

**Proteolyse des Amyloid-Vorläufer-Protein-verwandten
APLP2 durch α -Sekretasen**

Funktionelle Bedeutung bei der Differenzierung und Apoptose

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Kristina Endres
geb. in Frankfurt am Main

Mainz 2005

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2001 bis März 2005 am Institut für Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan: _____

1. Berichterstatter: _____

2. Berichterstatter: _____

Datum der mündlichen Prüfung: _____

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Proteolyse des Amyloid-Vorläufer-Protein-verwandten APLP2 durch α -Sekretasen“ selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass ich noch keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich unternommen habe.

Kristina Endres

Datum

Auszüge dieser Arbeit wurden bzw. werden wie folgt veröffentlicht:

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, 1456-1464

Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., Fahrenholz, F. (2005) Shedding of the Amyloid Precursor Protein like Protein APLP2 by disintegrin and metalloproteinases 10 and 17. *FEBS J.* (Manuskript in Vorbereitung)

Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., Fahrenholz, F. (2005) Shedding of the Amyloid Precursor-like Protein APLP2 by disintegrin metalloproteinases 10 and 17, Retinoic acid-induced upregulation during neuronal cell differentiation. *Poster Presentation, Abstract CBX0584, 28th Annual Meeting of the DGZ, Heidelberg*

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	MORBUS ALZHEIMER UND DAS AMYLOID-VORLÄUFER-PROTEIN APP	1
1.1.1	ZELLULÄRE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISTIKA	1
1.1.2	GENETISCHE FAKTOREN	3
1.1.3	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG DES AMYLOID-VORLÄUFER-PROTEINS APP	4
1.1.4	DIE AMYLOID-KASKADEN-HYPOTHESE	8
1.1.5	THERAPIE-ANSÄTZE	10
1.2	DIE APP-GENFAMILIE	11
1.2.1	PHYLOGENIE DER APP-SUPERFAMILIE	11
1.2.2	PROTEINSTRUKTUR UND EXPRESSION	13
1.2.3	FUNKTIONEN UND INTERAKTIONSPARTNER	16
1.2.3.1	APP als Zelladhäsionsmolekül	17
1.2.3.2	APP als neurotrophischer und neuroprotektiver Faktor	18
1.2.3.3	Interaktionen des APP-C-Terminus	18
1.2.3.4	Apoptotische und toxische Eigenschaften des APP	20
1.3	DAS PRIONENPROTEIN	22
1.4	DAS NOTCH-SYSTEM: SPALTUNG UND SIGNALTRANSDUKTION	24
1.5	ZIELSETZUNG	28
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	30
2.1	MATERIAL	30
2.1.1	GERÄTE	30
2.1.2	CHEMIKALIEN	31
2.1.3	KITSYSTEME	32
2.1.4	FERTIG-GELSYSTEME	32
2.1.5	INHIBITOREN, ENZYME UND PEPTIDSUBSTRATE	33
2.1.5.1	Inhibitoren	33
2.1.5.2	Enzyme	33
2.1.5.3	Peptidsubstrate	34
2.1.6	ANTI-KÖRPER	34
2.1.6.1	Primärantikörper	34
2.1.6.2	Sekundärantikörper	35
2.1.7	HÄUFIG VERWENDETE PUFFER, STAMMLÖSUNGEN UND KULTURMEDIEN	35
2.1.8	PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	39
2.1.8.1	Plasmide	39
2.1.8.2	Oligonukleotide	43
2.1.9	VERSUCHSTIERE, ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME	44
2.1.9.1	Versuchstiere	44
2.1.9.2	Zelllinien	46
2.1.9.3	Bakterienstämme	47
2.2	BIOINFORMATIK	48
2.2.1	ANFERTIGEN VON SEQUENZ-VERGLEICHEN	48
2.2.2	SOFTWARE ZUR BILDER-DIGITALISIERUNG	48

2.2.2.1	Photographische Darstellung von Ethidiumbromid-haltigen Nucleinsäuren in Agarosegelen	48
2.2.2.2	Photographische Darstellung von Proteinen im Western-Blot	48
2.2.3	AUSWERTUNGSSOFTWARE FÜR WESTERN-BLOTS	48
2.2.4	STATISTISCHE UND ALLGEMEINE AUSWERTUNG	49
2.3	METHODEN	49
2.3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	49
2.3.1.1	Plasmidschnellpräparation zur Analyse von <i>E. coli</i> -Transformanden	49
2.3.1.2	Plasmidpräparation über Silika- Säulen	50
2.3.1.3	Plasmidgroßpräparation	50
2.3.1.4	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	51
2.3.1.5	Isolierung von RNA aus Maus-Gehirnen mit peqGOLDTriFast	51
2.3.1.6	Quantifizierung von Nucleinsäuren	52
2.3.1.7	Reinigung und Fällung von Nucleinsäuren	53
2.3.1.7.1	PCI-Extraktion	53
2.3.1.7.2	Ethanolische Fällung von RNA	53
2.3.1.7.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	53
2.3.1.8	Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nucleinsäuren	54
2.3.1.9	Enzymatische Modifikation von Nucleinsäuren	55
2.3.1.9.1	Restriktionshydrolyse	55
2.3.1.9.2	Modifizierung von DNA-Enden	55
2.3.1.9.3	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	56
2.3.1.9.4	Phosphorylierung der 5'-Enden von Oligonucleotiden	56
2.3.1.9.5	Kovalente Verknüpfung von DNA-Molekülen (Ligation)	56
2.3.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
2.3.1.11	Lagerung von Nucleinsäuren	57
2.3.2	<i>IN-VITRO</i> -TEST ZUR SPALTUNG VON PEPTID-SUBSTRATEN	57
2.3.3	KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN- UND SÄUGERZELLEN	59
2.3.3.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	59
2.3.3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	59
2.3.3.1.2	Lagerung von <i>E. coli</i>	60
2.3.3.1.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	60
2.3.3.1.4	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	60
2.3.3.2	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	61
2.3.3.2.1	Kultivierung von Zellen	61
2.3.3.2.2	Passagieren von Zellen	61
2.3.3.2.3	Kryokonservierung von Zellen	61
2.3.3.2.4	Poly-L-Lysin-Beschichtung von Zellkulturschalen oder Deckgläschen	62
2.3.3.2.5	Transfektion von Zellen	62
2.3.3.2.6	Mikroskopische Untersuchung von Zellen	63
2.3.3.2.7	Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer	64
2.3.3.2.8	Differenzierung neuronaler Zellen mit Retinsäure	65
2.3.3.2.9	Nachweis apoptotischer Eigenschaften von Zellen	65
2.3.4	GEWINNUNG VON SEKRETIERTEN UND MEMBRANSTÄNDIGEN PROTEINEN AUS SÄUGERZELLEN	68
2.3.4.1	Sekretion von Proteinektodomänen in den Kulturüberstand	68
2.3.4.2	Proteinfällung aus Zellkulturmedium	69
2.3.4.3	Gewinnung von Zelllysaten	69

2.3.5	GEWINNUNG VON SEKRETIERTEN UND MEMBRANSTÄNDIGEN PROTEINEN AUS MAUSGEHIRN-PRÄPARATIONEN	70
2.3.5.1	Sektion und Gehirn-Präparation transgener Mäuse	70
2.3.5.2	Gewinnung von löslichen und membranständigen Proteinen aus Mausgehirnen	70
2.3.6	WESTERN-BLOT UND IMMUNDETEKTION VON PROTEINEN	71
2.3.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford	71
2.3.6.2	Deglykosylierung des Prionproteins	72
2.3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western-Blot	73
2.3.7	QUANTIFIZIERUNG VON SPEZIFISCHEN MRNAS	75
2.3.7.1	RealTime-RT-PCR	75
2.3.7.1.1	RT-PCR, Schmelzkurvenanalyse und Kontrolle der entstandenen Amplifikate im analytischen Agarose-Gel	76
2.3.7.1.2	Effizienzermittlung aus Standardkurven und Auswertung	78
2.3.7.2	Promotor-Test zum Nachweis transkriptorischer Aktivität von Reporterkonstrukten	80
2.3.7.2.1	Luciferase-Reporter-Test	80
2.3.7.2.2	EGFP-Reporter-Test	82
3	<u>ERGEBNISSE</u>	83

3.1	SPALTUNG DES APP-VERWANDTEN APLP2 DURCH DIE α-SEKRETASEN ADAM10 UND 17	83
3.1.1	<i>IN VITRO</i> -SPALTUNG EINES APLP2-PEPTIDS	83
3.1.2	SPALTUNG VON ENDOGENEM UND ÜBEREXPRIMIERTEM APLP2 IM ZELLULÄREN SYSTEM	84
3.1.2.1	Induktion der Proteolyse von APLP2 durch den Phorbolster PMA	84
3.1.2.2	Einfluss von Hydroxamsäure-basierenden Inhibitoren auf die Proteolyse von überexprimiertem APLP2	86
3.1.2.3	Inhibitor-Spektrum der Proteolyse von endogenem APLP2	87
3.1.2.3.1	Anreicherung der C-terminalen Spaltfragmente durch Inhibition der γ -Sekretase	87
3.1.2.3.2	Inhibition der APLP2-Proteolyse durch den β -Sekretase-Inhibitor II	90
3.1.2.3.3	Inhibition des APLP2-Proteolyse durch das nicht-selektive Hydroxamsäure-Derivat Galardin	94
3.1.2.3.4	Inhibition der APLP2-Prozessierung durch die Hydroxamsäure- Derivate GW280264X und GI254023X	96
3.1.2.4	Einfluss von überexprimiertem ADAM10, ADAM10DN und TACE auf die proteolytische Prozessierung von APLP2	98
3.1.2.5	Einfluss von ADAM10 auf die <i>in vivo</i> -Prozessierung von APLP2	101
3.1.2.5.1	Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper CT12 und D2II für APLP2 in Mausgehirn-Proben	101
3.1.2.5.2	Einfluss von überexprimiertem ADAM10 auf die APLP2- Prozessierung <i>in vivo</i>	102
3.1.2.6	Koregulation von APP und APLP2 mit ihren Proteasen ADAM10 und TACE während der Neuroblastoma-Differenzierung	106
3.1.2.6.1	Phänotypischer Nachweis der Neuroblastoma-Differenzierung	106
3.1.2.6.2	Quantifizierung der Substrat- und Proteasen-mRNA	107

