPipMaker** und **mVista** (*main Vista*) wurde zum Vergleich der genomischen ADAM10-Sequenz des Menschen mit der der Maus und der Ratte (Schwartz *et al.*, 2003) genutzt. Das Ergebnis dieser Analyse wurde in das Programm **rVista** (*regulatory Vista*) eingesetzt, dadurch wurden die konservierten Bereiche im ADAM10-Promotor durch lokales Alignment bestimmt (Loots *et al.*, 2000).

### 2.9.2.2 *Proteindatenbanken*

**SWISS-PROT** und **TrEMBL** sind die beiden bekanntesten und wohl umfangreichsten Proteinsequenzdatenbanken.

[www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)

**PIR** (*protein information resource*) liefert nicht redundante Proteinsequenzdaten.

[www.nbrf.georgetown.edu/pir](http://www.nbrf.georgetown.edu/pir)

**PDB** (*protein data bank*) informiert über die dreidimensionalen Strukturen von Proteinen.

[www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)

### 2.9.3 *Phylogenetische Untersuchungen*

Das Programm Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) wurde für den Aminosäuresequenzvergleich des ADAM10-Proteins verschiedener Spezies verwendet. Für die Darstellung des Aminosäuresequenzvergleichs wurde das Programm Genedoc 2.6 (Nicholas und Nicholas, 1997) zu Hilfe genommen.

Für die Rekonstruktion des phylogenetischen Stammbaums wurden folgende Programme genutzt: MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001) and MrBayes 3.0 beta4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

Die mit MrBayes 3.0 ausgeführte phylogenetische Analyse wurde unter Annahme des WAG-Austauschmatrixmodells (Whelan and Goldman, 2001) durchgeführt. Das „*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo Sampling*“ wurde ausgeführt mit einer „*cold*“ und drei „*heated*“ Ketten. Der Lauf erfolgte über 100000 Generationen. Initiale Stammbäume wurden willkürlich gewählt, jede 10. Baumgeneration wurde ausgewertet und drei unabhängige Läufe wurden durchgeführt. Die Berechnung der posterioren Wahrscheinlichkeiten wurde anhand der letzten 9000 Stammbäumen durchgeführt (burn-in = 1000).

Für die *neighbor-joining*-Analyse (Saitou and Nei, 1987) wurden die Proteindistanzen unter Verwendung der PAM-Austauschmatrix kalkuliert (Dayhoff *et al.* 1978). Das Programm MEGA version 2.1 wurde für die Stammbaumerstellung verwendet. Die Zuverlässigkeit der Stammbäume wurde mit der *bootstrap*-Analyse (Felsenstein, 1985) mit 1000 Replikationen überprüft.

#### **2.9.4 Computergestützte Sequenzanalyse**

Das Programm **PC-Gene** (Version 6.85, IntelliGenetics Inc., Geneva, Schweiz) wurde zur Überprüfung der von der Firma Genterprise (Mainz) angefertigten Sequenzierungen sowie zur Erstellung von Klonierungsvektorsequenzen verwendet.

Mit dem Programm **Chromas** (Version 1.4, Conor McCarthy, Griffith University, Brisbane, Australien) wurden die Sequenzierungsergebnisse der Firma Genterprise graphisch überprüft.

Die Gel- und Blotauswertung erfolgte unter zu Hilfenahme der Programme **Diana V1.6** und **AIDA 2.0** (Raytest, Straubenhardt).

#### **2.9.5 Graphische Auswertung und Statistik**

Abgebildete Grafiken und die Berechnung statistischer Werte anhand der ermittelten Daten wurden mit Hilfe des Programms **Excel 2003** (Microsoft) erstellt. Bei Mehrfachbestimmungen wurden der Mittelwert sowie die einfache Standardabweichung berechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Humane ADAM10-Genomstruktur und Exon/Intron Übergänge

In der Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) findet sich unter den Zugangsnummern (*Accession Number*, Acc. No.) NM001110 und AF09615 die vollständige humane ADAM10-cDNA mit einer Länge von 3410 Nukleotiden.

Die cDNA-Sequenz umfasst einen 5'-untranslatierten Bereich von 469 bp, einen offenen Leserahmen von 2247 bp und einen 3'-untranslatierten Bereich von 764 bp. Im 3'-UTR findet man zwei Polyadenylierungssignalen, AATAAA, und ein Polyadenylierungssignal, TATAAA (Abbildung 3.1).

	<i>GAATTCGAGGATCCGGGTA</i>	19
<i>CCATGGG</i> CGGGCGGCAGGCCTAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCGCGGCATGCGCGCGCCCCTGAAGCGCCTGGGGACGGGTATGGGCGG		109
GAGGTAGGGGCGCGGGTCCCGCGTGCAGTTGGGTGCCCGCGCGTACGTGGTGAGGAAGGAGGCGGAGGTCTGAGTTTCGAGGGAGGGGG		199
GGAGAGAAGAGGGAACGAGCAAGGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGAAACGAACGAGGGGAGGGAGGTCCCTGTTTTGGAGGAGC		289
TAGGAGCGTTGCCGGCCCCTGAAGTGAGCGAGAGGGAGGTGCTTCGCCGTTTCTCCTGCCAGGGGAGGTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCT		379
CCGACCAAGCCCCTTTCAGCTTCTCCCTCCGGATCGATGTGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGGCGGCGGGCAGCGGCAGCGGAAG		469
<b>Signalsequenz</b>	<b>Prodomäne</b>	
<b>ATGGT</b> GTGTGCTGAGAGTGTAAATTCTGCTCCTCCTCGGGCGGGGATGGGAGGTCAGTATGGGAATCCTTTAAATAAATATATCAGA		559
M V L L R V L I L L L S W A A G M G G Q Y G N P L N K Y I R		30
CATTATGAAGGATTATCTTACAATGTGGATTCAATACACCAAAAACACCAGCGTCCAAAAGAGCAGTCTCACATGAAGACCAATTTTTA	▲	649
H Y E G L S Y N V D S L H Q K H Q R A K R A V S H E D Q F L		60
CGTCTAGATTTCCATGCCCATGGAAGACATTTCAACCTACGAATGAAGAGGGACACTTCCCTTTTCAGTGATGAATTTAAAGTAGAAACA		739
R L D F H A H G R H F N L R M K R D T S L F S D E F K V E T	▲	90
TCAATAAAGTACTTGATTATGATACCTCTCATATTTACACTGGACATATTTATGGTGAAGAAGGAAGTTTTAGCCATGGGTCTGTTATT		829
S N K V L D Y D T S H I Y T G H I Y G E E G S F S H G S V I	▲	120
GATGGAAGATTGAAGGATTCATCCAGACTCGTGGTGGCACATTTTATGTTGAGCCAGAGAGATATATTAAGACCGAACTCTGCCA		919
D G R F E G F I Q T R G G T F Y V E P A E R Y I K D R T L P		150
TTTCACTCTGTCATTTATCATGAAGATGATATTAACATATCCCCATAAATACGGTCCCTCAGGGGGGCTGTGCAGATCATTCAGTATTTGAA		1009
F H S V I Y H E D D I N Y P H K Y G P Q G G C A D H S V F E		180
AGAATGAGGAAATACCAGATGACTGGTGTAGAGGAAGTAACACAGATACCTCAAGAAGAACATGCTGCTAATGGTCCAGAACTTCTGAGG	▲	1099
R M R K Y Q M T G V E E V T Q I P Q E E H A A N G P E L L R	▲	210
<b>Metalloproteinase-Domäne</b>		
AAAAACGTTACAACCTCAGCTGAAAAAATACTTGTGACGTTTATATTCAGACTGATCATTTGTTCTTTAAATATTACGGAACACGAGAA		1189
K K R T T S A E K N T C Q L Y I Q T D H L F F K Y Y G T R E		240
GCTGTGATTGCCAGATATCCAGTCAATGTTAAAGCGATTGATACAATTTACCAGACCACAGACTTCTCCGGAATCCGTAACATCAGTTTC		1279
A V I A Q I S S H V K A I D T I Y Q T T D F S G I R N I S F	▲	270
ATGGTGAACGCATAAGAATCAATACAACCTGCTGATGAGAAGACCCTACAATCCTTTCCGTTTCCCAAATATTGGTGTGGAGAAGTTT		1369
M V K R I R I N T T A D E K D P T N P F R F P N I G V E K F		300
CTGGAATTGAATCTGAGCAGAATCATGATGACTACTGTTTGGCCTATGTCTTCACAGACCGAGATTTGATGATGGCGTACTTGGTCTG	▲	1459
L E L N S E Q N H D D Y C L A Y V F T D R D F D D G V L G L		330
GCTTGGGTTGGAGCACCTTCAGGAAGCTCTGGAGGAATATGTGAAAAAGTAAACTCTATTTCAGATGGTAAGAAGAAGTCTTAAACACT		1549
A W V G A P S G S S G G I C E K S K L Y S D G K K K S L N T	▲	360
GGAATTATTACTGTTTCAACTATGGGTCTCATGTACTCCCAAAGTCTCTCACATTAATTTGCTCACGAAGTTGGACATAACTTTGGA		1639
G I I T V Q N Y G S H V P P K V S H I T F A H E V G H N F G		390
TCCCCACATGATTCTGGAACAGAGTGCACACCAGGAGAATCTAAGAATTTGGGTCAAAAAGAAAATGGCAATTACATCATGTATGCAAGA		1729
S P H D S G T E C T P G E S K N L G Q K E N G N Y I M Y A R	▲	420

## Ergebnisse

GCAACATCTGGGGACAAACTTAACAACAATAAATTCCTACTCTGTAGTATTAGAAATATAAGCCAAGTTCTTGAGAAGAAGAGAAACAAC	1819
A T S G D K L N N N K F S L C S I R N I S Q V L E K K R N N	450
<b>Disintegrin-Domäne</b>	
TGTTTTGTGTAATCTGGCCAACCTATTTGTGGAATGGAATGGTAGAACAAAGGTGAAGAATGTGATTGTGGCTATAGTGACCAGTGTAAA	1909
C F V E S G Q P I C G N G M V E Q G E E C D C G Y S D Q C K	480
▲	
GATGAATGCTGCTTCGATGCAAAATCAACCAGAGGGAAGAAAATGCAAACCTGGGAAACAGTGCAGTCCAAGTCAAGGTCCTTGT	1999
D E C C F D A N Q P E G R K C K L K P G K Q C S P S Q G P C	510
▲	
TGTACAGCACAGTGTGCATTCAAGTCAAAGTCTGAGAAGTGTGGGATGATTCAGACTGTGCAAGGGAAGGAATATGTAATGGCTTCACA	2089
C T A Q C A F K S K S E K C R D D S D C A R E G I C N G F T	540
<b>Cysteinreiche Domäne</b>	
GCTCTCTGCCAGCATCTGACCTAAACCAAACCTTCACAGACTGTAATAGGCATACACAAGTGTGCATTAATGGGCAATGTGCAGGTTCT	2179
A L C P A S D P K P N F T D C N R H T Q V C I N G Q C A G S	570
▲	
ATCTGTGAGAAATATGGCTTAGAGGAGTGTACGTGTGCCAGTTCTGATGGCAAAGATGATAAAGAATTATGCCATGTATGCTGTATGAAG	2269
I C E K Y G L E E C T C A S S D G K D D K E L C H V C C M K	600
AAAATGGACCCATCAACTTGTGCCAGTACAGGGTCTGTGCAGTGGAGTAGGCACCTTCAGTGGTCAACCATCACCTGCAACCTGGATCC	2359
K M D P S T C A S T G S V Q W S R H F S G R T I T L Q P G S	630
▲	
CCTTGCAACGATTTTAGAGGTTACTGTGATGTTTTTCATGCGGTGCAGATTAGTAGATGCTGATGGTCTCTAGCTAGGCTTAAAAAGCA	2449
P C N D F R G Y C D V F M R C R L V D A D G P L A R L K K A	660
<b>Transmembrandomäne</b>	
ATTTTTAGTCCAGAGCTCTATGAAAACATTTGCTGAATGGATTGTGGCTCATTGGTGGGCAGTATTACTTATGGGAATTGCTCTGATCATG	2539
I F S P E L Y E N I A E W I V A H W W A V L L M G I A L I M	690
▲	
<b>Cytoplasmatische Domäne</b>	
CTAATGGCTGGATTTATTAAGATATGCAGTGTTCATACTCCAAGTAGTAATCCAAAGTTGCCTCCTCCTAAACCCTTCAGGCACTTTA	2629
L M A G F I K I C S V H T P S S N P K L P P P K P L P G T L	720
▲	
AAGAGGAGGAGACCTCCACAGCCCATTCAGCAACCCAGCGTCAAGCGGCCCGAGAGAGTTATCAAATGGGACACATGAGACGCTAACTG	2719
K R R R P P Q P I Q Q P Q R Q R P R E S Y Q M G H M R R *	750
CAGCTTTTGCCTTGTTCTTCTAGTGCCTACAATGGGAAAACCTTCACTCCAAGAGAAACCTATTAAGTCATCATCTCCAAACTAAACC	2809
CTCACAAAGTAACAGTTGAAGAAAAATGGCAAGAGATCATATCCTCAGACCAGGTGGAATTAATAATTTTAAAGCCTGAAAATTCCAA	2899
TTTGGGGTGGGAGGTGGAAAAGGAACCCAAATTTCTTATGAACAGATATTTTAACTTAATGGCACAAAGTCTTAGAATATTATTATGT	2989
GCCCGTGTTCCTGTTCTTCGTTGCTGCATTTTCTTCACTTGCAGGCAAACTTGGCTCTCAATAAACTTTTACCACAAATGAAATAAA	3079
TATATTTTTTCAACTGCCAATCAAGGCTAGGAGGCTCGACCACCTCAACATTTGGAGACATCACTTGCCAATGTACATACCTTGTATAT	3169
GCAGACATGTATTTCTTACGTACACTGTACTTCTGTGTGCAATTTGTAACAGAAATGCAATATGGATGTTTCTTTGTATTATAAAATTT	3259
TTCCGCTCTTAATTAATAAATTAATGACATACTCAGGATAACAGAGAATGGTGGTATTTCAGTGGTCCAGGATTCTGTAATGCT	3349
TTACACAGGCAGTTTTGAAATGAAAATCAATTTACCCCATGGTACCCGGATCCTCGAATTC	3410

**Abbildung 3.1:** DNA-Sequenz und Aminosäuresequenz der humanen ADAM10-cDNA.

Exonübergänge sind durch Dreiecke markiert. Der Translationsstartpunkt und das Stopkodon sind fett markiert. Die Aminosäuresequenz steht unterhalb der DNA-Sequenz im Einbuchstabenkode. Die Polyadenylierungssignale im 3'-untranslatierten Bereich sind unterstrichen. Die Nukleotidsequenz des humanen ADAM10 findet sich in der Gendatenbank unter der Zugangsnummer NM\_011100, die Aminosäuresequenz unter der Zugangsnummer NP\_001101 bzw. bei SWISSPROT mit den entsprechenden Domänen unter der Zugangsnummer O14672. Die ersten 25 bp sind nicht homolog mit dem humanen ADAM10-Gen und sind kursiv dargestellt.

Um die humane ADAM10 5'-Region mit dem dazugehörigen Promotor zu identifizieren, wurde die cDNA Sequenz in das Suchprogramm Blast (*Basic local alignment search tool*) der NCBI-Genbank eingesetzt. Das Programm hat Zugriff auf die Daten der NCBI-Genbank und sucht diejenigen Sequenzen heraus, die die größte Übereinstimmung mit der eingesetzten Sequenz haben. In diesem Fall wurde der BAC-Klon RPCI 11 123C21 (AC009944, 10 contigs, 184564 bp) ermittelt, der die mutmaßliche genomische Region des humanen ADAM10-Gens enthält, welche auf Chromosom 15 bei Locus 15q22.1-15q22.33 liegt. Beim Vergleich der humanen ADAM10-cDNA Sequenz (AF09615) mit der genomischen ADAM10-Sequenz (NT\_010194) zeigte sich, dass die ersten 25 bp der humanen ADAM10-cDNA-Sequenz nicht homolog sind. Nur 444 bp des 5'-untranslatierten Bereiches stimmen mit der humanen ADAM10-cDNA-Sequenz überein.



## Ergebnisse

Die Position der Exon/Intron Übergänge wurden durch Vergleich der Sequenz des BAC-Klons und der humanen ADAM10-cDNA-Sequenz ermittelt (Diplomarbeit Claudia Prinzen, 2001). Später wurde unter Verwendung des Programms SPIDEY (2.9.2.1) die genomische humane ADAM10-Sequenz (NT\_010194) mit der humanen ADAM10-cDNA-Sequenz (AF009615) verglichen und auch hier die Exon/Intron Übergänge ermittelt (Tabelle 3.1). Ebenso wurde mit der genomischen ADAM10-Sequenz der Maus (NT\_039474) und der murinen ADAM10-cDNA-Sequenz (NM\_007399) verfahren (Tabelle 3.2). Eine solche Analyse war bei der genomischen ADAM10-Sequenz der Ratte auf Chromosom 8 (NW\_047799) aufgrund von Anordnungsfehlern im Rattengenom nicht möglich. Die Sequenzen aller Exon/Intron Spleißstellen entsprechen der GT-AG Regel (Shapiro and Senapathy, 1987).

**Tabelle 3.1:** Exon/Intron Übergänge beim humanen ADAM10-Gen.

Exon	Exongröße (bp)	Donor- verbindungsstelle	Intron	Akzeptor- verbindungsstelle	Introngröße (bp)	Unterbrochene Aminosäure
1 mit 5'UTR	499	TGGGAGgtgagg	I	ttatagGTCAGT	31753	G/ly
2	151	TGGAAGgtaagt	II	ttacagACATTT	35263	Ar/g
3	119	TTTATGgtaagt	III	taatagGTGAAG	2914	G/ly
4	159	ATATTAgtaagt	IV	ttttagACTATC	13927	A/sn
5	101	ACACAGgtaagg	V	gtatagATACCT	18893	Gln/
6	150	GCCAGgtattt	VI	tcataGATATCC	2077	Gln/
7	93	ATAAGAgtaagg	VII	tttttagATCAAT	2926	Arg/
8	184	CTTCAGgtagt	VIII	gattagGAAGCT	7418	G/ly
9	164	TCCCCAgtaagt	IX	tgacagCATGAT	5313	Pro/
10	184	TTGTTGgtatgt	X	cctcagAATCTG	6079	G/lu
11	151	GTGCAGgtacct	XI	ctctagTCCAAG	9480	Se/r
12	184	AATGGGgtaagc	XII	ttctagCAATGT	701	G/ly
13	109	AGAAAAGtaagg	XIII	ttccagTGGACC	482	M/et
14	221	ATTGTGgtaagt	XIV	ttctagGCTCAT	10573	Val/
15	127	TTCCAGgtaaga	XV	tcacagGCACTT	1957	G/ly
16 mit 3'UTR	764					

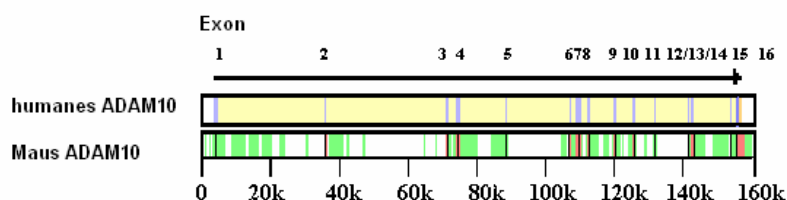
**Tabelle 3.2:** Exon/Intron Übergänge beim Maus ADAM10-Gen.

Exon	Exongröße (bp)	Donor- verbindungsstelle	Intron	Akzeptor- verbindungsstelle	Introngröße (bp)	Unterbrochene Aminosäure
1 mit 5'UTR	80	TGGGAGgtgaga	I	ttatagGTCAGT	24028	G/ly
2	151	TGGAAGgtgagt	II	ttgcagACAGTT	15253	Ar/g
3	119	TTTATGgtaagt	III	caatagGTGAAG	3837	G/ly
4	159	ATATTAgtaagt	IV	cttttagACTATC	18235	A/sn
5	101	GCCCGGgtaagg	V	gtacagGCACAT	3629	Arg/
6	153	GCTCAGgtactg	VI	tactagATATCC	2233	Gln/
7	93	ATAAGAgtaagg	VII	tttttagATCAAT	1757	Arg/
8	184	CTTCAGgtagat	VIII	aattagGAAGCT	5894	G/ly
9	164	TCTCCAgtgagt	IX	tgccagCATGAT	7258	Pro/
10	184	TTGTTGgtatgt	X	cctcagAATCTG	4317	G/lu
11	151	GTGCAGgtacct	XI	tcctagTCCGAG	770	Se/r
12	184	AATGGGgtaagc	XII	ccccagCAATGT	754	G/ly
13	109	AGAAAAGtaagg	XIII	ttccagTGGCTC	875	M/et
14	221	ATTGTGgtaagt	XIV	tgccagGCTCAC	7524	Val/
15	127	TTCCAGgtaagg	XV	ttgcagGCACTT	1501	G/ly
16 mit 3'UTR	301					

Die Exonbereiche konnten den einzelnen Domänen des humanen ADAM10-Proteins (Rosendahl *et al.*, 1997) zugeordnet werden. Exon 1 beinhaltet die 5'-untranslatierten Region and die ersten 18

Aminosäuren der kodierenden Region. Dieses Exon umfasst somit die vollständige Signalpeptidsequenz des Enzyms. Die Prodomäne wird von den Exons 2, 3, 4 und einem Teil des Exons 5 verschlüsselt. Die Metalloproteinase-Domäne wird von den Exons 5-10 kodiert, gefolgt von der Disintegrin-Domäne, die von den Exons 10 bis 12 kodiert wird. Teile von Exon 12, Exon 13, Exon 14 und ein Teil des Exons 15 kodieren für die cysteinreiche Domäne, gefolgt von der Sequenz, die die Transmembrandomäne kodiert (Exons 15 and 16). Das Translationsstopcodon TAA liegt in Exon 16, welches auch die Sequenz der cytoplasmatische Domäne enthält. Mit Ausnahme des Exons 16, welches 764 bp lang ist, sind alle anderen Exons relativ klein, von 93 bis 499 bp (Tabelle 3.1). Die Introngrößen liegen zwischen 482 und 35262 bp, wobei die größten Introns vorrangig am 5'-Ende des Gens liegen. Das ADAM10-Gen der Maus (Tabelle 3.2) besteht ebenfalls aus 16 Exons unterbrochen von 15 Introns. Die Größe der Introns und Exons sind denen des humanen ADAM10-Gens sehr ähnlich (Tabelle 3.1 und 3.2). Das humane ADAM10-Protein und das der Maus unterscheiden sich nicht in ihrer Länge und haben eine 90%ige Identität und sogar eine 95%ige Ähnlichkeit.

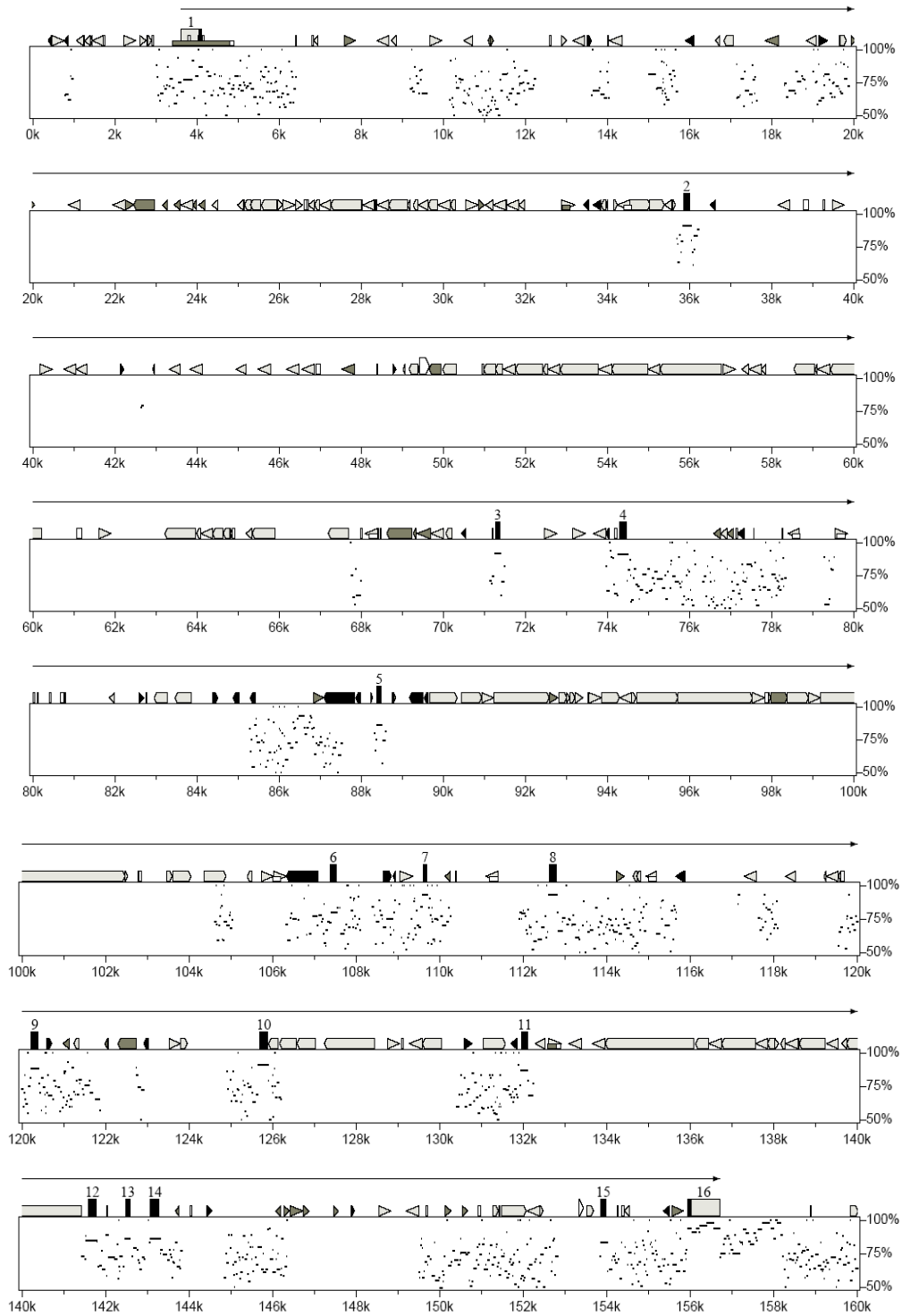
Für den Vergleich der genomischen Sequenzen von humanem und murinem ADAM10 wurde das Programm MultiPipMaker verwendet (<http://Bio/cse/psu/edu/pipmaker/>). Das Programm berechnet und visualisiert lokale Übereinstimmungen von ähnlichen Regionen in zwei oder mehr Sequenzen (Schwartz *et al.*, 2000) und basiert auf dem BLASTZ Algorithmus (Schwartz *et al.*, 2003). Im dargestellten Diagramm (Abbildung 3.2) wurde die humane ADAM10-Sequenz als Matrize verwendet, diese wurde mit der auf Chromosom 9 der Maus lokalisierten ADAM10-Sequenz verglichen. Im erhaltenen Diagramm kann man innerhalb der genomischen Sequenz die konservierten Regionen der 16 Exons erkennen, die von den Introns mit einigen repetitiven Elementen unterbrochen werden. An den Enden der genomischen Sequenzen befinden sich die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs). Die 3'-UTR ist hoch konserviert, was dafür spricht, dass in diesem Bereich regulatorische Elemente des ADAM10-Gens liegen (Abbildung 3.3). CpG Inseln werden für den Bereich des 5'-UTR, des ersten Exons und den Beginn des ersten Introns angezeigt.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Exon/Intron-Organisation.

Die waagrechte Linie repräsentiert das gesamte ADAM10-Gen mit ca. 160 kb. Die senkrechten Balken stellen die 16 Exons innerhalb des ADAM10-Gens dar. Die Dicke der Balken ist proportional zur jeweiligen Exon-Länge. Die Abstände zwischen den Balken entsprechen den jeweiligen Intron-Längen. Grüne Bereiche im Maus ADAM10 zeigen Ähnlichkeiten zum humanen ADAM10, die oberhalb von 50% liegen.

# Ergebnisse



**Abbildung 3.3:** Genomische Organisation von humanem und murinem ADAM10.

Das humane ADAM10-Gen überspannt 154 kb mit 16 Exons. Die Positionen der Exons und Introns und die Größe der Exons und Introns sind zwischen humanem und murinem ADAM10 recht ähnlich. Punkte bzw. Striche zeigen Ähnlichkeiten zwischen der humanen und der murinen Sequenz an, die oberhalb von 50% liegen. Die Grafik wurde durch Verwendung des Programms MultiPipMaker erstellt.

### 3.2 Phylogenetische Untersuchungen

Durch eine Suche mit dem BLASTP-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1995) in der nonredundant (nr)-Datenbank des NCBI wurden neben dem humanem ADAM10-Protein selbst ((NP\_001101, Homo sapiens (Mensch)) eine Reihe möglicher orthologer Proteine aus anderen Spezies gefunden:

CAH92668	<i>Pongo pygmaeus</i> (Orang-Utan)
NP_031425	<i>Mus musculus</i> (Maus)
XP_217197	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)
NP_776921	<i>Bos taurus</i> (Rind)
NP_989592	<i>Gallus gallus</i> (Huhn)
AAM34686	<i>Xenopus laevis</i> (Frosch)
NP_956714	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)
CAF99588	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Kugelfisch)
XP_393114	<i>Apis mellifera</i> (Honigbiene)
EAA10101	<i>Anopheles gambiae</i> (Anopheles-Mücke)
NP_492377	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)

Die gefundenen Aminosäuresequenzen der verschiedenen Spezies wurden mit dem Alignment-Programm Clustal X verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die einzelnen Domänen zwischen den Spezies hochkonserviert vorliegen. Hervorheben kann man die Konservierung des Cysteinrestes, der für den so genannten „Cystein-Switch“ innerhalb der Prodomäne von Bedeutung sein könnte (Loechel *et al.*, 1998 und 1999). Auch die Proproteinkonvertase-Spaltstelle am Ende der Prodomäne findet sich in den meisten Spezies wieder. Die Histidinreste im katalytischen Zentrum des ADAM10-Proteins sind bei alle Spezies konserviert. Einige Aminosäuren der Disintegrin-Schleife, der disintegrinähnliche Domäne, der prolinreichen Sequenz und der cytoplasmatischen Domäne sind ebenfalls stark konserviert. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen, wie auch eine putative Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle finden sich in den meisten anderen Spezies (siehe Anhang, Abbildung 6.2 und 6.3).

Auf Grundlage des Aminosäuresequenzvergleiches wurde eine *neighbor-joining*-Stammbaumanalyse mit dem Programm MEGA2 erstellt, die den Verwandtschaftsgrad der ADAM10-Proteine aufzeigt (2.9.3 und Anhang, Abbildung 6.4). Die Zuverlässigkeit der Stammbaumtopologie wurde mit der *bootstrap*-Analyse überprüft (2.9.3).

Der mit Hilfe des Programms MrBayes erstellte *Maximum-Likelihood*-Stammbaum zeigt im Wesentlichen eine sehr ähnliche Topologie. Beide Protein-Bäume reflektieren bekannte phylogenetische Verwandtschaften von Taxa, so z.B. die Mensch-Orang-Utan- und Ratte-Maus-Verzweigung, sowie die Verwandtschaft von *Bos taurus* mit den anderen Mammaliern und die basale Stellung von *Gallus*, *Xenopus* und den Fischen relativ zu den Säugern. Schwach unterstützt

sind die Verzweigungen der ADAM10-Bäume im Bereich der frühen Vertebratenevolution, wo sich leichte Differenzen zwischen dem Protein-Baum und der Speziesphylogenie ergeben.

Auffällig in den ADAM10-Bäumen sind einige lange Äste mit offenbar relativ schneller Sequenzevolution, so z.B. in der Linie der Ratte, sowie besonders im Falle des *Caenorhabditis elegans*-Proteins.

Kuzbanian (KUZ, T13809), eine konservierte Disintegrin-Metalloproteinase, das bei der Neurogenese in *Drosophila* eine Rolle spielt, hat in einigen Teilbereichen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zum humanen ADAM10-Protein. Es unterscheidet sich aber stark in der Länge der Aminosäuresequenz: 1239 Aminosäuren im KUZ der Fruchtfliege stehen 748 Aminosäuren des ADAM10-Proteins beim Menschen gegenüber. Da derzeit unklar ist, wie diese längere Aminosäuresequenz zustande kommt, und ob es sich hier bei KUZ um das zu ADAM10 orthologe Gen handelt, erfolgte die Stammbaumanalyse ohne die Einbeziehung der Aminosäuresequenz von Kuzbanian.

### **3.3 Transkriptionsstartpunkte des humanen ADAM10-Gens**

Um das bisher unbekanntes 5'-Ende der humanen ADAM10-cDNA zu ermitteln, wurde zunächst versucht mittels RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) den genauen Startpunkt der Transkription des humanen ADAM10 zu finden. Als Ausgangsmaterial für die 5'-RACE diente mRNA aus HEK293-Zellen (2.6.5.2). Die Erststrangsynthese (Reverse Transkription) wurde mit verschiedenen Enzymen durchgeführt (2.6.5.13). Anschließend wurde die cDNA über den PCR-Purification Kit gereinigt. Zur Bindung der Primer SMART II for bzw. hAD10RACE\_for2, die über mehrere Guaninnukleotide verfügen, wurden in der *Tailing* Reaktion durch die terminale Transferase (TdT) Cytosinnukleotide an die cDNA angehängt (Abbildung 2.5). Die *Tailing* Reaktion wurde durch Vorversuche an verschiedenen Promotorkonstrukten überprüft. Auch die PCR Kontrollen an Plasmid-DNA, die die ADAM10-cDNA enthielten, verliefen positiv. Trotzdem kam es bei der PCR an dC-getailter cDNA nur zur Bildung von Primerdimere. Mit Hilfe der RACE-Technik gelang es nicht, ein Amplifikat herzustellen. Dies lag möglicherweise daran, dass die ADAM10-cDNA über starke Sekundärstrukturen verfügt und nur gering exprimiert ist. Für eine niedrige Expressionsrate sprechen Daten, die mit Affimetrix-DNA-Chips erhalten wurden und sich bei der Genecard zu ADAM10 finden ([www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)). Selbst durchgeführte Echtzeit RT-PCR Experimente ergaben eine Differenz der ct-Werte zwischen humanem ADAM10 und GAPDH von 7. Bei einer idealen Reaktionseffizienz der RT-PCR entspricht eine Differenz von 3,322 einem Verdünnungsfaktor von 10. Dies bedeutet, dass die mRNA-Menge von GAPDH um den Faktor 1000 größer ist als die mRNA-Menge von ADAM10.

## Ergebnisse

Im Folgenden wurde über die EST-Analyse (*expressed sequence tag*) nach dem Transkriptionsstartpunkt gesucht. Die ersten 444 bp der humanen ADAM10-cDNA stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle ATG wurden für eine BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990) gegen die EST-Datenbank verwendet. Mit dieser Methode konnten unterschiedlich lange 5'-untranslatierte Bereiche ermittelt werden (Tabelle 3.3). Neben der Suche nach dem Transkriptionsstartpunkt zeigt die EST Analyse auch die Gewebsverteilung der Expression von ADAM10 an (Tabelle 3.3). Das humane ADAM10-Gen wird in sehr vielen Geweben exprimiert.