3.1.2.6.3	Quantifizierung der Substrat- und Proteasen-Expression im Western-Blot	109
3.1.2.6.4	Quantifizierung der Sekretion von APPs α und APLP2s im Western-Blot	112
3.1.2.6.5	Einfluss des Metalloproteinase-Inhibitors Ro-31-9790 auf die Neuroblastoma-Differenzierung	114
3.1.2.7	Koregulation von APP und APLP2 mit ihren Proteasen ADAM10 und TACE während der Apoptose in Neuroblastoma-Zellen	116
3.1.2.7.1	Einfluss des Apoptose auf die Morphologie von Neuroblastoma-Zellen	117
3.1.2.7.2	Quantifizierung der Substrat- und Proteasen-Expression im Western-Blot	117
3.1.2.7.3	Untersuchung der Abhängigkeit der Koregulation von APLP2 und ADAM10 während der Apoptose vom NF κ B-Signalweg	122
3.1.2.7.4	Einfluss von ADAM10- und TACE-Inhibitoren auf die Apoptose in Neuroblastoma-Zellen	124
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR SPALTUNG DES NOTCH-REZEPTORS DURCH DIE α-SEKRETASEN	125
3.2.1	<i>IN VITRO</i> -SPALTUNG VON NOTCH-1-PEPTIDEN	125
3.2.2	EINFLUSS DER α -SEKRETASEN AUF DIE AKTIVIERUNG DES NOTCH-SYSTEMS IN NIH3T3-ZELLEN	129
3.2.2.1	Untersuchungen zur Notch-Aktivierung mittels eines Promotor-Tests	130
3.2.2.2	Untersuchungen der Notch-1-Proteolyse im Western-Blot	134
3.2.3	EINFLUSS DER ADAM10- UND ADAM10DN-ÜBEREXPRESSION AUF DAS NOTCH-SYSTEM IN TRANSGENEN MÄUSEN	136
3.3	EINFLUSS DER α-SEKRETASEN AUF DAS PRIONENPROTEIN	138
3.3.1	SPALTUNG EINES VOM HUMANEN PRIONPROTEIN ABGELEITETEN PEPTIDS	138
3.3.2	EINFLUSS VON ADAM10- UND ADAM10DN-ÜBEREXPRESSION IN TRANSGENEN MÄUSEN AUF DIE SPALTUNG DES PRPC	140
4	<u>DISKUSSION</u>	145
4.1	INTERAKTION DES ZELLULÄREN PRIONPROTEINS MIT DEN α-SEKRETASEN ADAM10 UND TACE	145
4.1.1	<i>IN VITRO</i> ERFOLGT KEINE SPALTUNG DES PRIONPROTEINS DURCH DIE BEIDEN PROTEASEN	145
4.1.2	ADAM10 BEEINFLUßT DIE EXPRESSION DES PRIONPROTEINS IN TRANSGENEN MÄUSEN	145
4.2	BEEINFLUSSUNG DES NOTCH-SYSTEMS DURCH DIE α-SEKRETASEN ADAM10 UND TACE	148
4.2.1	<i>IN VITRO</i> STELLT NOTCH-1 EIN SUBSTRAT FÜR BEIDE PROTEASEN DAR	149
4.2.2	BEEINFLUSSUNG DES NOTCH-SYSTEMS DURCH ADAMS IN DER ZELLKULTUR	150
4.2.3	TRANSKRIPTION DES NOTCH-ZIELGENS HES-5 IN ADAM10-TRANSGENEN MÄUSEN	151
4.3	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON APLP2 DURCH ADAM10 UND TACE	152

4.3.1	<i>IN VITRO</i> ERFOLGT KEINE SPALTUNG EINES APLP2-PEPTIDS DURCH DIE PROTEASEN ADAM10 UND TACE	152
4.3.2	IN DER ZELLKULTUR STELLT APLP2 EIN SUBSTRAT FÜR ADAM10 UND TACE DAR	153
4.3.3	APLP2 WIRD <i>IN VIVO</i> DURCH ADAM10 IN TRANSGENEN MÄUSEN PROZESSIERT	154
4.3.4	DIE PHYSIOLOGISCHE SITUATION DER ZELLE NIMMT EINFLUSS AUF DIE PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON APLP2 IN NEUROBLASTOMA-ZELLEN	155
4.3.4.1	Die Retinsäure-induzierte Differenzierung führt zu einer konzertierten Hochregulation von ADAM10 und seinem Substrat APLP2	156
4.3.4.2	Mechanismus der konzertierten Hochregulation von ADAM10 und seiner Substrate und deren Bedeutung für das Auswachsen von Neuriten	157
4.3.4.3	Bedeutung der regulativen Rolle der Retinsäure für die Alzheimersche Krankheit	161
4.3.4.4	Die Induktion der Apoptose durch exogen zugeführte Substanzen resultiert in einer verminderten ADAM10-Aktivität	162
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	165
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	166
7	<u>ANHANG</u>	183
7.1	ABKÜRZUNGEN	183
7.2	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	184
7.2.1	TABELLEN	184
7.2.2	ABBILDUNGEN	184
7.3	STRUKTURFORMELN DER VERWENDETEN INHIBITOREN	186
7.4	PLASMID-KARTEN KOMMERZIELL ERHÄLTLICHER VEKTOREN	187

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer und das Amyloid-Vorläufer-Protein APP

Aufgrund der demographischen Entwicklung der industrialisierten Staaten erreichen zunehmend mehr Menschen ein Lebensalter, in dem neurodegenerative Krankheiten verstärkt auftreten. Eine der häufigsten Demenzerkrankungen ist dabei die Alzheimersche Krankheit (AD), die durch ihren Entdecker Alois Alzheimer bereits 1906 in den wesentlichen klinischen Merkmalen charakterisiert wurde: progressiver Verlust der Gedächtnisleistung, gestörte kognitive Fähigkeiten, Verhaltensveränderungen (z.B. Paranoia und soziale Unangepasstheit) und zunehmender Verlust des Sprachvermögens. Schätzungen gehen von 1 Million Fällen der Demenzerkrankung in Deutschland aus, zu denen bis ins Jahr 2050 in etwa 1,3 Millionen Neuerkrankte hinzukommen dürften (9. Koordinierte Bevölkerungsdiagnose, Statistisches Bundesamt, 2001). Da die Krankheit in ihrem Verlauf in einer völligen Pflegebedürftigkeit der Patienten endet, ist die Aufklärung der Pathogenese und potentieller therapeutischer Ansätze sowohl ökonomisch als auch menschlich von großer Bedeutung.

1.1.1 Zelluläre und biochemische Charakteristika

Eine Korrelation zwischen den klinischen Symptomen und besonderen, mikroskopisch nachweisbaren Läsionen im Gehirn von dementen Patienten konnte bereits 1907 von Alois Alzheimer beobachtet werden (Alzheimer, 1907). Die neuropathologischen Veränderungen bei AD beginnen im enthorinalen Cortex und setzen sich im limbischen System und Bereichen des Allocortex fort. Sie umfassen sogenannte neuritische Plaques und neurofibrilläre Bündel (siehe Abbildung 1).

Einleitung

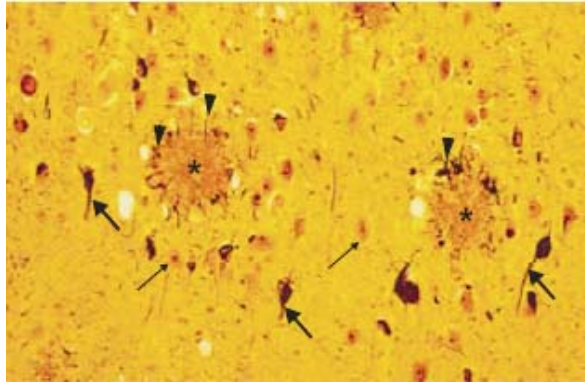


Abbildung 1: Neuropathologische Veränderungen im Gehirn eines an AD erkrankten Patienten (modifiziert nach Selkoe, 1999)

Der Schnitt durch die Amygdala eines Alzheimer Patienten (modifizierte Bielschowsky-Silberfärbung) zeigt die klassischen neuropathologischen Läsionen der Erkrankung: neuritische Plaques und neurofibrilläre Bündel. Die Plaques (*) bestehen aus kompakten extrazellulären Ablagerungen von A β -Peptiden, die von dystrophischen Neuriten (Pfeilspitzen) umgeben sind. Einige der Pyramidalneuronen enthalten stark gefärbte neurofibrilläre Bündel (dicke Pfeile) im perinukleären Cytoplasma. Daneben sieht man Pyramidalneuronen (dünne Pfeile) ohne pathologische Veränderungen.

Eine der zwei charakteristischen Gehirn-Läsionen bilden die neuritischen oder senilen Plaques, die sich mikroskopisch als sternförmige extrazelluläre Masse darstellen (Abbildung 1). Sowohl in diesen Plaques als auch in der unmittelbaren Umgebung finden sich dystrophische Neurite, die oftmals verbreitert scheinen und ultrastrukturelle Abnormitäten wie vergrößerte Lysosomen, vermehrte Mitochondrien und tau-Filamente aufweisen. Die Hauptkomponente der 10 bis >120 μ m großen Ablagerungen wurde von Glenner und Wong (1984) erstmals als das Peptid β A4 (β -Amyloid, A β ; Peptid mit β -Faltblattstruktur und 4 kDa Molekulargewicht), welches ein Spaltprodukt des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP: *amyloid precursor protein*) ist, identifiziert. Weitere Komponenten wie die APP-verwandten Proteine APLP1 und 2 (Bayer et al., 1997; Crain et al., 1996) oder auch das Prionenprotein (Ferrer et al., 2001) wurden ebenfalls in den Plaques gefunden.

Die zweite pathologische Erscheinung besteht aus intrazellulären neurofibrillären Ablagerungen, die mikroskopisch als große, nicht-membrangebundene Fasern erscheinen, welche einen Großteil des perinukleären Cytoplasmas einnehmen. Immunocytochemische und biochemische Analysen konnten aufzeigen, dass diese paarig aufgewundenen Fibrillen (PHF: *paired helical filaments*) aus dem hyperphosphoryliertem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau bestehen (Kosik et al.,

1986; Nukina und Ihara, 1986; Wood et al., 1986). Zahlreiche Kinasen wie z.B. die Cyclin-abhängige Kinase 5 (cdk5) (Patrick et al., 1999; Noble et al., 2003) sind in der Lage tau zu phosphorylieren. Eine Dysregulation dieser Kinasen z.B. durch A β -Peptide initiiert die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins, so dass es seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli verliert und zu PHFs aggregiert (siehe Abbildung 2).

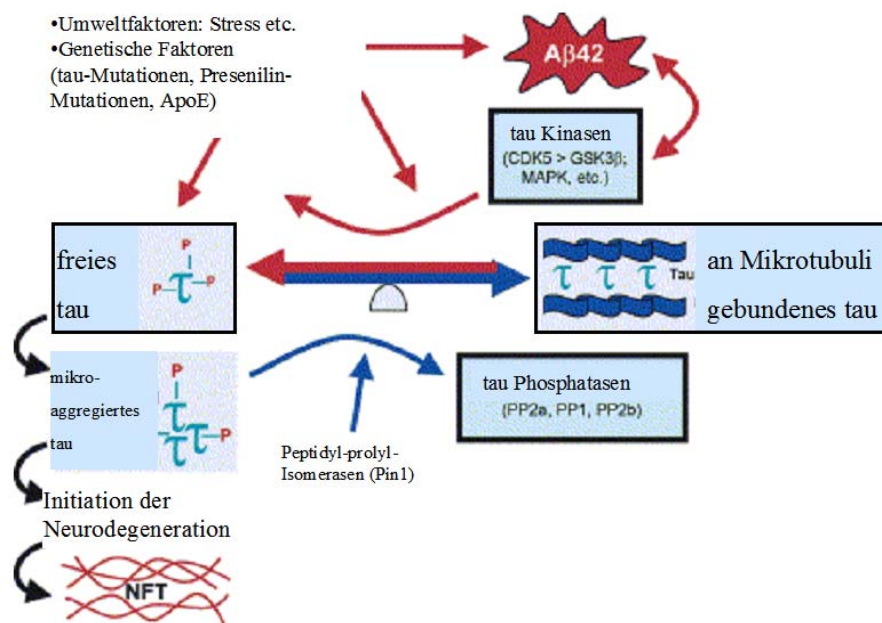


Abbildung 2: Bildung von neurofibrilläre Bündel (PHF, NFT) aus hyperphosphorylierten tau-Proteinen und Neurodegeneration (verändert nach Geschwind, 2003)

Die Bindung des tau-Proteins an Mikrotubuli wird durch den Phosphorylierungsstatus der Zelle reguliert. Faktoren, die eine Hyperphosphorylierung begünstigen, sind mit roten Pfeilen markiert.

Die zwei klassischen Läsionen, neuritische Plaques und neurofibrilläre Bündel, müssen nicht zwangsläufig gemeinsam auftreten. Tau-Ablagerungen ohne begleitende Plaques sind für eine Anzahl seltenerer neurodegenerativer Krankheiten beschrieben (Kuf-Krankheit, Frontotemporale Demenz) und auch tau-Bündel-arme Varianten der AD sind charakterisiert (Terry et al., 1987).

1.1.2 Genetische Faktoren

Während die weitaus größte Zahl der AD-Patienten (90-95%) in einem Alter von über 65 Jahren klinisch auffällig wird (Citron, 2000), existiert neben dieser

Einleitung

sporadischen Form der Krankheit auch eine familiäre Form (FAD). Diese tritt bedeutend früher in Erscheinung und wird in autosomal dominanter Form vererbt. Hierzu gehören Mutationen des APP (z.B. Goate et al., 1991), die Trisomie 21 (Tokuda et al., 1997) oder in den meisten Fällen Mutationen in den Presenilinen (Sherrington et al., 1995; Schellenberg et al., 1992), die an der Prozessierung des APP beteiligt sind. Alle beschriebenen Mutationen führen über eine veränderte Prozessierung des APP bzw. über eine erhöhte Expression (bei Trisomie 21) zu einer vermehrten Bildung des A β -Peptids. Mutationen des tau-Gens sind nach derzeitigem Stand der Forschung nicht genetisch mit AD gekoppelt, sondern verursachen die Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (gekoppelt mit Chromosom 17; Hutton et al., 1998; Übersichtsartikel: Spillantini et al., 1998).

Neben den autosomal dominant vererblichen Mutationen ist eine Reihe von genetischen Risikofaktoren beschrieben, die zwar einen Ausbruch der Krankheit nicht zwangsläufig machen, aber doch begünstigen können. Einer dieser Faktoren ist das ϵ 4-Allel des Apolipoprotein-E, das im Vergleich mit der Gesamtpopulation in Alzheimer-Patienten überrepräsentiert ist (Strittmatter et al., 1993). Zudem tritt bei Transformation des gealterten Gehirns zum AD-typischen Gehirn eine Hochregulation von Stress-, proinflammatorischen und apoptotischen Genen auf (Lukiw, 2004), die einen Einfluss auf den Verlauf der Demenz haben könnten.

1.1.3 Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP

Das APP-Protein gelangt während der Translation in das endoplasmatische Retikulum und über die Golgivesikel zur Plasmamembran. Auf diesem konstitutiv sekretorischen Weg wird es durch N- und O-Glykosylierung (Weidemann et al., 1989) und Phosphorylierung (Suzuki et al., 1994 und 1997; Hung und Selkoe, 1994) modifiziert. Das reife APP dient dann als Substrat für zwei unterschiedliche proteolytische Prozessierungswege (siehe Abbildung 3):

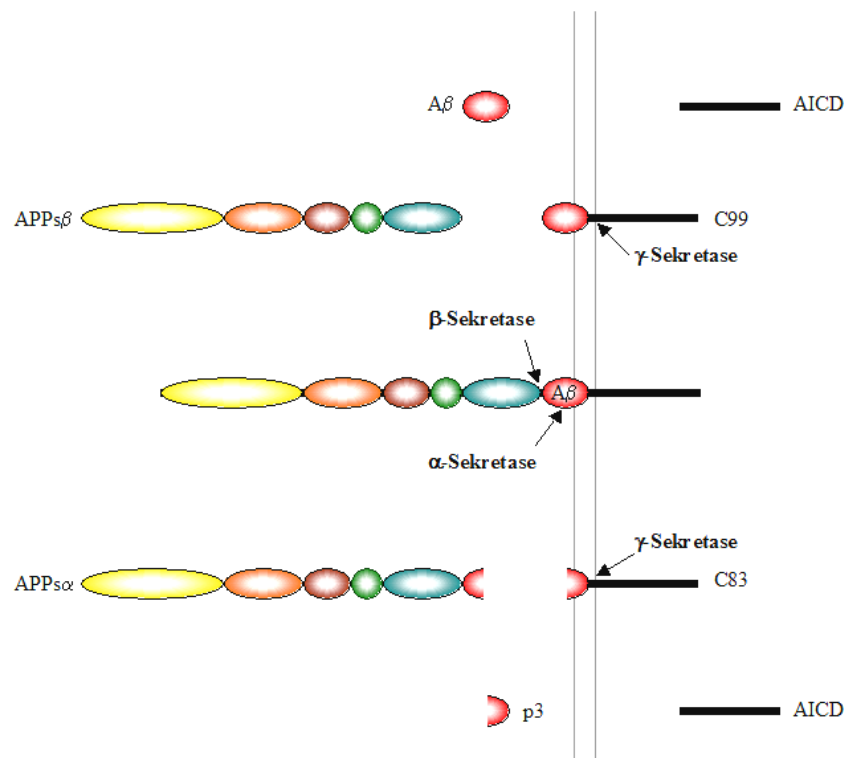


Abbildung 3: Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP

APP wird zunächst durch die α - oder β -Sekretase gespalten, so dass ein großes, lösliches Proteinfragment (APPs α oder APPs β) freigesetzt wird. Gleichzeitig verbleiben zwei C-terminale Fragmente (C83 und C99) in der Membran, die dann durch die γ -Sekretase prozessiert werden. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten der exakten Spaltposition in der Transmembrandomäne, so dass auch mehrere Fragmente unterschiedlicher Aminosäuresequenz daraus resultieren. Aus der γ -Spaltung entstehen nach erfolgter β -Sekretase-Spaltung so z.B. A β 40 und 42 und das intrazelluläre Fragment AICD (APP intrazelluläre Domäne), während die γ -Spaltung nach der α -Sekretase-Spaltung zur Freisetzung des p3- und des AICD-Fragments führt (zur Domänenstruktur: siehe Abbildung 7).