**Tabelle 3.3:** ESTs des humanen ADAM10.

ESTs	Länge des 5'-Bereichs (ATG +1)
BM787941 (Magen)	-41 bp
BG529940 (Hoden), BM832725 (Magen)	-60 bp
BG502824 (Hoden)	-66 bp
BX490092 DKFZ, BG535075 (Lunge)	-96 bp
BM931211 (Augen)	-108 bp
CB989710 (Plazenta), CB989571 (Plazenta)	-110 bp
BQ425786 (Gebärmutter)	-120 bp
BP380593 (Neuroblastomazellen), AU077190	-140 bp
AL701538 DKFZ	-144 bp
BP278988 (Gliomazellen)	-154 bp
BG328482 (Darm), BP344582 (Synovialmembran)	-162 bp
BX474133 DKFZ, BM785695 Magen	-173 bp
BQ423636 (Haut)	-176 bp
BP350736 ( <i>sqaumous</i> )	-179 bp
BI462507 (Hoden)	-185 bp
BP351589 ( <i>sqaumous</i> )	-193 bp
BG171245 (Niere), BF033257 (Eierstöcke), BM835390 (Magen), AL521862 (Neuroblastomazellen), BX489857 DKFZ, AL696201 DKFZ, AL521861 (Neuroblastomazellen), BX481361 DKFZ, BQ681245 (Haut), BQ681504 (Haut), BQ684174 (Haut), BX498019 (Leber), AL708404 DKFZ, BE934813 (Genick), BX502202 (Leber), BP365329 (Lunge), BP361405 (Thalamus), BP356651 ( <i>mammary glands</i> T47D), BP337390 (Muskelzellen der Koronararterie), BP320313 (Plazenta), CN277180 (Stammzellen), CN277178 (Stammzellen), CN277169 (Stammzellen), BX957073 DKFZ, BX956789 DKFZ, BX955316 DKFZ, BX955309 DKFZ, BX951309 DKFZ, BX646307 DKFZ, BP246919 (Niere), AL696201 DKFZ, BP237606 (Leber)	-200 bp

Die meisten und längsten ESTs begannen 200 bp stromaufwärts vom ATG. Hier könnte ein möglicher Startpunkt für die Transkription des humanen ADAM10-Gens liegen. Neben diesem Startpunkt zeugen weitere kürzere ESTs von mehreren alternativen Transkriptionsstartpunkten.

Möglicherweise sind diese kürzeren ESTs aber nur Abbauprodukte der eigentlichen mRNA, bedingt durch die Aufbereitung der Proben.

In der NCBI-Datenbank findet sich unter den Zugangsnummern NM001110 und AF09615 die humane ADAM10-cDNA mit einem 444 bp stromaufwärts vom ATG gelegenen Startpunkt. Auch an dieser Stelle könnte ein möglicher Transkriptionsstartpunkt liegen. So scheint es mehrere alternative Startpunkte für die Transkription im humanen ADAM10-Promotor zu geben.

### **3.4 Vergleich der 5'-untranslatierten Regionen der ADAM10-Gene von Mensch, Maus und Ratte**

Für die mRNA von ADAM10 fand sich beim Menschen und bei der Maus eine sehr hohe Sequenzidentität von 90%. Die Sequenzidentität auf der Aminosäureebene lag bei diesen Spezies bei 90%. Der mVista Vergleich (2.9.2.1) der 5'-untranslatierte Region von humanem und murinem ADAM10 zeigt eine beachtliche Übereinstimmung von 78% innerhalb der ersten 479 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt (Abbildung 3.4, 3.5 und 3.6). Die Übereinstimmung der Sequenz zwischen Mensch und Ratte liegt in den ersten 390 bp ebenfalls bei 78%. Beim Vergleich der Maus und Ratten ADAM10 5'-untranslatierten Region lag diese Übereinstimmung über den gesamten Bereich von 2200 bp bei 87% (Abbildung 3.5 und 3.6).

Durch Analyse der humanen 5'-untranslatierten Region mit dem Programm MatInspector (2.9.2.1) wurden zahlreiche mutmaßliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Oct-1, CREB1/cJun, Sp1, Maz, CAAT-Box, USF, MZF-1, RXR, NFκB and CDPCR3HD) identifiziert. Einige dieser Bindungsstellen sind in allen drei Spezies konserviert (Sp1, CAAT-Box, USF, RXR, MZF-1, NFκB). Daher ist es gut möglich, dass die Transkription in den drei Organismen auf gleiche Art reguliert wird. In größerem Abstand zum Transkriptionsstartpunkt geht die relativ große Ähnlichkeit zwischen den drei Spezies stark zurück. Diese stromaufwärts gelegene Sequenz scheint nicht an der Regulation der ADAM10-Expression beteiligt zu sein (Abbildung 3.4).







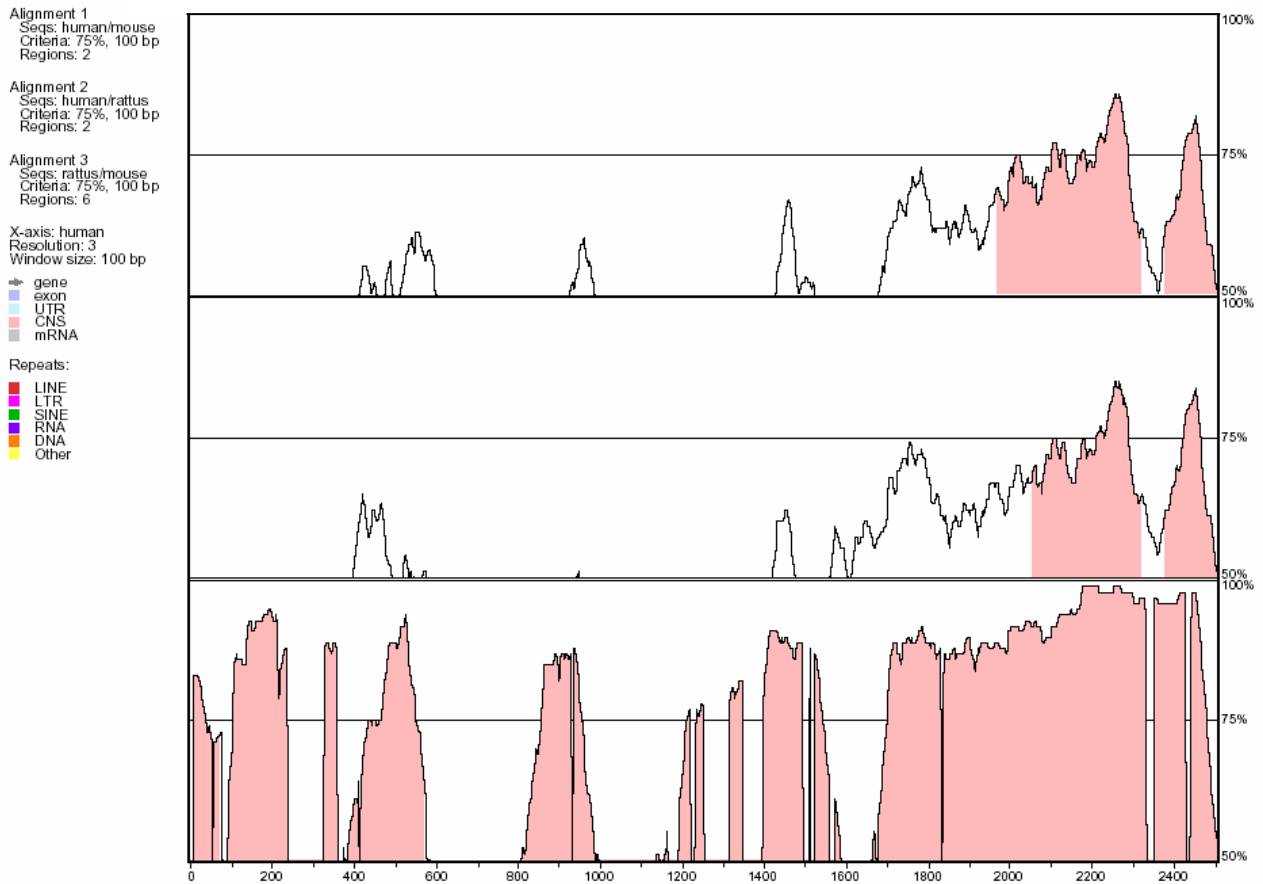


Abbildung 3.6: mVista Vergleich der Promotorregion von Mensch und Maus (oben), Mensch und Ratte (Mitte) und Ratte und Maus (unten).

### 3.5 Analyse der 5'-untranslatierten Region des humanen ADAM10-Gens

Um potentiell wichtige Regulatorelemente innerhalb des 5'-untranslatierten Bereichs des humanen ADAM10-Gens zu finden, wurden verschiedenen Transkriptionsfaktordatenbanken (MatInspector, rVista) verwendet. Die Analyse der ersten 2179 bp unmittelbar stromaufwärts vom Translationsstartpunkt erbrachte eine Reihe unterschiedlicher „*cis-acting*“ Elemente mit einer 100%igen Kern- und größer als 90%iger Matrixübereinstimmung zu den dokumentierten Transkriptionsfaktorerkennungsstellen. In den Abbildungen 3.4 und 3.5 ist die Sequenz des humanen ADAM10-Gens mit den konservierten Bindungsstellen für verschiedenen Transkriptionsfaktoren mit entsprechender Kernregion wiedergegeben (Brn-2, SREBP, Oct-1, CREB1/cJun, GC-Box, CAAT-Box, Sp1, USF, Maz, MZF-1, NFκB, RXR und CDPCR3HD).

Der GC-Gehalt der ersten 600 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt ist 67%. Der 5'-untranslatierte Bereich ist eingebettet in eine große GC-reiche Domäne (900 Nukleotide), die beim Nukleotid -700 über das erste Exon bis zum Nukleotid +200 reicht. Diese Region ist

charakteristisch für CpG Inseln (Bird, 1986, Larsen *et al.*, 1992). Neun CpG Inseln wurden durch Internetrecherche mit dem Programm ITBA-CNR gefunden (2.9.2.1). Das Vorliegen von CpG Inseln deutet darauf hin, dass die ADAM10-Expression durch DNA-Methylierung moduliert sein könnte.

Die Computer unterstützte Sequenzanalyse identifizierte keine klassische TATA box in der Umgebung der Transkriptionsstartpunkte. Alternativ wurde nach einer Initiationssequenz (Inr) mit der Sequenz Py-Py-A-N-A/T-Py-Py, Py ist C oder T (Weis and Reinberg, 1997; Smale, 1997; Javahery *et al.*, 1994) gesucht, jedoch wurde keine charakteristische Inr-Sequenz in der Nähe der möglichen Transkriptionsstartpunkte entdeckt. Jedoch wurden eine klassische CAAT-Box bei -480 bp und zwei Sp1-Bindungsstellen, (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/A), bei -521 bp und -366 bp (Abbildung 3.4 und 3.5), ermittelt. Durch diese Regulatorelemente sind die Voraussetzungen für eine Transkriptionsinitiation gegeben (Smale, 1997).

Weitere Analysen identifizierten zwei potentielle Bindungsstellen für den nervensystem-spezifischen Faktor Brn-2 (-1972 und -1737) mit der Konsensussequenz NNCATNSRWAATNMRN (He *et al.*, 1989, Li *et al.* 1993). Vier mögliche Bindungsstellen für das SREB-Protein (*sterol regulatory element binding protein*) (Yokoyama *et al.*, 1993) wurden innerhalb der humanen ADAM10 5'-Region lokalisiert: bei -1801 bp, -1623 bp, -1377 bp und -1240 bp. Der ADAM10-Promotor hat außerdem potentielle Bindungsstellen für die ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren Oct-1 (-780) (Sturm *et al.*, 1988) und Sp1 (-521 und -366) (Stroem *et al.*, 1996, Yieh *et al.*, 1995).

Zusätzlich konnten beim Vergleich der humanen, Maus und Ratten ADAM10 5'-Region verschiedenen Motive identifiziert werden, die in allen drei Spezies vorkommen (Abbildung 3.4 und 3.5): die Sp1-Bindungsstellen (-521 und -366), die CAAT-Box (-479) und potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren USF (*upstream stimulatory factor*) (-317), MZF-1 (-237), RXR (-203), NFκB (-198) und das CAAT *displacement protein* CDPCR3HD (-57). Der hohe Grad an Konservierung der potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen zwischen den beiden Spezies deutet auf deren biologische Relevanz hin.

Die 5'-Region des humanen ADAM10-Gens beinhaltet ebenfalls zwei Tandemwiederholungen der Dinukleotide CA (-1307/-1285 and -1172/-1138) (Abbildung 3.4). Diese repetitive Sequenz wurde mehrere Male im humanen and Maus Genom gefunden (Rietveld *et al.*, 2003). CA-Dinukleotidwiederholungen sind an der Modulation der Expression beteiligt (Shimajiri *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2003) und in einigen Fällen mit Krankheiten assoziiert (Fornoni *et al.*, 2002; Kitawaki *et al.*, 2002).

### 3.6 Isolation der 5'-untranslatierten Sequenz des humanen ADAM10-Gens

Der BAC-Klon RPCI 11 123C21 (AC0099443, Children's Hospital Oakland-BACPAC Resources, Oakland, CA, USA) enthält einen Teilbereich des menschlichen Chromosoms 15, mit einem Teil des humanen ADAM10-Gens. Durch den Sequenzvergleich des BAC-Klons mit der humanen ADAM10-cDNA-Sequenz (NM\_001101, AF009615) unter Verwendung der Programme BLAST und BLAST2 wurde der 5'-untranslatierter Bereich des humanen ADAM10-Gen identifiziert. Durch vergleichende Analysen (SPIDEY) mit der ADAM10-cDNA und der genomischen Sequenz des humanen ADAM10-Gens wurde unter Berücksichtigung der GT-AG Regel die Lage der Exon/Intron-Übergänge ermittelt.

Die DNA des BAC-Klons RPCI 11 123C21 wurde über den Mini Prep Plasmid Kit (QIAGEN) gereinigt.

### 3.7 Klonierung der Luciferase-Reporterkonstrukte

Mit dem Primerpaar hAD10Profor4 $\leftrightarrow$ hAD10Prorev5 und einem Polymerasegemisch (5 U Q-Tag- und 1 U Pfu-Polymerase) wurde eine PCR an der isolierten BAC-DNA RPCI 11 123C21 bei einer Annealingtemperatur von 54°C durchgeführt (Tabelle 3.4). Auf diese Weise entstand das erwartete ca. 2800 bp große Amplifikat, an das mittels Taq-DNA-Polymerase Adeninnukleotide angehängt wurden. Ebenso wurden an den zuvor *EcoRV* geschnittenen pUC57 Vector Thymidinnukleotide angehängt. Beide Fragmente wurde zum Plasmid pCP7 ligiert (2.6.5.9.5) und in *E. coli* transformiert (2.6.4.1).

Der Vektor pUC57 enthält ein Ampicillin-Resistenzgen und ein  $\beta$ -Galaktosidasegen. Positive weiße Klone, die den Vektor mit Insert innerhalb des  $\beta$ -Galaktosidasegens aufgenommen haben, können so durch Blau-Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal-haltigen LB-Ampicillin-Platten identifiziert werden. Der weiße Klon CP7b.5 wurde vereinzelt, eine Dauerkultur angelegt (2.6.2) und die Plasmid-DNA gereinigt (2.6.5.1.2).

Da durch die PCR mit dem Primerpaar hAD10Profor4 $\leftrightarrow$ hAD10Prorev5 nicht nur der potentielle Promotorbereich amplifiziert worden war, sondern auch ein Bereich des Plasmids pBACe3.6, musste diese nicht benötigte Region entfernt werden. Die Plasmid-DNA von CP7b.5 aus dem methylierungsdefekten *E. coli* Stamm SCS 110 konnte mit beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Cla*I geschnitten werden. Durch den *Cla*I-Schnitt wurde der Vektor CP7b.5 linearisiert. Anschließend wurde durch *Bam*HI die pBACe3.6 Region vom ADAM 10-Promotorbereich entfernt. Das so entstandene 2179 bp große, promotorhaltige Fragment wurde aus einem ethidiumbromidfreien Agarosegel isoliert und anschließend einer T4-DNA-Polymerasebehandlung

unterzogen. Das so vorbereitete Promotorfragment wurde mit dem *SmaI* geschnitten und dephosphorylierten Luciferase-Vektor pGL3-Basic zum Plasmid pCP9 ligiert (2.6.5.9.5). Über LB-Ampicillin-Platten wurden mehrere Klone vereinzelt und die Plasmid-DNA nach der Schnell-Methode isoliert (2.6.5.1.1). Zur Überprüfung der Klonierung wurden alle Plasmidpräparationen mit *HindIII* geschnitten und auf einem Gel analysiert (2.6.5.9.1). Der Klon mit der Plasmid-DNA pCP9.3 wurde erneut vereinzelt, anschließend wurde eine Plasmidpräparation angefertigt und die Richtigkeit der Sequenz durch Sequenzierung überprüft. Nach Verifizierung der Promotorsequenz wurde von Klon CP9.3 eine Dauerkultur angelegt (2.6.2) und die Plasmid-DNA im Großmaßstab isoliert (2.6.5.1.4).

## Ergebnisse

**Tabelle 3.4:** Herstellung der ADAM10-Promotorkonstrukte (siehe auch Anhang 6.1)

Name	Klonierungsvektor	Insert
CP7b.5	pUC57T, <i>EcoRV</i> , Thymin	BAC RPCI 11 123C21 hAD10Profor4⇔hAD10Prorev 5'-CGTCGAACTTATCGCTGTCTT-3'⇔5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' 2800 bp PCR-Produkt Adenin
CP9.3 (-2179/-54)	pGL3-Basic, <i>SmaI</i> , dephosphoryliert	CP7b.5 <i>ClaI</i> , <i>BamHI</i> , T4 2129 bp Fragment
CP14.8 (-2179/-508)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP7b.5 <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> 1674 bp Fragment
CP47.2 (-2093/-444)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 12 5'-TTGT <b>GGATCC</b> GCACTACCACAAGAGATTAG-3'⇔5'-CCTGTCCGCCGGCGGAGAGCTG-3' <i>BamHI</i> 1500 bp
CP17.1 (-2093/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor6⇔hAD10Prorev7 5'-TTGT <b>GGATCC</b> GCACTACCACAAGAGATTAG-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 1661 bp
CP21.1 (-1754/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor7⇔hAD10Prorev7 5'-GTTG <b>GGATCC</b> CGAGACCAGCCTAACCAACAT-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 1224 bp
CP23.1 (-1193/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Pro for 9⇔hAD10Pro rev 7 5'-TGGC <b>GGATCC</b> GCGGAGACCTGTCTTTAG-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 750 bp
CP28.1 (-889/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor11⇔hAD10Prorev7 5'-TGG <b>AGGATCC</b> AGACAGTCTGGTTCAGGTT-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 459 bp
CP29.2 (-762/-433))	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor12⇔hAD10Prorev7 5'-TTG <b>AGGATCC</b> TTGCATTTATGTTCGCATC-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 332 bp
CP30.1 (-684/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor13⇔hAD10Prorev7 5'-CTTG <b>GGATCC</b> GTGGTGCACCAAGAGAGGC-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 244 bp
CP31.3 (-608/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor14⇔hAD10Prorev7 5'-GAA <b>AGGATCC</b> CTTGCTTACATCTTCCACGG-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 178 bp
CP34A.1 (-555/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor15⇔hAD10Prorev7 5'-CTC <b>AGGATCC</b> CTAACACGTAGCGGAGCAC-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 122 bp
CP35.1 (-497/-433)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Profor16⇔hAD10Prorev7 5'-CCCC <b>GGATCC</b> AGGACAAACCCCGCCTCCC-3'⇔5'-CTGCCGCCGCTTCCTGTCCG-3' <i>BamHI</i> 64 bp
CP38.8 (-467/-30)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	BAC RPCI11 123C21 hAD10Profor18⇔hAD10Prorev2 5'-AGCC <b>GGATCC</b> CAGCTCTCCGCCGGCGGAC-3'⇔5'-ACACTCTAGCAACACCATCT-3' <i>BamHI</i> 150 bp
CP42.3 (-444/-30)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Pro for 19⇔hAD10Pro rev 10 5'-GAC <b>AGGATCC</b> GGCGGCAGGCCTAGCAGCACGGGAAC⇔ 5'-TCTCAGCAACAC <b>AAGCTT</b> CCGCTGCCGCTG-3' <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> 500 bp
CP49.2 (-300/-1)	pGL3-Basic, <i>HindIII</i> , T4, <i>BgIII</i>	CP9.3 hAD10Pro for 21⇔hAD10Pro rev 10 5'-GTG <b>AGGATCC</b> AGGCGGAGGTCTGAGTTTC-3'⇔5'-TCTCAGCAACAC <b>AAGCTT</b> CCGCTGCCGCTG-3' <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> 1500bp

Durch Verkürzungen des 3'- und 5'-Promotorbereiches sollte der Minimalpromotor bestimmt und mögliche wichtige regulatorische Elemente identifiziert werden. Die 3'-Verkürzung erfolgte über die Restriktion des Plasmids pCP7b.5 mit den Enzymen *SmaI* und *BamHI*. Das 1674 bp große Fragment wurde mit dem *Firefly*-Luciferase-Reportervektor pGL3-Basic (*HindIII*, T4, *BglII*) zum Plasmid pCP14.8 fusioniert (Tabelle 3.4). Die weiteren Deletionskonstrukte der 5'-Region des humanen ADAM10-Gens wurden meist durch Amplifizierung eines Teilbereiches der Plasmid-DNA des ersten Klons CP9.3 (-1735/+390) und deren Einbau in den *Firefly*-Luciferase-Reportervektor pGL3-Basic gewonnen (Tabelle 3.4). Der Vorwärtsprimer wurde so gewählt, dass er eine *BamHI* Schnittstelle enthielt. Der Rückwärtsprimer wurde mit einer *HindIII*-Schnittstelle versehen (Tabelle 3.4).

*E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit dem jeweiligen Ligationsansatz transformiert (2.6.4.1) und anschließend auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen. Sechzehn Einzelklone wurden ausgestrichen und aus diesen wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.6.5.1.1). Die Zusammensetzung der Plasmid-DNAs wurde durch Sequenzierung (Sequenzierprimer GL\_rev bzw. GL\_for) von der Firma Genterprise (Mainz) abgesichert (2.9.3). Von jedem Klon wurde eine Dauerkultur angelegt (2.6.2) und die Plasmid-DNA im Großmaßstab mit dem EndoFree Plasmid Kit (QIAGEN) isoliert (2.6.5.1.4).

### **3.8 Transiente Transfektionen von unterschiedlichen Zelllinien mit dem ADAM10-Promotorkonstrukt pCP53AB.1 (-2179/-1)**

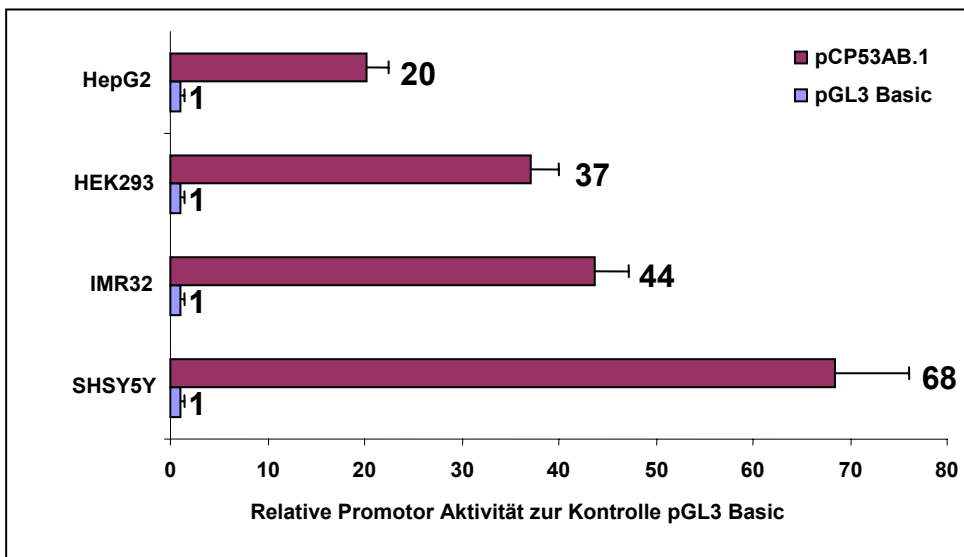
Durch PCR wurden 2179 bp der 5'-Region stromaufwärts des Translationsstartpunktes hergestellt. Um zu untersuchen, ob dieses genomische DNA-Fragment die Promotorregion des humanen ADAM10-Gens enthält, wurde sie in das *Firefly*-Luciferase-Reporterplasmid pGL3-Basic (Promega) kloniert. Der pGL3-Basic Vector enthält keinen eukaryotischen Promotor und keine Enhancersequenz stromaufwärts des Luciferase-Reportergens. Die Expression der Luciferaseaktivität in transfizierten Zellen ist somit abhängig von einem funktionalen Promotor direkt stromaufwärts der Luciferase-cDNA. Das pCP53AB.1 Plasmid wurde so konstruiert, dass die humane ADAM10 5'-Region von -2179 bis -1 stromaufwärts vom Luciferase Reporter Gen eingebaut wurde.

Weil ADAM10 ubiquitär exprimiert wird (Wolfsburg *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1996), wurde zunächst überprüft, ob der humane ADAM10-Promotor in verschiedene Zelllinien aktiv ist. Dazu wurde die Zelllinien HEK293, HepG2, SHSY5Y und IMR32 mit der Plasmid-DNA pCP53AB.1 (-2179/-1) und mit dem Normierungsvektor phRL-SV40, welcher die *Renilla*-Luciferase kodiert, transient transfiziert. Diese Zellen sollen stellvertretend für die verschiedenen menschlichen Gewebe stehen, wie Niere, Leber und neuronales Gewebe. Zur Kontrolle wurden dieselben

## Ergebnisse

Zelllinien mit dem Luciferase Vektor pGL3-Basic ohne Promotor und mit dem Normierungsvektor phRL-SV40 transfiziert. Zur Transfektion wurde Lipofectamine2000 (Invitrogen) verwendet. Nach drei Tagen wurden die Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität gemessen. Die relative Luciferaseaktivität einer Probe wurde durch das Verhältnis der *Firefly*-Luciferaseaktivität zur Aktivität der *Renilla*-Luciferase normiert.

Nach Transfektion der ADAM10-Promotorregion in pCP53AB.1 wurde die relative Luciferaseaktivität in SHSY5Y gegenüber dem leeren Vektor pGL3-Basic um das 68-fache gesteigert, in HEK293-Zellen um das 37-fache, in IMR32 Zellen um das 44-fache und in HepG2 Zellen um das 20-fache (Abbildung 3.7). Diese Versuche zeigen, dass die Region von -2179 bis -1 stromaufwärts vom ADAM10-Translationsstartpunkt tatsächlich Promotoraktivität besitzt.



**Abbildung 3.7:** Vergleich der ADAM10-Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien.

Die Zelllinien wurden mit dem Plasmid pCP53AB.1 (-2179/-1) transient transfiziert, welches die humane ADAM10 5'-Region (-2179/-1) fusioniert mit dem *Firefly*-Luciferasegen enthält. In allen Zelllinien ist der ADAM10-Promotor aktiv und induziert die *Firefly*-Luciferaseexpression. Um die relativen Lichteinheiten (RLU) zwischen den verschiedenen Zelllinien zu vergleichen, wurde die  $RLU_{pGL3}$  mit dem promotorlosen pGL3-Basic Vektor auf 1 gesetzt. Alle Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Transfektionsexperimenten, jedes in Triplikaten angefertigt.



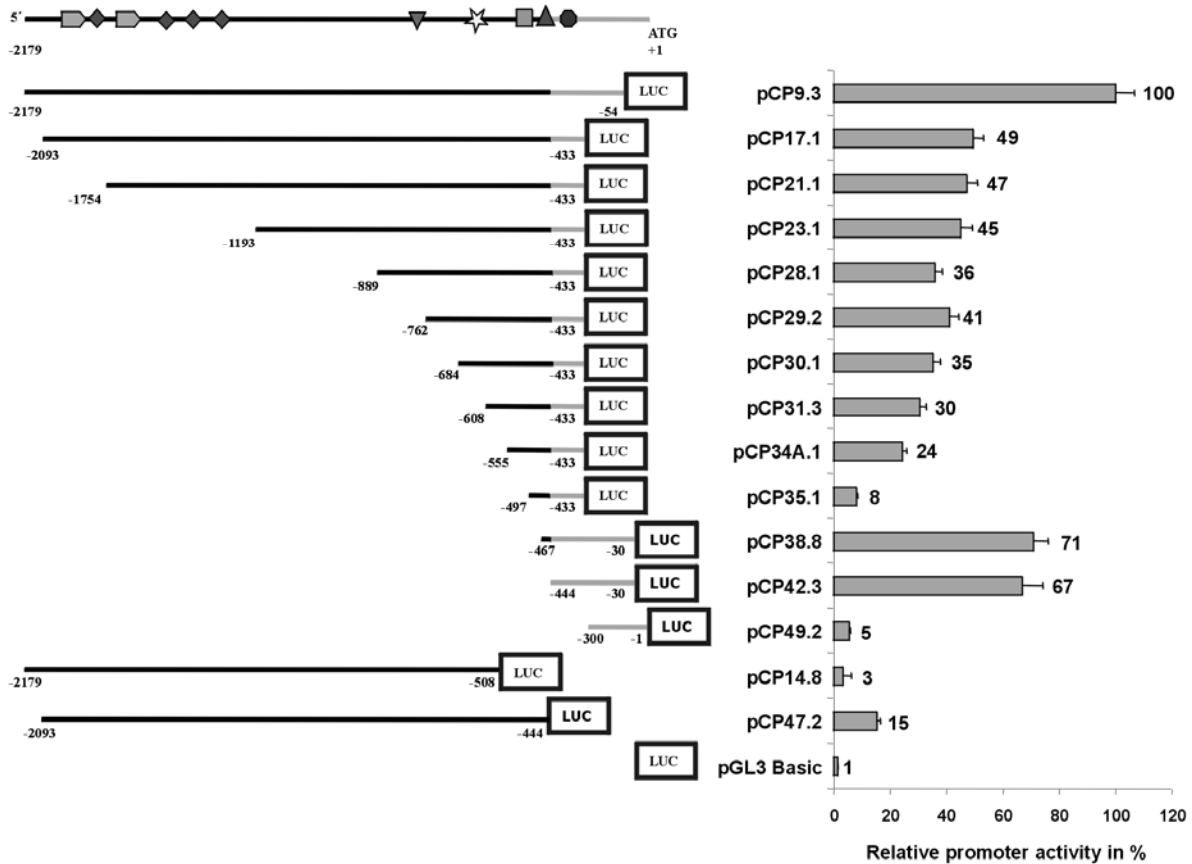
### **3.9 Transiente Transfektionen von HEK293-Zellen mit verkürzten ADAM10-Promotorkonstrukten**

Um herauszufinden, welcher 5'-Bereich für die Transkription des humanen ADAM10-Gens essentiell ist und welche Regionen in die Regulation der ADAM10-Transkription eingreifen, wurden unterschiedliche 3'- und 5'-ADAM10-Promotorkonstrukte [pCP9.3 (-2179/-54), pCP14.8 (-2179/-508), pCP47.2 (-2093/-444), pCP17.1 (-2093/-433), pCP21.1 (-1754/-433), pCP23.1 (-1193/-433), pCP28.1 (-889/-433), pCP29.2 (-762/-433), pCP31.3 (-608/-433), pCP34A.1 (-555/433), pCP35.1 (-497/-433), pCP38.8 (-467/-30), pCP42.2 (-444/-30), pCP49.2 (-300/-1)] hergestellt und in das Reporter Plasmid pGL3-Basic kloniert (Tabelle 3.5a, Tabelle 3.5b und Abbildung 3.8).

Es erfolgte ein Lipofectamine2000-vermittelte Kotransfektion der ADAM10-Promotorkonstrukte und des Normierungsvektors phRL-SV40 in HEK293-Zellen. Nach drei Tagen wurden alle Zellen lysiert und die Luciferaseaktivitäten mittels des Luciferase-Reporter-Tests am Chemiluminometer gemessen (2.7.2.5). Der Vergleich der normierten RLU eines Konstruktes gibt indirekt Aufschluss, in wie weit der jeweilige Promotorabschnitt zu einer Beeinflussung der Transkription des ADAM10-Gens beiträgt.

Der Promotorbereich im Plasmid pCP9.3 (-2179/-54) zeigte die höchste Promotoraktivität und dessen  $RLU_{CP9.3}$  wurde auf 100% gesetzt ( $p < 0,001$  zu allen anderen Konstrukten).

Eine Serie von Deletionskonstrukten pCP17.1 (-2093/-433), pCP21.1 (-1754/-433), pCP23.1 (-1193/-433), pCP28.1 (-889/-433), pCP29.2 (-762/-433), pCP30.1 (-684/-433), pCP31.3 (-608/-433), pCP34A.1 (-555/-433) und pCP35.1 (-497/-433), welche ein gemeinsames 3'-Ende (nt -433) aufwiesen, aber unterschiedliche 5'-Enden besaßen, zeigten eine Promotoraktivität zwischen 8% und 49% (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung der ADAM10-Promotordeletionskonstrukte und deren Aktivitäten. Auf der linken Seite sind schematisch die ADAM10-Promotordeletionskonstrukte dargestellt. Auf der rechten Seite sind die relativen Promotoraktivitäten in den transient transfizierten HEK293-Zellen dargestellt. Die gemessene *Firefly*-Luciferaseaktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferaseaktivität des kotransfizierten Plasmids phRL-SV40 normiert. Die höchste ADAM10-Promotoraktivität wurde bei der transienten Transfektion des Plasmids pCP9.3 (-2179/-54) festgestellt und wurde auf 100% gesetzt. Alle Säulen repräsentieren den Anstieg der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Aktivität des Plasmids pCP9.3 (-2179/-54) und sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Promotoraktivität des Plasmids pCP17.1 (49%) war im Vergleich zum Plasmid pCP9.3 ( $p < 0,001$ ) niedriger, aber nicht signifikant unterschiedlich zu denen der Plasmide pCP21.1, pCP23.1 and pCP29.2 ( $p > 0,005$ ). Die Deletionskonstrukte pCP21.1, pCP23.1, pCP28.1, pCP29.1, pCP30.1 und pCP31.3 unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Aktivität ( $p > 0,005$ ), waren aber alle signifikant aktiver als der promotorlose Vektor pGL3-basic ( $p < 0,001$ ).

**Die niedrigeren Promotoraktivitäten dieser Konstrukte implizieren, dass die Region zwischen -433 and -54 Elemente enthält, die für die ADAM10-Expression wichtig sind.**

Die Transfektion des Plasmid pCP34A.1 (-555/-433) führte zu einer Promotoraktivität von 24%, welche signifikant unterschiedlich zu denen der Plasmid pGL3-basic and pCP9.3 (-2179/-54) ( $p < 0,001$ ) ist, jedoch nicht zu pCP47.2 (-2093/-444) ( $p > 0,005$ ). Eine weitere Deletion des 5'-Endes

bis -497 (Plasmid pCP35.1) reduzierte die Promotoraktivität nahezu bis zur Hintergrundaktivität des promotorlosen Plasmids pGL3-basic ( $p > 0,005$ ).

**Diese Daten implizieren, dass weder positive noch negative Regulatorelemente in der Region zwischen -2093 and -555 existieren, und dass die Elemente, die für die ADAM10-Expression wichtig sind stromabwärts von -555 liegen.**

Die Entfernung der zwei Brn-2-Bindungsstellen (-1972 and -1737) und die Deletion der vier SREBP-Bindungsstellen (-1801, -1623, -1377 and -1240) reduzieren nicht die Aktivität des Promotors in HEK293-Zellen. Dieselbe Beobachtung wurde bei Entfernung der Oct-1-(-780) und der CREB1/cJun-Bindungsstelle (-644) gemacht.

Die Promotorregion in den Plasmiden pCP38.8 (-467/-30) and pCP42.3 (-444/-30) zeigte im Vergleich zu dem Plasmid pCP9.3 (-2179/-54) eine Promotoraktivität von 70%. Diese Deletionskonstrukte sind nicht signifikant unterschiedlich in ihrer Aktivität ( $p > 0,005$ ), aber unterschiedlich in ihrer Aktivität im Vergleich zu allen anderen Konstrukten ( $p < 0,001$ ). Die Promotoraktivität diese Konstrukte liegt höher im Vergleich zu den Konstrukten mit dem 3'-Ende bei -433.