1) amyloidogener Weg: Hierbei spaltet die β -Sekretase in der extrazellulären Domäne von APP, dabei entsteht das große lösliche Fragment APPs β (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Hussain et al., 1999). Der in der Membran verbleibende C-terminale Rest von 99 Aminosäuren (C99) wird anschließend durch die γ -Sekretase in der Transmembran-Region gespalten. Dabei wird ein 40 oder 42 Aminosäuren großes A β -Peptid (A β 40 bzw. 42) freigesetzt. Dies stellt vor allem in der größeren Variante die Hauptkomponente der senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten dar (siehe 1.1.4).

2) nicht-amyloidogener Weg: Die sogenannte α -Sekretase spaltet das APP in der Mitte der A β -Region, so dass ein großes lösliches Fragment, das APPs α freigesetzt

Einleitung

wird. Der in der Membran verbleibende C-Terminus (C83) wird durch die γ -Sekretase zu den Fragmenten p3₄₀ und p3₄₂ prozessiert. Die Prozessierung von APP setzt sich aus einer konstitutiven und einer regulierbaren Komponente zusammen, letztere ist durch die Proteinkinase C (PKC) aktivierbar (Buxbaum et al., 1993; LeBlanc et al., 1998).

Als mögliche α -Sekretasen sind ADAM9, ADAM10 und auch TACE (ADAM17) beschrieben (ADAM: *a disintegrin and metalloproteinase*). Die Überexpression von ADAM9 führte zu einer vermehrten APP α -Produktion in COS-7-Zellen. Gleichzeitig wurde jedoch für gereinigtes ADAM9 gezeigt, dass ein synthetisches APP-Peptid nicht an der α -Sekretase-Spaltstelle prozessiert wird (Roghani et al., 1999). Zudem erwies sich die APP-Prozessierung in ADAM9 Knock-out-Mäusen als unverändert im Vergleich zu Kontrolltieren (Weskamp et al., 2002). Für ADAM10 ist eine sowohl konstitutive als auch eine regulierte α -Sekretase-Aktivität nachgewiesen (Lammich et al., 1999). Dabei erfolgt die *in vitro*-Proteolyse eines APP-Peptids an der physiologischen Spaltstelle (zwischen K16 und L17 des A β -Peptids). Eine stabile Überexpression der Protease führte in HEK 293-Zellen zu einer deutlich erhöhten APP α -Sekretion, während eine dominant negative Variante mit einer Mutation im katalytischen Zentrum (Zinkbindungsmotiv) zu einer signifikanten Erniedrigung der konstitutiven und der stimulierbaren α -Sekretase-Aktivität führte (Lammich et al., 1999). Zudem konnte in ADAM10-transgenen Mäusen eine verstärkte Aktivität der α -Sekretase anhand der vermehrten Sekretion des APP α verzeichnet und die Plaque-Bildung verhindert werden (Postina et al., 2004). Da Fibroblasten aus ADAM10-Knock-Out-Mäusen noch in der Lage sind APP proteolytisch zu prozessieren (Hartmann et al., 2002), scheint eine gewisse Redundanz vorzuliegen und mehrere α -Sekretasen zu existieren. Fibroblasten aus TACE-Knock-Out-Mäusen zeigten in der PKC-stimulierten APP α -Sekretion Defekte (Buxbaum et al., 1998) und eine stabile Überexpression von TACE in HEK 293-Zellen führte zu einer deutlich verstärkten konstitutiven Freisetzung von APP α (Slack et al., 2001).

Die durch Prozessierung von APP gebildeten Spaltprodukte haben verschiedene physiologische und pathologische Eigenschaften (siehe 1.2.3). Das A β -Peptid wird

ebenfalls sekretiert und bildet unlösliche, fibrilläre Aggregate (Amyloid-Plaques, siehe 1.1.4). Bis ins Jahr 1992 nahm man daher an, dass der amyloidogene Prozessierungsweg des APP einen pathologischen Prozess darstellt. Untersuchungen mit Antikörpern gegen A β -Peptide zeigten jedoch, dass A β als normales metabolisches Produkt konstitutiv von Zellen unter physiologischen Bedingungen sekretiert wird (Haass et al., 1992; Busciglio et al., 1993) und auch in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Plasma gesunder Menschen nachzuweisen ist (Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992). Sowohl in Neuronen, als auch anderen Gehirn-Zelltypen wie Astrocyten, Mikroglia oder endothelialen und glatten Muskelzellen wurde die A β -Sekretion nachgewiesen. Zusammen mit dem im Blut zirkulierenden A β entsteht nach der Passage der Blut-Hirn-Schranke (Poduslo et al., 1997; Poduslo et al., 1999) ein Pool an aggregationsfähigen Peptiden. Durch eine erhöhte Bildung von A β -Peptiden bzw. durch einen verminderten Abbau kommt es zu einer intrazellulären Aggregation (z.B. Cuello, 2005) und zur extrazellulären Plaquebildung.

Auch die APP-verwandten APLP-Proteine (*amyloid precursor-like proteins*) unterliegen einer Prozessierung durch verschiedene Proteasen, wenngleich hierbei keine A β -Peptide entstehen. Zunächst wurde lediglich die Sezernierung löslicher Ektodomänen in den Zellkulturüberstand und in die Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen (Slunt et al., 1994; Paliga et al., 1997). Durch massenspektrometrische Analysen von Rattenhirn-Homogenaten zeigte sich, dass auch ein korrespondierendes C-terminales Fragment, das durch γ -Sekretase-Spaltung hervorging, entsteht (Gu et al., 2001). Der Einsatz des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT bestätigte diesen proteolytischen Prozess für APLP1 (Scheinfeld et al., 2002). Verschiedene Analysen schlossen sich an, die zeigten, dass diesem C-terminalen löslichen APLP-Produkt ähnliche signaltransduzierende, transkriptionsaktivierende Eigenschaften wie dem aus APP generierten AICD (siehe S. 20) zukamen und gemeinsame Bindungspartner für die intrazelluläre Domäne existieren (Walsh et al., 2003; Scheinfeld et al., 2002).

Das vorangestellte Spaltereignis, das zur Generierung der γ -Sekretase-Substrate führt, blieb zunächst unaufgeklärt. Einen ersten Hinweis ergab die Induzierbarkeit

der APLP2-Proteolyse durch den Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in humanen epithelialen Cornea-Zellen (Xu et al., 2001). Eine solche Aktivierbarkeit durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat ist häufig im Zusammenhang mit einer von Metalloproteinasen abhängigen Katalyse beobachtet worden (Lammich et al., 1999; Garton et al., 2003; Le Gall et al., 2003). Allerdings ist der Mechanismus der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-Wirkung nicht vollständig geklärt, so dass dies alleine nicht als Argument für eine Beteiligung von Metalloproteinasen gelten konnte. Erst neueste Untersuchungen konnten die Vermutung einer APLP2-Spaltung durch Metalloproteinasen anhand von Inhibitor-Versuchen untermauern: Die Inkubation von Zellen mit den Hydroxamsäure-Inhibitoren TAPI-2 und Batimastat führte zu einer Reduktion der C-terminalen APLP2-Spaltfragmente, die sukzessive durch die γ -Sekretase prozessiert werden können (Eggert et al., 2004). Diese Breitband-Inhibitoren schränken das Spaltereignis auf die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und der ADAMs ein. Auch wurden durch APLP-Deletionsmutanten die Spaltstellen dieser Prozessierung eingegrenzt. Hieraus ergab sich, dass die Spaltung, die in der Freisetzung der Ektodomäne der APLPs resultiert, analog zur Spaltung des APP erfolgt. Damit war ein Indiz für die Beteiligung der α -Sekretasen, die die Sekretion des neuroprotektiven APP α (siehe S. 18) vermitteln, gegeben.

Auch Spaltstellen analog zur β -Sekretase-Prozessierung des APP wurden so in den APLPs identifiziert. Dies stimmt mit Untersuchungen (Li und Südhof, 2004) überein, die durch Coexpression von BACE-1 (*beta site APP cleaving enzyme 1*) und den APLPs in HEK 293-Zellen eine Modifikation der Prozessierung anhand der C-terminalen Fragmente zeigten. Auch *in vivo* wurde die Beteiligung von BACE an der APLP2-Prozessierung nachgewiesen (Pastorino et al., 2004): BACE-Knock-Out-Mäuse wiesen verglichen mit nicht-transgenen Kontrollmäusen verminderte Mengen an löslichem APLP2 auf, während die Überexpression der Protease zu einer Sekretions-Steigerung führte.

1.1.4 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die erhöhte Produktion von β -Amyloid-Peptiden spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese vererbbarer AD-Formen (siehe 1.1.2). Sporadische und vererbare Varianten der Demenz zeigen die gleichen pathologischen Läsionen und den

gleichen klinischen Phänotyp. Daraus lässt sich schließen, dass eine veränderte APP-Prozessierung in beiden Fällen eine zentrale Rolle spielt. Ein Modell für die Entstehung der Alzheimerschen Krankheit stellt die Amyloid-Kaskaden-Hypothese dar.

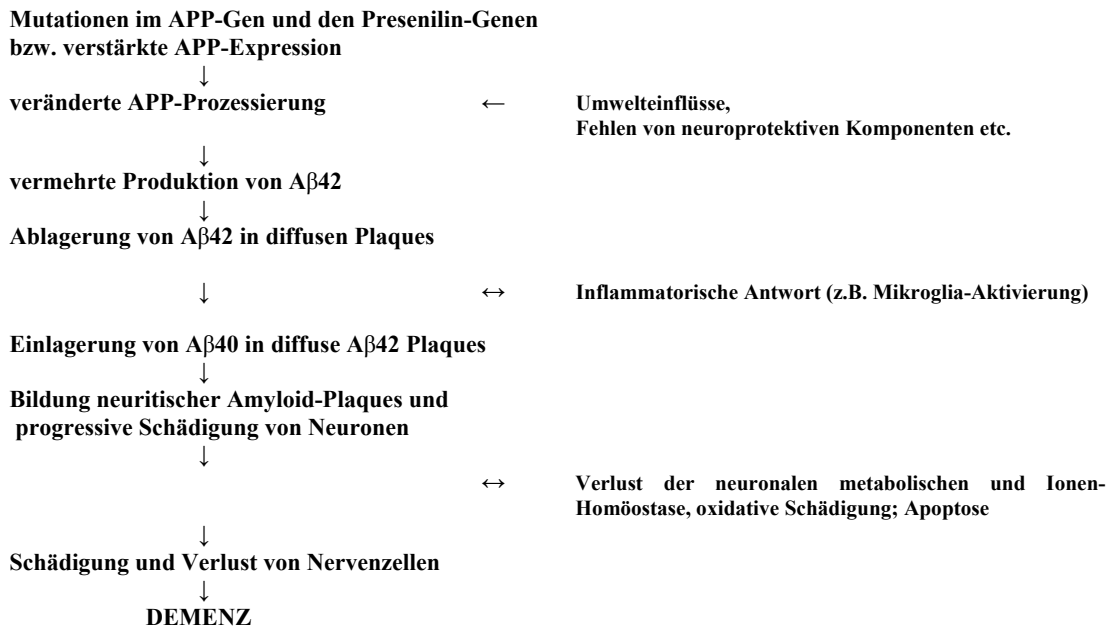


Abbildung 4: Amyloid-Kaskaden-Hypothese zur Pathogenese der AD (modifiziert nach Selkoe, 2001; Hardy und Selkoe, 2002)

Danach wird die Ablagerung von Aβ-Peptiden als zentrales Ereignis und Ursache für die Neurodegeneration bei AD angesehen. Im Rahmen dieser Hypothese wird die Entstehung der typischen Plaques durch erhöhte Konzentration von fibrillärem Aβ42 im Vergleich zu löslichem Aβ40 begünstigt. Im Gegensatz zu Aβ40 zeigt das hydrophobere Aβ42 *in vitro* eine verstärkte Tendenz zur Aggregation (Jarrett et al., 1993). Ebenso wird Aβ42 bereits in früheren Stadien von AD in den sogenannten diffusen Plaques gefunden (Yamaguchi et al., 1989). Derzeit wird angenommen, dass die reifen, neuritischen Plaques durch zunehmende Einlagerung von Aβ40 sowie fibrillärem Aβ42 in diffuse Plaques entstehen (Selkoe, 1999; Selkoe, 2001).

Aber auch Veränderungen im Zellstoffwechsel, insbesondere die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins (siehe Abbildung 2), könnten die Ursache der pathologischen Veränderungen in den Neuronen darstellen, wenngleich die Tauopathien in Abwesenheit von Aβ-Ablagerungen eher auf ein sekundäres Ereignis

Einleitung

im Verlauf ätiologisch unterschiedlicher neuronaler Verletzungen hindeuten. Weitere Gegenargumente zur Amyloid-Kaskaden-Hypothese sind die nur teilweise Korrelation zwischen der Anzahl neuritischer Plaques und dem Ausmaß der Demenz, der Nachweis von Amyloidablagerungen fern der Bereiche der Neuronendegradation und das Auftreten von Plaques bei älteren gesunden Menschen. Nach neueren Untersuchungen ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese dahingehend zu modifizieren, dass vermutlich intra- und extrazellulär gebildete lösliche, oligomere A β -Peptide ursächlich für die Neurodegeneration sind (Walsh und Selkoe, 2004). Diese führen bereits vor der Manifestation von senilen Plaques zu einer Beeinträchtigung synaptischer Funktionen wie der Langzeitpotenzierung (LTP) (Walsh et al., 2005) und zu pathologischen Prozessen.

1.1.5 Therapie-Ansätze

Frühe Therapien basierten auf der Minderung einzelner Symptomaten der AD, wie eine Erhöhung der im Krankheitsverlauf reduzierten Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin; Nitsch et al., 1996). Damit ließ sich jedoch lediglich der Krankheitsverlauf verzögern. Ebenso ist der Einsatz von antiinflammatorischen Substanzen, Antioxidantien oder Modulatoren der involvierten Signalwege möglich. Dabei erscheint jedoch die Toxizität einiger Komponenten - vor allem in älteren Menschen - und auch die möglicherweise auftretenden Nebeneffekte problematisch. Neuere Ansätze zielen direkt auf das A β im Gehirn: Die Aktivierung A β -abbauender Enzyme wie des IDE (*insulin degrading enzyme*) (Leissring et al., 2003) oder niedermolekulare Substanzen, die nach Passage der Blut-Hirnschranke die Aggregation der A β -Peptide unterbinden oder auflösen (Cherny et al., 2001), scheinen erfolgversprechend.

Den Hauptansatz zur Therapie des Morbus Alzheimer bietet die direkte Modulation der APP-prozessierenden Enzyme. Da für die β -Sekretase bislang nur wenige physiologische Substrate neben APP bekannt sind, könnte eine Inhibition dieses Enzyms Erfolg versprechen. Auch eine Inhibierung der γ -Sekretase käme in Frage, wobei mehrere Substrate wie auch die Notch-Rezeptoren betroffen wären (siehe 1.4). Da jedoch nur wenige Spaltprodukte des Notch für die Signalübertragung in Zellen nötig sind (Schroeter et al., 1998), könnte eine solche Reduktion der katalytischen

Aktivität ohne größere Nebenwirkungen bleiben. Ob jedoch die Spaltprodukte anderer Substrate wie des γ -gespaltenen APP oder der APLPs für die normale Funktion der Zellen unerlässlich sind, ist noch nicht geklärt.

Einen weiteren Ansatz bietet die Aktivierung der α -Sekretasen. Diese Modulation hätte den Vorteil, dass neben der Reduktion der A β -Peptide zeitgleich neuroprotektive und neurotrophische lösliche Moleküle entstünden (siehe 1.2.3.2), die positiv auf die geschädigten Neuronen einwirken könnten. Ein erster Versuch zu einer solchen Therapie ist beschrieben (Postina et al., 2004): Die Überexpression der α -Sekretase ADAM10 in Plaque-entwickelnden AD-Modellmäusen verminderte die Ausprägung der Plaques signifikant und führte zu einer Wiederherstellung der Gedächtnis- und Lernfunktion der Mäuse. Auch hierbei stellt sich wiederum das Problem, dass die α -Sekretasen ein relativ großes Substratspektrum aufweisen. Daher ist es umso wichtiger, die einzelnen Substrate zu identifizieren und die Wirkung ihrer Spaltprodukte zu charakterisieren.

1.2 Die APP-Genfamilie

Das Amyloid Vorläuferprotein APP ist Teil einer Multi-Gen-Superfamilie, das die Säuger-APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2, das *Drosophila* APPL und das APL-1 aus *Caenorhabditis elegans* umfasst. Neuere Untersuchungen führten zur Entdeckung eines APLP2 in *Xenopus laevis*. APP wurde zudem in vielen Vertebraten-Spezies wie dem Zebrafisch *Danio rerio* oder dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* charakterisiert.

1.2.1 Phylogenie der APP-Superfamilie

Die Proteine der APP-Superfamilie weisen einen hohen Grad der Konservierung bezüglich der Aminosäuresequenz auf. So sind z.B. die Aminosäuren in murinem APLP2 verglichen mit APP zu 52% identisch und zu 71% ähnlich (Slunt et al., 1994). Auffällig ist dabei, dass sowohl der extrazelluläre als auch der cytoplasmatische Bereich stark konserviert ist, während der Bereich vor der Transmembrandomäne, der bei APP die A β -Sequenz enthält, in keinem der APLPs Homologien aufweist (siehe Abbildung 5).