**In der Region zwischen -467 and -444 scheinen somit keine Aktivatoren oder Repressoren zu liegen ( $p > 0,005$ , pCP38.8 gegen pCP42.3).**

Das kürzeste Konstrukt mit einer hohen Luciferaseaktivität ist pCP42.3 (-444/-30). Die Deletion der Region zwischen -444 und -300 in pCP49.2 (-300/-1) vermindert die Promotoraktivität auf das Niveau der Hintergrundaktivität des Plasmids pGL3-basic ( $p > 0,05$ ). Auch die Deletion der Region zwischen -508 and -1 (pCP14.8 (-2179/-508)) reduziert die Promotoraktivität auf Hintergrundniveau ( $p > 0,005$  im Vergleich zu pGL3-basic). Das 5'-ADAM10-Promotorfragment in pCP47.2 (-2179/-444), das die Region zwischen -508 and -444 enthält, zeigte ebenfalls eine niedrige Promotoraktivität (15%,  $p < 0,001$  im Vergleich zu pGL3-basic).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass in der Region von -508 und -300 Aktivatoren der ADAM10-Transkription liegen, die kritisch für die basale Promotoraktivität sind. In dieser Region liegen eine CAAT-Box (-479), eine Sp1 Bindungsstelle (-366) und ein USF Element (-317) (Abbildung 3.8). Die Beseitigung dieser möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen in pCP49.2 (-300/-1) reduziert die Promotoraktivität auf Hintergrundniveau (Abbildung 3.8). Somit scheinen die ersten

508 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts wichtig für die basale ADAM10-Promotoraktivität zu sein.

Da die Promotoraktivität bei Entfernung der Region zwischen -1754 and -889 unverändert bestehen bleibt, scheinen die zwei Kopien der CA-Dinukleotidwiederholungen (-1307/-1285 und -1172/-1138) keine wichtige Funktion bei der ADAM10-Genexpression zu spielen.

### **3.10 Punktmutationen im ADAM10-Promotorbereich**

Um zu überprüfen, ob tatsächlich an die konservierten Bindungsstellen die für die Aktivierung notwendigen Transkriptionsfaktoren binden, wurden Punktmutationen in die Sp1-Bindungsstellen, in die CAAT-Box und in das USF-Element im ADAM10-Promotor eingeführt. Dazu wurde die überlappende PCR verwendet: Zwei separate PCR Fragmente für je eine vordere und eine hintere Hälfte eines späteren Hybridproduktes wurden mit nichtmutierten äußeren Primern hAD10Profor6 und hAD10Prorev und mutierten inneren Primern (Tabelle 2.4) hergestellt. Die zwei Amplifikate wurden jeweils aus einem ethidiumbromidfreien Agarosegel isoliert. Das vordere Amplifikat wurde mit dem hinteren Amplifikat gemischt und eine weitere PCR an dieser Matrizen-DNA mit den äußeren Primern durchgeführt. Das PCR-Produkt dieser Reaktion und das *Firefly*-Luciferase-Reporterplasmid wurden geschnitten (siehe Tabelle 3.5a und 3.5b), gereinigt und zu den Konstrukten pCP52AB.1, pCP53AB.1, pCP54AB.1, pCP55AB.1, pCP57AB.1, pCP58AB.1, pCP59AB.1, pCP60AB.1 und pCP61AB.2 fusioniert (Tabelle 3.5a und 3.5b). Zusätzlich wurden von den ersten acht Konstrukten Verkürzungen der Promotorregion mittels *SacI* Schnitt hergestellt. Die Einführung der Punktmutationen wurde bei allen Promotorkonstrukten durch Sequenzierung überprüft (Genterprise).

## Ergebnisse

**Tabelle 3.5a:** Herstellung der Punktmutationskonstrukte

Name	Vektor	Insert
CP52A.6	pGL3, <i>HindIII</i> , T4, <i>BglII</i>	CP7b.5 hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 13 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTTCTCACCAACTGACGCGCGG-3' CP42.3 hAD10Pro for 24⇔hAD10Pro rev 5'-CCGCGCGTCAGTTGGTGAGGAAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' Fusions-PCR hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' T4, <i>BamHI</i> 2100 bp
CP52AB.1 USF (-317)	CP52A, <i>KpnI</i> , <i>StuI</i> 5204 bp	CP9.3 <i>KpnI</i> , <i>StuI</i> 1777 bp
CP53A.15	pGL3, <i>HindIII</i> , T4, <i>BglII</i>	CP7b.5 hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 13A 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTTCTCACACGTGACGCGCGG-3' CP42.3 hAD10Pro for 24A⇔hAD10Pro rev 5'-CGCGCGTCACGTGGTGAGGAAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' Fusions-PCR hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' T4, <i>BamHI</i> 2100 bp
CP53AB.1 Wildtyp	CP53A, <i>KpnI</i> , <i>StuI</i> 5204 bp	CP9.3 <i>KpnI</i> , <i>StuI</i> 1777 bp
CP54A.8	pGL3, <i>HindIII</i> , T4, <i>BglII</i>	CP7b.5 hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 14 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTGGTCCCAACCGGAAAGGGGAGCG-3' CP42.3 hAD10Pro for 25⇔hAD10Pro rev 5'-CGCTCCCCTTCGGTGGGGACCAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' Fusions-PCR hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' T4, <i>BamHI</i> 2100 bp
CP54B.1	CP53AB.1 <i>EcoRI</i> , <i>StuI</i> , 5400 bp	CP54A.8 <i>EcoRI</i> , <i>StuI</i> 1000 bp
CP54AB.1 Sp1 (-521)	CP54B.1 <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> 5750 bp	CP53AB.1 <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> 1230 bp
CP55AB.1 Sp1 (-521) USF (-317)	CP54B.1 <i>StuI</i> , <i>HindIII</i> , 550 bp	CP52AB.1 <i>StuI</i> , <i>HindIII</i> 6430 bp
CP57A.9	pGL3, <i>HindIII</i> , T4, <i>BglII</i>	CP53AB.1 hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 15 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-GCTGGGATGAGGCTTGGG-3' CP53AB.1 hAD10Pro for 26⇔hAD10Pro rev 5'-CCCAAGCCTCATCCCAGC-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' Fusions-PCR hAD10Pro for 6⇔hAD10Pro rev 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTTCCGCTGCCGCTGCCG-3' T4, <i>BamHI</i> 2100 bp

## Ergebnisse

**Tabelle 3.5b:** Herstellung der Punktmutationskonstrukte

Name	Vektor	Insert
CP57AB.1 CAAT (-479)	CP53AB.1, <i>Bst</i> XI, <i>Stu</i> I, 5534 bp	CP57A.9, <i>Bst</i> XI, <i>Stu</i> I 1366 bp
CP58AB.1 CAAT (-479) USF (-317)	CP57AB.1, <i>Stu</i> I, <i>Hind</i> III 550 bp	CP52AB.1, <i>Stu</i> I, <i>Hind</i> III 6430 bp
CP59A12	pGL3, <i>Hind</i> III, T4, <i>Bg</i> II	CP54AB.1 hAD10Pro for 6, hAD10Pro rev 15 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-GCTGGGATGAGGCTTGGG-3' CP54AB.1 hAD10Pro for 26, hAD10Pro rev 5'-CCCAAGCCTCATCCCAGC-3' ⇔ 5'-CTCCGCTGCCGCTGCCG-3' Fusions-PCR hAD10Pro for 6, hAD10Pro rev 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTCCGCTGCCGCTGCCG-3' T4, <i>Bam</i> HI 2100 bp
CP59AB.1 Sp1 (-521) CAAT (-479)	CP9.3, <i>Kpn</i> I, <i>Pvu</i> II, 1476 bp	CP59A, <i>Kpn</i> I, <i>Pvu</i> II 5505 bp
CP60AB.1 Sp1 (-521) CAAT (-479) USF (-317)	CP59AB, <i>Stu</i> I, <i>Hind</i> III, 550 bp	CP52AB.1 <i>Stu</i> I, <i>Hind</i> III 6430 bp
CP61A.1	pGL3, <i>Hind</i> III, T4, <i>Bg</i> II, 4800 bp	CP53AB.1 hAD10Pro for 6, hAD10Pro rev 17 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'- CGCGCCCCTACCTCCCAACCTACCCGTCC-3' CP53AB.1 hAD10Pro for 28, hAD10Pro rev 5'-GGACGGGTAGGTTGGGAGGTAGGGGCGCG-3' ⇔ 5'-CTCCGCTGCCGCTGCCG-3' Fusions-PCR hAD10Pro for 6, hAD10Pro rev 5'-TTGTGGATCCGCACTACCACAAGAGATTAG-3' ⇔ 5'-CTCCGCTGCCGCTGCCG-3' T4, <i>Bam</i> HI 2100 bp
CP61AB.2 Sp1 (-366)	CP9.3, <i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> III, 1234 bp	CP61A.1, <i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> III 5743 bp
CP52C USF (-317)		CP52AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP53C Wildtyp		CP53AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP54C Sp1 (-521)		CP54AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP55C Sp1 (-521) USF (-317)		CP55AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP57C CAAT (-479)		CP57AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP58C CAAT (-479) USF (-317)		CP58AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP59C Sp1 (-521) CAAT (-479)		CP59AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert
CP60C Sp1 (-521) CAAT (-479) USF (-317)		CP60AB.1, <i>Sac</i> I, gereinigt, ligiert

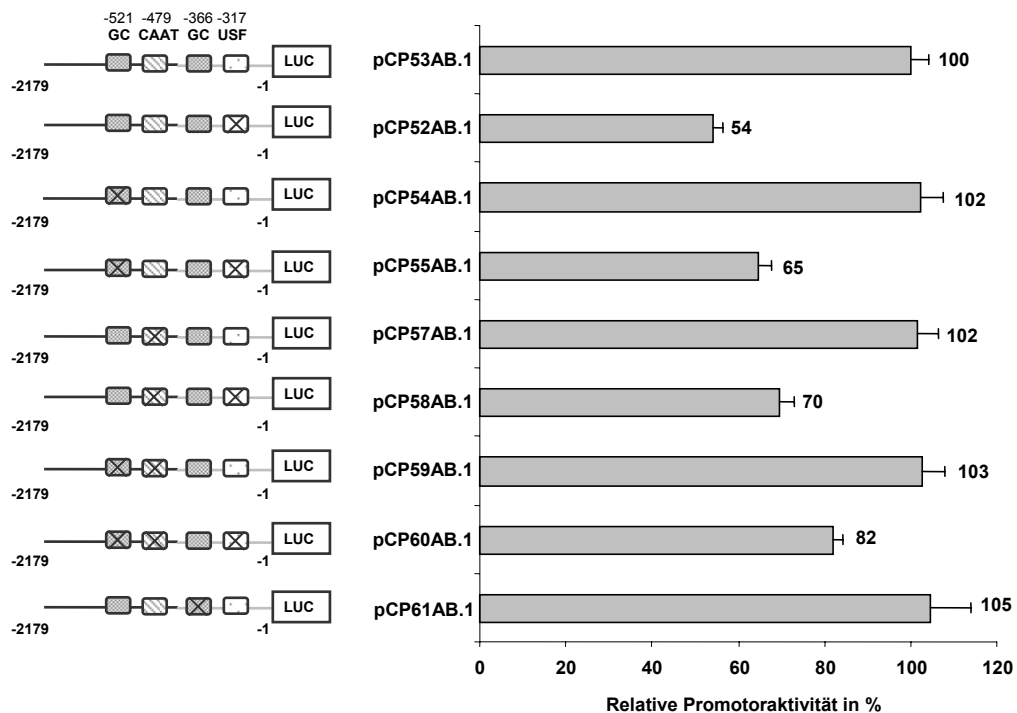
### 3.11 ADAM10-Promotoraktivität nach Einführung von Punktmutationen in konservierten Elementen

Durch die Deletionsanalyse konnte die für die ADAM10-Expression wichtige Region zwischen -508 und -300 bestimmt werden. Konstrukte mit Punktmutationen in den Sp1-Bindungsstellen, in der CAAT-Box und im USF-Element sowie Kombinationen der Punktmutationen im ADAM10-Promotor wurden auf ihre Luciferaseaktivität in transient transfizierten HEK293-Zellen überprüft.

**Tabelle 3.6:** Eingeführte Punktmutationen an den entsprechenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen im ADAM10-Promotor.

Transkriptionsfaktorbindungsstellen	Sequenz
GC-box/Sp1-Stelle (-521)	CGTCCCCGCCCCGGGGCGGGACCAG
Mutierte GC-box/Sp1-Stelle (521)	CGTCCCC <b>CTT</b> CCGG <b>TTG</b> GGGACCAG
Sp1-Stelle (-366)	GGACGGGTAGGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGGACGG
Mutierte Sp1-Stelle (-366)	GTAGG <b>TTG</b> GGAGGTAGGGGCGCG
CAAT-Box (-479)	CCCAAGCCCAATCCCAGC
Mutierte CAAT-Box (-479)	CCCAAGCC <b>TCAT</b> CCCAGC
USF-Stelle (-317)	CGCGCGTCACGTGGTGAGGAAG
Mutierte USF-Stelle (-317)	CGCGCGTCAG <b>TT</b> GGTGAGGAAG

Die Luciferaseaktivitäten der Punktmutanten wurden mit der Luciferaseaktivität des Wildtyps (pCP53AB.1, -2179/-1) verglichen. Wie in den Abbildungen 3.9 und 3.10 gezeigt, wurde die Promotoraktivitäten der Sp1- und CAAT-Mutanten nicht durch die eingefügten Mutationen beeinflusst. Bei den USF-Mutanten kam es hingegen immer zu erniedrigten Promotoraktivitäten.

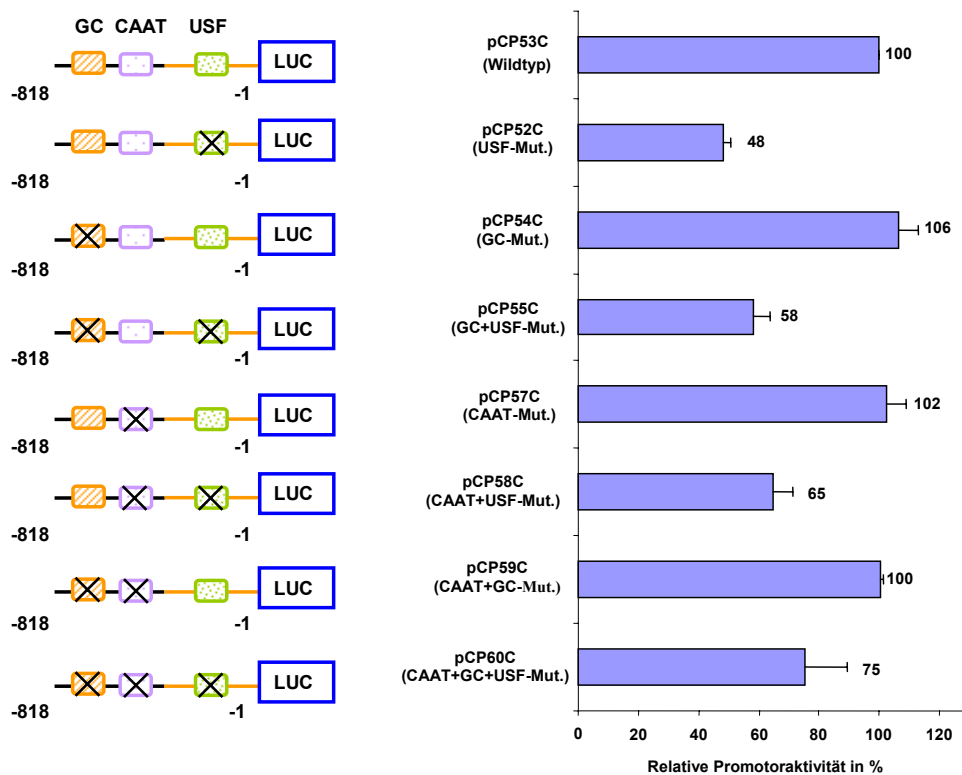


**Abbildung 3.9:** Schematische Darstellung der Punktmutanten und deren Luciferaseaktivität.

Auf der linken Seite sind die Punktmutanten der Sp1-Bindungsstelle, der GC-Box und des USF-Element schematisch dargestellt. Auf der rechten Seite ist deren Aktivität in transient transfizierten HEK293-Zellen wiedergegeben. Die *Firefly*-Luciferaseaktivität wurde auf die *Renilla* Luciferaseaktivität des kotransfizierten Plasmids phRL-SV40 normiert. Die Luciferaseaktivität des Wildtyp-Plasmids pCP53AB.1 wurde auf 100 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus vier unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

Eine Reduktion des Promotorbereiches auf die höher konservierte Region zwischen -818 und -1 veränderte das Ergebnis der transienten Transfektion und der ermittelten Luciferasewerte nicht. Die im Bereich zwischen -2179 und -819 potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren hatten durch Interaktion mit den Faktoren im Bereich zwischen -818 und -1 keinen Einfluss auf die vorher erzielten Ergebnisse. Die Luciferaseaktivitäten wurden bei den verkürzten Promotorkonstrukten durch die USF-Einzelmutation (pCP52C) und die USF-Kombinationsmutationen (pCP55C, pCP58C und pCP60C) ebenfalls reduziert.

**Dies zeigt, dass das USF-Element eine wichtige Rolle bei der ADAM10-Genexpression spielt.**



**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung der 5'-verkürzten Punktmutanten und deren Luciferaseaktivität. Auf der linken Seite sind die Punktmutanten der Sp1-Bindungsstelle, der GC-Box und des USF-Element schematisch dargestellt. Auf der rechten Seite ist deren Aktivität in transient transfizierten HEK293-Zellen wiedergegeben. Die *Firefly*-Luciferaseaktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferaseaktivität des kotransfizierten Plasmids phRL-SV40 normiert. Die Luciferaseaktivität des Wildtyp-Plasmids pCP53C wurde auf 100% gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus vier unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden.



### 3.12 Versuche an *Drosophila* Schneider Insektenzellen

*Drosophila* Schneider Insektenzellen sind ein gutes Modellsystem zur Überprüfung der Beteiligung von Sp-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Transkription von Genen, da sie selbst keine endogenen Sp-Faktoren exprimieren.

#### 3.12.1 Herstellen der pPac-Expressionsvektoren

Um die Beteiligung der Sp-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der ADAM10-Transkription nachzuweisen, wurden Expressionsvektoren für Sp-Transkriptionsfaktoren verwendet, die von Herrn Prof. Suske (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt wurden. Die pPac-Vektoren beinhalten die jeweilige cDNA eines Sp-Transkriptionsfaktors unter Kontrolle des *Drosophila melanogaster* Aktin-5C-Promotors. Der Vektor pPacSp1 enthält die Sp1-cDNA, die für das 778 Aminosäuren umfassende humane Protein kodiert, die Vektoren pPacSp3 und pPacUSp3 enthalten die humane Sp3-cDNA. Im Vektor pPacUSp3 ist der Sp3-cDNA Sequenz ein künstliches ATG vorgeschaltet, so dass das vollständige 697 Aminosäuren umfassende Sp3-Protein gebildet wird. Dem Vektor pPacSp3 fehlt dieses ATG, so dass nur ein verkürztes Sp3-Protein gebildet wird, dem eine der Aktivierungsdomänen fehlt (Prof. Suske, Universität Marburg).

Die Plasmide pPacSp1, pPacSp3 und pPacUSp3 sowie der Normierungsvektor p97b (Expressionsplasmid für Insektenzellen, welches das  $\beta$ -Galaktosidasegen enthält) wurden mittels Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht (2.6.5.1). Anschließend erfolgte die endotoxinfreie Präparation der Plasmid-DNA (2.6.5.1.4).

Um einen Kontrollvektor ohne cDNA zu erhalten (pPacLeer), wurde aus dem Vektor pPacSp3 mittels *Bam*HI-Restriktion die cDNA des Sp3 Faktors herausgeschnitten. Anschließend wurde eine T4-DNA-Polymerasebehandlung vorgenommen, der die Isolierung des 6400 bp großen Vektorfragmentes folgte. Dieses Fragment wurde durch Ligation wieder fusioniert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht.

Dasselbe 6400 bp Fragment diente auch als Ausgangvektor für die Klonierung des Plasmids pPacUSF. Der RZPD Klon IRALp962B0633Q mit der cDNA des humanen Transkriptionsvektors USF wurde käuflich erworben (RZPD, Berlin). Aus diesem Klon wurde die Plasmid-DNA isoliert und der Vektoranteil anschließend mit *Not*I, *Hpa*I und *Bgl*III herausgeschnitten. Das dabei entstandene 1950 bp große Fragment enthielt die vollständige cDNA des Faktors USF1. Diese wurde aus einem ethidiumbromidfreien Agarosegel isoliert und anschließend mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Der Ligationsansatz des 6400 bp Vektorfragments mit der 1950 bp großen cDNA wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und führte nach Plasmidisolierung zum

Expressionsvektor pPacUSF. Die richtige Orientierung der cDNA in diesem Vektor wurde mittels zweier Restriktionen mit *HindIII* und *ScaI* überprüft.

Sowohl vom Plasmid pPacLeer als auch vom Plasmid pPacUSF wurden endotoxinfreie DNA-Präparationen hergestellt.

Mit den Primern USF\_for und USF\_rev wurde zusätzlich an der Plasmid-DNA pPacUSF eine Sequenzierung durchgeführt, die nochmals die richtige Orientierung der cDNA innerhalb dieses Vektors bestätigte.

**Tabelle 3.7:** Herstellung des Vektors pPacLeer und pPacUSF.

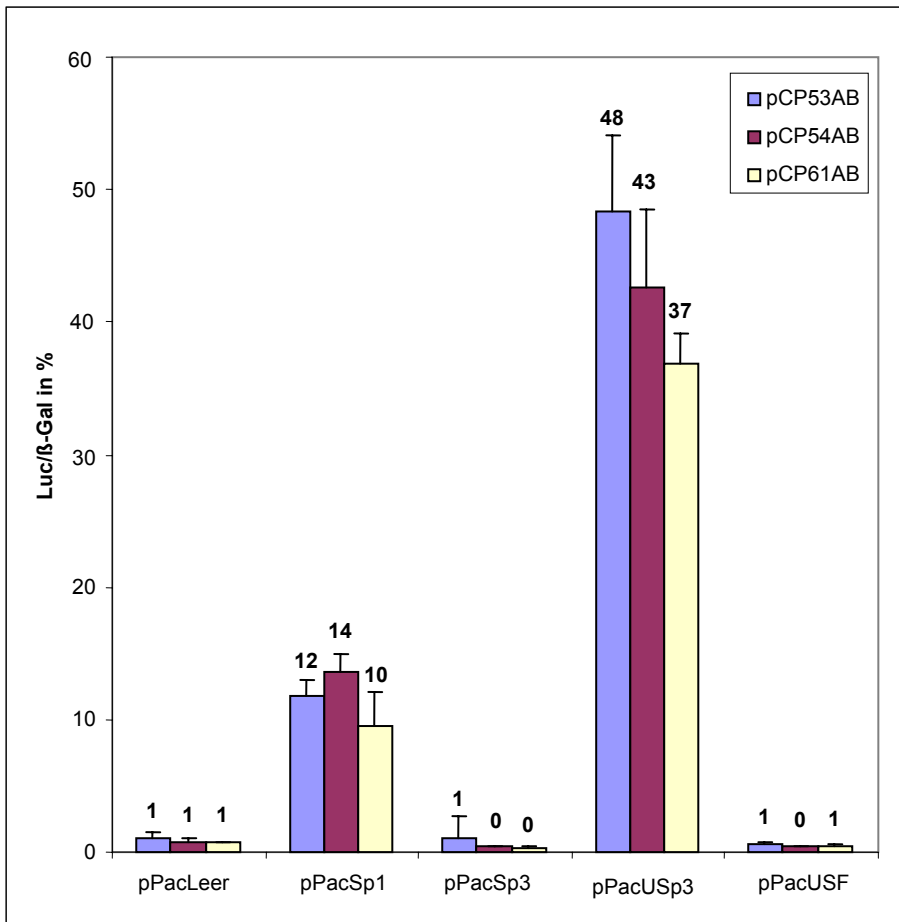
Name	Klonierungsvektor	Insert
pPacLeer	pPacSp3, BamHI, T4, 6400 bp	-
pPacUSF	pPacSp3, BamHI, T4, 6400 bp	RZPD Klon IRALp962B0633Q, NotI, HpaI, BglII, T4, 1950 bp

### 3.12.2 Transiente Transfektionen von *Drosophila* Schneider Insektzellen SL2 mit ADAM10-Promotorkonstrukten und pPac-Expressionsvektoren

Insektzellen stellen ein gutes Modell da, weil sie selbst keine endogenen Sp-Faktoren exprimieren. Um den Effekt von verschiedenen Sp-Faktoren auf die ADAM10-Promotoraktivität zu bestimmen, wurden *Drosophila* Schneider Insektzellen (SL2) mit den Promotorvektoren pCP53AB.1 (Wildtyp), pCP54AB.1 (Sp1 Mutante -521), pCP61AB.1 (Sp1 Mutante -366) und mit den verschiedenen pPac-Expressionsvektoren kotransfiziert: pPacLeer, pPacSp1, pPacSp3, pPacUSp3 und pPacUSF. Zur Normierung der Luciferasewerte wurden die Insektzellen zusätzlich mit dem Plasmid p97b, einem Vektor mit  $\beta$ -Galaktosidasegen unter Kontrolle des copia-Elements, transfiziert. Das copia-Element ist ein 5 kb großes Retrotransposon aus *Drosophila melanogaster*, das als Promotor agieren kann und sehr hohe Transkriptionsraten induziert (Saunders *et al.*, 1989). Der  $\beta$ -Galaktosidase-Test wurde wie beschrieben (2.7.2.7) durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, kommt es durch Kotransfektion mit den Plasmiden pPacSp1 und pPacUSp3 zu einer Stimulation der Promotoraktivität. Als Negativkontrolle diente der Vektor pPacLeer. Alle Luciferasewerte wurden auf die  $\beta$ -Galaktosidasewerte, die ebenfalls nach der Zelllyse bestimmt wurden, normiert (2.7.2.7). Die mit pPacLeer erzielten Werte wurden in den Grafiken jeweils auf 1 gesetzt.

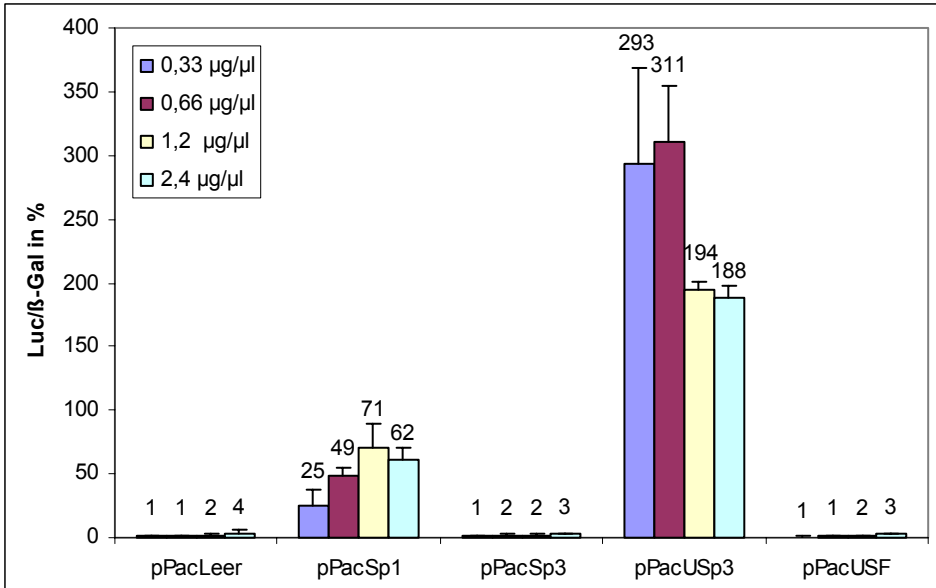
## Ergebnisse



**Abbildung 3.11:** Promotoraktivität verschiedener ADAM10-Promotorkonstrukte bei Anwesenheit verschiedener humaner Transkriptionsfaktoren: Sp1, Sp3, USp3 und USF.

Eine 10-14 fache Stimulation wurde bei Kotransfektion der ADAM10-Promotorkonstrukte pCP53AB.1, pCP54AB.1 und pCP61AB.2 mit dem Expressionsvektor pPacSp1 beobachtet. Die Kotransfektion mit dem Plasmid pPacUSp3 führte zu einer Stimulation der Luciferaseaktivität um das 37-48 fache. Bei Kotransfektion von pPacSp3 oder pPacUSF kam es zu keiner Aktivierung des Promotors.

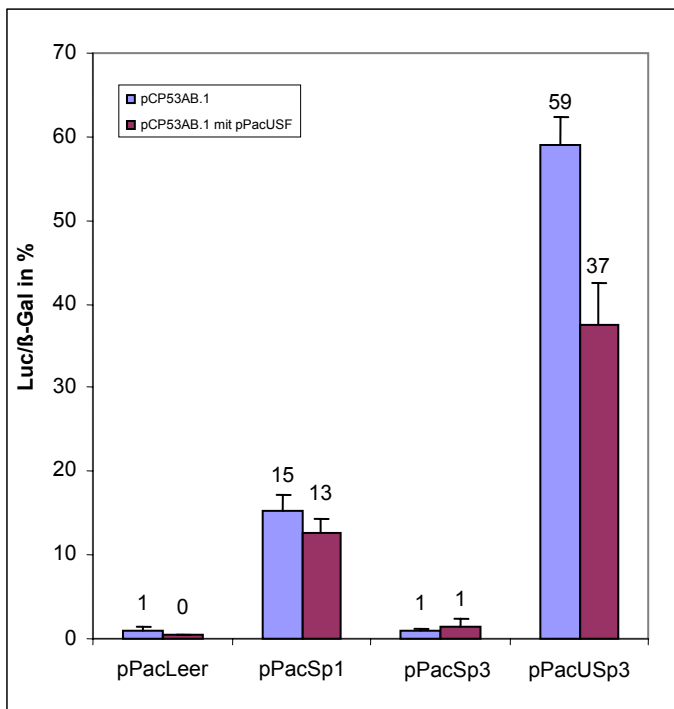
Da bei den parallel durchgeführten Kotransfektionen mit den Promotormutanten pCP54AB.1 (Sp1 Mutante -521) und pCP61AB.1 (Sp1 Mutante -366) keine Unterschiede bei den Luciferasewerten zu sehen waren, bestätigte sich hier, dass die Mutationen sich nicht auf die Transkriptionsfaktorbindung ausgewirkt hatten. So kam es auch in der transienten Transfektion der ADAM10-Promotormutanten pCP54AB.1 (Sp1 Mutante -521) und pCP61AB.1 (Sp1 Mutante -366) im Vergleich zum Wildtyp bei HEK293-Zellen zu keiner Veränderung der Promotoraktivität (siehe Abschnitt 3.11).



**Abbildung 3.12:** Transiente Transfektion von SL2-Zellen mit pCP53AB.1 (Wildtyp-ADAM10-Promotor) mit unterschiedlichen Konzentrationen an pPac-Expressionsvektoren.

Bei Kotransfektion mit unterschiedlichen Mengen an pPac-Expressionsvektoren wurde überprüft, ob die Effekte konzentrationsabhängig sind. In Abbildung 3.12 kann man sehen, dass auch größere Mengen an pPacSp3 und pPacUSF nicht zu einer Stimulation des ADAM10-Promotors führten. Die Kotransfektionen mit pPacSp1 oder pPacUSp3 zeigten hingegen wieder den stimulatorischen Effekt. Die unterschiedliche Aktivierung durch pPacSp1 gegenüber pPacUSp3 wurde durch eine erhöhte Menge an Expressionsvektor nicht verändert. Es kann davon ausgegangen werden, dass der ADAM10-Promotor durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und noch mehr durch USp3 aktiviert werden kann.

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob sich durch gleichzeitige Transfektion des Expressionsvektors pPacUSF mit den anderen Expressionsvektoren der Promotor doch noch aktiviert werden kann. USF kann als Homodimer oder Heterodimer an Promotoren binden und benötigt eventuell weitere Kofaktoren zur Aktivierung.



**Abbildung 3.13:** Transiente Transfektion von SL2-Zellen mit pCP53AB.1 und Kombinationen von pPac-Expressionsvektoren.

Auch hier kam es zu keiner signifikanten Steigerung der Aktivität gegenüber den Einzeltransfektionen mit pPacSp1 und pPacUSp3. Da nicht überprüft werden konnte, ob in den Zellen eine Überexpression, richtige Faltung und exakter Transport von USF in den Zellkern erfolgte, wurde auf weitere Versuche verzichtet. Weitere Faktoren könnten notwendig sein, um eine Promotoraktivierung durch USF auszulösen.

### 3.13 Untersuchungen des ADAM10-Promotors im EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Um zu überprüfen, ob potentielle Bindungsstellen durch Transkriptionsfaktoren besetzt werden, sollten die unterschiedlichen Bindungsstellen im ADAM10-Promotor auf molekularer Ebene im so genannten *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) näher untersucht werden. Es wurden DNA-Protein-Interaktionen für die bereits zuvor in Reportergenkonstrukten analysierten Sp1-Bindungsstellen, das USF-Element und eine RXR-Bindungsstelle im EMSA untersucht.

Als biotinmarkierte Oligonukleotide wurden jeweils doppelsträngige Oligonukleotide verwendet, die in ihrer Mitte die Bindungsstelle enthielten (Tabelle 2.5, Abbildung 3.14).

## Ergebnisse

```

                                Sp1 (-521)                                Maz (-491) CAAT-Box (-479)
-571 bp CTCTAACACGTAGCGGAGCACTATCTCCGCGTAG-SAGCGCTCCGCCCCGGG-----GCGGGACCAGSACAAAACCCCGCCTCCCAAGCCCAATCCCAG
CTGGAAGAACCAG-GTAGCACTTTCCACAGGAAAAGAGCGCTCCCGCCCCGGGGCGGTGGCGGGAGTCTCCAGCGGCCCCCGCCTCCCAGGCCAATCCCTG
CTGGTAGAACCCAG-GTAGCACTTTCCACGAAAAAGAGCGCTCCCGCCCCGGGGCGGTGGCGGGGCTTTCCCGTAGCCCCCGCCTCCAAAGCCAATCCCTG

-471 bp CTCTCCGCGCGGGACAGGAAG--GCGGGCGCAGGCCTAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCGCGGCATGCGCGCGCCCTGAAGCGCCTGGGSGA-CGGG
CTCTCCGCCAGCGGACAGGAAGCAGCGGCGG--GGCCTAGCGGCCCGGGCGCTCGCCTCGGCACGCATGCGCATTATCCCGGGGCGCTTGGGGAGCAGG
CTCGCCGCAAGCGGACAGGAAGCAGCGGCGG--GGCCTAGCGGCCGGGCGCTCGCCTTGGCACGCATGCGCACCATCCGGGGCGCCTGTGGGAGCAGG

                                Sp1 (-366)                                USF (-317)                                RXR (-302)                                Maz (-278)
-371 bp SAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGCTCCGCGTGCCAGTTGGGTGCCCGCGGTCACGTGGTGAGGAAGAGCGGAGGCTGTGAGTTTCGAAGAGGGGGG
GCGGGGCGGGAGGCAGGGGTGCGGCCTCGCGAGTGTATTGGGTGCCGTCCGCTCACGTGGCGAGAAAGGAGGCGGAGGCCCGCGGCTC--AGGGAAGGGG
GCGGGGCGGGAGGCAGGGGCGGGCTCGCGAGTGCATTGGGTACGGATGCGTCACGTGGCGAGAAAGGAGGCGGAGGCCCGCGGCTC--AGGGAAGGGG

                                MZF-1 (-237)                                RXR (-203) NFkB (-198)
-271 bp GAGAGAAGAGGAAACAGCAAGGGAAGGAAAGCGGGGAAAGGAGGAAGGAACGAACGASGGGGAGGGAGGTCCTGTTCGAGGAGCTAGGAGCGTTG
CTGAGACCAGCCGAAGAGCGAGGGCAGGGAAGCGGGAAAGGAGGAAGGAAGAGAGCCGAGGGGGAGGGAGGCCCTGTTTTGGCGGAGCAGGGCGCGC.
CTGAGACCAGCCGAAGAGCGAGGGCAGGGAAGCGGGAAAGGAGGAAGGAAGAGAGCCGAGGGGGAGGGAGGCCCTGTTTTGGCGGAGTAGGGCGCGC.

```

Abbildung 3.14: Sequenzen der Oligonukleotide, die in den verschiedenen EMSA eingesetzt wurden.

Alle Oligonukleotide wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Komplexbildung mit Kernproteinen untersucht.

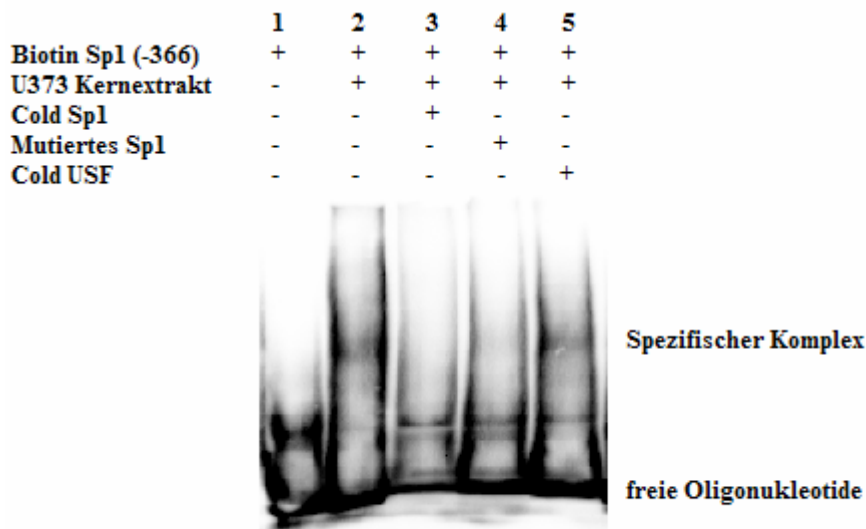
Inkubiert man biotinmarkierte Oligonukleotiddoppelstränge, die bestimmte Bindungsstellen enthalten, mit den daran bindenden Transkriptionsfaktoren, so ist bei einer anschließenden Gelelektrophorese eine verminderte Laufgeschwindigkeit gegenüber den ungebundenen Oligonukleotiddoppelsträngen zu beobachten. Durch Zugabe von nichtmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotiddoppelsträngen (Kompetition) kann die Intensität der im Western-Blot erhaltenen Banden abgeschwächt werden.

Als erstes wurde ein *Annealing* der einzelsträngigen Oligonukleotide mit den zu diesen komplementären Oligonukleotiden durchgeführt (Tabelle 2.5). Die dabei entstandenen doppelsträngigen Oligonukleotide beinhalten jeweils eine Bindungsstelle.

Wenn die biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelstränge ohne Kernextrakte inkubiert wurden, entstanden in keinem Fall Bandenverschiebungen (Abbildung 3.15, 3.16 und 3.17, Spur 1). Nach der Inkubation der Oligonukleotiddoppelstränge für die potentielle Sp1-Bindungsstelle (-521) mit Kernextrakten aus U373-Astrozytomazellen konnten ebenfalls keine Bandenverschiebungen festgestellt werden. Erst bei Inkubation der Oligonukleotiddoppelstränge für die potentielle Sp1-Bindungsstelle bei -366 mit U373-Kernextrakt wurde eine Bandenverschiebung beobachtet (Abbildung 3.15, Spur 2). Die Intensität dieser Bande konnte durch Kompetition mit denselben unmarkierten Oligonukleotiddoppelsträngen zurückgedrängt werden (Abbildung 3.15, Spur 3). Bei Kompetition mit den unmarkierten mutierten Sp1-Oligonukleotiddoppelsträngen wurde kein *Shift* beobachtet. Trotz eingefügter Punktmutation bleibt die Fähigkeit zur Proteinbindung erhalten, d.h. die Bindungsstelle wurde nicht zerstört.

Die Kompetition mit einem potentiell nicht bindenden Oligonukleotiddoppelstrang (USF bei -317) führte wieder zu der zuvor beobachteten spezifischen Bande (Abbildung 3.15, Spur 5).

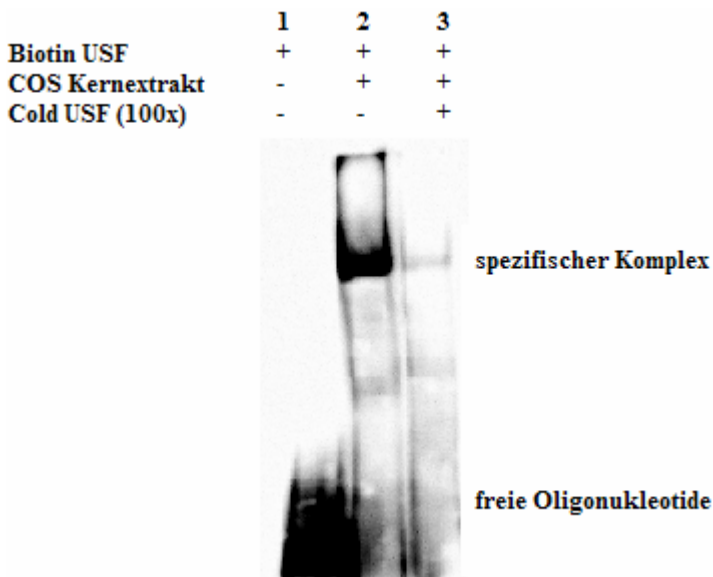
## Ergebnisse



**Abbildung 3.15:** Sp1 EMSA von Position -366.

In der ersten Spur wurden ungebundene biotinmarkierte Sp1-Oligonukleotiddoppelstränge aufgetragen. Durch Bindung dieser Oligonukleotiddoppelstränge mit dem U373-Kernextrakt kommt es in der zweiten Spur zur Bildung eines *Shifts*. Diese Bandenverschiebung wird in Spur 3 durch Konkurrenz mit unmarkierten sequenzspezifischen Sp1-Oligonukleotiddoppelsträngen zurückgedrängt. Auch bei Konkurrenz mit mutierten Sp1-Oligonukleotiddoppelsträngen entstand kein *Shift*. In Spur 5 ist zu sehen, dass bei Konkurrenz mit potentiell nicht bindenden USF-Oligonukleotiddoppelsträngen die Bandenverschiebung erhalten bleibt.

In einem weiteren EMSA wurden die Oligonukleotiddoppelstränge für die potentielle USF Bindungsstelle mit Kernextrakten aus COS-Zellen inkubiert. Die Bandenverschiebung, die bei dieser Reaktion entstand, konnte durch die Konkurrenz mit unmarkierten USF-Oligonukleotiddoppelsträngen unterdrückt werden (Abbildung 3.16, Spur 2 und 3).



**Abbildung 3.16:** USF EMSA

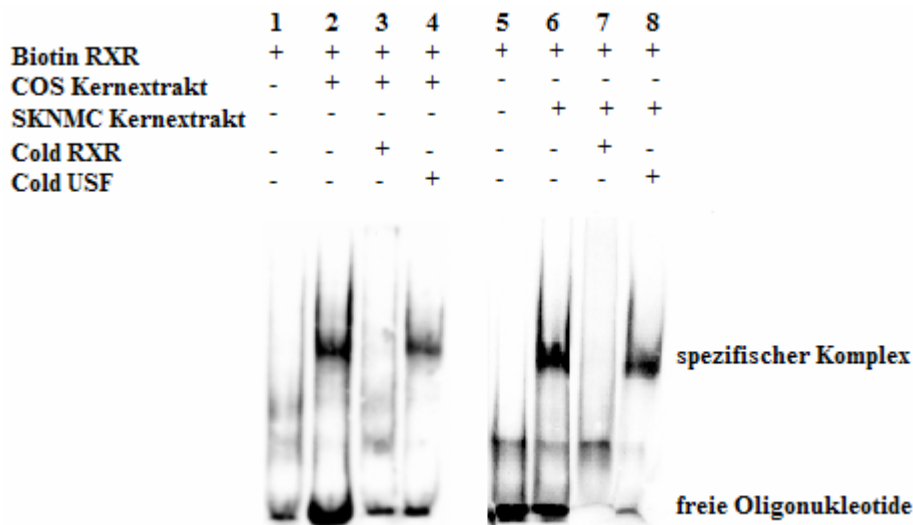
In der ersten Spur wurden ungebundene biotinmarkierte USF-Oligonukleotiddoppelstränge aufgetragen. Durch Bindung dieser Oligonukleotiddoppelstränge mit dem COS-Kernextrakt kommt es in der zweiten Spur zur Bildung eines *Shifts*. Diese Bandenverschiebung wird in Spur 3 durch Konkurrenz mit unmarkierten sequenzspezifischen USF-Oligonukleotiddoppelsträngen zurückgedrängt.

Dieser EMSA ließ sich nicht mit dem ersten biotinmarkierten Oligonukleotiddoppelstrang wiederholen. Es wurde ein weiteres biotinmarkiertes USF Oligonukleotid hergestellt. Der *Shift* mit diesem Oligonukleotiddoppelstrang und SKNMC-Kernextrakt konnte wiederholt werden.

Allerdings ließ sich der spezifische Komplex nicht mehr durch Konkurrenz mit dem vorherigen etwas kürzeren unmarkierten USF-Oligonukleotiddoppelsträngen unterdrücken. Möglicherweise binden die längeren USF-Oligonukleotiddoppelstränge ihren Komplexpartner besser als die kürzeren USF-Oligonukleotiddoppelstränge.

Bei weiteren Wettbewerbsversuchen mit mutierten unmarkierten USF-Oligonukleotiddoppelsträngen blieb die Bandenverschiebung ebenfalls erhalten. Diese Oligonukleotiddoppelstränge scheinen den Transkriptionsfaktor, der an dieser Stelle bindet, nicht mehr zu binden, so dass es zu keiner Konkurrenz um den Transkriptionsfaktor kommt. Damit bestätigt sich, dass die eingefügte Punktmutation zu einer Zerstörung der Bindungsstelle geführt hat.

Schließlich wurde ein EMSA mit Oligonukleotiddoppelsträngen für die potentielle RXR-Bindungsstelle und Kernextrakten aus COS- bzw. SKMNC-Zellen durchgeführt. Der *Shift*, der bei dieser Reaktion entstand, konnte durch Konkurrenz mit unmarkierten RXR-Oligonukleotiddoppelsträngen unterdrückt werden (Abbildung 3.17, Spur 3 und 7). Bei Konkurrenz mit einem potentiell nicht bindenden Oligonukleotiddoppelstrang (USF bei -317) kam es wie zuvor zum *Shift* (Abbildung 3.17, Spur 4 und 8).



**Abbildung 3.17:** RXR EMSA

In der ersten und in der fünften Spur wurden ungebundene biotinmarkierte RXR-Oligonukleotiddoppelstränge aufgetragen. Durch Bindung dieser Oligonukleotiddoppelstränge mit dem COS-Kernextrakt (Spur 2) und mit dem SKNMC-Kernextrakt (Spur 6) kommt es zur Bildung eines *Shifts*. Diese Bandenverschiebung wird in Spur 3 und 7 durch Konkurrenz mit unmarkierten sequenzspezifischen RXR-Oligonukleotiddoppelsträngen zurückgedrängt. Auch In Spur 4 und 8 ist zu sehen, dass bei Konkurrenz mit potentiell nicht bindenden USF-Oligonukleotiddoppelsträngen die Bandenverschiebung erhalten bleibt.

Eine Aussage über den genauen Transkriptionsfaktor, der an der jeweiligen Bindungsstelle bindet, konnte nicht getroffen werden, da auf Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern verzichtet wurde.



### 3.14 Versuche mit den Sterol-Regulatorelement-Bindungsproteinen (SREBPs)

#### 3.14.1 Herstellung der Expressionsvektoren mit den Sterol-Regulatorelement-Bindungsproteinen (SREBPs)

Die Expressionsvektoren mit den Sterol-Regulatorelement-Bindungsproteinen (SREBPs) wurden bereits während meiner Diplomarbeit (2001) von mir kloniert. Die Vorgehensweise ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

**Tabelle 3.8:** Herstellung der Expressionsvektoren mit den Sterol-Regulatorelement-Proteinen (SREBPs).

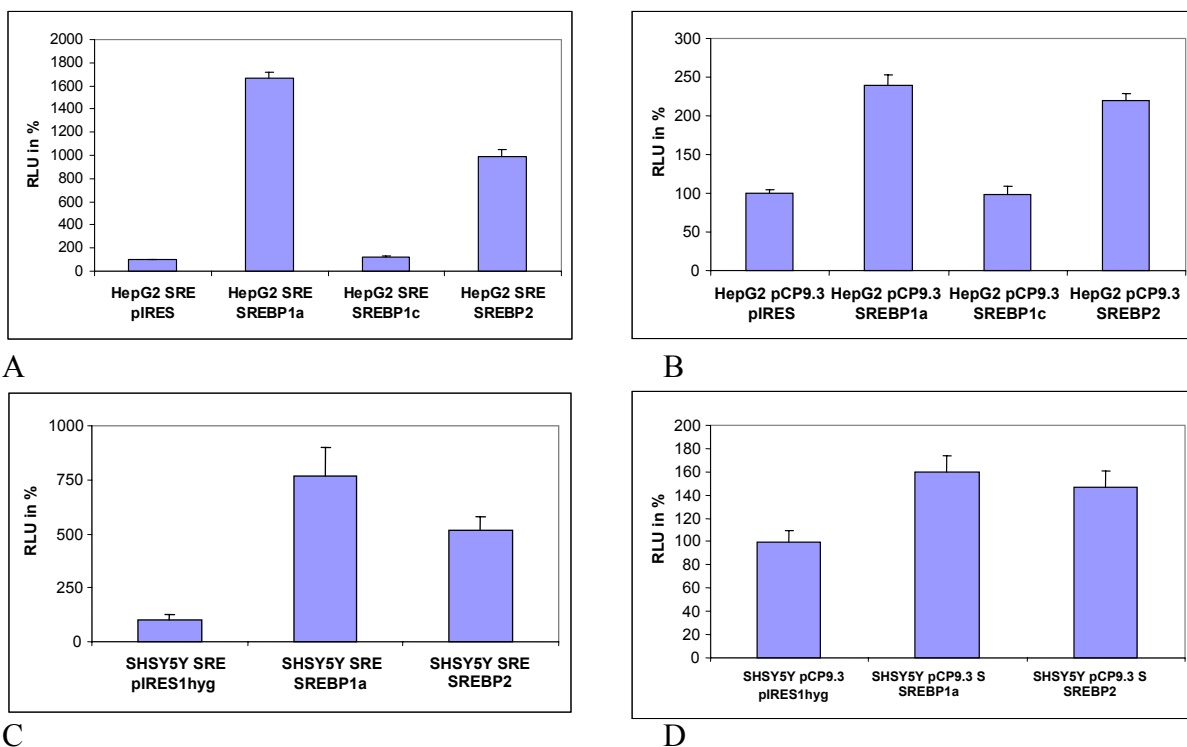
Konstrukt Kürzel	Bakterienstamm	Vektor	Insert	Inhalt
<b>pCP2.15</b> Sequenzierprimer: IRESfor, SREBP2a_for2, IRESrev, IRESrev2	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pIRES1hyg, <i>Bst</i> XI, T4, <i>Bam</i> HI, 5700bp gelisoliert  => Ampicillinresistenz	1423 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar <b>SREBP2a_for</b> $\leftrightarrow$ <b>SREBP2a_rev</b> durch RT-PCR an RNA aus HEK293-Zellen mit SuperscriptII und dem Advantage-PCR-Kit hergestellt, Pfu-DNA-Polymerase behandelt, <i>Bam</i> HI geschnitten, gelisoliert	cDNAs der transkriptionsaktivierenden N-terminalen Region der Transkriptionsfaktoren SREBP-2 (AC: U02031, EMBL-Datenbank; Methionin 1 bis Asparagin 468)
<b>pCP26.9</b> Sequenzierprimer SREBP1a_for	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pIRES1hyg, <i>Bst</i> XI, T4, <i>Bam</i> HI, gereinigt  => Ampicillinresistenz	pCMV-SREBP-1a-460 ( <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC-Nr.: 99637)), <i>Age</i> I geschnitten, T4 behandelt, <i>Bam</i> HI geschnitten, 1900bp Fragment gelisoliert	cDNAs der transkriptionsaktivierenden N-terminalen Region der Transkriptionsfaktoren SREBP-1a (AC: U00968, EMBL-Datenbank; Methionin 1 bis Asparagin 460)
<b>pCP36.10</b> Sequenzierprimer Universal_for, SREBP1a_rev und SREBP1a_for3 sequenziert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pUC57T, <i>Eco</i> RV, Thyminnukleotid angehängt  => Ampicillinresistenz => Blau-Weiß-Selektion	1400 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar <b>SREBP1c_for</b> $\leftrightarrow$ <b>SREBP1a_rev</b> durch pCMV-SREBP1c-436 ( <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC-Nr.: 99636) mit Pfu-DNA-Polymerase hergestellt und gelisoliert; phosphoryliert; Adeninnukleotide mit Taq-DNA-Polymerase angehängt und gereinigt	cDNAs der transkriptionsaktivierenden N-terminalen Region der Transkriptionsfaktoren SREBP-1c (AC: AF286470, EMBL-Datenbank; Methionin 1 bis Asparagin 436)
<b>CP39.6</b> Sequenzierprimer IRES_for	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pIRES1hyg, <i>Bam</i> HI, T4, gereinigt  => Ampicillinresistenz	CP36.10 mit <i>Bam</i> HI und <i>Xba</i> I geschnitten und das 1400 bp Fragment gelisoliert, T4 behandelt und gereinigt	cDNAs der transkriptionsaktivierenden N-terminalen Region der Transkriptionsfaktoren SREBP-1c (AC: AF286470, EMBL-Datenbank; Methionin 1 bis Asparagin 436)

### 3.14.2 Einfluss von überexprimierten SREBPs auf die ADAM10-Promotoraktivität

Um den Einfluss der SREBPs auf die ADAM10-Promotoraktivität zu untersuchen, wurden HepG2 und SHSY5Y-Zellen transient mit den Vektorpaaren SRE-luc (Kontrollvektor) ↔ phRL-SV40 bzw. pCP9.3 (-1735/+390) ↔ phRL-SV40 sowie jeweils mit SREBP-kodierenden Vektoren kotransfiziert (2.7.2.2). Nach drei Tagen wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Chemiluminometer bestimmt (2.7.2.5).

Die Kotransfektion mit den SREBP1a- und SREBP2-Expressionsvektoren führte bei dem Kontrollvektor SRE-luc, der mehrere *sterol regulatory elements* in seinem Promotor enthält, zu einem starken Anstieg der Luciferaseaktivität. Bei Kotransfektion mit dem SREBP1c-Expressionsvektor blieb der Luciferasewert auf dem Niveau der Kontrolle (pIRES1hyg). Die Kotransfektion der SREBP-haltigen Vektoren zusammen mit dem Kontrollvektor SRE-luc, diente der Überprüfung der SREBP-Überexpression. Für die Vektoren pCP2.15 (SREBP2) und pCP26.9 (SREBP1a) konnten die funktionelle Überexpression bestätigt werden.

Bei der Kotransfektion der SREBP-haltigen Vektoren mit dem ADAM10-Promotorvektor pCP9.3 (-1735/+390) konnte ebenfalls ein Anstieg der Luciferaseaktivität bei der Überexpression von SREBP2 und SREBP1a festgestellt werden. Dieser fiel im Vergleich zu dem Kontrollvektor SRE-luc wesentlich schwächer aus.



**Abbildung 3.18:** Kotransfektion der SREBP-Expressionsvektoren mit dem Kontrollvektor SRE-luc (A und C) bzw. mit dem ADAM10-Promotorvektor pCP9.3 (B und D) in HepG2 (A und B) und SHSY5Y Zellen (C und D).

Die Kotransfektion mit weiteren verkürzten ADAM10-Promotorvektoren, bei denen potentielle SREBP-Bindungsstellen deletiert waren, zusammen mit SREBP-Expressionsvektoren führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Nur bei dem größten ADAM10-Promotorvektor pCP9.3 konnte eine Steigerung der Luciferaseaktivität bei Anwesenheit von SREBPs festgestellt werden. Ein Problem hierbei könnte sein, dass sich die Kotransfektion mit mehr als zwei Vektoren sehr unterschiedlich auf das Ergebnis der Transfektion auswirken kann.

In weiteren Versuchen wurden die SREBP-Expressionsvektoren pCP2.15 (SREBP2) und pCP26.9 (SREBP1a) in HepG2 Zellen eingebracht. Nach 3 Tagen wurde aus diesen Zellen die RNA isoliert. In *Real time* RT-PCR Experimente wurde überprüft, ob sich die ADAM10-Genexpression tatsächlich durch Überexpression der SREBPs beeinflussen lässt. Die SREBP1a bzw. SREBP2 mRNA-Menge war in beiden Transfektionen tatsächlich deutlich erhöht, ohne dabei die mRNA-Menge des jeweils anderen SREBP zu beeinflussen. Die mRNA-Menge von ADAM10 bzw. von BACE1 wurde allerdings nicht beeinflusst. Die Normierung bei dieser RT-PCR erfolgte auf GAPDH. Somit bestätigt sich am endogenen ADAM10 nicht der Effekt, der durch die Überexpression der SREBPs im Promotorassay gefunden wurde. Allerdings sei laut Horton *et al.* (2003) ein Effekt durch überexprimierte Transkriptionsfaktoren auf einen künstlichen Promotor wenig aussagekräftig.

Die Überexpression der SREBP2 bzw. SREBP1a Proteine konnte mittels Antikörper nicht bestätigt werden, da sowohl die in Hybridomaüberständen vorhandene Antikörper (2.7.1.3, Tabelle 2.13) als auch käuflich erworbene Antikörper (PharMingen) nicht effektiv waren.

Daneben zeigte sich, dass die *Real time* RT-PCR Ergebnisse durch das Transfektionsreagenz (Lipofectamine2000 im Vergleich zur Calciumphosphat-Transfektion) als auch durch einen Mediumwechsel (bei Calciumphosphat-Transfektion) beeinflusst wurden. Dies könnten neben der Kotransfektion von mehr als zwei Vektoren die stark schwankenden Ergebnisse bei dem Promotorassay erklären.

### **3.15 Einfluss von chemischen Substanzen auf die Promotoraktivität in transient transfizierten Zellen**

#### **3.15.1 Einfluss des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf die Promotoraktivität**

Lovastatin ist ein Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, welche ein Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese ist. Durch Erniedrigung des Cholesteringehalts in einer Zelle, sollte es zu einer vermehrten Proteolyse des Transkriptionsfaktors SREBP kommen, der dann möglicherweise die Expression verschiedener Gene beeinflusst. Lovastatin hemmt aber auch das Proteasom und verlängert die G1-Phase von Zellen. Darüber hinaus nimmt Lovastatin Einfluss auf viele zelluläre Signalwege, so verringert es die Anbindung von Rho an die Membran, senkt die Jun-Kinase1-Aktivität und darüber die Ap1-Bildung. Weiterhin hemmt es die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch weniger NF $\kappa$ B für die DNA-Bindung zur Verfügung steht (Bardeleben v. R., 2001).

Um herauszufinden, ob die Promotoraktivität des humanen ADAM 10-Gens möglicherweise durch eine Lovastatinbehandlung beeinflusst werden kann, wurden HepG2-Zellen mit den Vektorpaaren SRE-luc $\leftrightarrow$ phRL-SV40 bzw. pCP9.3 (-1735/+390) $\leftrightarrow$ phRL-SV40 transfiziert (2.7.2.2). Nach zwei Tagen wurde das FCS-haltige Medium gegen cholesterinarmes LDS-haltiges Medium ausgetauscht. Die Hälfte der Zellkulturschalen wurde mit 1  $\mu$ M Lovastatin behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Chemiluminometer gemessen (2.7.2.5).

Durch den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin wurde die zelluläre Antwort auf den Kontrollvektor SRE-luc, der auf eine erhöhte aktive SREBP-Menge reagieren sollte, nicht beeinflusst. Auch die Stimulation der Luciferaseaktivität des ADAM10-Promotors fiel gegenüber unbehandelten Zellen eher gering aus. Im Vergleich zu den Kontrollzellen lagen die prozentualen Luciferasewerte der mit Lovastatin behandelte HepG2-Zellen zwar etwas höher, von einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität kann aber nicht gesprochen werden. Es sieht so aus, als ob die Kombination aus cholesterinarmem LDS-haltigem Medium und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin die Aktivität des ADAM 10-Promotors nicht beeinflusst.

Dies sollte zusätzlich durch *Real time* RT-PCR Experimente bei Verwendung unterschiedlicher HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren überprüft werden. Hierzu wurden HEK293, SHSY5Y, HepG2 und SKNMC Zellen ein Tag in cholesterinarmem LDS-haltigem Medium vorinkubiert bevor das Medium gewechselt wurde und jeweils die Hälfte der Zellkulturschalen mit 1  $\mu$ M Lovastatin bzw. Simvastatin bzw. Cerivastatin behandelt wurden. Nach 24 h wurden die RNA aus diesen Zellen isoliert und in *Real time* RT-PCR Experimente eingesetzt. In HEK293, SHSY5Y, HepG2 und SKNMC Zellen kam es zu einer Erhöhung der mRNA-Menge der HMG-CoA-Reduktase, die eine Folge der durch die Behandlung mit Statinen ausgelösten Veränderung des Cholesteringehalts der

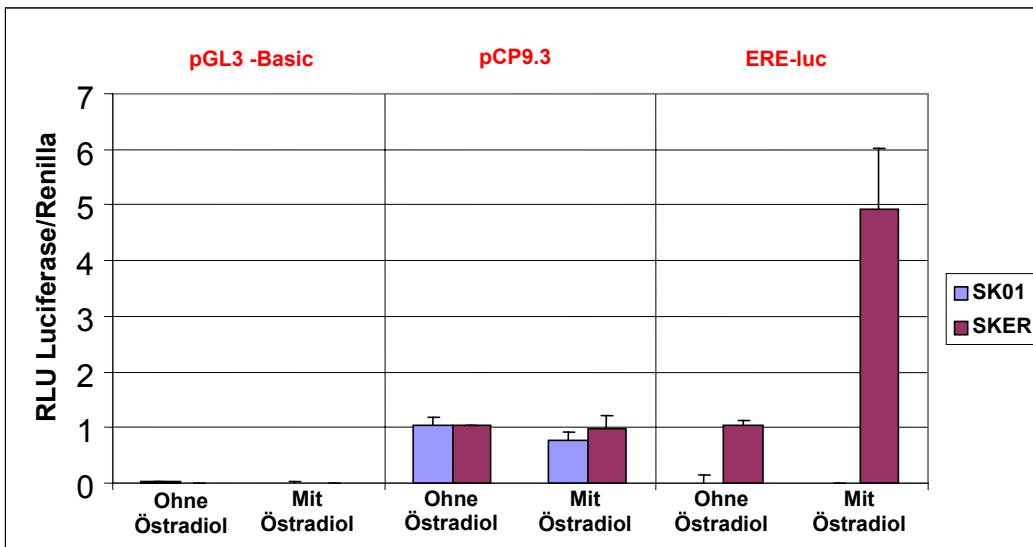
Zellen ist. Trotz der Aktivität der eingesetzten Substanzen zeigte sich in allen Zellen keine Beeinflussung der ADAM10-mRNA-Menge. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der Lovastatinbehandlung auf andere Gene untersucht. Neben der HMG-CoA-Reduktase wurden auch die mRNA-Mengen von SREBP1a und SREBP2 erhöht. Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 wurde wie auch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 nicht durch die Lovastatinbehandlung beeinflusst. Auch die ct-Werte von ApoE waren in HepG2-Zellen nur minimal erhöht, d.h. es lag keine signifikant höhere mRNA-ApoE-Kopienzahl vor. Schließlich wurden Stimulationsversuche mit 50  $\mu$ M Zaragozicsäure in LDS-haltigem Medium an SKNMC Zellen über 3 h, 6 h bzw. 24 h durchgeführt. Auch der Squalen-Synthase-Inhibitor Zaragozicsäure beeinflusste den ct-Wert, d.h. die mRNA-ADAM10-Kopienzahl nicht. Die Normierung aller *Real time* RT-PCR Experimente erfolgte auf die ct-Werte der GAPDH.

### **3.15.2 Einfluss von $\beta$ -Östradiol auf die Promotoraktivität in transient transfizierten SK01 und SKER Zellen**

$\beta$ -Östradiol ist ein Östrogen und bindet im Zellinneren an einen Östrogen-Rezeptor (ER). Der aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und kann dort über DNA-Bindung als Dimer an ein so genanntes „*estrogen response element*“ (ERE) mit dem Halbelement TGACCT binden. Auf diese Weise können verschiedene Gene aktiviert werden.  $\beta$ -Östradiol wirkt als Hormon auf die Hypophyse, den Uterus (Proliferation des Endometriums), die Muskulatur, das Skelett, das Fettgewebe, das Blut (Thrombozyten-Erhöhung), die Knochen (erhöhte Osteoblastenaktivität, Protein- und Mineraleinbau), die Haut (Fettgewebekonstruktion in der Unterhaut). Im Besonderen ist es an der weiblichen Sexualentwicklung beteiligt.

Östrogene regulieren den Metabolismus von APP, vermindern die Menge an A $\beta$  (Jaffe A. *et al.*, 1994), aktivieren die  $\alpha$ -Sekretase und schützen die Neuronen vor oxidativen Stress (Behl *et al.*, 1995).

Um die Auswirkung von  $\beta$ -Östradiol auf den ADAM10-Promotor zu untersuchen, wurden SKER- und SK01-Zellen mit den Vektorpaaren pGL3-Basic $\leftrightarrow$ pRL-CMV bzw. pCP9.3 (-1735/+390) $\leftrightarrow$ pRL-CMV bzw. ERE-luc $\leftrightarrow$ pRL-CMV transfiziert. Bei den Zelllinien handelt es sich SKNMC Zellen die zum einen stabil mit einem leeren Expressionsvektor und zum anderen mit dem Östradiol-Rezeptor-Expressionsvektor stabil transfiziert wurden. Der Vektor ERE-luc beinhaltet Östradiol-Rezeptor-Elemente und ist somit ein Kontrollvektor, der die Aktivierung des Östradiol-Signalweges anzeigen soll. Beide Zelllinien sowie der ERE-luc Vektor wurden dem Institut von Herrn Prof. Behl (Universität Mainz) überlassen.



**Abbildung 3.19:** Stimmulationsversuch mit  $\beta$ -Östradiol an SK01 und SKER Zellen.

SK01-Zellen (ohne Östradiol-Rezeptor, blau) bzw. SKER-Zellen (mit Östradiol-Rezeptor, pink) wurden mit den Plasmiden pGL3-Basic (Null-Kontrolle) bzw. pCP9.3 (ADAM10-Promotorkonstrukt, -1735/+390) bzw. ERE-luc (beinhaltet Östradiol-Rezeptor-Elemente) kotransfiziert. Zwei Tage später wurde die Zellen mit  $1 \mu\text{M}$   $\beta$ -Östradiol bzw. mit äquivalenten Mengen an 100%igem Ethanol behandelt. Im Anschluss an eine vierstündige Inkubationszeit wurden alle Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt (2.4.1).

Da der in normalem FCS-haltigen Medium enthaltene Farbindikator Phenolrot möglicherweise die Funktion des  $\beta$ -Östradiols ersetzen kann (persönliche Mitteilung Dr. G. Gimpel), wurde das normale FCS-haltige Medium durch phenolrotfreies Medium mit gestrippten FCS (ebenfalls von Herrn Prof. Behl zur Verfügung gestellt; enthält keine Substanzen wie Hormone, die den Versuch beeinflussen könnten) ersetzt. Zwei Tage später wurde ein Teil der Zellen mit  $1 \mu\text{M}$   $\beta$ -Östradiol, ein anderer Teil mit einer äquivalenten Menge an 100%igem Ethanol behandelt. Im Anschluss an eine vierstündige Inkubationszeit wurden alle Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt (2.4.1). Es wurde eine eindeutige Stimulierung des ERE-Kontrollvektors in SKER-Zellen durch  $\beta$ -Östradiol erreicht. Der Promotor von ADAM10 (pCP9.3) wird in SKER-Zellen durch  $\beta$ -Östradiol nicht stimuliert. ERE-Bindungsstellen im ADAM10-Promotor scheinen daher unwahrscheinlich.

### **3.16 Einfluss von chemischen Substanzen auf die Promotoraktivität in stabilen Zelllinien**

Um zu überprüfen, ob sich die Promotoraktivität durch externe Faktoren beeinflussen lässt, wurden Stimulationsversuche an den stabilen Zelllinien SHY56.6 und SKN56.6 durchgeführt.

#### **3.16.1 Herstellung der stabilen Zelllinien SHY56.6 und SKN56.6**

Um eine stabile Zelllinie mit dem *Firefly*-Luciferasegen unter der Kontrolle des humanen ADAM10-Promotors zu etablieren, musste ein neuer Vektor (pCP56.6) mit einem weiteren Selektionsgen (Geneticin) hergestellt werden. Aus dem Plasmid pcDNA3 wurde mit *NruI* und *BamHI* der CMV-Promotor entfernt. Dann wurde ein 4415 bp großes Fragment aus dem Plasmid pCP53AB.1 isoliert. Hierin enthalten ist das *Firefly*-Luciferasegen unter Kontrolle des ADAM10-Promotors. Der Vektor pCP53AB.1 wurde mit *PvuI* linearisiert. Dann erfolgte eine T4-DNA-Polymerase Behandlung, der sich eine Restriktion mit *BamHI* anschloss. Das 4700 bp große Fragment aus pcDNA3 wurde mit dem 4415 bp großen Fragment aus pCP53AB.1 ligiert (2.6.5.9.5) und dieser Ansatz zur Transformation von *E. coli DH5 $\alpha$*  verwendet (2.6.4.1). Anschließend wurde eine endotoxinfreie Plasmid-Präparation von pCP56.6 angefertigt (2.6.5.1.4). Stabile Zelllinien wurden durch Transfektion unter Verwendung des Plasmids pCP56.6 und Selektion mit G418 (Geneticin) erzeugt (2.7.2.3).

Um an diesem Mischklon zu überprüfen, ob das *Firefly*-Luciferasegen zusammen mit dem ADAM10-Promotor in dessen Genom integriert wurde, wurde die chromosomale DNA aus den SHSY5Y-Zellen mittels des DNeasy Tissue Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert. Diese DNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *KpnI* geschnitten. In eine nachfolgende PCR (2.6.5.10) wurden 5  $\mu$ l dieser DNA eingesetzt. Als Primer dienten ein ADAM10-Primer (hAD10Pro\_for6) und ein Luciferase-Primer (Luc\_rev). Ein 2200 bp Fragment wurde amplifiziert, der einen Teil des ADAM10-Promotors mit der daran angeschlossenen cDNA des *Firefly*-Luciferasegen enthält.

Zusätzlich wurde überprüft, ob sich Luciferaseaktivität an lysierten Zellen nachweisen ließ. Auch dies war der Fall. Da humane Zellen selber kein Luciferasegen beinhalten, kann man die Luciferaseaktivität auf den Einbau des Luciferasegens unter der Kontrolle des ADAM10-Promotors zurückführen.

Für die Stimulationsversuche wurden die stabilen Zelllinien ausgesät und anschließend mit verschiedenen Substanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit erfolgten die Lyse der Zellen und die Bestimmung der Luciferasewerte im Chemiluminometer. Diese Werte wurden auf die Proteinmenge normiert.

### **3.16.2 Einfluss von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)**

Der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Diese Kinase gehört zu den Schlüsselkomponenten einer Signalkaskade, die als Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli aktiviert wird. Normalerweise geht die Aktivierung von einem bestimmten Rezeptor an der Zelloberfläche aus. Durch Ligandenbindung kommt es zur Aktivierung eines nachgeschalteten G-Proteins, welches dann die Phospholipase C aktiviert. Dieses Enzym spaltet in der Membran das Phosphatidyl-Inosit-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). Der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) übt irreversibel die Funktion des Diacylglycerin (DAG) als Aktivator der Proteinkinase C aus. Die Wirkung dieser Kinase ist mannigfaltig. Einige Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-Jun und CRE-BP1 werden phosphoryliert und dadurch aktiviert, z. B. indem das phosphorylierte c-Jun mit c-Fos das Dimer AP-1 bildet. Auch andere Kinasen werden durch die Proteinkinase C aktiviert z.B. MAP-Kinasen, die wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren wie Elk-1 oder den Inhibitor von NFκB, IκBα.