Einleitung

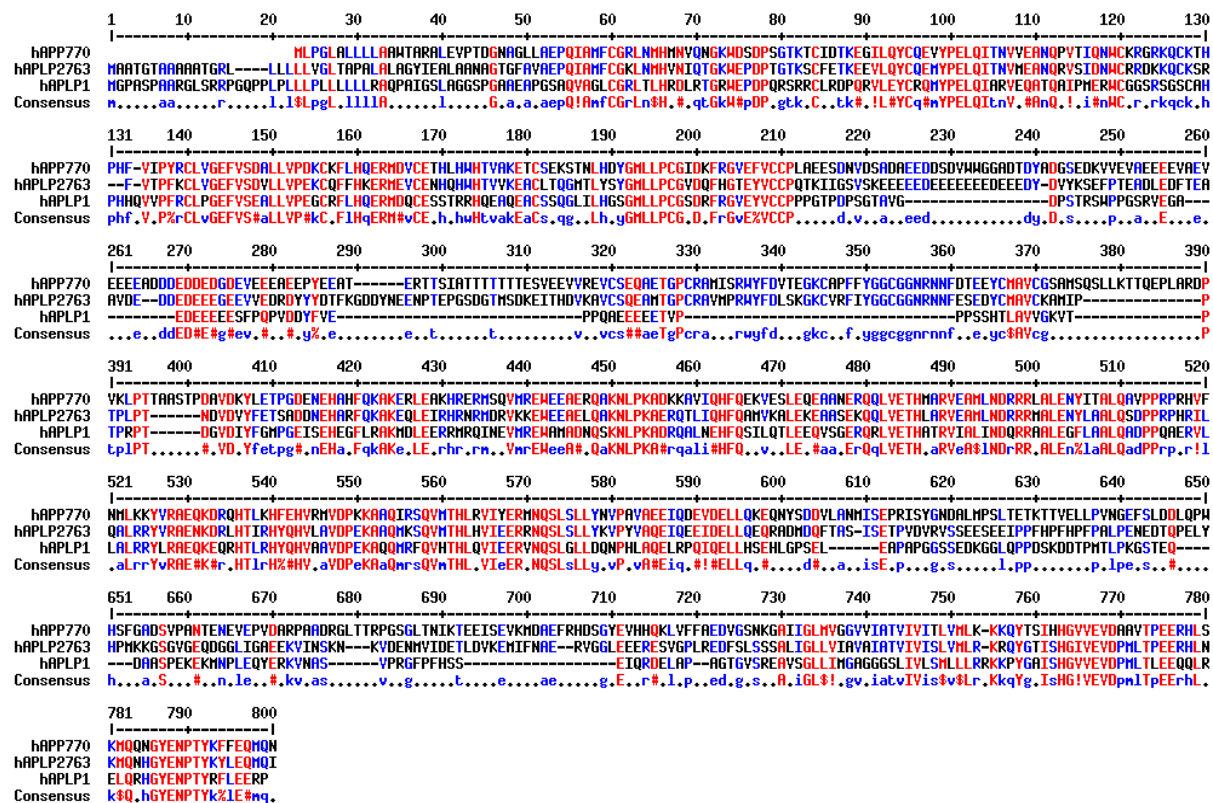


Abbildung 5: Sequenzvergleich der humanen Proteine der APP-Superfamilie

Der Sequenzvergleich wurde mit der Software Multalin Version 5.4.1 (Corpet, 1988) unter Verwendung der Sequenz für humanes APP770 (NP_000475), APLP1 (NP_005157) und APLP2-763 (NP_001633) durchgeführt. Identische Aminosäuren aller drei Sequenzen (rot) oder von zwei Sequenzen (blau) sind hervorgehoben. Die gemeinsame Konsensussequenz zeigt an, dass ein großer Teil der Ektodomäne und die cytoplasmatische Domäne stark konserviert sind, während die Sequenz des A β -Peptides (AS 701 bis 741 in hAPP770) in keinem der zwei Paralogen zu finden ist.

Durch die Untersuchung der Aminosäuresequenzen konnte eine phylogenetische Einteilung der APP-Protein-Familie erfolgen (Collin et al., 2004). Dabei ergab sich, dass eine frühe Genduplikation zur Entstehung zweier Schwestergruppen, der APP- und der preAPLP-Familie, führte (Abbildung 6). Diese erste Teilung erfolgte vermutlich vor der Auftrennung in Säuger und Amphibien, da sowohl in den Säugern als auch im Krallenfrosch *X. laevis* APP- und APLP2-Proteine identifiziert wurden. Der ersten folgte eine zweite Genduplikation, die in der Auftrennung der pre-APLP-Familie in APLP1 und APLP2 resultierte.

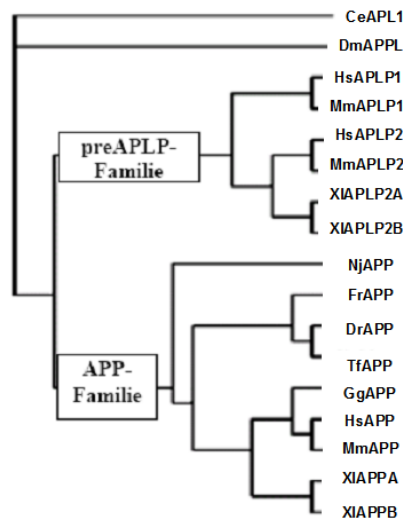


Abbildung 6: Phylogenetische Analyse der APP/ APLP-Proteinfamilie (modifiziert aus Collin et al., 2004)

Der Stammbaum zeigt die frühe Auftrennung in eine APP- und eine pre-APLP-Familie, der dann die weitere Auftrennung in APLP1 und APLP2 folgte. Untersuchte Spezies: Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dr, *Danio rerio*; Fr, *Fugu rubripes*; Gg, *Gallus gallus*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Nj, *Narke japonica*; Tf, *Tetraodon fluviatilis*; Xl, *Xenopus laevis*.

Zu einem abweichenden Ergebnis bezüglich der Phylogenie der APP- und APP-
verwandten Proteine führte die Analyse der Exonstruktur der einzelnen Gene (Coulson et al., 2000): Nach einer ersten Trennung in eine APLP1- und eine APP/APLP2-Linie sollte eine zweite Genduplikation zur Entstehung der separaten APP- und der APLP2-Familie geführt haben. Zum Zeitpunkt dieser Analyse war jedoch das APLP2 aus *X. laevis* noch nicht identifiziert, so dass hier vielleicht die entscheidende phylogenetische Verknüpfung fehlte.

1.2.2 Proteinstruktur und Expression

Das APP-codierende Gen des Menschen besteht aus 18 Exonen, von denen die Exone 7, 8 und 15 alternativ gespleißt werden können. Die zehn *in vivo* existierenden Spleißvarianten werden während der Entwicklung und in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich exprimiert (Sandbrink et al., 1997; Sandbrink et al., 1994). Das Protein APP695 wird dabei hauptsächlich in Neuronen exprimiert, während APP751 und 770 die Hauptformen in peripheren Geweben und Gliazellen darstellen (Sandbrink et al., 1994). Das APP-Protein ist ein Transmembranprotein vom Typ I mit einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer vergleichsweise kurzen cytoplasmatischen Domäne (Kitaguchi et al., 1988;

Einleitung

Tanzi et al., 1988). Nach N- und O-Glykosylierungen wird das Protein über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert. Handelt es sich um eine Proteinvariante, deren mRNA nicht das Exon 15 beinhaltet, so wird im Golgi-Apparat zusätzlich eine Chondroitinsulfat-Glucosaminoglycan-Modifikation (CS-GAG, siehe Abbildung 8) angefügt. Diese APP-Proteoglykane wurden zuerst für Leukozyten nachgewiesen, finden sich aber auch in peripheren Zellen und nur in geringer Menge in Neuronen (Sandbrink et al., 1993; Pangalos et al., 1995).

Die extrazelluläre Domäne des APP besteht aus einem Signalpeptid, das bei Eintritt in das ER abgespalten wird, einer cysteinreichen Domäne, einer sauren Domäne mit Zink- und Kupfer-Bindungsstellen, einer Kunitz-Typ Protease-Inhibitor-domäne sowie einer OX-2- und einer Kohlenhydrat-Domäne (siehe Abbildung 7). Daran anschließend - unmittelbar vor der Transmembranregion - beginnt die charakteristische A β -Domäne. Im Zellinneren findet sich die cytoplasmatische Domäne mit mehreren Bindungsstellen für Interaktionspartner (siehe Abbildung 9). Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht, dass die APLP1- und 2-Proteine viele dieser Domänen mit dem APP gemeinsam haben, während die Ox-2- und vor allem die A β -Domäne diesen Proteinen vollständig fehlt.

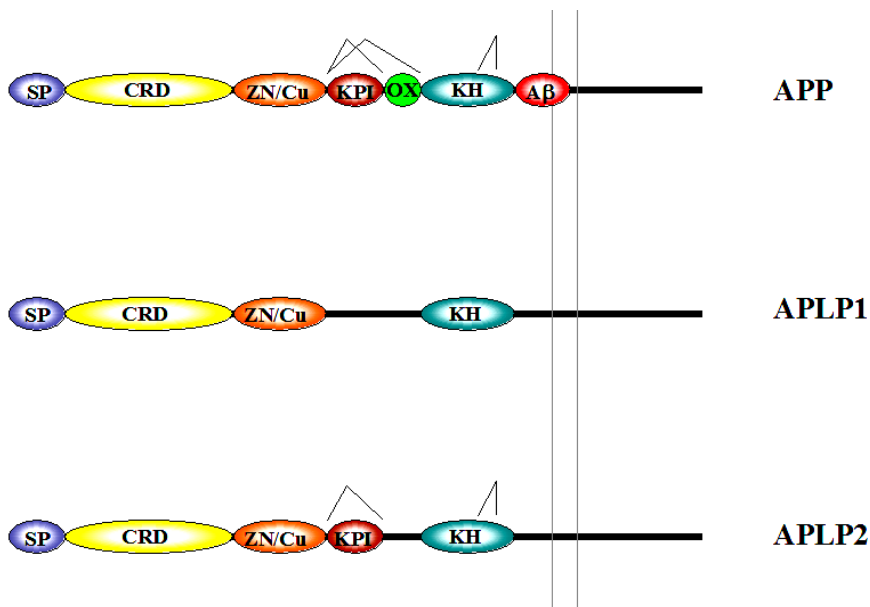


Abbildung 7: Domänenstruktur der Proteine der APP-Superfamilie

Die Proteine der APP-Superfamilie sind aus folgenden Domänen aufgebaut: Signalpeptid (SP), Cysteinreiche Domäne (CRD), saure Domäne mit Zink- und Kupfer-Bindestellen (ZN/Cu), Kunitz-Typ-Protease-Inhibitor-domäne (KPI), Kohlenhydrat-Domäne (KH) und intrazelluläre Domäne. Die OX-2-Domäne mit

Homologie zum MRC-OX-2-Antigen (OX) (Konig et al., 1992) und die A β -Domäne sind nur für APP charakteristisch. Klammern zeigen die Orte alternativen Spleißens in der zugrunde liegenden mRNA an.