Durch PMA-Behandlung wurde der Einfluss der Proteinkinase C auf den ADAM 10-Promotor überprüft. Das FCS-haltige Medium wurde erneuert und 1 μM PMA (in DMSO) ins Medium gegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 3 h bzw. 6 h lysiert, anschließend wurde die Luciferaseaktivität gemessen (2.7.2.5). Der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) schien keinen Effekt auf die Promotoraktivität zu haben. Die Luciferaseaktivität der mit PMA stimulierten SHY56.6 und SKN56.6 Zellen war identisch mit der von DMSO behandelten Zellen.

### **3.16.3 Einfluss von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)**

Im Laufe der Entwicklung wird die Anzahl der Zellen im ZNS durch programmierten Zelltod (Apoptose) stark reduziert, während die verbliebenen Zellen an Größe zunehmen, sich differenzieren, migrieren und untereinander synaptische Kontakte ausbilden. Diese Prozesse unterliegen der Kontrolle einer Vielzahl verschiedener Proteine, von denen vor allem Neurotrophinen eine bedeutende Rolle zukommt. Neurotrophine bilden innerhalb der Wachstumsfaktoren eine Familie, die für die Entwicklung und das Funktionieren des ZNS entscheidend sind. Sie können sowohl als Überlebensfaktoren als auch als Apoptoseinitiatoren auf Neurone wirken. Zur Familie der Neurotrophine gehört auch BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Die Wirkung des BDNF erfolgt über einen Rezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität (trkB) der in undifferenzierten Neuroblastomen stark exprimiert wird (Nakagawara *et al.*, 1994).

Die Bindung von BDNF an seinen trk-Rezeptor führt als erstes zur trk-Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität. Durch die ligandenvermittelte Aggregation der



Rezeptoren kommt es zur Autophosphorylierung intrazellulärer Domänen, die eine Aktivierung von Signalmolekülen (*Phospholipase C*, *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase* und Adapterprotein *Shc* und *Grb2*) zur Folge haben. Die weitere Signalkaskade ist vor allem die ras-abhängige MAP-Kinase-Kaskade.

Das FCS-haltige Medium wurde erneuert und 50 pg/ml BDNF ins Medium der SKN56.6 Zellen gegeben. Zur Kontrolle blieben SKN56.6 Zellen unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 3 h, 6 h, 24 h bzw. 30 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen (2.7.2.5). Der Wachstumsfaktor BDNF schien keinen Effekt auf die Promotoraktivität zu haben. Die Luciferaseaktivität der mit BDNF stimulierten SKN56.6 Zellen war identisch mit denen von unbehandelten SKN56.6-Zellen.

### **3.16.4 Einfluss von Bradykinin**

Verschiedene Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin und Bradykinin induzieren (über rezeptorvermittelte Änderungen der  $Ca^{2+}$ -Konzentration) die Synthese der Eicosanoide. Nach einem Mediumwechsel wurde in das FCS-haltige Medium der SKN56.6 Zellen 300  $\mu$ M Bradykinin gegeben. Zur Kontrolle blieben SKN56.6 Zellen unbehandelt. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 3 h, 6 h, 24 h bzw. 30 h lysiert, anschließend wurde die Luciferaseaktivität im Chemiluminometer gemessen (2.7.2.5). Der Entzündungsmediator Bradykinin schien keinen Effekt auf die Promotoraktivität zu haben. Die Luciferaseaktivität der mit Bradykinin stimulierten SKN56.6-Zellen war identisch mit den unbehandelten SKN56.6-Zellen.

### **3.16.5 Einfluss von Zaragozicsäure**

Die Zaragozicsäure ist ein Inhibitor der Squalensynthese im Sterolbiosynthese-Weg. Durch eine Erniedrigung des Cholesteringehalts in einer Zelle, sollte es zu einer vermehrten Proteolyse des Transkriptionsfaktors SREBP kommen, der dann möglicherweise die Expression verschiedener Gene beeinflusst. Um herauszufinden, ob die Promotoraktivität des humanen ADAM 10-Gens möglicherweise direkt durch eine Zaragozicsäure-Behandlung beeinflusst werden kann, wurde 50  $\mu$ M Zaragozicsäure in LDS-haltiges Medium von SKN56.6-Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 3 h, 6 h bzw. 24 h lysiert, anschließend wurde die Luciferaseaktivität im Chemiluminometer gemessen (2.7.2.5). Ein Effekt auf die Promotoraktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

### **3.16.6 Einfluss von *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE)**

*Caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) ist eine Komponente aus Propolis der Honigbiene. Es hat anti-mitogene, anti-carcinogene, anti-inflammatorische und immunomodulatorische Eigenschaften. Es wird als spezifischer synthetischer Inhibitor für die NFκB Aktivierung beschrieben. Außerdem soll es die Lipidperoxidation vermindern und die Aktivität der Ornithindecaboxylase, der Proteintyrosinkinase und der Lipoxygenase hemmen. Schließlich soll es die Apoptose auslösen. Um die Auswirkung von CAPE auf den ADAM10-Promotor zu untersuchen, wurden die stabilen SHY56.6- und SKN56.6-Zellen ausgesät und 4 h mit 25 µg/ml CAPE behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit äquivalenten Mengen an 50% Ethanol behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen (2.4.1). Die Promotoraktivität wurde bei allen Versuchen um ca. 50% reduziert. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich später heraus, dass die Luciferaseaktivität direkt durch CAPE negativ beeinflusst wird. Daher konnte das durch die CAPE Stimulation erzielte Ergebnis nicht weiter verwendet werden.

### **3.16.7 Einfluss von Lactacystein**

Lactacystein ist ein Inhibitor der Proteasomen vermittelten Degradation des Faktors IκB, was sich wiederum auf die NFκB Menge in den Zellen auswirken sollte. Die stabilen SKN56.6-Zellen wurden ausgesät und 4 h mit 5 µM Lactacystein bzw. der äquivalenten Menge DMSO behandelt. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (100 ± 3%) lagen die Luciferasewerte bei den Lactacystein behandelten SKN56.6 Zellen (112 ± 3%) nur geringfügig höher. Ein signifikanter Einfluss von Lactacystein auf die Promotoraktivität von ADAM10 konnte nicht nachgewiesen werden.

### **3.16.8 Einfluss von Camptothecin**

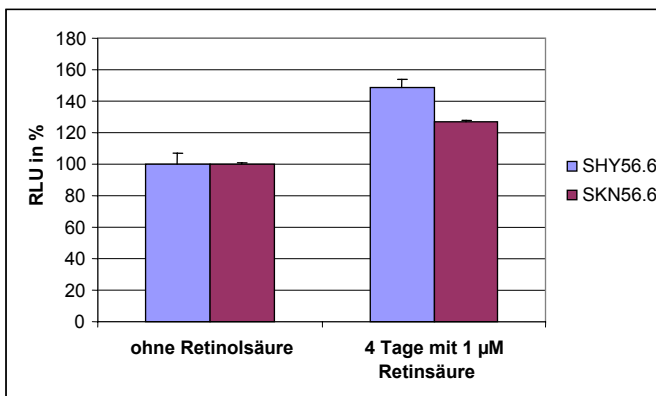
Camptothecin und seine Derivate sind spezifische Topoisomerase I Inhibitoren. Die Substanz bindet kovalent an einen spaltbaren Topoisomerase-Komplex, stabilisiert ihn und interferiert mit der DNA. Es werden Einzel- und Doppelstrangbrüche innerhalb der DNA ausgelöst. Die Topoisomerase I hat die Aufgabe die supercoiled DNA der Chromosomen während der DNA-Replikation und der Transkription zu entwinden. Durch Camptothecin werden beide Prozesse unterbrochen bzw. gehemmt. Dies führt schließlich zum Tod der Zelle. Um herauszufinden, ob die Promotoraktivität des humanen ADAM10-Gens möglicherweise direkt durch Apoptose auslösende Substanzen wie Camptothecin beeinflusst werden kann, wurde 2 µM Camptothecin ins Medium der SHY56.6 und SKN56.6 Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 6 h lysiert, anschließend wurde die Luciferaseaktivität gemessen (2.7.2.5). Bei den SHY56.6 Zellen kam es zu

einer Verminderung der Luciferaseaktivität von 100% auf 78% und bei SKN56.6 Zellen von 100% auf 64%. Da die Luciferaseaktivität nicht direkt durch Camptothecin beeinflusst wurde, scheint die Apoptose auslösende Substanz Camptothecin die Promotoraktivität in beiden Zelllinien negativ zu beeinflussen.

### 3.16.9 Einfluss von Retinsäure

Schließlich wurden Stimulationsversuche mit all-trans Retinsäure (Vitamin-A-Säure) durchgeführt. Der Ligand Retinsäure bindet als niedermolekulare Verbindung an einen Rezeptor in der Zelle. Durch diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Der Komplex kann dann in den Zellkern wandern, als Transkriptionsfaktor in Wechselwirkung mit vielen Promotoren treten und so die Expression der Gene beeinflussen. Beim Rezeptor-Ligand-Komplex handelt es sich um Zinkfinger-Protein, das als Heterodimer an die entsprechende Konsensussequenz bindet. Es induziert zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren AP2, MZF-1 und ETS. Über die direkte Interaktion mit der entsprechenden Bindungsstelle auf dem Promotor als auch über die indirekte Interaktion mit induzierten Transkriptionsfaktoren wie MZF-1 kann die Expression beeinflusst werden. Retinsäure wirkt sich auf die Entwicklung und Differenzierung von Zellen aus.

Um die Auswirkung von Retinsäure auf den ADAM10-Promotor zu untersuchen wurden die stabilen SHY56.6-Zellen ausgesät und 4 Tage mit 1  $\mu$ M Retinsäure in phenolrotfreiem Medium behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen bei denen ebenfalls täglich das Medium gewechselt wurde. Nach 4tägiger Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen (2.4.1). Der Promotor wurde in seiner Aktivität um 50% gesteigert. Auch hier war das Ergebnis reproduzierbar.

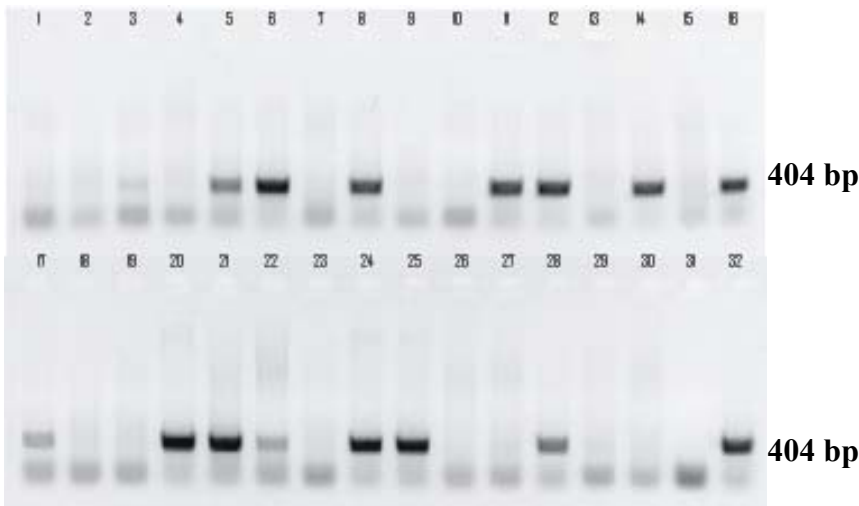


**Abbildung 3.20:** Behandlung der stabilen Zelllinien SHY56.6 und SKN56.6 mit Retinsäure. SHY56.6- (blau) bzw. SKN56.6-Zellen (pink) wurden vier Tage mit bzw. ohne 1  $\mu$ M Retinsäure behandelt. Im Anschluss daran wurden alle Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt (2.4.1).

### 3.17 Genotypisierung von transgenen Mäusen

Im Mausmodell sollte überprüft werden, ob eine neuronale Überexpression von bovinem ADAM10 in transgenen Tieren zu einem Anstieg des löslichen neuroprotektiven APP $\alpha$  und zu einer Abnahme der A $\beta$ -Peptide führt. Um einen möglichen Einfluss der Überexpression des bovinem ADAM10 auf andere bei der Alzheimer-Demenz beteiligten Genen in diesen transgenen Mäusen auszuschließen, sollten *Real Time* RT-PCR Experimente an RNA aus Mausgehirngeweben vorgenommen werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurden transgene Mäuse unter pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten. Die Nachkommen jeder Mauslinien (Tabelle 2.12) mussten jeweils auf ihre Transgenität hin überprüft werden. Zur Identifizierung von ADAM10 und APP transgenen Mäusen wurden Ohrbiopsien angefertigt, mit Proteinase K verdaut, und die enthaltene chromosomale DNA als Matrize für eine PCR verwendet (2.6.5.15). Die Überexpression des C-terminale HA-getaggten bovinen ADAM10 bzw. die Überexpression der dominant-negative ADAM10-Form, ADAM10-E384A-HA (ADAM10-dn) konnte durch PCRs mit dem Primerpaar Thy1\_for2 und Protease5\_rev nachgewiesen werden. Die Überexpression der London-Mutante von APP konnte durch das Primerpaar P2 und P3 nachgewiesen werden. Durch die Verwendung der transgenspezifischen Primer (Tabelle 2.10) entsteht jeweils eine Bande, die bei nichttransgenen Tieren fehlt. Auch bei den doppeltransgenen Mäusen konnte durch beide PCRs die Genotypisierung erfolgen.

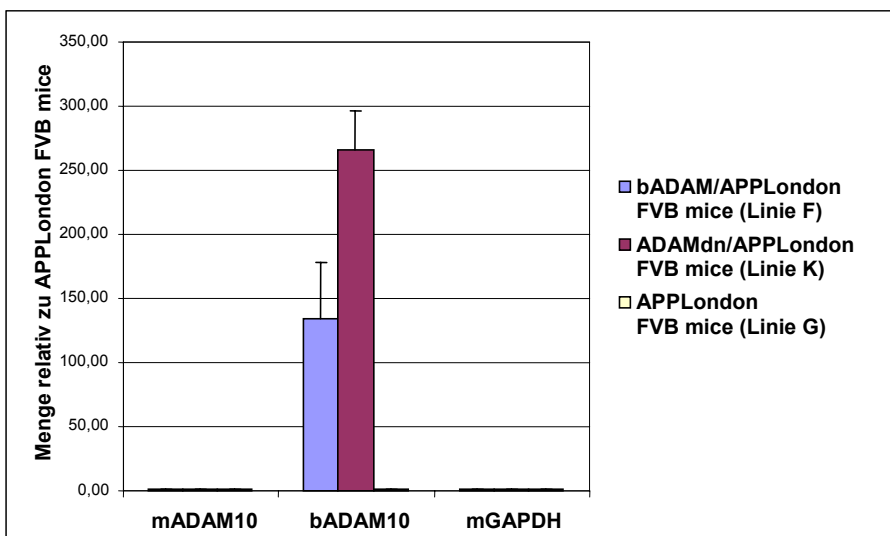


**Abbildung 3.21:** Beispiel einer Genotypisierung.

Aufgetragen sind ADAM10 PCR-Ansätze aus einer Genotypisierung: Spur 1-7 D-Linie, Spur 8-16 B-Linie, Spur 17-22 K-Linie, spur 23-30 F-Linie, Spur 31 Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O), Spur 32 Positivkontrolle (hzB-Linie). Ansätze mit einer deutlichen Bande lieferten das ADAM10 Amplifikat. Die PCR dieser Tiere fiel also positiv aus (Spur 5, 6, 8, 11, 12, 14, 16, 20, 21, 24, 25, 28).

### 3.18 *Real time* RT-PCR Experimente an RNA aus doppeltransgenen Mäusen

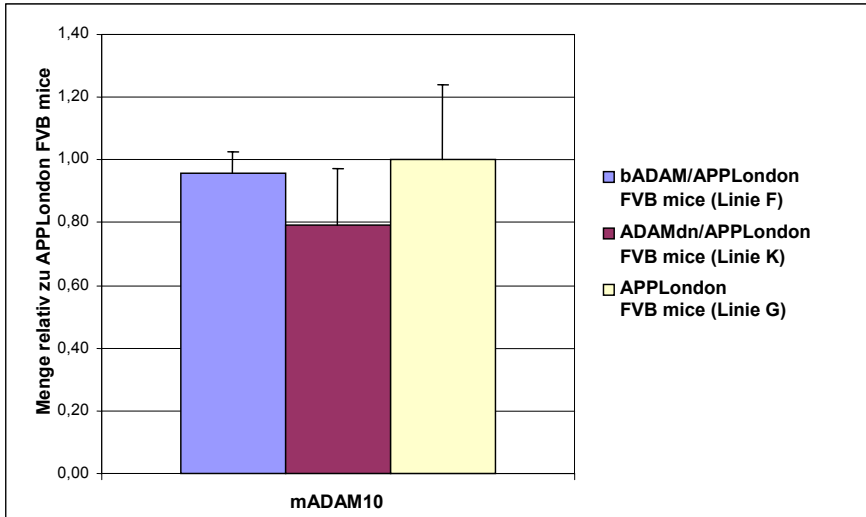
Zunächst sollte an den Mauslinien F (ADAM10 (high) x APP/London) bzw. K (ADAM10dn x APP/London) im Vergleich zu der Mauslinie G (APP/London) die Überexpression der jeweiligen ADAM10-mRNA überprüft werden. Hierzu wurde die RNA aus Mausgehirnproben isoliert (2.6.5.3) und in eine *Real time* RT-PCR eingesetzt (2.6.5.12). Dabei zeigte sich, dass sowohl die mRNA-Menge des bovinen C-terminal HA-getaggten ADAM10 als auch die mRNA-Menge der dominant negativen ADAM10-Form gegenüber der mRNA-Menge des endogenen murinen ADAM10 deutlich erhöht ist. Die erhaltenen ct-Werte wurden auf den ct-Wert der GAPDH normiert.



**Abbildung 3.22:** *Real time* RT-PCR an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.

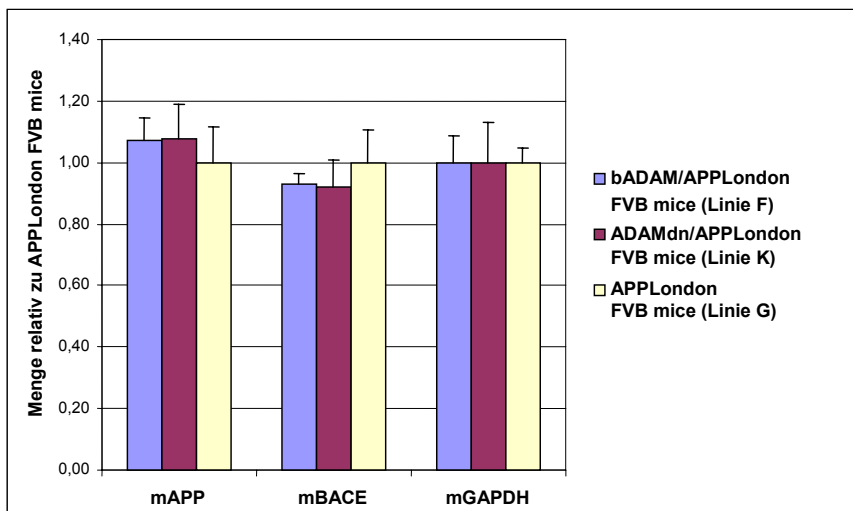
Für die *Real time* RT-PCR wurde die RNA aus Gehirnproben der Mauslinien F (blau) bzw. K (pink) im Vergleich zu der Mauslinie G (gelb) verwendet. Für das murine ADAM10 wurde das Primerpaar mADR\_for und mADR\_rev, für das bovine ADAM10 das Primerpaar hADAM\_Reti\_for und hADAM\_Reti\_rev\_r und für die murine GAPDH das Primerpaar GAPDH\_for und GAPDH\_rev genutzt. Das murine ADAM10 wurde in seiner Expression durch die starke Überexpression der beiden bovinen ADAM10-Formen nicht beeinträchtigt.

Um zu analysieren, ob die Überexpression von C-terminal HA-getaggtem bovinen ADAM10 bzw. die Überexpression der dominant-negative ADAM10-Form Einfluss auf die Genexpression anderer Mausgene nimmt, wurden weitere *Real time* RT-PCR Experimente durchgeführt. Hierzu wurde dieselbe RNA aus Gehirnproben der Mauslinien F (ADAM10 (high) x APP/London), K (ADAM10dn x APP/London) und G (APP/London) verwendet. Es zeigte sich, dass die mRNA-Menge des endogenen murinen ADAM10 nicht beeinflusst wurde, ebenso wenig wie die mRNA-Menge von endogenem APP und BACE1.



**Abbildung 3.23:** *Real time* RT-PCR an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.

Für die *Real time* RT-PCR wurde die RNA aus Gehirnprouben der Mauslinien F (blau) bzw. K (pink) im Vergleich zu der Mauslinie G (gelb) verwendet. Für das murine ADAM10 wurde das Primerpaar mADR\_for und mADR\_rev genutzt. Das murine ADAM10 wurde in seiner Expression durch die starke Überexpression der beiden bovinen ADAM10-Formen nicht beeinträchtigt.



**Abbildung 3.24:** *Real time* RT-PCR an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.

Für die *Real time* RT-PCR wurde die RNA aus Gehirnprouben der Mauslinien F (blau) bzw. K (pink) im Vergleich zu der Mauslinie G (gelb) verwendet. Für das murine APP wurde das Primerpaar hAPP695\_RT\_for und hAPP695\_RT\_rev, für das murine BACE wurde das Primerpaar mBACE\_RT-PCR\_for und mBACE\_RT-PCR\_rev und für die murine GAPDH das Primerpaar GAPDH\_for und GAPDH\_rev genutzt. Das murine APP und das murine BACE wurden in ihrer Expression durch die starke Überexpression der beiden bovinen ADAM10-Formen (Abbildung 3.22) nicht beeinträchtigt.

Auch in diesen Experimenten wurden die ermittelten ct-Werte auf den ct-Wert der murinen GAPDH bezogen.

Nachdem bestätigt worden war, dass bei den transgenen Mäusen zum einen eine Überexpression der bovinen ADAM10-Gene vorlag und zum anderen die endogene Expression von ADAM10, BACE1 und APP durch die Überexpression dieser bovinen ADAM10-Gene nicht beeinflusst wurde, wurden die transgenen Mäuse in weiteren Experimenten genauer untersucht. Hierbei ging es

darum die Funktion von ADAM10 als  $\alpha$ -Sekretase in den transgenen Mäusen zu bestätigen (Postina *et al.*, 2004).

## 4 Diskussion

### 4.1 Das humane ADAM10-Gen

In dieser Arbeit wurde der genomische Aufbau des humanen ADAM10-Gens aufgeklärt, welches auf Chromosom 15 lokalisiert ist (Yamazaki *et al.*, 1997). Die 5'-untranslatierte Region von 2179 bp beinhaltet den Promotor, daran schließt sich die codierende Region mit 16 Exons und 15 Introns an, gefolgt vom 3'-untranslatierten Bereich mit 764 bp (Tabelle 3.1). Das Genom hat also eine Größe von 151833 bp (Tabelle 3.1) und kodiert für 748 Aminosäuren (Yamamoto *et al.*, 1999), die denen des Maus ADAM10-Proteins sehr ähnlich sind.

Das Gen setzt sich aus 16 Exons zwischen 93 und 764 bp und 15 Introns zwischen 482 und 35263 bp zusammen (Tabelle 3.1). Alle Exons sind relativ klein, die Introns hingegen zum Teil sehr groß. Die größten Introns innerhalb des ADAM10-Gens liegen dabei im 5'-Bereich. Diesbezüglich gleicht die genomische Organisation des humanen ADAM10-Gens vielen anderen Genen (Santamarina-Fojo *et al.*, 2002). Die genomische Organisation des humanen und des Maus ADAM10 sind sich sehr ähnlich (Abbildung 3.2 und 3.3).

Die große Ähnlichkeit in der ADAM10-Aminosäuresequenz vieler Spezies (z.B. *H. sapiens-M. musculus*: Übereinstimmung 90%, Ähnlichkeit 92%; *H. sapiens-D. rerio*: Übereinstimmung 74%, Ähnlichkeit 84%; *H. sapiens-C. elegans*: Übereinstimmung 38%, Ähnlichkeit 54%) lässt auf einen hohen Grad der Konservierung des Proteins im Laufe der Evolution schließen (Anhang, Abbildung 6.2 und 6.3). Vergleicht man den Stammbaum der Spezies mit den hier erstellten Stammbäumen des ADAM10-Proteins (Anhang, Abbildung 6.4 und 6.5), so finden sich in der Gruppe der Vertebraten (Mensch, Orang-Utan, Maus, Ratte, Rind, Huhn, Kugelfisch, Zebrabärbling und Frosch) offenbar orthologe Kopien von ADAM10. Die Tiere dieser Gruppe eignen sich somit als Modellsystem für funktionelle Studien an ADAM10. Neben den Vertebraten findet man potentielle Orthologe von ADAM10 auch in Genomen von Insekten (Anophelesmücke und Honigbiene) wieder. Für die Fruchtfliege wurde auch eine passende Aminosäuresequenz gefunden (NP\_477187, Kuzbanian, KUZ, *Drosophila melanogaster*), die dem humanen ADAM10-Protein ähnlich ist (Übereinstimmungen = 312/911 (34%), Ähnlichkeit = 431/911 (47%)). Die Aminosäuresequenz der Fruchtfliege ist allerdings deutlich länger (1238 Aminosäuren) als die humane Sequenz (748 Aminosäuren), und stark konservierte Bereiche wechseln sich mit nichtkonservierten Bereichen ab. Da unklar ist, wodurch es zu dieser stark abgeleiteten Form des Drosophilaproteins gekommen ist, wurde bei der Erstellung des Stammbaus darauf verzichtet diese Aminosäuresequenz mit



aufzunehmen. Es bedarf funktioneller Untersuchungen, um die mögliche Orthologie zwischen dem KUZ-Protein von *Drosophila* und ADAM10 der Vertebraten zu bestätigen.

## **4.2 Die Promotorregion des humanen ADAM10-Gens**

### **4.2.1 Transkriptionsstartpunkte des humanen ADAM10**

Bei der Promotoranalyse ([www.itba.mi.cnr.it/webgene](http://www.itba.mi.cnr.it/webgene)) wurde keine TATA-Box stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes gefunden. Der Promotor des humanen ADAM 10-Gens gehört somit zur Gruppe der TATA-losen Promotoren.

Durch eine EST Analyse wurde die Existenz eines alternativen Transkriptionsstartpunktes festgestellt. Neben dem möglichen Startpunkt bei -444 bp, der sich aus der kompletten ADAM10-cDNA ergibt, wurde dieser Startpunkt bei -200 bp lokalisiert (Tabelle 3.3). Die Sequenz um diesen möglichen Transkriptionsstartpunkt unterscheidet sich jedoch von der Initiatorsequenz Py-Py-A-N-A/T-Py-Py, die für TATA-lose Promotoren beschrieben wird (Smale, 1997).

Die 5'-untranslatierte Region des humanen ADAM10 ist GC-reich. Auch wurde ein Bereich von -700 bis +200 bp gefunden, in dem mehrere CpG-Inseln vorkommen (Abbildung 3.3). In einer Region mit CpG-Inseln liegt eine offene Chromatinstruktur vor. Diese CpG-Inseln sind Stellen, an denen es zur Interaktion von Transkriptionsfaktoren und dem Promotor eines Genes kommen kann (Tazi and Bird, 1990; Bird, 1986). Sehr oft haben GC-reiche TATA-lose Promotoren keinen einzelnen Transkriptionsstartpunkt sondern mehrerer Transkriptionsstartpunkte (Lu *et al.*, 1994).

Beim humanen ADAM10-Gen könnte es sich um ein so genanntes Haushaltsgen (*housekeeping gene*) handeln, das konstitutiv exprimiert wird. Haushaltsgene haben in der Regel keine TATA-Box und verfügen nicht über ein festgelegtes Initiatorelement (Smale, 1994 und 1997; Hernandez, 1993; Weis und Reinberg, 1997). Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an demethylierten GC-Inseln (Sp1-Bindungsstellen) aus (Ng und Bird, 1999). Der Präinitiationskomplex wird hier durch die Wechselwirkungen zwischen Sp1 und TAFs stabilisiert (Kaufmann und Smale, 1994; Martinez *et al.*, 1994).

Entsprechend dem humanen ADAM10-Promotor fehlt auch dem APP-Promotor eine typische TATA-Box. Der APP-Promotor hat ebenfalls einen GC-Gehalt von 72% (Salbaum *et al.*, 1989). Eine mögliche Methylierung der CpG-Inseln wurde für den APP-Promotor vorhergesagt (Salbaum *et al.*, 1989). Auch soll es mehrere Transkriptionsstartpunkte beim APP-Promotor geben. Unter diesem Gesichtspunkt sind die Promotoren von ADAM10 und APP recht ähnlich.

#### **4.2.2 Ubiquitäre Expression des humanen ADAM10-Gens**

Um zu überprüfen, ob die Region stromaufwärts des vermuteten Transkriptionsstartpunkts tatsächlich Promotorfunktion besitzt, wurden 2179 bp des 5'-untranslatierten Bereichs des ADAM10-Gens in den Luciferasevektor pGL3-Basic kloniert (Tabelle 3.5a, pCP53AB.1). Der Vektor pCP53AB.1 wurde dann zur transienten Transfektion von verschiedenen Zelllinien verwendet.

Da die Luciferaseaktivität nach transienter Transfektion gegenüber dem Kontrollvektor pGL3-Basic stark erhöht war (Abbildung 3.7), konnte davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt im Vektor pCP53AB.1 den ADAM10-Promotor enthielt. Die höchste ADAM10-Promotoraktivität fand sich in den neuronalen SHSY5Y Zellen, gefolgt von neuronalen IMR32 Zellen. Eine geringere ADAM10-Promotoraktivität wurde bei den Nierenzellen HEK293 und bei den Leberzellen HepG2 gemessen. Dieses Ergebnis bestätigt die ubiquitäre Expression des ADAM10-Proteins (Howard *et al.*, 1996; Yavari *et al.*, 1998). Des Weiteren unterstützt diese Beobachtung, dass die ADAM10-Expression im Gehirn favorisiert von statten geht.

#### **4.2.3 Vergleich der humanen, der Maus und der Ratten ADAM10-Promotorsequenz**

Beim Vergleich der 5'-untranslatierten Region des humanen ADAM10-Gens (Chromosom 15) mit einer entsprechenden Sequenz der Maus (Chromosom 9) und der Ratte (Chromosom 8) zeigte sich ein hoher Grad an Ähnlichkeit zwischen den Spezies innerhalb der ersten 500 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt (Abbildung 3.4, 3.5 und 3.6). In einer größeren Distanz zum Transkriptionsstartpunkt nimmt diese Ähnlichkeit stark ab (Abbildung 3.4). Die Analyse des ADAM10-Promotors des Menschen, der Maus und der Ratte mit Hilfe unterschiedlicher Computerprogramme (MatInspector, mVista, rVista) identifizierte mehrere mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen zwischen -508 und -1 (Sp1-, CAAT-Box, USF-, RXR-, MZF-1, NFκB-, und CDCR3HD-Bindungsstellen). Die Sequenz dieser Bindungsstellen war bei allen Spezies konserviert (Abbildung 3.5), was auf einen ähnlichen Mechanismus bei der Regulation der ADAM10-Expression hindeutet.

Einige dieser für das humane ADAM10-Gen gefundenen potentiellen Bindungsstellen kommen auch in Promotoren anderer Gene vor, die an der Alzheimer'schen Erkrankung beteiligten sind, wie z.B. dem APP-Gen und den Presenilin-Genen. So wurden Sp1-Bindungsstellen für den APP- (Izumi *et al.*, 1992), den Presenilin-1- (Mitsuda *et al.*, 1997) und den Presenilin-2- (Pennypacker *et al.*, 1998) Promotor beschrieben. Der humane Presenilin-1-Promotor beinhaltet zusätzlich eine CAAT-Box, eine AP-2, eine PEA3 und eine Ets Transkriptionsfaktorbindungsstelle (Mitsuda *et al.*, 1997; Pastorcic and Das, 2003).

#### 4.2.4 Aktivitätsvergleich von verkürzten ADAM10-Promotorkonstrukten

Die funktionelle Analyse des humanen ADAM10-Promotors wurde mit 5'- und 3'-Deletionskonstrukten in HEK293-Zellen fortgesetzt. Transienten Transfektionen und Luciferaseaktivitätsmessungen brachten zum Vorschein, dass die Region von -508 bis -300 essentiell für die konstitutive ADAM10-Promotoraktivität ist (Abbildung 3.8). In dieser Region liegen potentielle Bindungsstellen für Sp1 (-366), USF (-317) und RXR (-302) sowie die potentielle CAAT-Box (-479).

Die Anwesenheit bestimmter Elemente im Promotor bedeutet jedoch nicht, dass das betreffende Gen auch durch diesen Faktor beeinflusst wird. Obwohl ein CREBP1/cJun-Element (*cAMP response element binding protein-1*) mit einer 100%iger Kern- und Matrixhomologie 644 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt gefunden wurde, hatte dessen Deletion keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Diese Bindungsstelle ist auch nicht über andere Spezies konserviert.

Auch die Deletionen der Brn-2, SREBP- und Oct-1-Konsensussequenzen beeinflussten die ADAM10-Promotoraktivität nicht signifikant. Man muss daher davon ausgehen, dass diese Elemente funktionell nicht wichtig für die konstitutive ADAM10-Promotoraktivität in HEK293 Zellen sind.

Ähnlich verhält es sich mit den repetitiven Sequenzen, die sich in der Region zwischen -1754 und -889 befinden. Die Deletion der zwei Kopien der CA-Dinukleotidwiederholung (-1307/-285 und -1172/-1138) hatte keine funktionelle Bedeutung für den ADAM10-Promotor. Dies steht im Kontrast zu anderen Promotoren, wie zum Beispiel des Promotors der Matrixmetalloproteinase 9, in dem die CA-Dinukleotidwiederholungen an der Modulation der Expression beteiligt sind (Shimajiri *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2003).

#### 4.2.5 ADAM10-Promotoraktivität nach Einführung von Punktmutationen in konservierten Elementen

Es wurden Promotorkonstrukte mit individuellen Punktmutationen in den putativen Sp1-Bindungsstellen (-521 und -366), in der CAAT-Box (-479) und im USF-Element (-317) hergestellt und in HEK293-Zellen untersucht. Die Analyse ergab, dass das USF-Element als Aktivator an der ADAM10-Transkription beteiligt ist und eine wichtige Funktion bei der Promotoraktivierung einnimmt.

Der Transkriptionsfaktor USF (*upstream stimulatory factor*) ist ein basisches Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Protein (Watt und Molloy, 1988; Bendall und Molloy, 1994). Es handelt sich um einen transkriptionellen Aktivator (Potter *et al.*, 1991), der mit TFII-I (Roy *et al.*, 1991) und TFIID interagiert (Sawadogo, 1988). USF erleichtert die Bildung des Präinitiationskomplexes während der

*in vitro* Chromatinzusammensetzung (Workman *et al.*, 1990) und kann die Transkription durch Stabilisierung dieses Komplexes aktivieren (Roy *et al.*, 1991). *In vitro* Transkriptionen und Kotransfektionsstudien zeigten, dass USF die Transkription vom humanen APP-Promotor aktiviert (Kovacs *et al.*, 1995).

Die CAAT-Box 479 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (+1) scheint hingegen keine Bedeutung bei der ADAM10-Promotorregulation zu haben. Für diese Region wurden bei der computergestützten Promotoranalyse auch keine potentiellen Bindungsstellen für ein CCAAT-Bindungsprotein (CTF bzw. CNF-I, CBE bzw. NF-Y) ausgewiesen.

Auch die Punktmutationen in den Sp1-Bindungsstellen 521 und 366 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes beeinflussten die Aktivität des Promotors nicht. Diese Bindungsstellen sind aber in allen drei Spezies konserviert und wurden bei der computergestützten Promotoranalyse eindeutig als Sp1-Bindungsstellen ausgewiesen. Die Bedeutung von Sp1 für die Promotorregulation wurde daher nochmals durch Untersuchungen in Schneider *Drosophila* Zellen und EMSA überprüft.

#### **4.2.6 Versuche an Schneider *Drosophila* Insektenzellen**

Schneider *Drosophila* Insektenzellen enthalten endogen keine Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie. Durch transiente Kotransfektionen des humanen ADAM10-Promotors (pCP53AB.1), zweier seiner Sp1-Punktmutanten (pCP54AB.1 und pCP61AB.2) und der pPac-Expressionsvektoren für Sp1, Sp3, USp3 und USF-1 konnte eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und USp3 an der Promotorregulation bestätigt werden. Eine Transkription vom ADAM10-Promotor war in allen Fällen ohne die zusätzliche Expression von Sp1 bzw. USp3 nicht nachweisbar. Dies demonstriert, dass sowohl Sp1 als auch USp3 kritische Faktoren in der Transkriptionsregulation des humanen ADAM10-Gens sind, wobei USp3 ein stärkerer Stimulator zu sein scheint als Sp1. Die Sp1-Punktmutationen in den ADAM10-Promotorkonstrukten (pCP54AB.1 und pCP61AB.2) beeinflussten hingegen das Ergebnis dieser Versuche nicht. Dies zeigt eindeutig, dass die eingeführten Punktmutationen nicht ausreichten, um die Bindung der Sp1-Transkriptionsfaktoren zu verhindern.

Mitglieder der Sp-Familie haben ein Zinkfinger-Motiv und wirken als Transkriptionsaktivator (Briggs *et al.*, 1986). Es sind Interaktionen mit Initiatorbindenden Faktoren wie z.B. TAF II 110 bekannt (Seto *et al.*, 1993), die eventuell auch beim ADAM10-Promotor wirksam sind. Sp1 wird auch mit dem Erhalt unmethylierter GC-Inseln in Verbindung gebracht (Brandeis *et al.*, 1994). Ein Einfluss der DNA-Methylierung auf die Aktivität des ADAM10-Promotors wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet.

Die transienten Kotransfektion des Expressionsvektors pPacUSF-1 führten hingegen nicht zur Aktivierung des humanen ADAM10-Promotors. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Überexpression des Proteins trotz richtiger USF-1 cDNA Sequenz im Expressionsvektor nicht funktioniert. Möglicherweise wird das Protein auch nicht richtig gefaltet oder der Transport in den Zellkern findet nicht statt. Außerdem könnte ein Interaktionspartner fehlen, der für die Aktivierung des Promotors mit USF notwendig ist. In der Literatur konnten keine Hinweise gefunden werden, dass heterolog exprimiertes USF-1 in Schneiderzellen aktiv ist. Schließlich ist derzeit nicht sicher, welches Protein an der entsprechenden Bindungsstelle 317 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt bindet. Wie mit dieser Arbeit aber bereits gezeigt, bindet an dieser Stelle eindeutig ein Aktivator des ADAM10-Promotors. Dies sollte durch EMSA-Studien bestätigt werden.

#### **4.2.7 Untersuchungen des ADAM10-Promotors im EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)**

Mit der vorliegenden Arbeit sind einige Hinweise für wichtige Bindungsstellen im ADAM10-Promotor geliefert worden. Daher wurden zusätzlich zu der Promotoranalyse mittels Reportergenkonstrukten und Luciferasemessungen einzelne Promotorregionen einer EMSA-Analyse unterzogen, um die Protein/DNA-Interaktion zu bestätigen.

Ein Oligonukleotiddoppelstrang um die Region 366 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt wurde in einem EMSA (Abbildung 3.14) eingesetzt. Für diese Region wurde in computergestützten Analysen eine Sp1-Bindungsstelle vorausgesagt. Die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Promotorregulation des humanen ADAM10-Gens wurde durch Transfektionsversuche in Schneider Drosophila Insektzellen bestätigt. Im EMSA wurde eine Protein/DNA-Interaktion für diese Region bestätigt, welche durch sequenzspezifische unmarkierte Oligonukleotiddoppelstränge unterdrückt werden konnte. Da auch die Konkurrenz mit unmarkierten mutierten Sp1-Oligonukleotiddoppelsträngen dieser Region die Protein/DNA-Interaktion verdrängte, bestätigte sich, dass die eingeführte Punktmutation an dieser Stelle nicht effizient war, die Proteinbindung zu unterdrücken.

In einem weiteren EMSA (Abbildung 3.15) wurde die Sequenz um die Region -317 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt verwendet. Vom Programm MatInspector wurde für diese Region eine Bindungsstelle für das USF-Element vorausgesagt. Punktmutationen in der Bindungssequenz führten bei Reportergenstudien zu einer starken Verminderung der Promotoraktivität. Im EMSA konnte eine Proteinbindung an diese Region nachgewiesen werden. Der *Shift* konnte durch sequenzspezifische unmarkierte Oligonukleotiddoppelstränge unterdrückt

werden. Bei Konkurrenz mit mutierten unmarkierten USF-Oligonukleotiddoppelsträngen konnte die Protein/DNA-Interaktion nicht unterdrückt werden. Diese doppelsträngigen Oligonukleotide scheinen den Transkriptionsfaktor, der an dieser Stelle bindet, nicht mehr zu binden, so dass es zu keiner Konkurrenz um den Transkriptionsfaktor kommt. Damit bestätigt sich, dass die eingefügte Punktmutation zu einer Zerstörung der Bindungsstelle geführt hat.

Schließlich wurde ein EMSA (Abbildung 3.16) mit Oligonukleotiddoppelsträngen für die potentielle RXR-Bindungsstelle durchgeführt. Die Protein/DNA-Interaktion, die bei diesem EMSA nachgewiesen werden konnte, konnte durch Konkurrenz mit sequenzspezifischen unmarkierten RXR-Oligonukleotiddoppelsträngen unterdrückt werden.

Es wurden somit DNA/Protein-Interaktion bei Sp1(-366), USF(-317) und RXR(-203) identifiziert. Ein EMSA mit Sp1-Oligonukleotiddoppelsträngen (-521) führte nicht zum erwarteten *Shift*. Es zeigte sich, dass die Zusammensetzung des Bindungspuffers für die Komplexbildung entscheidend ist. Möglicherweise wäre ein längeres Oligonukleotid in der Lage gewesen, den DNA-Protein-Komplex zu bilden.

Eine gesicherte Aussage über den Transkriptionsfaktor, der an der jeweiligen Bindungsstelle bindet, kann nicht getroffen werden, da bisher auf Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern verzichtet wurde.

#### **4.2.8 Einfluss von überexprimierten SREBPs auf den ADAM10-Promotor**

Um einen Einfluss von überexprimierten SREBPs auf die Promotoraktivität des ADAM10-Gens zu untersuchen, wurden Expressionsvektoren mit den Sterol-Regulatorelement-Bindungsproteinen (SREBP) hergestellt (Tabelle 3.7). Zwei Zelllinien (HepG2, SHSY5Y) wurden mit den Promotorkonstrukten und den SREBP-Expressionsvektoren transfiziert. Überexprimiertes SREBP1a und SREBP2 führte in beiden Zelllinien zu einer Aktivierung des Kontrollvektors SRE-luc wie auch des Promotorvektors pCP9.3(-1735/+390). Die Überexpression des Faktors SREBP1c beeinflusste die Promotoraktivität der eingesetzten Vektoren nicht (Abbildung 3.17).

Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von SREBP1a und SREBP2 in *Real time* RT-PCR Experimenten nicht zu einer Erhöhung der endogenen ADAM10-Genexpression. Der positive Effekt der SREBPs aus den Reporterstudien konnte somit auf der Ebene des endogenen ADAM10 nicht bestätigt werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse von Reporterstudien muss berücksichtigt werden, dass die zur Transfektion verwendete Promotorkonstrukte nicht in einer Chromatinstruktur organisiert sind. Ein Effekt durch Überexpression eines Transkriptionsfaktors auf einen künstlichen Promotor ist daher nur mit Einschränkungen aussagekräftig (Horton *et al.*, 2003)

#### **4.2.9 Induktion des humanen ADAM10-Promotors durch potentiell transkriptionsfördernde Substanzen an transient transfizierten Zellen**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität des humanen ADAM10-Promotors regulieren. Daher wurden verschiedene Zelllinien transient mit Promotorkonstrukten transfiziert und anschließend in Stimulationsversuche eingesetzt. Die dabei verwendeten Substanzen sollten sich auf unterschiedliche Signalwege in der Zelle auswirken.

##### **4.2.9.1 Cholesterinbiosyntheseweg**

Lovastatin wurde verwendet, da eine cholesterinabhängige Regulation von ADAM 10 gefunden wurde (Kojro *et. al.*, 2001). Die Substanz ist ein Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, einem Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese. Durch eine Erniedrigung des Cholesteringehaltes in der Zelle sollte es zu einer vermehrten Spaltung der SREBP-Transkriptionsfaktoren kommen, die dann möglicherweise die Expression des ADAM10-Gens beeinflussen.

Bei der Lovastatinbehandlung der mit dem Kontrollvektor SRE-luc bzw. mit dem Promotorkonstrukt pCP9.3 transfizierten HepG2 Zellen konnte kein Effekt auf die Regulation des ADAM10-Promotors nachgewiesen werden.

Um herauszufinden, ob die Promotoraktivität des humanen ADAM10-Gens möglicherweise doch durch Statine beeinflusst wird, wurden HEK293, SHSY5Y, HepG2 und SKNMC Zellen mit verschiedenen Statinen behandelt. In *Real time* RT-PCR Experimenten konnte eine Erhöhung der Genexpression der HMG-CoA-Reduktase sowie von SREBP1a und SREBP2 festgestellt werden. Diese Reaktionen dürften auf eine Erniedrigung des Cholesteringehaltes in Folge der Statinbehandlung zurückzuführen sein, die in die Stimulationsversuche eingesetzten Substanzen waren also aktiv. Trotzdem konnte keine Veränderung der Genexpression bei ADAM10 festgestellt werden. Auch eine Stimulation der HepG2 Zellen mit Zaragozicsäure, einem Inhibitor der Squalen-Synthase, beeinflusste in *Real time* RT-PCR Experimenten die ADAM10-Expression nicht.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Inhibitoren des Cholesterinbiosyntheseweges keinen Einfluss auf die ADAM10-Promotorregulation hatten. Da aber auf Proteinebene eine cholesterinabhängige Regulation von ADAM10 vorliegt, sind weitere Untersuchungen nötig, diesen Effekt näher aufzuklären.

##### **4.2.9.2 Östradiolsignalweg**

Von Östrogenen ist bekannt, dass sie den Metabolismus von APP beeinflussen, die Menge an A $\beta$  vermindern (Jaffe A. *et al.*, 1994), die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität verstärken und die Neuronen vor oxidativen Stress schützen (Behl *et al.*, 1995). Daher wurde der Einfluss des Östrogens  $\beta$ -Östradiol

auf die ADAM10-Promotoraktivität in SKNMC Zelllinien untersucht. Diese waren zum einen stabil mit einem leeren Expressionsvektor und zum anderen mit dem Östradiol-Rezeptor-Expressionsvektor transfiziert. Beide Zelllinien wurden transient mit dem Kontrollvektor ERE-luc bzw. mit dem Promotorkonstrukt pCP9.3 (-1735/+390) transfiziert. Der ERE-Kontrollvektor wurde durch die vierstündige Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol eindeutig stimuliert, d.h. die Behandlung war wirksam. Im Vergleich dazu wurde der ADAM10-Promotor im Vektor pCP9.3 durch  $\beta$ -Östradiol nicht in seiner Aktivität beeinflusst.

Dieses Ergebnis unterstreicht eine östrogenunabhängige Expression des humanen ADAM10-Gens.

#### **4.2.10 Induktion des humanen ADAM10-Promotors durch potentiell transkriptionsfördernde Substanzen an stabilen Zelllinien**

Um die Ergebnisse transienter Transfektionen und Stimulationsversuche so reproduzierbar wie möglich zu machen, wurde an Stelle von Calciumphosphat mit Lipofectamine2000 und an Stelle von DNA-MAXI-Präparationen mit endotoxinfreier Plasmid-DNA gearbeitet. Unterschiedliche Transfektionseffizienzen und Wachstumsunterschiede im Anschluss an transiente Transfektionen wurde auf diese Weise so gering wie möglich gehalten.

Alternativ wurde aber nach einem Weg gesucht, diese Problematiken mit einer stabilen Zelllinie zu umgehen. So wurden die Zelllinien SHSY5Y und SKNMC stabil mit der ADAM10-Promotorregion von -2179 bis -1 und dem daran angeschlossenen *Firefly*-Luciferasegen transfiziert.

Mit diesem stabilen Zellsystem ließ sich nun auf einfache Weise überprüfen, ob bestimmte Substanzen Einfluss auf die ADAM10-Promotoraktivität nehmen. Auch Langzeitexperimente sind nun im Gegensatz zu transienten Transfektionen möglich.

##### **4.2.10.1 Einfluss verschiedener potentiell transkriptionsfördernder Substanzen auf die ADAM10-Promotoraktivität**

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), einem Proteinase C Aktivator, nicht zu einer Promotoraktivierung in den stabil transfizierten SHSY5Y und SKNMC Zellen führte. Ebenso hatte die Behandlung mit dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und mit Bradykinin keinen Einfluss auf die ADAM10-Promotoraktivität. Die Stimulation der Signalwege über die Proteinkinase C, über das Neurotrophin BDNF bzw. über Bradykinin, die sich alle positiv auf die Freisetzung von APPsa auswirken, scheinen keinen direkten Einfluss auf die ADAM10-Expression zu haben.



Anhand von Stimulationsversuchen an stabilen SKN56.6-Zellen bestätigte sich, dass der Inhibitor der Squalen-Synthase Zaragozicsäure keinen Effekt auf die Expression des ADAM10-Gens hat. Die Promotoraktivität von ADAM10 ist unabhängig von Veränderungen des Cholesterinbiosyntheseweges.

### **4.2.10.2 Apoptosesignalwege**

Mit verschiedenen Apoptose auslösenden Substanzen wurde überprüft, ob eine Induktion des Apoptosesignalweges Einfluss auf die ADAM10-Promotoraktivität hat. Ergebnisse aus der Behandlung mit *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) konnten auf Grund einer Beeinflussung der Luciferaseaktivität selbst nicht verwendet werden. Die Behandlung mit Lactacystein, einem Proteasomeninhibitor, der sich auch auf die Menge an NF $\kappa$ B auswirken sollte, hatte keinen Einfluss auf die Promotoraktivität von ADAM10. Die Behandlung mit Camptothecin, einem spezifischen Topoisomerase I Inhibitor, führte allerdings zu einer eindeutigen Verminderung der ADAM10-Promotoraktivität in SHY56.6- und SKN56.6-Zellen. Die Apoptose auslösende Substanz Camptothecin beeinflusste die Promotoraktivität in beiden Zelllinien negativ. Eine Induktion des Apoptosesignalweges scheint sich somit negativ auf die Genexpression des humanen ADAM10 auszuwirken.

### **4.2.10.3 Signalwege, die zur Differenzierung der Zellen führen**

Schließlich wurden Stimulationsversuche mit all-trans Retinsäure (Vitamin-A-Säure) durchgeführt, die sich auf die Entwicklung und Differenzierung von Zellen auswirken sollten. Die Bindung des aktiven Rezeptor-Protein-Komplexes als Heterodimer an eine Konsensussequenz in Promotorregionen kann die Expression verschiedener Gene induzieren. Dabei handelt es sich unter anderem um die Transkriptionsfaktoren AP2, MZF-1 und ETS, die dann wiederum andere Gene mit entsprechenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen induzieren können. In den stabilen SHY56.6-Zellen kam es durch viertägige Behandlung mit Retinsäure zu einer Promotoraktivierung von 50%. Bei der computergestützten Analyse des ADAM10 5'-untranslatierten Bereiches fanden sich zwei potentielle Bindungsstellen für den Retinsäurerezeptor (RXR): 302 und 203 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes. Des Weiteren wurde eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor MZF-1 bei -237 identifiziert, über den indirekt durch die Retinsäure ein Einfluss ausgeübt werden könnte. Im Gegensatz zu der Apoptose auslösenden Substanz Camptothecin wirkt sich die Stimulation mit Retinsäure, die die Entwicklung und Differenzierung von Zellen fördert, positiv auf die ADAM10-Promotoraktivität aus. Dieser Effekt ließ sich auch in *Real time* RT-PCR Experimenten und in Western Blots bestätigen (T. Endres, mündliche Mitteilung). Sowohl die

mRNA-Menge als auch die Proteinmenge von ADAM10 war nach viertägiger Retinsäureinkubation erhöht. Die Retinsäurebehandlung wirkte sich differenzierend auf die Morphologie der Zellen aus (T. Endres, mündliche Mitteilung).

Die bei Alzheimer Patienten verringerte ADAM10-Aktivität (Tyler *et al.*, 2002), könnte auf die im Alter abnehmende Anzahl der RXR-Rezeptoren (Corcoran *et al.*, 2004) und die erhöhte Apoptose der Nervenzellen zurückzuführen sein. Aus den Stimulationsversuchen mit Retinsäure und dem durch diese Substanz ausgelösten positiven Effekt auf die Promotoraktivität von ADAM10 zeigt sich, dass sich eine Verminderung der RXR-Rezeptoren negativ auf die die Genexpression von ADAM10 auswirken könnte. Die apoptoseauslösende Substanz Camptothecin zeigte zusätzlich einen negativen Effekt auf die Genexpression von ADAM10. Beide Ergebnisse liefern Ansätze, die verminderte ADAM10-Aktivität im Gehirn der Alzheimererkrankten zu erklären. Eine Therapie mit Vitamin A könnte daher womöglich beiden negativen Effekten entgegenwirken.

Dazu ist es notwendig, weiterführenden Experimenten am ADAM10-Promotor durchzuführen, um die Bindungsstelle zu finden, die auf die Stimulation mit all-trans Retinsäure anspricht. Dies könnte über die Einführung weiterer Punktmutationen an den RXR- und an der MZF-1 Bindungsstelle geschehen. Auch der Signalweg über die Bindung an einen Rezeptor bis in den Zellkern könnte über die neuen stabilen Zelllinien mit unterschiedlichen Aktivatoren und Inhibitoren näher untersucht werden.

### **4.2.11 Untersuchungen an doppeltransgenen Mäusen**

Am Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. F. Fahrenholz wurde in einem Tiermodell durch Überexpression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 überprüft, ob die Menge an neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden durch eine Erhöhung der ADAM10-Expression vermindert wird.

Im Rahmen dieses Projektes wurden von mir die transgenen Mäuse auf ihre Transgenität hin untersucht. Durch die Überexpression von humanem mutierten APP im Gehirn dieser transgenen Mäusen kommt es mit fortschreitendem Alter der Tiere zur Ablagerung der A $\beta$ -Peptide (Amyloidplaques), einem auch bei der Alzheimer'schen Erkrankung auftretenden Phänomen.

In Voruntersuchungen musste die Überexpression des bovinen ADAM10 und des dominant-negative ADAM10 bestätigt werden. An den Mauslinien F (ADAM10 (high) x APP/London) bzw. K (dnADAM10xAPP/London) konnte im Vergleich zu der Mauslinie G (APP/London) die Überexpression der jeweiligen bovinen ADAM10-mRNA gezeigt werden. Gleichzeitig musste ein Einfluss der bovinen ADAM10-Überexpression auf die anderen an der Alzheimer'schen Erkrankung beteiligten Gene ausgeschlossen werden. Hierzu wurden *Real time* RT-PCR Versuche

an RNA aus Gehirnproben der Mauslinien F (ADAM10 (high) x APP/London), K (dnADAM10xAPP/London) und G (APP/London) durchgeführt, die einen Einfluss auf die Expression der Mausgene ADAM10, APP und BACE ausschlossen.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die neuronale Überexpression von bovinem ADAM10 in den doppeltransgenen (ADAM10 (high) x APP/London) Mäusen die Menge an neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden verringert und gleichzeitig die Menge an neuroprotektiv wirkenden APPs $\alpha$  erhöht. Ebenso wurde die Amyloidplaquebildung in diesen doppeltransgenen Mäusen vermindert und deren synaptische Plastizität und kognitive Fähigkeiten glichen denen gesunder Tiere. Umgekehrt führte die Überexpression des dominant-negativen ADAM10 zu einer Erhöhung der Amyloidplaquebildung (Postina *et al.*, 2004).

In weiteren Versuchen soll die RNA aus dem Hippocampus dieser transgenen Tiere isoliert und vergleichende Studien mittels der Mikroarray-Technologie durchgeführt werden. Der Einfluss der ADAM10-Überexpression auf die Expression anderer Gene gestattet einen besseren Einblick auf die neuroprotektive Wirkung von ADAM10. Mit den Ergebnissen dieser neuen Studien kommt man eventuell einem neuen Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer'schen Erkrankung näher.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das ADAM10-Gen kodiert für eine membrangebundene Disintegrin-Metalloproteinase, die das Amyloidvorläuferprotein spaltet. Im Mausmodell konnte bewiesen werden, dass die Überexpression von ADAM10 die Plaquebildung vermindern und das Langzeitgedächtnis verbessert. Aus diesem Grund ist es für einen möglichen Therapieansatz für die Alzheimer'sche Erkrankung erforderlich, die Organisation des humanen ADAM10-Gens und seines Promotors aufzuklären.

Beim Vergleich der genomischen Sequenzen von humanem und murinem ADAM10 zeigte sich eine hohe Übereinstimmung. Beide Gene umfassen 160 kbp und bestehen aus 16 Exons. Die ersten 500 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt zwischen dem Menschen, der Maus und der Ratte sind hoch konserviert. Diese Region beinhaltet spezifische regulatorische Elemente, die die ADAM10-Transkription modulieren. In den ersten 2179 bp stromaufwärts vom humanen ADAM10-Translationsstartpunkt fanden sich einige potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Brn-2, SREBP, Oct-1, Creb1/cJun, USF, Maz, MZF-1, NFκB und CDPCR3HD). Es wurde eine charakteristische GC-Box und eine CAAT-Box, aber keine TATA-Box identifiziert. Nach Klonierung dieser 2179 bp großen Region wurde eine starke Promotoraktivität, insbesondere in neuronalen Zelllinien, gefunden. Bei der Analyse von Deletionskonstrukten wurde die Region zwischen -508 und -300 als essentiell für die Transkriptionsaktivierung bestimmt.

Die Promotoraktivität wird zudem streng herunterreguliert, wenn in die Region 317 bp stromaufwärts vom Startpunkt der Translation eine Punktmutation eingeführt wird. Diese per Computeranalyse als USF-Bindungsstelle deklarierte Region spielt eine zentrale Rolle bei der ADAM10-Transkription. Im EMSA wurde eine Protein-DNA-Interaktion für diese Region gezeigt. Durch transienten Transfektionen in Schneider *Drosophila* Insektenzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von Sp1 und USp3 für die ADAM10-Promotoraktivität entscheidend ist. In EMSA-Studien bestätigte sich eine Protein-DNA-Interaktion für die Region -366 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt.

Die Punktmutation in der CAAT-Box veränderte die die Promotoraktivität nicht. Da weiterhin für diese potentielle Bindungsstelle kein Bindungsfaktor vorausgesagt wurde, scheint die CAAT-Box keine Bedeutung bei der Promotorregulation zu spielen.

Schließlich fand sich im EMSA eine Protein-DNA-Interaktion für die Bindungsstelle 203 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt. Diese in Computeranalysen als RXR-Bindungsstelle identifizierte Region ist ebenfalls von Bedeutung in der Promotorregulation.

Auf der Suche nach Substanzen, die die ADAM10-Promotoraktivität beeinflussen, wurde ein negativer Effekt durch die apoptoseauslösende Substanz Camptothecin und ein positiver Effekt durch die Zelldifferenzierungsauslösende Substanz all-trans Retinsäure festgestellt.

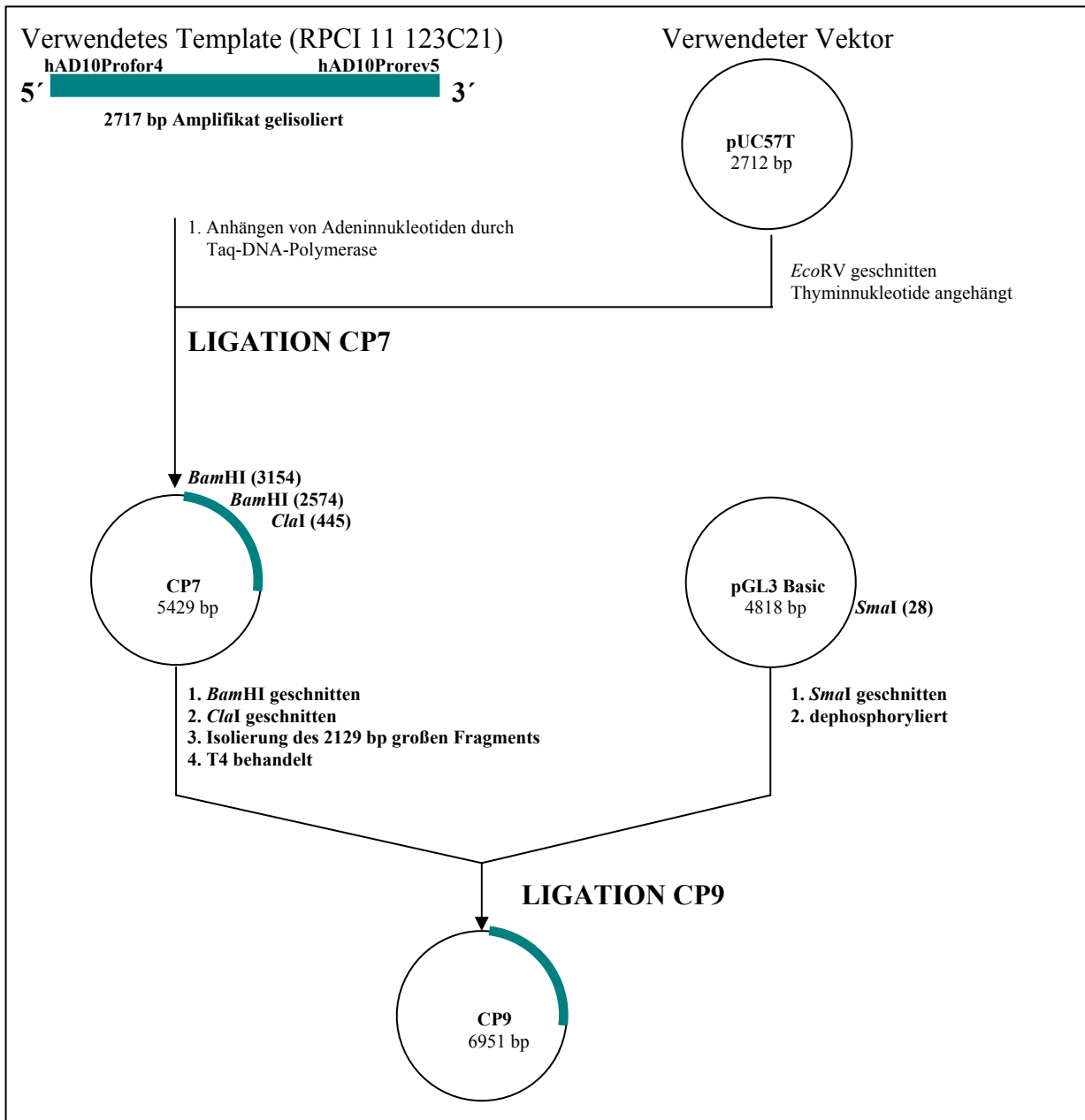
Mit dieser Arbeit wurde die genomische Organisation des ADAM10-Gens zusammen mit dem zugehörigen Promotor aufgeklärt und ein neuer Regulationsmechanismus für die Hochregulation der Expression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 gefunden.

Im Weiteren sollen nun die genauen Mechanismen bei der Hochregulation der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 durch Retinsäure untersucht und durch Mikroarray-Analysen an RNA-Proben transgener Mäuse, welche ADAM10 überexprimieren, neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer'schen Erkrankung identifiziert werden.

## 6 Anhang

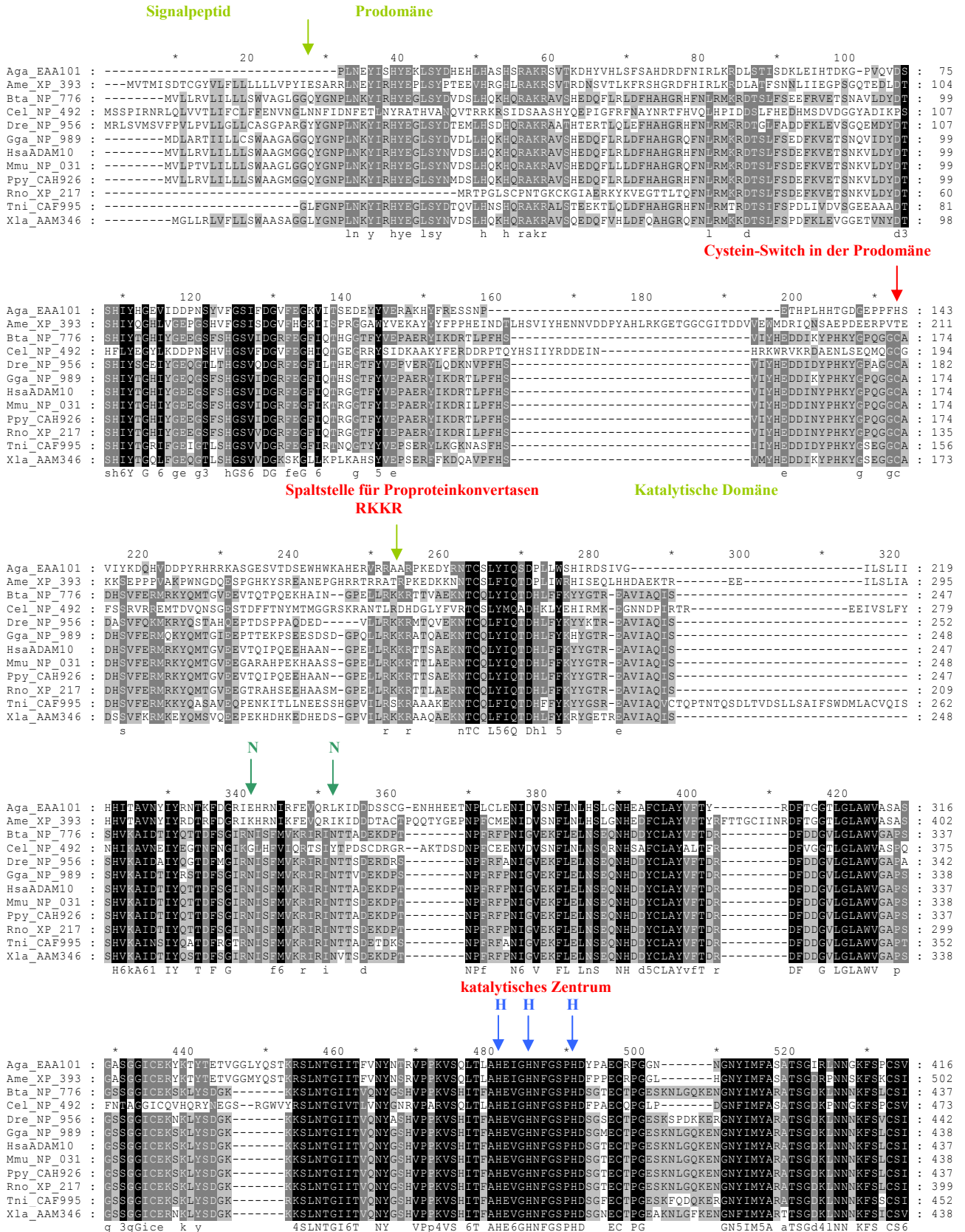
### 6.1 Einklonierung des humanen ADAM10-Promotors in das Plasmid pGL3-Basic

Abbildung 6.1: Übersicht der Schritte zur Einklonierung des Promotorbereiches des humanen ADAM10-Gens in das Plasmid pGL3-Basic.

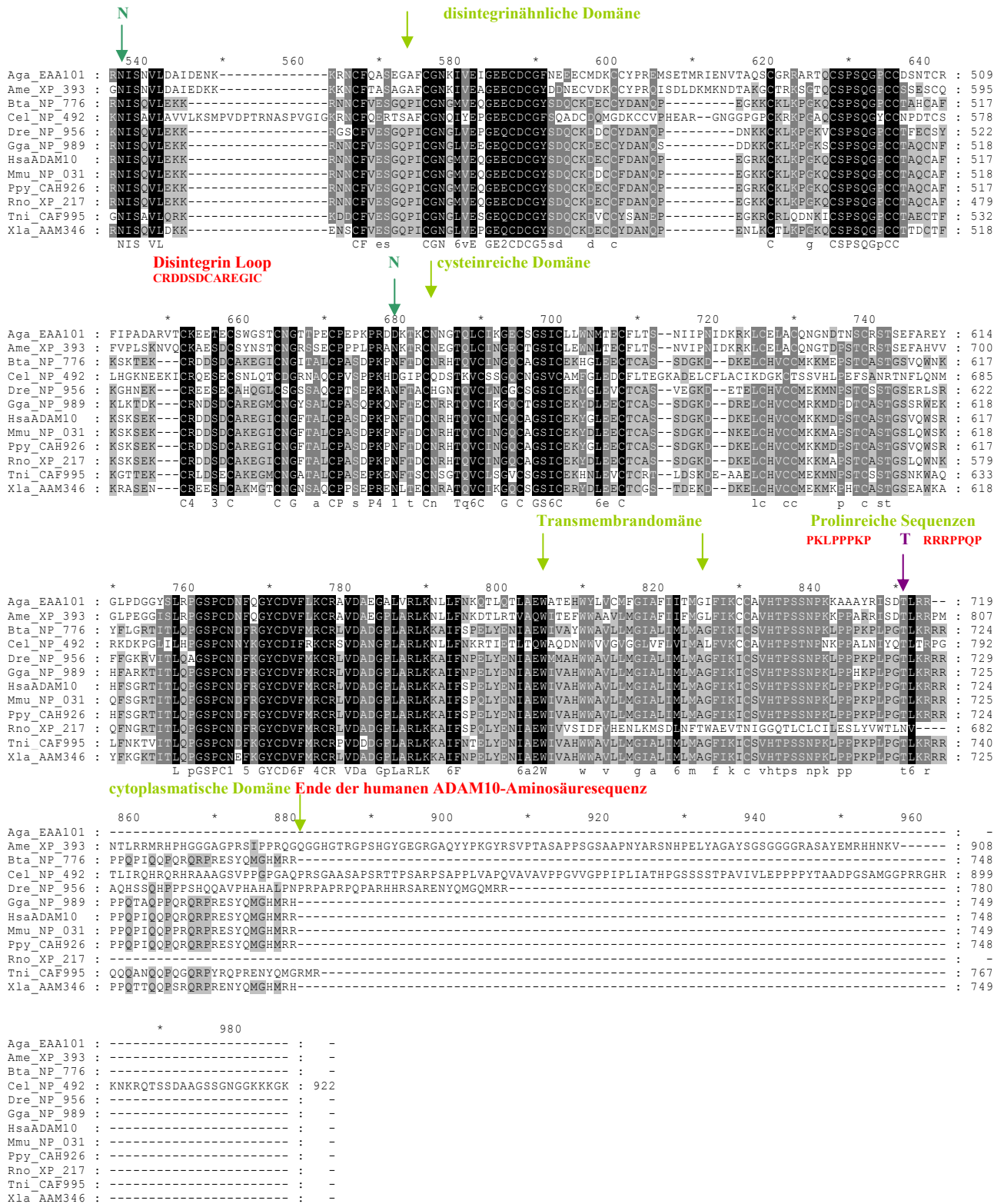


## 6.2 Phylogenetische Analyse des ADAM10-Proteins

Abbildung 6.2: Aminosäurevergleich zwischen den verschiedenen Spezies, dargestellt mit dem Programm Genedoc. Legende zu Abbildung 6.2 und 6.3 siehe unten.