APLP1 wird ohne variables Spleißen in Neuronen und einigen Gliazellen des zentralen Nervensystems exprimiert (Lorent et al., 1995). Dies gilt auch für das *Drosophila* APPL (Martin-Morris et al., 1990). APLP2 hingegen weist eine ebenso ubiquitäre Expression wie APP auf und ist auch in mehreren Spleißvarianten beschrieben (Slunt et al., 1994; Sandbrink et al. 1994). In den APLP2-Isoformen, denen ein für 12 Aminosäuren codierendes Exon fehlt (siehe Abbildung 8), entsteht eine Bindungsstelle für eine Chondroitin-Glukosaminoglykan-Modifikation. Ähnlich wie bei APP finden sich diese modifizierten APLP2-Proteine jedoch nur zu geringen Anteilen in neuronalen Zellen (z.B. 5% der APLP2-mRNA im Cerebellum; Sandbrink et al., 1994) und vorwiegend in peripheren Geweben (z.B. 84% in der Niere; 70% in der Lunge).

A

hAPP	640	GEFSLDQLQPWHSFGADSV	PANTENEVE	EPVDARPAADRGLTTRPG	SGLTN
hAPLP2	640	PENEDTQPELYHPMKKG	SGVGEQDGLIGAE	EKKVINSKN	KVDENMVI
hAPP	690	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYE	VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI	IIGLMVGGV	
hAPLP2	690	DETLDVKEMIFNAE	RVGGL	EEERESVGPLREDFSLSSS	ALIGLLVIAV
hAPP	740	<u>VIATVIVITLVML</u>			
hAPLP2	740	<u>AIATVIVISLVML</u>			

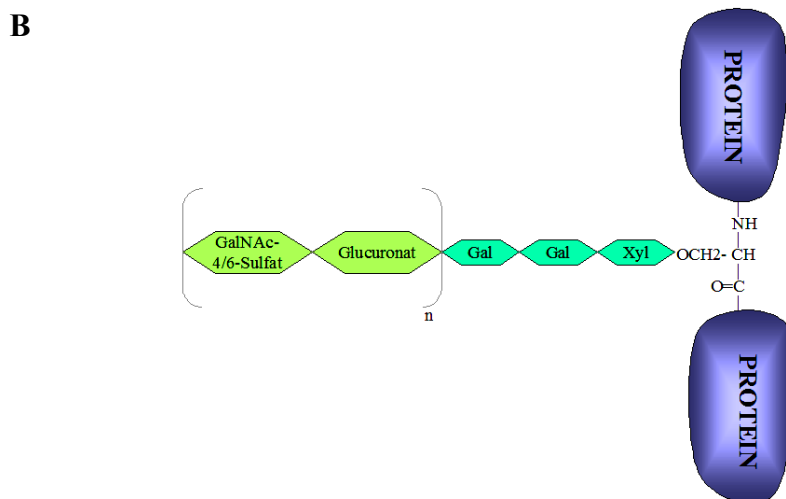


Abbildung 8: CS-GAG-Modifikation von APP und APLP2

A) Dargestellt ist der nicht-konservierte Bereich der Aminosäuresequenz vor der Transmembrandomäne (unterstrichen) des humanen APP770 und des humanen APLP2763. Identische Aminosäuren sind blau markiert, die alternativ gespleißten Insertionen sind grau und die modifizierten Serinreste gelb hinterlegt. B) Chondroitin-Glukosaminoglykan-Modifikation: Ausgehend von einer Xylosyltransferase-Reaktion wird über ein Trisaccharid die Modifikation mit variierender Kettenlänge an einen Serin-Rest des Proteins angefügt.

Einleitung

Ein wichtiger Unterschied zum APP ist, dass die überwiegend in Neuronen exprimierte Isoform des APLP2 (APLP2-763) die KPI-Domäne enthält (Sandbrink et al., 1997), während APP695, die Hauptform des APP in neuronalen Zellen, diese Domäne nicht aufweist. Im Säuger-Gehirn werden alle Mitglieder der APP-Proteinfamilie weitgehend überlappend exprimiert (Wasco et al., 1993; Lorent et al., 1995; Crain et al., 1996; McNamara et al., 1998). Biochemische Analysen zeigten jedoch subzellulär eine präsynaptische Anreicherung des APP (Ferreira et al., 1993) und des APLP2 (Lyckman et al., 1998) auf, während APLP1 spezifisch der Postsynapse zugeordnet werden konnte (Kim et al., 1995).

1.2.3 Funktionen und Interaktionspartner

Obwohl das APP-Protein und seine Spaltprodukte aufgrund der grundlegenden Rolle des Moleküls in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit seit nahezu zwei Jahrzehnten intensiv erforscht werden, konnte ihre physiologische Funktion bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden. Viele biologische Funktionen wurden dem Protein aufgrund phänomenologischer Daten zugeordnet (Übersicht in: DeStrooper et al., 2000; Annaert et al., 2002), wie z.B. neuronale Zelladhäsion (Breen et al., 1991), Neuritenwachstum (Allinquant et al., 1995), Zellmigration (Sabo et al., 2001) oder Proliferation neuronaler Vorläuferzellen (Hayashi et al., 1994; Ohsawa et al., 2001; Caille et al., 2004).

Für die APP-verwandten Säuger-Proteine APLP1 und APLP2 sind bislang relativ wenige Untersuchungen zur Funktion erfolgt, dennoch zeichnet sich vor allem durch die Untersuchung von Einzel- und kombinierten Knock-Outs in Mäusen eine gewisse Redundanz unter den Mitgliedern der Protein-Familie ab. Mäuse mit Einzel-Knock-Outs der Proteine waren lebensfähig und wiesen nur geringe Einschränkungen z.B. der lokomotorischen Aktivität oder in bezug auf das Gewicht auf (Muller et al., 1996; Zheng et al., 1995; von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000).

Kombinationen von APLP2^{-/-} mit APP^{-/-} oder APLP1^{-/-} hingegen waren innerhalb von 24 h nach der Geburt letal (von Koch et al., 1997), während APP^{-/-} / APLP1^{-/-} - Kombinationen lebensfähig und ohne auffälligen Phänotyp waren. Dies deutet zum einen an, dass es eine gewisse Redundanz zwischen den drei Proteinen gibt, zum anderen kristallisiert sich eine wichtige Rolle für das APLP2-Protein heraus.

Dreifach-Knock-Outs in Mäusen erwiesen sich kurz nach der Geburt als letal (Herms et al., 2004). Im Gegensatz zu den Kombinationen von APLP2^{-/-} und APP^{-/-} oder APLP1^{-/-}, die keinen auffälligen Phänotyp hatten, zeigten 81% der Dreifachmutanten auffällige Fehlbildungen des Gehirns: Verlagerte Zellansammlungen in der marginalen Zone und dem Subarachnoidal-Raum treten aufgrund der Überwanderung corticaler Zellen auf. Als Folge ist die Architektur betroffener Areale des Gehirns völlig zerstört. Diese Form der neuronalen Fehlbildung erinnert an die Typ-II-Lissencephalie beim Menschen und verdeutlicht die essentielle Rolle der APP-Proteinfamilie in der normalen Gehirnentwicklung und frühen postnatalen Phase.

1.2.3.1 APP als Zelladhäsionsmolekül

Die Expression des APP als ein membrangebundenes Glykoprotein führte schon früh zu der Annahme, dass es an der Zelladhäsion beteiligt sein könnte. Dafür sprach das unregelmäßige, punktförmige Verteilungsmuster des APP auf der Oberfläche von Neuronen, das ähnlich dem Verteilungsmuster von CAMs war (*cell adhesion molecules*) (Shivers et al., 1988), und seine synaptische Lokalisierung (Schubert et al., 1991; Storey et al., 1996). Die Induktion der APP α -Sekretion durch den Nervenwachstumsfaktor NGF oder den Fibroblastenwachstumsfaktor führten zu einer verstärkten Adhäsion von PC12-Zellen an eine Collagenmatrix (Schubert et al., 1989). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Fab'-Fragmente von APP-Antisera sowohl die Zell-Zell- als auch die Zell-Matrix-Interaktion inhibieren (Breen et al., 1991; Chen und Yankner, 1991) und dass ein Antisense-vermittelter APP-Knock-Down zu einer verminderten Zell-Substratadhäsion führt (Coulson et al., 1997). Zudem wurde für zahlreiche Elemente der extrazellulären Matrix eine Interaktion mit APP beschrieben. Beispiele hierfür sind das Laminin (Behr et al., 1996; Kibbey et al., 1993), Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) (Narindrasorasak et al., 1991; Coulson et al., 1997) oder Glucosaminoglykane (Multhaup, 1994).

Auch die APP-verwandten Proteine APLP1 und 2 scheinen adhäsive Eigenschaften mit APP zu teilen: Die phylogenetische Analyse (Coulson et al., 2000) spricht für eine gemeinsame Adhäsionsfunktion, deren Spezifität durch die nicht-konservierten Bereiche der Proteine vermittelt wird. Zudem ist für APLP2 eine Interaktion mit

Einleitung

verschiedenen Matrixkomponenten wie Laminin, Fibronectin oder HSPGs in CHO-Zellen gezeigt worden (Li et al., 1999).