# Anhang



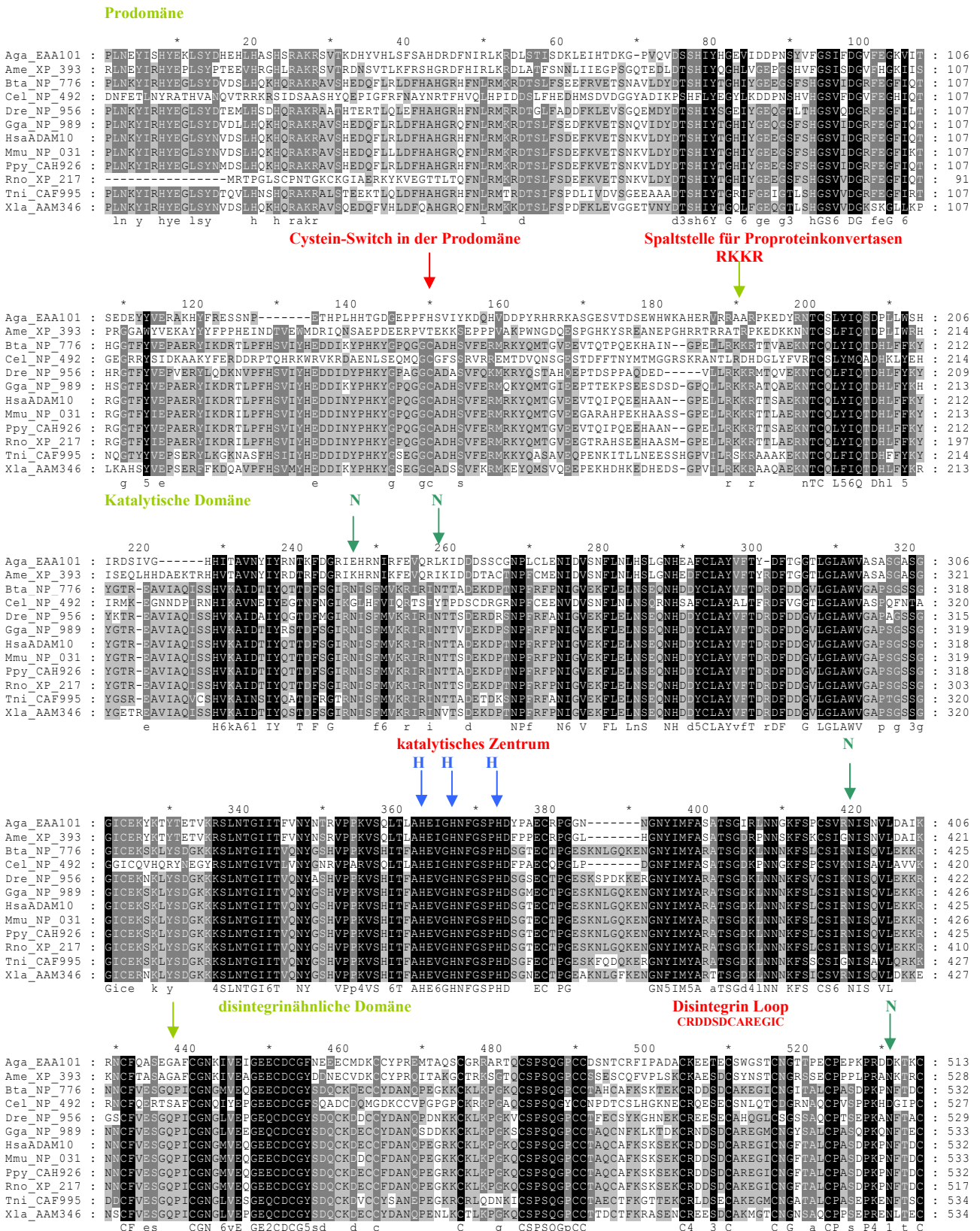


# Anhang

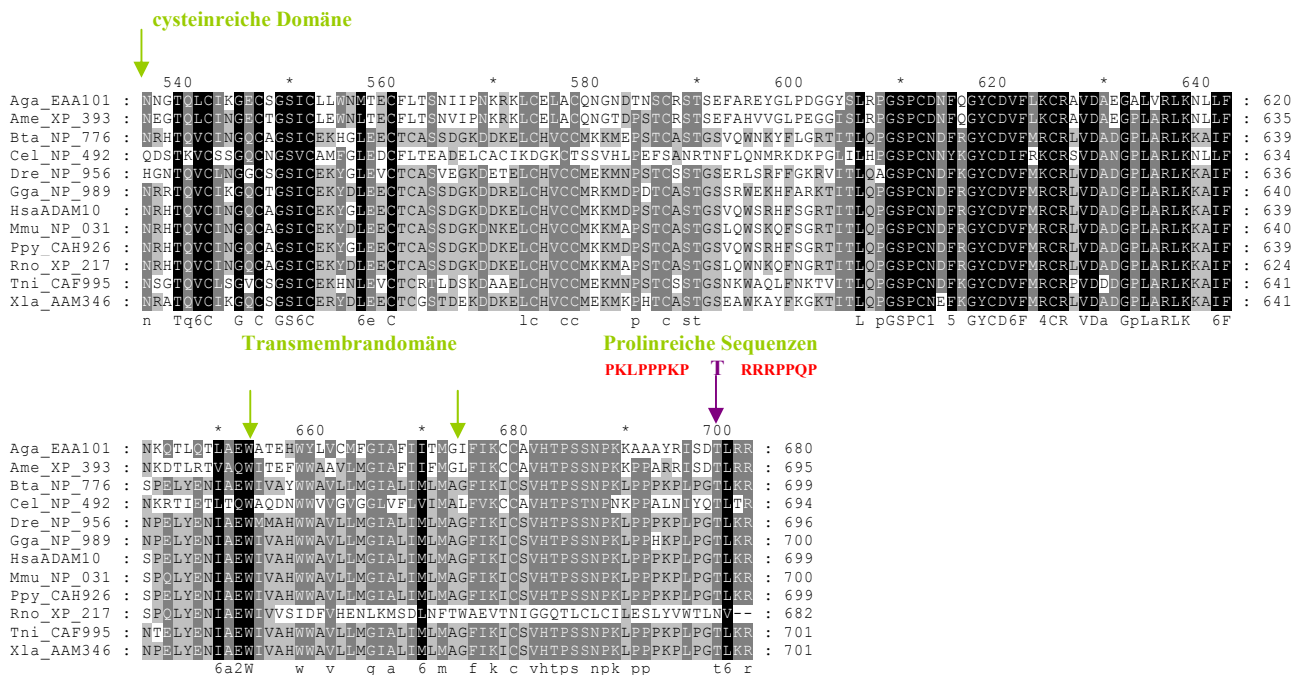
**Abbildung 6.3:** Verkürzter, auf konservierte Bereiche beschränkter Aminosäurevergleich zwischen den verschiedenen Spezies, dargestellt mit dem Programm Genedoc.

Dieses Alignment, in dem schlecht übereinstimmende Lückenbereiche entfernt wurden, war die Grundlage für die Erstellung der phylogenetischen Bäume.

Legende siehe unten.



# Anhang



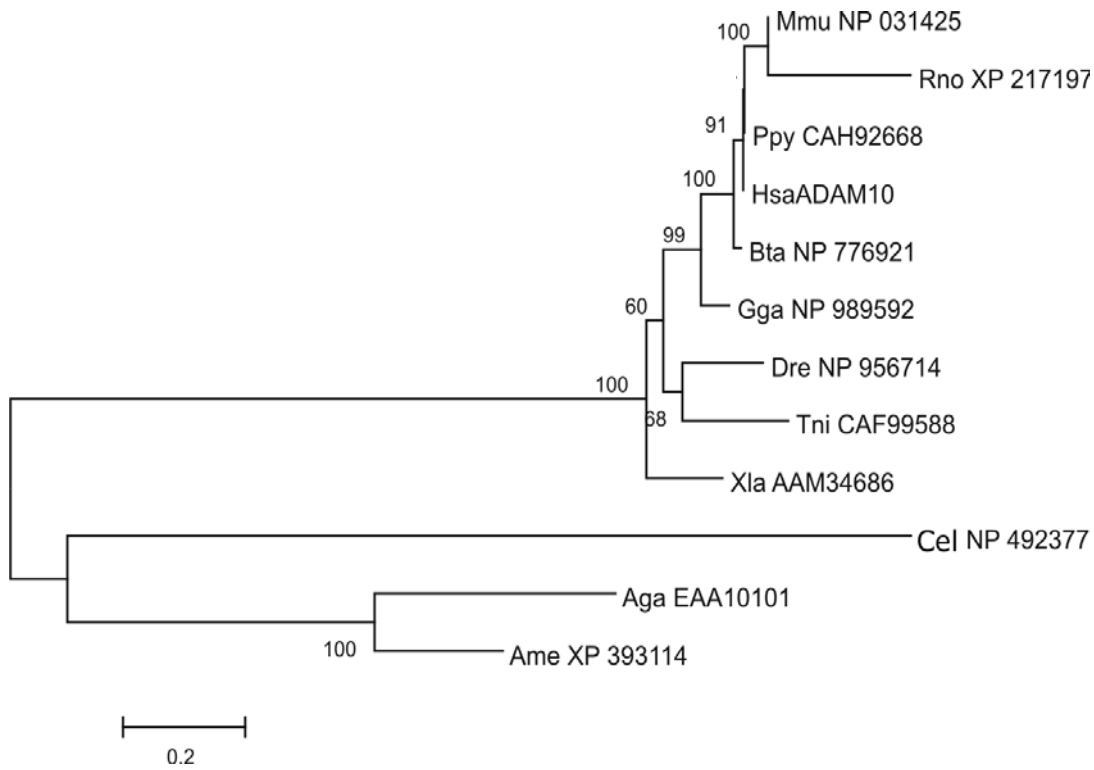
## Zu den Abbildungen 6.2 und 6.3:

### Verwendete ADAM10-Aminosäuresequenzen:

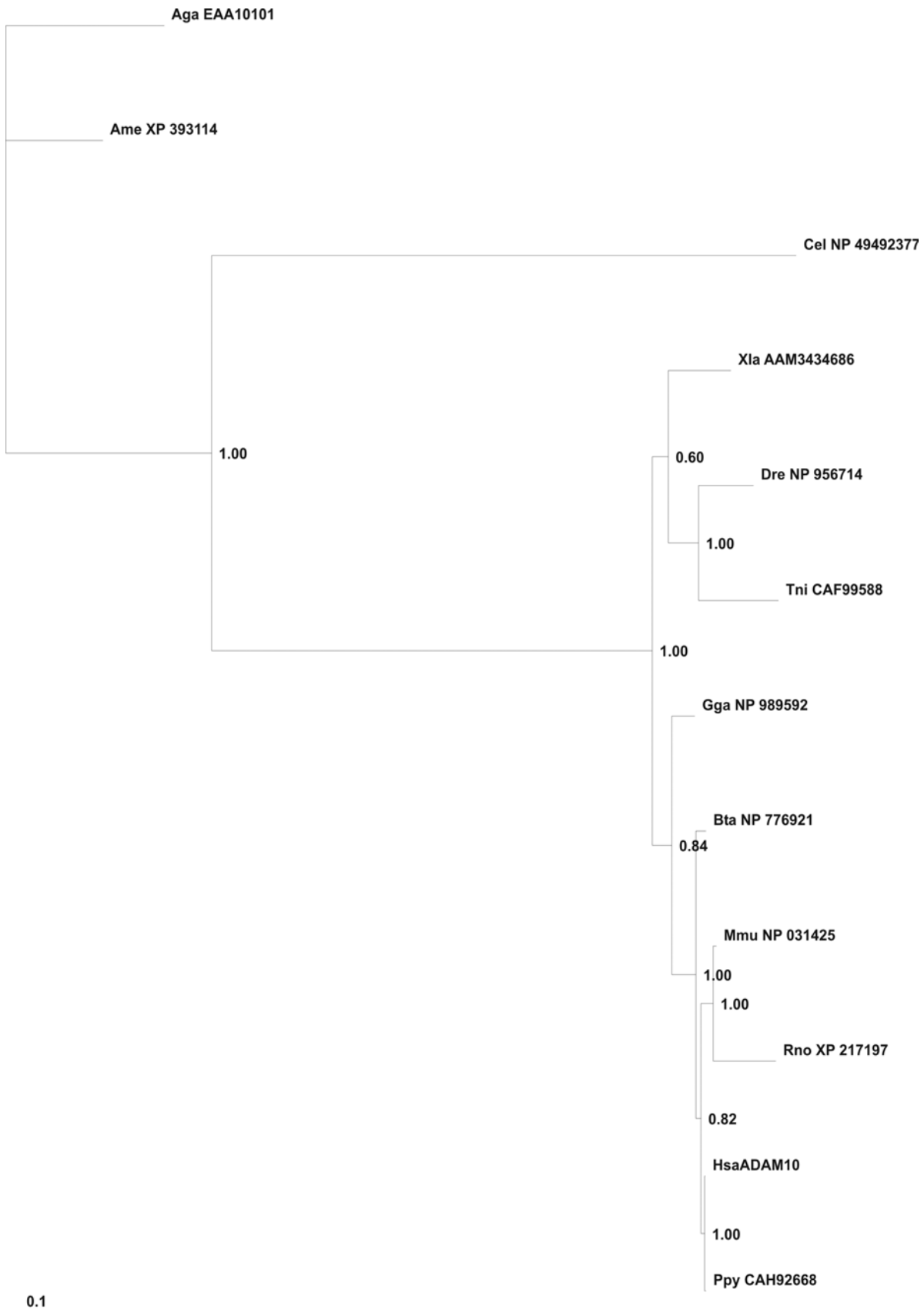
EAA10101	<i>Anopheles gambiae</i>	Aga	Mücke
XP_393114	<i>Apis mellifera</i>	Ame	Honigbiene
NP_776921	<i>Bos Taurus</i>	Bta	Rind
NP_492377	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cel	Fadenwurm
NP_956714	<i>Danio rerio</i>	Dre	Zebrafärbli
NP_989592	<i>Gallus gallus</i>	Gga	Huhn
NP_001101	<i>Homo sapiens</i>	Has	Mensch
NP_031425	<i>Mus musculus</i>	Mmu	Maus
CAH92668	<i>Pongo pygmaeus</i>	Ppy	Orang-Utan
XP_217197	<i>Rattus norvegicus</i>	Rno	Ratte
CAF99588	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tni	Kugelfisch
AAM34686	<i>Xenopus laevis</i>	Xla	Frosch

Schwarz markierte Aminosäuren sind zu 100%, dunkelgrau markierte zu 80% und hellgrau markierte Aminosäuren zu 60% konserviert. Die einzelnen Domänen des humanen ADAM10-Proteins sind gekennzeichnet. Der Cysteinrest innerhalb der Prodomäne, der eventuell für den Cystein-Switch von Bedeutung ist, ist rot hervorgehoben. Die Propeptidkonvertase-Spaltstelle am Ende der Prodomäne ist rot betont. Die Histidinreste im katalytischen Zentrum sind blau markiert. Der Disintegrin-Loop in der disintegrinähnliche Domäne und die prolinreiche Sequenz in der cytoplasmatischen Domäne sind rot, die vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen grün und die putativer Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstelle ist lila markiert.

**Abbildung 6.4:** Phylogenetischer Stammbaum des ADAM10-Proteins mit Hilfe der *neighbor-joining*-Methode. Die Zuverlässigkeit des Stammbaums wurde durch *bootstrap*-Analyse (1000 Replikate) überprüft: *bootstrap* Werte > 80 gelten als sehr verlässlich, *bootstrap* Werte > 50 als noch akzeptabel.



**Abbildung 6.5:** Phylogenetischer Stammbaum des ADAM10-Proteins erstellt mit dem Programm MrBayes. Die angegebenen Zahlenwerte sind die posterioren Wahrscheinlichkeiten für die gezeigten Verzweigungen.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A $\beta$	$\beta$ -Amyloidpeptid
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i> (Disintegrin-Metalloprotease)
amp	Ampicillin-Resistenzgen
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
APP $\alpha$	$\alpha$ -Sekretase-gespaltenes, lösliches APP
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BACE	<i><math>\beta</math>-site APP cleaving enzyme</i>
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> DNA (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
CDPCR3HD	<i>cut-like homeodomain protein</i>
CMV	Cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Da	Dalton
d.h.	das heißt
Dis	Disintegrin-Domäne von ADAM 10
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötale Kälberserum)
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
k	kilo
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli
μ	mikro
M	mol/l
mA	Milliamper
MAPK	<u>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</u>
Maz	Myc assoziiertes Zinkfingerprotein
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Minute(n)
MP	Metalloprotease-Domäne von ADAM 10
M <sub>r</sub>	relative Molekülmasse
mRNA	<i>messenger</i> -RNA (Boten-RNA)
MZF-1	<i>myeloid zinc finger 1</i>
n	nano
NFκB	nuclear factor kappa B
Oct-1	Octamerbindungsprotein-1
p	pico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCR	<i>p</i> olymerase <i>c</i> hain <i>r</i> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>p</i> otentia <i>h</i> ydrogenii (Wasserstoffstärke)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pro	Prodomäne von ADAM 10
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>r</i> ounds <i>p</i> er <i>m</i> inute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur (20 - 25°C)
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	<i>VDR/RXR Vitamin D receptor RXR heterodimer site</i>
s	Sekunde(n)
SCAP	<u>SREBP cleavage activating protein</u>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
s.o.	siehe oben
Sp	<i>stimulating protein</i>
SREBP	<u>sterol regulatory element binding protein</u>
STET	Saccharose-Tris-EDTA-Triton X-100
SV 40	Simian Virus 40
SVMP	<i>snake venom metalloprotease</i> (Schlangengift-Metalloprotease)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TACE	<u>TNF<math>\alpha</math>-converting enzyme</u> (TNF $\alpha$ -konvertierendes Enzym)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-Puffer)
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Enzymeinheiten ( <i>units</i> )
USF	<i>upstream stimulating factor</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche

## Abkürzungsverzeichnis

---

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen



## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Im Gehirn von Alzheimerpatienten (links) finden sich im Vergleich zum gesunden Menschen (rechts) extrazelluläre Plaques aus aggregierten Amyloid- $\beta$ -Peptiden (A $\beta$ ) und intrazelluläre Neurofibrillenbündel ( <a href="http://www.ahaf.org">www.ahaf.org</a> ).	2
<b>Abbildung 1.2:</b> Assoziation zwischen Mikrotubuli und Tau-Proteinen.	2
<b>Abbildung 1.3:</b> MRT-Bilder des Gehirns auf der Basis der Daten von zwölf Alzheimerpatienten zu Studienbeginn (links), nach zwölf Monaten (Mitte, Rote und graue Felder bedeuten starke Neuronenverluste) und nach 18 Monaten (rechts). Es ist deutlich der Schwund bestimmter Gehirnregionen bei Alzheimerpatienten zu erkennen ( <a href="http://www.jesus.ch/index.php/D/article/156/6993">http://www.jesus.ch/index.php/D/article/156/6993</a> ).	4
<b>Abbildung 1.4:</b> Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) und seiner Mutationen.	6
<b>Abbildung 1.5:</b> Die proteolytische Prozessierung von APP (nach Citron, 2000).	8
<b>Abbildung 1.6:</b> Domänenstruktur eines ADAM-Proteins.	10
<b>Abbildung 1.7:</b> RNA-Spleißen im Zellkern (nach Lewin, 1998).	16
<b>Abbildung 2.1:</b> Schematischer Strukturvergleich von den Sp-Familienmitgliedern (Zhang <i>et al.</i> , 2003).	36
<b>Abbildung 2.2:</b> DNA-Schmelzkurve (DNA-Dissoziationskurve)	55
<b>Abbildung 2.3:</b> PCR-Amplifikationskurve (Applied Biosystem)	56
<b>Abbildung 2.4:</b> Standardkurve von hADAM10	58
<b>Abbildung 2.5:</b> Kurze schematische Darstellung der 5'-RACE-Technik.	59
<b>Abbildung 2.6:</b> Biolumineszenzreaktion der <i>Firefly</i> -Luciferase (Promega)	69
<b>Abbildung 2.7:</b> Biolumineszenzreaktion der <i>Renilla</i> -Luciferase (Promega)	70
<b>Abbildung 2.8:</b> pGL3-Basic Vektor	71
<b>Abbildung 2.9:</b> phRL-SV40 Vektor	71
<b>Abbildung 2.10:</b> Überblick zum Dual-Luciferase-Test	72
<b>Abbildung 2.11:</b> Aufbau des Semidry-Blots	82
<b>Abbildung 3.1:</b> DNA-Sequenz und Aminosäuresequenz der humanen ADAM10-cDNA	88
<b>Abbildung 3.2:</b> Schematische Darstellung der Exon/Intron-Organisation	90
<b>Abbildung 3.3:</b> Genomische Organisation von humanem und murinem ADAM10	91
<b>Abbildung 3.4:</b> Die Nukleotidsequenz der 5'-untranslatierten Region des humanen und des murinen ADAM10-Gens.	96
<b>Abbildung 3.5:</b> Die Nukleotidsequenzen der 5'-untranslatierten Regionen des ADAM10-Gens von Mensch, Maus und Ratte.	97
<b>Abbildung 3.6:</b> mVista Vergleich der Promotorregion von Mensch und Maus (oben), Mensch und Ratte (Mitte) und Ratte und Maus (unten).	98
<b>Abbildung 3.7:</b> Vergleich der ADAM10-Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien.	104
<b>Abbildung 3.8:</b> Schematische Darstellung der ADAM10-Promotordeletionskonstrukte und deren Aktivitäten.	106
<b>Abbildung 3.9:</b> Schematische Darstellung der Punktmutanten und deren Luciferaseaktivität.	111
<b>Abbildung 3.10:</b> Schematische Darstellung der 5'-verkürzten Punktmutanten und deren Luciferaseaktivität.	112
<b>Abbildung 3.11:</b> Promotoraktivität verschiedener ADAM10-Promotorkonstrukte bei Anwesenheit verschiedener humaner Transkriptionsfaktoren: Sp1, Sp3, USp3 und USF.	115

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 3.12:</b> Transiente Transfektion von SL2-Zellen mit pCP53AB.1 (Wildtyp-ADAM10-Promotor) mit unterschiedlichen Konzentrationen an pPac-Expressionsvektoren.	116
<b>Abbildung 3.13:</b> Transiente Transfektion von SL2-Zellen mit pCP53AB.1 und Kombinationen von pPac-Expressionsvektoren.	117
<b>Abbildung 3.14:</b> Sequenzen der Oligonukleotide, die in den verschiedenen EMSA eingesetzt wurden.	118
<b>Abbildung 3.15:</b> Sp1 EMSA von Position -366.	119
<b>Abbildung 3.16:</b> USF EMSA	119
<b>Abbildung 3.17:</b> RXR EMSA	120
<b>Abbildung 3.18:</b> Kotransfektion der SREBP-Expressionsvektoren mit dem Kontrollvektor SRE-luc (A und C) bzw. mit dem ADAM10-Promotorvektor pCP9.3 (B und D) in HepG2 (A und B) und SHSY5Y Zellen (C und D).	122
<b>Abbildung 3.19:</b> Stimulationsversuch mit $\beta$ -Östradiol an SKO1 und SKER Zellen.	126
<b>Abbildung 3.20:</b> Behandlung der stabilen Zelllinien SHY56.6 und SKN56.6 mit Retinolsäure.	131
<b>Abbildung 3.21:</b> Beispiel einer Genotypisierung.	132
<b>Abbildung 3.22:</b> <i>Real time</i> RT-PCR an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.	133
<b>Abbildung 3.23:</b> <i>Real time</i> RT-PCR an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.	134
<b>Abbildung 3.24:</b> <i>Real time</i> RT-PCR an RNA aus doppeltransgenen Mäusen.	134
<b>Abbildung 6.1:</b> Übersicht der Schritte zur Einklonierung des Promotorbereiches des humanen ADAM10-Gens in das Plasmid pGL3-Basic.	150
<b>Abbildung 6.2:</b> Aminosäurevergleich zwischen den verschiedenen Spezies, dargestellt mit dem Programm Genedoc.	151
<b>Abbildung 6.3:</b> Verkürzter, auf konservierte Bereiche beschränkter Aminosäurevergleich zwischen den verschiedenen Spezies, dargestellt mit dem Programm Genedoc.	153
<b>Abbildung 6.4:</b> Phylogenetischer Stammbaum des ADAM10-Proteins mit Hilfe der <i>neighbor-joining</i> -Methode.	155
<b>Abbildung 6.5:</b> Phylogenetischer Stammbaum des ADAM10-Proteins erstellt mit dem Programm MrBayes.	156

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b>	Verwendete Plasmide	36
<b>Tabelle 2.2:</b>	Verwendete Primer für die Herstellung der Promotorkonstrukte.	37
<b>Tabelle 2.3:</b>	Verwendete Primer für die Herstellung der Promotorkonstrukte.	38
<b>Tabelle 2.4:</b>	Verwendete Primer für die Einführung von Punktmutationen.	38
<b>Tabelle 2.5:</b>	Oligonukleotide, die für EMSA Versuche verwendet wurden.	38
<b>Tabelle 2.6:</b>	Verwendete Sequenzierprimer	39
<b>Tabelle 2.7:</b>	Für die Überprüfung der stabilen Expression des Vektors pCP56.6 verwendete Primer.	39
<b>Tabelle 2.8:</b>	Verwendete Primer für die 5'-RACE.	39
<b>Tabelle 2.9:</b>	Für die <i>Real time</i> RT-PCR verwendete Primer.	40
<b>Tabelle 2.10:</b>	Primer, die für die Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendet wurden.	40
<b>Tabelle 2.11:</b>	Für die Isolierung der ADAM10-Promotorregion relevanter BAC-Klon.	41
<b>Tabelle 2.12:</b>	Alle gezüchteten transgenen Mäuse mit ihrer Kurzbezeichnung und ihrem jeweiligen Genotyp.	61
<b>Tabelle 2.13:</b>	Liste der verwendeten Zelllinien, ihre Quelle und eine kurze Charakterisierung.	63
<b>Tabelle 2.14a:</b>	Liste der Substanzen, die in den Stimulationsversuchen eingesetzt wurden.	67
<b>Tabelle 2.14b:</b>	Liste der Substanzen, die in den Stimulationsversuchen eingesetzt wurden.	68
<b>Tabelle 2.15:</b>	BSA-Eichreihe für die Proteinbestimmung.	78
<b>Tabelle 3.1:</b>	Exon/Intron Übergänge beim humanen ADAM10-Gen.	89
<b>Tabelle 3.2:</b>	Exon/Intron Übergänge beim Maus ADAM10-Gen.	89
<b>Tabelle 3.3:</b>	ESTs des humanen ADAM10.	94
<b>Tabelle 3.4:</b>	Herstellung der ADAM10-Promotorkonstrukte (siehe auch Anhang 6.1)	102
<b>Tabelle 3.5a:</b>	Herstellung der Punktmutationskonstrukte	109
<b>Tabelle 3.5b:</b>	Herstellung der Punktmutationskonstrukte	110
<b>Tabelle 3.6:</b>	Eingeführte Punktmutationen an den entsprechenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen im ADAM10-Promotor.	111
<b>Tabelle 3.7:</b>	Herstellung des Vektors pPacLeer und pPacUSF.	114
<b>Tabelle 3.7:</b>	Herstellung der Expressionsvektoren mit den Sterol-Regulatorelement-Bindungsproteinen (SREBPs).	121

## 10 Literaturverzeichnis

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995): *Molekularbiologie der Zelle*. 3.Auflage, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo, VCH.
- Almeida E.A.C., Huovila A.-P.J., Sutherland A.E., Stephens L.E., Calarco P.G., Shaw L.M., Mercurio L.M., Sonnenberg A., Primakoff P., Myles D.G., White J.M. (1995): Mouse Egg Integrin  $\alpha 6\beta 1$  Functions as a Sperm Receptor. *Cell* 81: 1095-1104.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3): 403-10.
- Anders A., Gilbert S., Garten W., Postina R., Fahrenholz F. (2001): Regulation of the ADAM10  $\alpha$ -secretase activity by its prodomain and proprotein convertase. *FASEB J.* 15(10):1837-9.
- Araki W., Kitaguchi N., Tokushima Y., Ishii K., Aratake H., Shimohama S., Nakamura S., Kimura J. (1991): Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(1):265-71.
- Artanavis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini M.E. (1995): Notch Signaling. *Science* 268: 225-232.
- Artanavis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J. (1999): Notch Signalling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 284: 770-776.
- Aso T., Conaway J.W. und Conaway R. (1994): Role of Core Promoter Structure in Assembly of the RNA Polymerase II Preinitiation Complex. *J. Biol. Chem.* 269 (42): 26575-26583.
- Asthana S., Baker L.D., Craft S., Stanczyk F.Z., Veith R.C., Raskind M.A., Plymate S.R. (2001): High-dose estradiol improves cognition for women with AD: results of a randomized study. *Neurology* 57(4):605-12.
- Ausubel F.A., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (Hrsg.) (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York.
- Balmer J.E., Blomhoff R. (2002): Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 43(11):1773-808.
- Bardeleben v. R. (2001): Einfluss pharmakologischer Isoprenylierungshemmstoffe auf Rho-regulierte Signalwege und auf die Resistenzbildung gegenüber gentoxischen Agentien. *Dissertationsarbeit am Fachbereich Chemie und Pharmazie der J. G.-Universität Mainz.*
- Bartus R.T., Dean R.L. 3rd, Beer B., Lippa A.S. (1982): The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558):408-14.
- Behl C., Davis J.B., Lesley R., Schubert D. (1994): Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77(6):817-27.
- Behl C., Widmann M., Trapp T. und Holsboer F. (1995): 17- $\beta$  estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. And Biophys. Res. Comm* 216: 473-482.
- Benbrook D. M., Jones N. C. (1994): Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res.* 22:1463-1469.
- Bendall A. J. und Molloy P. L. (1994): Base preference for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of magnesiumchloride on specificity and comparison with binding of Myc family members. *Nucleic Acids Res.* 22:2801-2810.
- Bennett M., Ngo T.T., Athanikar J.N., Rosenfeld J.M. und Osborne T.F. (1999): Co-stimulation of Promoter for Low Density Lipoprotein Receptor Gene by Sterol Regulatory Disrupted by the Yin Yang 1 Protein. *J. Biol. Chem.* 274 (19): 13025-13032.

## Literaturverzeichnis

---

- Bigler D., Chen M., Waters S., White J.M. (1997): A model of sperm-egg binding and ADAMs and integrin. *Trends Cell Biol.* 7: 220-225.
- Bird A.P. (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 (6067): 209-13.
- 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., Cerretti D. P. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Black R. A. und White, J. M. (1998): ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 654-659.
- Blackwood E.M. und Kadonaga J.T. (1998): Going the distance: A current view of enhancer action. *Science* 281: 61-63.
- Blobel, C. P. (1997): Metalloprotease-Disintegrins: Links to Cell Adhesion and Cleavage of TNF $\alpha$  and Notch. *Cell* 90, 589-592.
- Bode W., Gomis-Rüth F.-X., Stöcker W. (1993): Astacins, serralytins, 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.
- Bradford M. M. (1977). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brakebusch C., Varfolomeev E.E., Batkin M., Wallach D. (1994): Structural Requirements for Inducible shedding of the p55 Tumor Necrosis Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 32488-32496.
- Brandeis M., Frank D., Keshet I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A., Temper V., Razin A. und Cedar H. (1994): Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371(6496):435-438.
- Breitner J.C., Welsh K.A., Helms M.J., Gaskell P.C., Gau B.A., Roses A.D., Pericak-Vance M.A., Saunders A.M. (1995): Delayed onset of Alzheimer's disease with nonsteroidal anti-inflammatory and histamine H2 blocking drugs. *Neurobiol Aging* 16(4):523-30.
- Briggs M.R., Kadonaga J.T., Bell S.P., Tjian R. (1986): Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234(4772):47-52.
- Britten R.J. und Davidson E.H. (1969): Gene regulation for higher cells: A theory. *Science* 165: 349-357.
- Brown M.S. und Goldstein J.L. (1997): The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.
- Burley S.K. und Roeder R.G. (1996): Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* 65: 769-799.
- Burns M.P., Noble W.J., Olm V., Gaynor K., Casey E., LaFrancois J., Wang L., Duff K. (2003): Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res.* 31;110(1):119-25.
- Bush A.I. (2002): Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 23(6):1031-8.
- Buxbaum J. D., Liu K.-N., Luo Y., Slack J. L., Stocking K. L., Peschon J. J., Johnson R. S., Castner B. J., Cerretti D. P., Black R. A. (1998): Evidence That Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Converting Enzyme Is Involved in Regulated  $\alpha$ -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765-27767.
- Chantry, A., Gregson, N. A., Glynn, P. (1989). A Novel Metalloprotease Associated with Brain Myelin Membranes. *J. Biol. Chem.* 264, 21603-21607.
- Check E. (2002): Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature* 415(6871):462.

- Citron M., Teplow D.B., 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  $\beta$  amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 93: 13170-13175.
- Citron M. (2000): Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Today* 6: 392-397.
- Corcoran J.P.T., So P.L., Maden M. (2004): Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid  $\beta$  in the adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* 20: 896-902.
- Dagert M. und Ehrlich S. D. (1974). Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6, 23-28.
- Dallas D.J., Genever P.G., Patton A.J., Millichip M.I., McKie N., Skerry T.M. (1999): Localization of ADAM10 and notch receptors in bone. *Bone* 25 (1): 9-15.
- Dayhoff M., Schwartz R., Orcutt B. (1978). A model of evolutionary change in protein. Atlas of Protein Sequences and Structure, 5, 345--352.
- DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J., Dodart J.C., Paul S.M., Holtzman D.M. (2001): Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(15):8850-5.
- De Vrij F.M., Sluijs J.A., Gregori L., Fischer D.F., Hermens W.T., Goldgaber D., Verhaagen J., Van Leeuwen F.W., Hol E.M. (2001): Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J.* 15(14):2680-8.
- Dhandapani K.M. und Brann D.W. (2002): Protective Effects of Estrogen and selective estrogen Receptor Modulators in the brain. *Biology of Reproduction* 67, 1279-1385.
- Duncan E.A., Brown M.S., Goldstein J.L., Sakai J. (1997): Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a Leu-Ser bond in luminal loop of sterol regulatory element binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 272: 12778-12785.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J.T., Pesold B., Steiner H., Haass C. (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol.* 5(5):486-8.
- Ehlers M.R.W. und Riordan J.F. (1991): Membrane Proteins with Soluble Counterparts: Role of Proteolysis in the Release of Transmembrane Proteins. *Biochemistry* 30: 10065-10074.
- Emami K.H., Jain A, und Smale ST. (1997): Mechanism of synergy between TATA and initiator: Synergistic binding of TFIID following a putative TFII-induced isomerization. *Genes Dev.* 11: 3007-3019.
- Ericsson J., Jackson S.M., Edwards P.A. (1996): Synergistic binding of sterol regulatory element-binding protein and NF-Y to the farnesyl diphosphate synthase promoter is critical for sterol-regulated expression of the gene. *J Biol. Chem.* 271: 24359-24364.
- Ericsson J., Jackson S.M., Lee B.C., Edwards P.A. (1996): Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 93: 945-950.
- Ericsson J., Usheva A., Edwards P.A. (1999): YY1 Is a Negative Regulator of Transcription of Three Sterol Regulatory Element-binding Protein-responsive Genes. *J. Biol. Chem.* 274 (20): 14508-14513.
- Eriksen J.L., Sagi S.A., Smith T.E., Weggen S., Das P., McLendon D.C., Ozols V.V., Jessing K.W., Zavitz K.H., Koo E.H., Golde T.E. (2003): NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower A $\beta$  42 in vivo. *J Clin Invest.* 112(3):440-9.

## Literaturverzeichnis

---

- Esch F.S., Keim P.S., Beattie E.C., Blacher R.W., Culwell A.R. Oltersdorf T., McClure D., Ward P.J. (1990): Cleavage of Amyloid  $\beta$  Peptide During Constitutive Processing of Its Precursor. *Science* 248: 1122-1124.
- Fahrenholz F., Gilbert S., Kojro E., Lammich S., Postina R. (2000): Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 920: 215-22.
- 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. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 13233-13238.
- Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann D., Keller P., Runz H., Kuhl S., Bertsch T., von Bergmann K., Hennerici M., Beyreuther K., Hartmann T. (2001): Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(10):5856-61.
- Feldman H, Gracon S. (1996): Alzheimer's disease: symptomatic drugs under development. Clinical Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease. Gauthier S, ed., London: Martin Dunitz Ltd: 239-259.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fornoni A., Wang Y., Lenz O., Striker L.J., Striker G.E. (2002): Association of a decreased number of d(CA) repeats in the matrix metalloproteinase-9 promoter with glomerulosclerosis susceptibility in mice. *J Am Soc Nephrol.* 13(8):2068-76.
- 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 (Hooper, N.M., Hrsg.; Taylor & Francis, London): 47-81.
- Franzke C.W., Tasanen K., Schacke H., Zhou Z., Tryggvason K., Mauch C., Zigrino P., Sunnarborg S., Lee D.C., Fahrenholz F., Bruckner-Tuderman L. (2002): Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* 21(19):5026-35.
- Glenner G.G., Wong C.W. (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120(3):885-90.
- Goodman A.B. und Pardee A. B. (2003): Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *PNAS* 100 (5): 2901-2905
- Goodrich J.A. und Tjian R. (1994): TBP-TAF complexes: Selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 403-409.
- Goedert M. (1993): Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16(11):460-5.
- Gomis-Rüth F. X. (2003): Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *MOLECULAR BIOTECHNOLOGY* 24.
- Gotz J., Chen F., van Dorpe J., Nitsch R.M. (2001): Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A $\beta$ 42 fibrils. *Science* 293(5534):1491-5.
- Grace G. (1994): Taking the initiative. *Current Biology* 4: 374-376.
- 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: 3783-3793.
- Greenblatt J. (1997): RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 310-319.
- Haass C. (2004): Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 23(3):483-8.

- Haass C., Mandelkow E. (1999): Proteolysis by presenilins and the renaissance of tau. *Trends Cell Biol.* 9 241-244.
- Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I, Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B., Selkoe D.J. (1992): Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359: 322-325.
- Haass, C., Selkoe, D. J. (1993). Cellular Processing of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein and the Genesis of Amyloid  $\beta$ -Peptide. *Cell* 75, 1039-1042.
- Haass C., Steiner H. (2002): Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol.* 12(12):556-62.
- Hahn S. (1998): The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell* 95: 579-582.
- Hardy J., Selkoe D.J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 19;297(5580):353-6.
- Haring R., Fisher A., Marciano D., Pittel Z., Kloog Y., Zuckerman A., Eshhar N., Heldman E. (1998): Mitogen-activated protein kinase-dependent and protein kinase C-dependent pathways link the m1 muscarinic receptor to beta-amyloid precursor protein secretion. *J Neurochem.* 71(5):2094-103.
- Hromas R., Collins S.J., Hickstein D., Raskind W., Deaven L.L., O'Hara P., Hagen F.S., Kaushansky K. (1991): A retinoic acid-responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 266: 14183-14187.
- Harris M.E., Hensley K., Butterfield D.A., Leedle R.A., Carney J.M. (1995): Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 131(2):193-202.
- Hartmann D., de Strooper B., Serneels L., Craessaerts K., Herreman A., Annaert W., Umans L., Lubke T., Lena Illert A., von Figura K., Saftig P. (2002): The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 11(21):2615-24.
- Hattori M., Osterfield M., Flanagan J.G. (2000): Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 2000 Aug 25;289(5483):1360-5.
- He X., Treacy M. N., Simmons D. M., Ingraham H. A., Swanson L. W., Rosenfeld M. G. (1989): Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* 340:35-42.
- Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aguzzi A., Rulicke T., von Kretschmar H., von Koch C., Sisodia S., Tremml P., Lipp H.P., Wolfer D.P., Muller U. (2000): Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* 20(21):7951-63.
- Heinemeyer T., Wingender E. Reuter I., Hermjakob H., Kel A.E., Ignatieva E.V., Ananko E.A., Podkolodnaya O.A., Kolpakov F.A., Podkolodny N.L., Kolchanov N.A. (1998): Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, Compel. *Nucleic Acids Res* 26: 362-367.
- Hernandez N. (1993): TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes & Development* 7: 1291-1308.
- Hershko A. und Ciechanover A. (1998): The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-79.
- Holmes D.S. und Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Hong L., Koelsch G., Lin X., Wu S., Terzyan S., Ghosh A.K., Zhang X.C., Tang J. (2000): Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science* 290(5489):150-3.



## Literaturverzeichnis

---

- Honjo H., Iwasa K., Fushiki S., Hosoda T., Tatasumi H., Mihara M., Hirasugi Y., Oida M., Kariya K., Kikuchi N., Kawata M. (2003): Estrogen and Non-Feminizing Estrogen for Alzheimer's Disease. *Endocrine Journal* 50 (4): 361-367.
- Hooper N.M. (1994): Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354(1):1-6.
- Hooper N.M. (1996): The biological roles of zinc and families of zinc metalloproteases. Zinc Metalloproteinases in Health and Disease (Hooper N.M., Hrsg.; Taylor & Francis, London): 1-21.
- Hooper N.M., Karran E.H., Turner A.J. (1997): Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321: 265-279.
- Horton J.D., Shah N.A., Warrington J.A., Anderson N.N., Park S.W., Brown M.S., Goldstein J.L. (2003): Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(21):12027-32.
- Howard L., 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., Glynn P. (1996): Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem. J.* 317: 45-50.
- Hua X., Yokoyama C., Wu J., Briggs M.R., Brown M.S., Goldstein J.L., Wang X. (1993): SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11603-11607.
- Hua X., Wu J., Goldstein J.L., Brown M.S., Hobbs H.H. (1995): Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25: 667-673.
- Hua X., Sakai J., Brown MS., Goldstein J.L. (1996): Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 271: 10379-10384.
- Huang T.S., Lee C.C., Chang A.C., Lin S., Chao C.C., Jou Y.S., Chu Y.W., Wu C.W., Whang\_Peng J. (2003): Shortening of microsatellite deoxy(CA) repeats involved in GL331-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 300 (4): 901-7.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-5.
- Hundhausen C., Misztela D., Berkhout T.A., Broadway N., Saftig P., Reiss K., Hartmann D., Fahrenholz F., Postina R., Matthews V., Kallen K.J., Rose-John S., Ludwig A. (2003): The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102(4):1186-95.
- Hung AY, Selkoe DJ. (1994): Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13(3):534-42.
- Huovila A.P., Almeida E.A., White J.M. (1996): ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 8(5):692-9.
- 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., Christie G. (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14(6):419-27.
- Inzumi Y., Hirata M., Hasuwa H., Iwamoto R., Umata T., Miyado K., Kurisaki T., Sehara-Fujisawa A., Ohno S. und Mekada E. (1998): A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- $\gamma$ /ADAM 9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17: 7260-7272.

## Literaturverzeichnis

---

- Izumi R., Yamada T., Yoshikai S., Sasaki H., Hattori M., Sakaki Y. (1992): Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse. *Gene* 112 (2): 189-95.
- Jaffe A., Toran-Alleran C.D., Greengard P (1994): Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid  $\beta$  precursor protein. *J. Biol. Chem.* 269: 13065-13068.
- Jarrett J.T., Berger C.P. und Lansbury P.T. (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.
- Javahery R., Khachi A., Lo K., Zenzie Gregory B., Smale S.T. (1994): DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14 (1): 116-27
- Jiang H., Burdick D., Glabe C.G., Cotman C.W., Tenner A.J. (1994): beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol.* 152(10):5050-9.
- Jick H., Zornberg G.L., Jick S.S., Seshadri S., Drachman D.A. (2000): Statins and the risk of dementia. *Lancet.* 356(9242):1627-31.
- Kang J., Lemaire H.-G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.-H., Multhaup G., Beyreuther K. und Müller-Hill B. (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736.
- Li Z.W., Stark G., Gotz J., Rulicke T., Gschwind M., Huber G., Muller U., Weissmann C. (1996): Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12):6158-62.
- Li R., Lindholm K., Yang L.B., Yue X., Citron M., Yan R., Beach T., Sue L., Sabbagh M., Cai H., Wong P., Price D., Shen Y. (2004) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(10):3632-7.
- Kahn J., Ingraham R.H., Shirley F., Migaki G.I., Kishimoto T.K. (1994): Membrane Proximal Cleavage of L-Selectin: Identification of the Cleavage Site and a 6-kD Transmembrane Peptide Fragment of L-Selectin. *J. Cell Biol.* 125: 461-470.
- Karkkainen I., Rybnikova E., Pelto-Huikko M, Huovila A.P. (2000): Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 15 (6): 547-60.
- Kaufmann J. und Smale S.T. (1994): Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* 8 (7):821-9.
- Kitawaki J., Koshiba H., Kitaoka Y., Teramoto M., Hasegawa G., Nakamura N., Yoshikawa T., Ohta M., Obayashi H., Honjo H. (2004): Interferon-gamma gene dinucleotide (CA) repeat and interleukin-4 promoter region (-590C/T) polymorphisms in Japanese patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 19(8):1765-9.
- Kivipelto M., Helkala E.L., Laakso M.P., Hanninen T., Hallikainen M., Alhainen K., Iivonen S., Mannermaa A., Tuomilehto J., Nissinen A., Soininen H. (2002): Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann Intern Med.* 137(3):149-55.
- Koike H., Tomioka S., Sorimachi H., Saido T.C., Marayama K., Okuyama A., Fujisawa-Sehara A., Ohno S., Suzuki K., 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., März W., Fahrenholz F. (2001): Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(10):5815-5820.
- Kosik K.S. (1993): Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* 256: 780-783.

## Literaturverzeichnis

---

- Kovacs D.M., Wasco W., Witherby J., Felsenstein K.M., Brunel F., Roeder R.G., Tanzi R.E. (1995): The upstream stimulatory factor functionally interacts with the Alzheimer amyloid beta-protein precursor gene. *Hum Mol Genet* 4 (9): 1527-33.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. (2001): MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17(12):1244-5.
- Kwok R.P., Lundblad J.R., Chrivia J.C., Richards J.P., Bachinger H.P., Brennan R.G., Roberts S.G., Green M.R., Goodman R.H. (1994): Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370(6486):223-226.
- Lam Y.A., Pickart C.M., Alban A., Landon M., Jamieson C., Ramage R., Mayer R.J., Layfield R. (2000): Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(18):9902-6.
- Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M., Haass C., Fahrenholz F. (1999): Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7): 3922-7.
- Lannfelt L., Basun H., Vigo-Pelfrey C., Wahlund LO, Winblad B, Lieberburg I, Schenk D. (1995): Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neurosci Lett.* 199(3): 203-6.
- Larsen F., Gundersen G., Lopez R., Prydz H. (1992): CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13:1095-107.
- Lemere C.A., Blusztajn J.K., Yamaguchi H., Wisniewski T., Saido T.C., Selkoe D.J.. (1996) Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 3(1):16-32.
- Lewin B. (1990): Genes IV. John Wiley & Sons/Oxford University Press, New York .
- Li P., He X., Gerrero M. R., Mok M., Aggarwal A., Rosenfeld M. G. (1993): Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes Dev.* 7:2483-2496.
- Loechel F., Gilpin B.J., Engvall E., Albrechtsen R., Wewer U.M. (1998): Human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) Is an Active Metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 273: 16993-16997.
- Loechel F., Overgaard M.T., Oxvig C., Albrechtsen R., Wewer U. (1999): Regulation of Human ADAM 12 Protease by the Prodomain. Evidence for a Functional Cysteine Switch. *J. Biol. Chem.* 274: 13427-13433.
- Loots G.G., Ovcharenko I., Pachter L., Dubchak I., Rubin E.M. (2002): rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res.* 12(5): 832-9.
- Lopez O.L., DeKosky S.T. (2003): Neuropathology of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Rev Neurol.* 37(2):155-63.
- Lu J., Lee W., Jiang C., Keller E.B. (1994): Start site selection by Sp1 in the TATA-less human Ha-ras promoter. *J Biol Chem* 269 (7): 5391-402.
- Lum L., Reid M.S., Blobel C.P. (1998): Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273(40):26236-47.
- Lunn C.A., Fan X., Dalie B., Miller K., Zavodny P.J., Narula S.K., Lundell D. (1997): Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett*, 400(3): 333-5.
- Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B.D., Babu-Khan S., Denis P., Fan W., Kha H., Zhang J., Gong Y., Martin L., Louis J.C., Yan Q., Richards W.G., Citron M., Vassar R. (2001): Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci.* 4(3):231-2.

## Literaturverzeichnis

---

- Luo Y.Q., Hirashima N., Li Y.H., Alkon D.L., Sunderland T., Etcheberrigaray R., Wolozin B. (1995): Physiological levels of beta-amyloid increase tyrosine phosphorylation and cytosolic calcium. *Brain Res.* 681(1-2):65-74.
- Magara F., Muller U., Li Z.W., Lipp H.P., Weissmann C., Stagljar M., Wolfer D.P. (1999): Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(8):4656-61.
- Maruyama K., Kematani F., Usami M., Yamao-Hargaya W., Tanaka K. (1991): Secretase, Alzheimer amyloid protein precursor secreting enzyme is not sequence-specific. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1670-1676.
- Massague J., Pandiella A. (1993): Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 62:515-41.
- Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*82(12):4245-9.
- Mattson M.P., Cheng B., Culwell A.R., Esch F.S., Lieberburg I., Rydel R.E. (1993): Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10 (2): 243-254
- 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 (5):2133-43.
- Martinez E., Chiang C.-M, Ge H., Roeder R.G. (1994): TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II Promoter. *EMBO J.* 13 (13): 3115-3126.
- Martinez E., Ge H., Tao C.X., Palhan V., Roeder R.G. (1998): Novel cofactors and TFIIA mediate functional core promoter selectivity by the human TAFII150-containing TFIID complex. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6571-6583.
- Mechtersheimer S., Gutwein P., Agmon-Levin N., Stoeck A., Oleszewski M., Riedle S., Postina R., Fahrenholz F., Fogel M., Lemmon V., Altevogt P. (2001): Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol.* 155(4):661-73.
- Meziane H., Dodart J.C., Mathis C., Little S., Clemens J., Paul S.M., Ungerer A. (1998): Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12683-8.
- 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., Becherer J.D. (1999): Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem.* 274(43):30563-70.
- Millichip M.I., Dallas D.J., Wu E., Dale S. und McKie N. (1998): The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (2): 594-8.
- Milward E.A., Papadopoulos R., Fuller S.J., Moir R.D., Small D., Beyreuther K. und Masters C.L. (1992): The Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease Is a Mediator of Effects of Nerve Growth factor on Neutite Outgrowth. *Neuron* 9: 129-137.
- Mitsuda N., Roses A.D., Vitek M.P. (1997): Transcriptional regulation of the mouse presenilin-1 gene. *J Biol Chem* 272 (38): 23489-97.
- Moss M.L., White J.M., Lambert M.H., Andrews R.C. (2001): TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today* 6(8):417-426.
- Multhaup G., Schlicksupp A., Hesse L., Beher D., Ruppert T., Masters C.L., Beyreuther K.. (1996): The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* 271(5254):1406-9.
- Nagase H. und Woessner J.F.Jr. (1999): Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 21491-21494.

## Literaturverzeichnis

---

- Nakagawara A., Azar C.G., Scavarda N.J., Brodeur G.M. (1994): Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 14(1):759-67.
- Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., Smith T.F. (1994): The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371: 297-300.
- Ng H.H. und Bird A. (1999): DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 158-163.
- Nicholas, K. B., and H. B. Nicholas Jr. (1997): GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>
- Nitsch R.M., Slack B.E., Wurtman R.J., Growdon J.H. (1992): Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258(5080):304-7.
- Nitsch R.M., Deng M., Tennis M., Schoenfeld D., Growdon, J.H. (2000): The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total A $\beta$  in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 48:913-918.
- Nohturfft A., Hua X., Brown M.S., Goldstein J.L. (1996): Recurrent G-to-A substitution in a single codon of SREBP cleavage-activating protein causes sterol resistance in three mutant CHO cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13709-13714.
- Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998): Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J. Biol. Chem.* 273: 17243-17250.
- Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998): Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12848-12853.
- Nohturfft A., DeBose-Boyd R.A., Scheek S., Goldstein J.L., Brown M.S. (1999): Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmatic reticulum and Golgi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11235-11240.
- Nordberg A., Adem A., Hardy J., Winblad B. (1988): Change in nicotinic receptor subtypes in temporal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci Lett.* 86(3):317-21.
- Nunan J und Small D.H. (2000): Regulation of APP cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase. *FEBS Letters* 483: 6-10.
- Oddo S., Billings L., Kesslak J.P., Cribbs D.H., LaFerla F.M. (2004): Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 43(3):321-32.
- Orphanides G., Lagrange T., Reinberg D. (1996): The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 265-2683.
- Osborne T.F. (2000): Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action. *J. Biol. Chem.* 275: 32379-32382.
- Ott A., Breteler M.M., van Harskamp F., Claus J.J., van der Cammen T.J., Grobbee D.E., Hofman A. (1995): Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ.* 310(6985):970-3.
- Pabo C.O. und Sauer R.T. (1992): Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095.
- 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.
- Parker D., Ferreri K., Nakajima T., LaMorte V.J., Evans R., Koerber S.C., Hoeger C., Montminy M.R. (1996): Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16(2):694-703.

## Literaturverzeichnis

---

- Pastorcic M., Das H.K. (2003): Ets transcription factors ER81 and Elk1 regulate the transcription of the human presenilin 1 gene promoter. *Brain Res Mol Brain Res* 113(1-2): 57-66.
- Pawson P. (1995): Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-580.
- Pei D. und Weiss S.J. (1995): Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375: 244-247.
- Pei D. und Weiss S.J. (1996): Transmembrane-deletion Mutants of the Membrane-type Matrix Metalloproteinase-1 Process Progelatinase A and Express Intrinsic Matrix-degrading Activity. *J. Biol. Chem.* 271: 9135-9140.
- Pennypacker K.R., Fuldner R., Xu R., Hernandez H., Dawbarn D., Mehta N., Perez\_Tur J., Baker M., Hutton M. (1998): Cloning and characterization of the presenilin-2 gene promoter. *Brain Res Mol Brain Res* 56 (1-2): 57-65.
- Perez R.G., Zheng H., Van der Ploeg L.H., Koo E.H. (1997): The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci.* 17(24):9407-14.
- Peschon J.J., Torrance D., Stocking K.L., Glaccum M.B., Otten C., Willis C.R., Charrier K., Morrissey P.J., Ware C.B., Mohler K.M. (1998): TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 160(2):943-52.
- Petit A., Pasini A., Alves Da Costa C., Ayrat E., Hernandez J.F., Dumanchin-Njock C., Phiel C.J., Marambaud P., Wilk S., Farzan M., Fulcrand P., Martinez J., Andrau D., Checler F. (2003): JLK isocoumarin inhibitors: selective gamma-secretase inhibitors that do not interfere with notch pathway in vitro or in vivo. *J Neurosci Res.* 74(3):370-7.
- Postina R., Schroeder A., Dewachter I., Bohl J., Schmitt U., Kojro E., **Prinzen C.**, Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenne A., Godaux E., van Leuven F., Fahrenholz F. (2004): A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 113(10):1456-64.
- Potter J. J., Cheneval D., Dang C. V., Resar L. M. S., Mezey E., Yang V. W. (1991): The upstream stimulatory factor binds to and activates the promoter of the rat class I alcohol dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* 266:15457-15463.
- Pugh B.F. und Tjian R. (1991): Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes & Development* 5: 1935-1945.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T. (1995): MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23 (23): 4878-84.
- Qi H., Rand M.D., Wu X., Sestan N., Wang W., Rakic P., Xu T., Artavanis-Tsakonas S. (1999): Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283: 91-94.
- Rawson R.B., Zelenski N.G., Nijhawan D, Ye J., Sakai J., Hasan M.T., Chang T-Y., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997): Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell* 1: 47-57.
- Rawson R.B., Cheng D., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998): Isolation of cholesterol-requiring mutant CHO cells with defects in cleavage of sterol regulatory element binding proteins at Site-1. *J. Biol. Chem.* 273: 28261-28269.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. (1995): Evolutionary Families of Metallopeptidases. *Meth. Enzymol.* 248: 183-228.
- Refolo L.M., Malester B., LaFrancois J., Bryant-Thomas T., Wang R., Tint G.S., Sambamurti K., Duff K., Pappolla M.A. (2000): Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 7(4):321-31.

## Literaturverzeichnis

---

- Rietveld I, Jansen JA, Van Duijn CM, Lamberts SW (2003): A polymorphic CA repeat in the promoter region of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene. *Eur J Epidemiol* 18 (3): 191-3.
- Rogers J., Kirby L.C., Hempelman S.R., Berry D.L., McGeer P.L., Kaszniak A.W., Zalski J., Cofield M., Mansukhani L., Willson P., *et al.* (1993): Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43(8):1609-11.
- Roghani M., Becherer J. D., Moss M. L., Atherton R. E., Erdjument-Bromage H., Arribas J., Blackburn R. K., Weskamp G., Tempst P., 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.D., Cooter F.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.
- Rosendahl M. S., Ko S. C., Long D. L., Brewer M. T., Rosenzweig B., Hedl E., Anderson L., Pyle S. M., Moreland J., Meyers M. A., Kohno T., Lyons D. und Lichenstein H. S. (1997): Identification and Characterization of a Pro-tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -processing Enzyme from the ADAM Family of Zinc Metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 272, 24588-24593.
- Roy A.T., Meisterernst M., Pognonec P., Roeder RG (1991): Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354(6350):245-248.
- Russel A., DeBose-Boyd R.A., Brown M.S., Li W.-P., Nohturfft A., Goldstein J.L., Espenshade P.J. (1999): Transport-Dependent Proteolysis of SREBP: Relocation of Site-1 Protease from Golgi to ER Obviates the Need for SREBP Transport to Golgi. *Cell* 99: 703-712.
- Sahin U., Weskamp G., Kelly K., Zhou H.M., Higashiyama S., Peschon J., Hartmann D., Saftig P., Blobel C.P. (2004): Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol.* 164(5):769-79.
- Sakai J., Duncan E.A., Rawson R.B., Hua X, Brown M.S., Goldstein J.L. (1996): Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85: 1037-1046.
- Sakai J., Nohturfft A., Cheng D., Ho Y.K., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997): Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein (SCAP). *J. Biol. Chem.* 272: 20213-20221.
- Sakai J., Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997): Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* 272: 5785-5793.
- Sakai J. Rawson R.B., Espenshade P.J., Cheng D., Seegmiller A.C., Goldstein J.L., Brown M.S. (1998): Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* 2: 505-514.
- Saitoh T., Sundsmo M., Roch J.-M., Kimura N., Cole G., Schubert D., Oltersdorf T. und Schenk D.B. (1989): Secreted form of Amyloid  $\beta$  Protein Precursor Is Involved in the Growth Regulation of Fibroblasts. *Cell* 58: 615-622.
- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-25.
- Salbaum J.M., Weidemann A., Masters C.L., Beyreuther K. (1989): The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *Prog Clin Biol Res* 317: 277-83.

## Literaturverzeichnis

---

- Sano M., Ernesto C., Thomas R.G., Klauber M.R., Schafer K., Grundman M., Woodbury P., Growdon J., Cotman C.W., Pfeiffer E., Schneider L.S., Thal L.J. (1997): A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.* 336(17):1216-22.
- Santamarina-Fojo S., Peterson K., Knapper C., Qiu Y., Freeman L., Cheng J.F., Osorio J., Remaley A., Yang X.P., Haudenschild C., Prades C., Chimini G., Blackmon E., Francois T., Duverger N., Rubin E.M., Rosier M., Deneffe P., Fredrickson D.S., Brewer H.B. Jr. (2002): Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(14):7987-92.
- Sato H., Takino T., Okada Y., Cao J., Shinagawa A., Yamamoto E., Seiki M. (1994): A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370: 61-65.
- Saunders S.E., Rawls J.M., Wardle C.J., Burke J.F. (1989): High efficiency expression of transfected genes in a *Drosophila melanogaster* haploid (1182) cell line. *Nucleic Acids Res.* 17(15):6205-16.
- Sawadogo M. (1988): Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA RT binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J. Biol. Chem.* 263:11994-12001.
- Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandeventer C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400(6740):173-7.
- Schlöndorff J. und Blobel C.P. (1999): Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *Journal of Cell Science* 112, 3603-3617.
- Schubert D., La Corbiere, Saitoh T. und Cole G. (1989): Characterization of an amyloid  $\beta$  precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2066-2069.
- Schwartz S., Elnitski L., Li M., Weirauch M., Riemer C., Smit A., Green E.D., Hardison R.C., Miller W. (2003): MultiPipMaker and supporting tools: Alignments and analysis of multiple genomic DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 31 (13): 3518-24.
- Selkoe D.J. (1999): Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: Supp., A23-A31.
- Selkoe D J (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81:741-766.
- Sennvik K., Fastbom J., Blomberg M., Wahlund L.O., Winblad B., Benedikz E. (2000): Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278 (3): 169-72.
- Seto E., Lewis B., Shenk T. (1993): Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature* 365(6445):462-464.
- Shapiro M.B., Senapathy P. (1987): RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 15(17):7155-74.
- Shimajiri S., Arima N., Tanimoto A., Murata Y., Hamada T., Wang K.Y., Sasaguri Y. (1999): Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett* 455 (1-2): 70-4.
- Simons M., Keller P., Dichgans J., Schulz J.B. (2001): Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* 57(6):1089-93.
- Singh K. B. (1998): Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* 118(4):1111-20.
- 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



## Literaturverzeichnis

---

- D., Seubert P., Suomensaaari S.M., Wang S., Walker D., John V., et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein b-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Sisodia S.S. (1992):  $\beta$ -Amyloid precursor protein cleavage by a membran-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6075-6079.
- Smale S.T. (1994): core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In *Transcription Mechanisms and regulation* (ed. Conaway R.C. and conaway J.W.), pp. 63-81 raven Press, New York.
- Smale S.T. (1997): Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1351: 73-88.
- Small D.H., Mok S.S., Bornstein J.C. (2001): Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci.* 2(8):595-8.
- Smith R.P., Higuchi D.A. und Broze G.J. Jr. (1990): Platelet Coagulation Factor XIa-Inhibitor, a Form of Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *Science* 248: 1126-1128.
- Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., van Wart H.E. (1990): Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cystein switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 364-368.
- Stamatoyannopoulos J.A., Clegg C.H., Li Q. (1997): Sheltering of gamma-globin expression from position effects requires both an upstream locus control region and a regulatory element 3' to the A gamma-globin gene. *Mol. Cell. Biol.* 17(1):240-7.
- Steinbach J.P., Muller U., Leist M., Li Z.W., Nicotera P., Aguzzi A. (1998): Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death Differ.* 5(10):858-66.
- Stöcker W., Grams F., Baumann U, Reinemer P., Gomis-Rüth F.-X., McKay D.B., Bode W. (1995): The Metzincins: Topological and Sequential Relations Between the Astacins, Adamalysins, Serralysins and Matrixins (Collagenases) Define the Superfamily of Zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4: 823-840.
- Stroem A.-C., Forsberg M., Lillhager P., Westin G. (1996): The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression. *Nucleic Acids Res* 24:1981-1986.
- Strooper B.D. und Annaert W. (2000): Proteolytic processing and cell biological functions of amyloid precursor protein. *Journal of Cell Science* 113: 1857-1870.
- Sturm R. A., Das G., Herr W. (1988): The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 2:1582-1599.
- Sun Z., Means R. L., LeMagueresse B., Means A.R. (1995): Organization and analysis of the complete rat calmodulin-dependent protein kinase IV gene. *J. Biol. Chem.* 270 (49): 29507-14.
- Sun Z., Sassone-Corsi P. und Means A.R. (1995): calspermin gene transcription is regulated by two cyclic AMP response elements contained in an alternative promoter in the kinase IV gene. *Mol. Cell. Biol* 15 (1): 561-71.
- Suzuki T., Ando K., Isohara T., Oishi M., Lim G.S., Satoh Y., Wasco W., Tanzi R.E., Nairn A.C., Greengard P., Gandy S.E., Kirino Y. (1997): Phosphorylation of Alzheimer beta-amyloid precursor-like proteins. *Biochemistry.* 36(15):4643-9.
- Tang M.X., Jacobs D., Stern Y., Marder K., Schofield P., Gurland B., Andrews H., Mayeux R. (1996): Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet.* 348(9025):429-32.
- Tazi J., Bird A. (1990): Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60 (6): 909-20.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997): The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882

- Tong L., Thornton P.L., Balazs R., Cotman C.W. (2001): Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J Biol Chem* 276(20):17301-6.
- Tyler S.J., Dawbarn D., Wilcock G.K., Allen S.J. (2002): alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 299(3):373-6.
- van Leeuwen F.W., de Kleijn D.P., van den Hurk H.H., Neubauer A., Sonnemans M.A., Sluijs J.A., Koycu S., Ramdjialal R.D., Salehi A., Martens G.J., Grosveld F.G., Peter J., Burbach H., Hol E.M. (1998): Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 279(5348):242-7.
- Varshavsky A. (1997): The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci.* 22(10):383-7.
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440):735-41.
- Wang X., Sato R., Brown M.S., Hua X., Goldstein J.L. (1994): SREBP-1, a Membrane-Bound Transcription Factor Released by Sterol-Regulated Proteolysis. *Cell* 77: 53-62.
- Watt F. und Molloy P. L. (1988): Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2:1136-1143 .
- Weggen S., Eriksen J.L., Das P., Sagi S.A., Wang R., Pietrzik C.U., Findlay K.A., Smith T.E., Murphy M.P., Bulter T., Kang D.E., Marquez-Sterling N., Golde T.E., Koo E.H. (2001): A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414(6860):212-6.
- 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.
- Weis L. und Reinberg D. (1997): Accurate Positioning of RNA Polymerase II on a Natural TATA-Less Promoter Is Independent of TATA-Binding-Protein-Associated Factors and Initiator-Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 17 (6): 293-2984.
- Wertkin A.M., Turner R.S., Pleasure S.J., Golde T.E., Younkin S.G., Trojanowski J.Q. und Lee V.M.-Y. (1993): Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular  $\beta$ -amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9513-9517.
- Weskamp G., Krätzschmar J., Reid M.S., Blobel C.P. (1996): mDC9, a Widely Expressed Cellular Disintegrin Containing Cytoplasmic SH3 Ligand Domain. *J. Cell Biol.* 132: 17-726.
- Whelan S., Goldman N. (2001): A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol.* 18(5):691-9.
- Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T., Delon M.R. (1982): Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215(4537):1237-9.
- Wiley S.R., Kraus R.J., Mertz J.E. (1992): Functional binding of the "TATA" box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATA-less promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5814-5818.
- Wolfe M.S., Xia W., Sotaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T. und Selkoe D.J. (1999): Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* 398: 513-517.
- Wolfsberg T.G., Primakoff P., Myles D.G., 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.

## Literaturverzeichnis

---

- Wolfsberg T.G., Straight P.D., Gerena R., Houvila A.-P.J., Primakoff P., Myles D.G., White J.M. (1995): ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with A Disintegrin And Metalloprotease domain. *Dev. Biol.* 169: 378-383.
- 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., Sunderland T. (1995): Transforming growth factor beta induces a beta-responsive calcium fluxes in neurons. *Neuroreport.* 6(10):1429-33.
- Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G.G., Siegel G. (2000): Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* 57(10):1439-43.
- Workman J. L., Roeder R. G., Kingston R. E. (1990): An upstream transcription factor, USF (MLTF), facilitates the formation of preinitiation complexes during in vitro chromatin assembly. *EMBO J.* 9:1299-1308.
- Wu E., Croucher P.I., McKie N. (1997): Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derives from a range of haematological malignancies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 (2): 437-42.
- Xiong S., Chirala S.S. und Wakil S. (2000): Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites. *PNAS* 97 (8): 3948-3953.
- Yagami-Hiromasa T., Sato T., Kurisaki T., Kamijo K., Nabeshima Y.-I., Fujisawa-Sehara (1995): A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 377, 652-656.
- Yamamoto S., Higuchi Y., Yoshiyama K., Shimizu E., Kataoka M., Hijiya N. und Matsuura K. (1999): ADAM family proteins in the immune system. *Immunoglobulin today* 20 (6): 278-284 .
- Yamazaki K., Mizui Y., Tannaka I. (1997a): Radiation hybrid mapping of human ADAM10 gene to chromosome 15. *Genomics* 45: 457-459.
- Yamazaki K, Mizui Y, Sagane K, Tanaka I. (1997b): Assignment of a disintegrin and metalloproteinase domain 10 (Adam10) gene to mouse chromosome 9. *Genomics* 46(3): 528-9.
- Yan S., Zhu H., Fu J., Yan S.F., Roher A., Tourtellotte W.W., Rajavashisth T., Chen X., Godman G.C., Stern D., Schmidt A.M. (1997): Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(10):5296-301.
- Yanker B.A. (1996): Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuron* 16: 921-932.
- Yavari R., Adida C., Bray-Ward P., Brines M. & Xu T. (1998): Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* 7: 1161-1167.
- Ye J., Rawson R.B., Komuro R., Chen X., Davé U.P., Prywes R., Brown M.S., Goldstein J.L. (2000): ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Mol. Cell.* 6: 1355-1364.
- Yieh L., Sanchez H. B., Osborne T. F. (1995): Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6102-6106.
- Yokoyama C., Wang X., Briggs M. R., Admon A., Wu J., Hua X., Goldstein J., Brown M. S. (1993): SREBP-1, a basic helix-loop-helix leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75:187-197.
- Zambrano N., De Renzis S., Minopoli G., Faraonip R., Donini V., Scaloni A., Cimino F., Rusoo T. (1997): DNA-binding protein Pur  $\alpha$  and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem. J.* 328: 293-300.

## Literaturverzeichnis

---

- 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 X., Diab I.H., Zehner Z.E. (2003): ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res.* 31(11):2900-14.
- Zheng H., Jiang M., Trumbauer M.E., Sirinathsinghji D.J., Hopkins R., Smith D.W., Heavens R.P., Dawson G.R., Boyce S., Conner M.W., et al. (1995): beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81(4):525-31.
- Zhou Q., Lieberman P.M, Boyer T.G., Berk A.J. (1992): Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes & Development* 6: 1964-1974.

### Internet-Adressen:

Literatur	<a href="http://www.biosis.org">www.biosis.org</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
Alzheimer'sche Krankheit:	<a href="http://www.alois.de">www.alois.de</a> <a href="http://www.ahaf.org">www.ahaf.org</a> <a href="http://www.deutsche-alzheimer.de">www.deutsche-alzheimer.de</a>
ADAM10	<a href="http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/metfam.htm">http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/metfam.htm</a> <a href="http://www.ebi.ac.uk/proteome/HUMAN/chromosomes/15.html">www.ebi.ac.uk/proteome/HUMAN/chromosomes/15.html</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps.cgi">www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps.cgi</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/AceView/hs.cgi?1=ADAM10&amp;v=2">www.ncbi.nlm.nih.gov/AceView/hs.cgi?1=ADAM10&amp;v=2</a> <a href="http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Genetik/ADAMs/txt/ADAM10.html">www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Genetik/ADAMs/txt/ADAM10.html</a> <a href="http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?ADAM10">http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?ADAM10</a> <a href="http://www.uta.fi/~loicka/HADAMs.htm">www.uta.fi/~loicka/HADAMs.htm</a> <a href="http://www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/metall.html">www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/metall.html</a> <a href="http://www.people.Virginia.EDU~jag6n/adams.html">www.people.Virginia.EDU~jag6n/adams.html</a> <a href="http://www.rzpd.de">www.rzpd.de</a>
Datenbank	<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl">www.ebi.ac.uk/embl</a> <a href="http://gdbwww.gdb.org">http://gdbwww.gdb.org</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi</a> <a href="http://transfac.gbf.de">http://transfac.gbf.de</a> <a href="http://www.bionet.nsc.ru">www.bionet.nsc.ru</a> <a href="http://www.genomatix.de">www.genomatix.de</a> <a href="http://www.e25itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html">www.e25itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html</a> <a href="http://www.expasy.ch/sprot">www.expasy.ch/sprot</a> <a href="http://www.nbrf.georgetown.edu/pir">www.nbrf.georgetown.edu/pir</a> <a href="http://www.rcsb.org/pdb">www.rcsb.org/pdb</a> <a href="http://www.dot.imgen.bcm.tmc.edu">www.dot.imgen.bcm.tmc.edu</a> <a href="http://genomix.gsf.de">http://genomix.gsf.de</a> <a href="http://bimas.dcrn.nih.gov">http://bimas.dcrn.nih.gov</a>
BAC-Klon	<a href="http://www.chori.org/bacpac/vectorframe.htm">www.chori.org/bacpac/vectorframe.htm</a>