1.2.3.2 APP als neurotrophischer und neuroprotektiver Faktor
Sowohl das lösliche Spaltfragment APPs α als auch das membrangebundene APP könnten das Neuritenwachstum durch adhäsive Funktionen beeinflussen (siehe 1.2.3.1). Unabhängig davon besitzt das lösliche APP verschiedene neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften. Zum Beispiel führte die Behandlung von Zellen mit dem löslichen Spaltprodukt zu einem schnellen und anhaltenden Abfall des zellulären Calcium-Spiegels (Mattson et al., 1993), so dass es zu einer Abschwächung des von A β induzierten Ca²⁺-Anstiegs und der damit verbundenen Induktion freier Radikale dienen könnte (Goodman und Mattson, 1994). Auch durch Glutamat-Behandlung neuronaler Zellen wird der intrazelluläre Calcium-Spiegel erhöht, was den Zelltod zur Folge haben kann (Budd und Nicholls, 1996). Dieser Effekt wurde durch zeitgleiche Behandlung mit APPs α abgeschwächt. In ähnlicher Weise wirkte eine Co-Infusion von löslichem APP auf ischämische Verletzungen des Gehirns *in vivo*, die hauptsächlich auch durch chronische Freisetzung von Glutamat hervorgerufen werden (Mattson et al., 1993; Smith-Swintosky et al., 1994).

Während für APLP1 keine direkte protektive bzw. neurotrophische Wirkung beschrieben ist, führte die rekombinante APLP2-Ektodomäne zu einer Stimulation des Neuritenwachstums (Cappai et al., 1999). Für alle drei Proteine konnte eine Induktion der Expression durch Retinsäure-vermittelte Differenzierung von Neuroblastoma-Zellen nachgewiesen werden (Ruiz-Leon und Pascual, 2003; Beckman und Iverfeld, 1997; Adlerz et al., 2003), so dass eine gemeinsame Funktion beim Neuritenwachstum bestehen könnte. Zudem wurde gezeigt, dass sowohl das lösliche APP als auch das APLP2s zu einer Induktion der Neurogenese in der subventrikulären Zone des Maus-Gehirns führen (Caillé et al. 2004). Beide Proteolyseprodukte scheinen damit Regulatoren für die Proliferation neuronaler Vorläufer im adulten zentralen Nervensystem zu sein.

1.2.3.3 Interaktionen des APP-C-Terminus
Weitere Hinweise auf die Funktion der Proteine der APP-Familie liefern Untersuchungen zur Proteininteraktion der hochkonservierten cytoplasmatischen

Domäne. Mittels des Hefe-Zweihybridsystems wurden zwei Adapter-Protein-Familien (Fe65 und X11, siehe Abbildung 9), die mit Tyrosin-haltigen Motiven dieser Domäne interagieren, entdeckt: Beide Adapter-Moleküle binden über Phosphotyrosin-Interaktions-Domänen (PID) an das APP bzw. die APLPs (Fe65: Fiore et al., 1995; Guenette et al., 1999; Zambrano et al., 1997; X11: Borg et al., 1996; Tomita et al., 1999). Obwohl die Bedingungen für die Bindung von Fe65 und X11 an das Tyrosin-haltige Motiv NPTY leicht unterschiedlich sind (Borg et al., 1996), ist dennoch zu vermuten, dass hier ein kompetitives Verhältnis vorliegt. Interessanterweise hatte die Überexpression der Adapterproteine unterschiedliche Auswirkungen auf die APP-Prozessierung: Während Fe65 die Prozessierung verstärkte (Sabo et al., 1999), führte X11 zu einer geminderten γ -Sekretase-Prozessierung und zu einem Rückhalt des ungespaltenen APP in der Zelle (Borg et al., 1998; Ho et al., 2002; Xie et al., 2005).

Die Balance zwischen der Bindung der Adaptermoleküle kann vermutlich über ein drittes Protein, mDAB1, modifiziert werden, das in der selben Region bindet (Trommsdorff et al., 1998; Übersicht in Kawasumi et al., 2004). mDAB1 selbst kann wiederum nach Phosphorylierung Kinasen wie Fyn oder Src durch Bindung an deren SH2-Domäne rekrutieren. Weitere Proteine, die mit APP interagieren, sind das GTP-bindende Protein G₀ (Nishimoto et al., 1993), PAT1 (Zheng et al., 1998) und das APP-bindende Protein 1 (APP-BP1) (Chow et al., 1996).

Eine weitere Funktion für die freigesetzte intrazelluläre Domäne des APP (AICD, siehe Abbildung 3) ergibt sich aus der nukleären Translokation nach γ -Sekretase-Spaltung. Zusammen mit Fe65 und TIP60, einer Histon-Acetylase, induziert AICD transkriptionelle Aktivität (Cao und Sudhof, 2004). Bislang sind die Zielgene dieses Komplexes weitgehend unbekannt, wenngleich *in vivo* Anhaltspunkte für eine Aktivierung des *kai1*-Gens gefunden wurden (Baek et al., 2002). Auch für die Proteine APLP1 und APLP2 sind ähnliche Aktivitäten für die intrazelluläre Domäne nachgewiesen (Scheinfeld et al., 2002, Walsh et al., 2003).

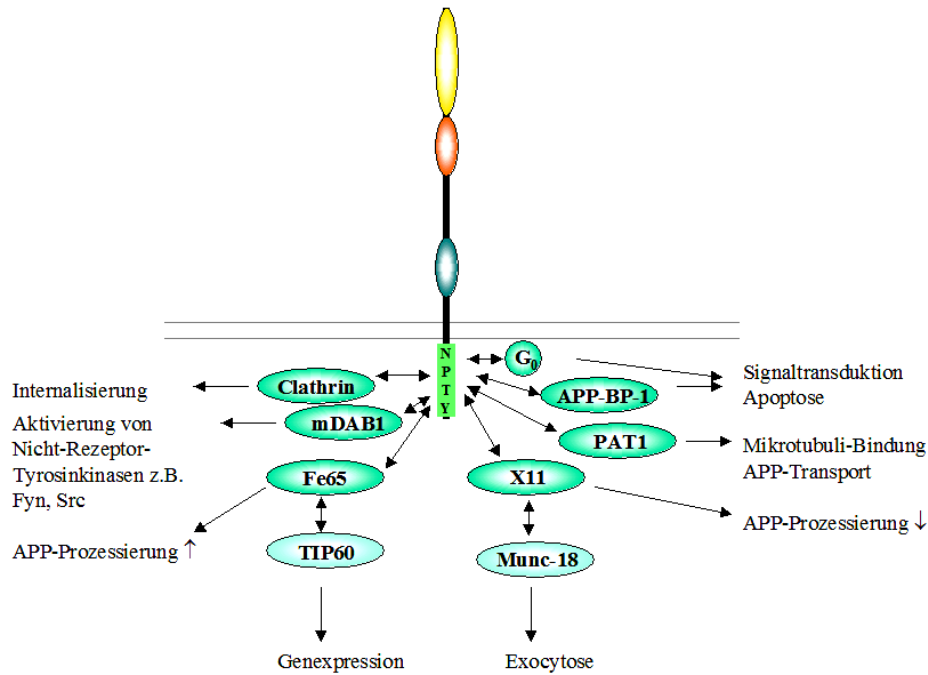


Abbildung 9: Bindungspartner des APP/APLP-C-Terminus

Dargestellt ist ein APP/APLP-Molekül mit den gemeinsamen Domänen (siehe Abbildung 7). In der cytoplasmatischen Domäne ist das konservierte NPTY-Motiv hervorgehoben, da es zahlreiche der dargestellten Interaktionen vermittelt. Pfeile verweisen auf die Konsequenzen dieser Interaktionen bzw. auf sekundäre Bindungspartner.

1.2.3.4 Apoptotische und toxische Eigenschaften des APP

Während dem löslichen APP α und dem ungespaltenen APP zumeist neuroprotektive Eigenschaften zugeordnet werden konnten (siehe 1.2.3.1 und 1.2.3.2), führt A β zu toxischen Effekten. Verschiedene Mechanismen, durch die A β toxische Wirkung vermitteln kann (siehe Abbildung 10), sind mittlerweile beschrieben. Zum Beispiel führt A β zum Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels und nachfolgend zum Zelltod (Joseph und Han, 1992). Zudem kann das Peptid die membrangebundene Na⁺/K⁺-ATPase hemmen, wodurch es erneut zum Anstieg des Calcium-Spiegels und zur Schädigung neuronaler Zellen kommt (Mark et al., 1995). Auch die hoch-affine Cholin-Aufnahme und die davon abhängige Acetylcholin-Freisetzung im Cortex und Hippocampus werden durch A β inhibiert, so dass die Abnahme der cholinergen Funktion, die mit der Alzheimerschen Krankheit korreliert, verstärkt wird (Kar et al., 1998).

Während der tatsächliche Mechanismus, durch den A β zum Zelltod führt, weiter ungeklärt bleibt, häufen sich die Hinweise, dass es sich um eine Zelldegeneration via den apoptotischen Signalweg handelt. Eine Inkubation primärer kortikaler Ratten-Neuronen mit A β führte zur Apoptose-Induktion, die von einer typischen Aktivierung früher Gene der Apoptose wie c-jun, c-fos und junB begleitet war (Estus et al., 1997). Zudem unterbindet das anti-apoptotische Proto-Oncogen bcl-2 den durch A β verursachten oxidativen Schaden (Saille et al., 1999). Des Weiteren kann das Peptid zu einer Aktivierung von Caspasen führen und Caspase-2 und 12-defiziente Neuronen zeigen eine verminderte Anfälligkeit für die A β -Toxizität (Nakagawa et al., 2000; Troy et al., 2000; Takuma et al., 2004).

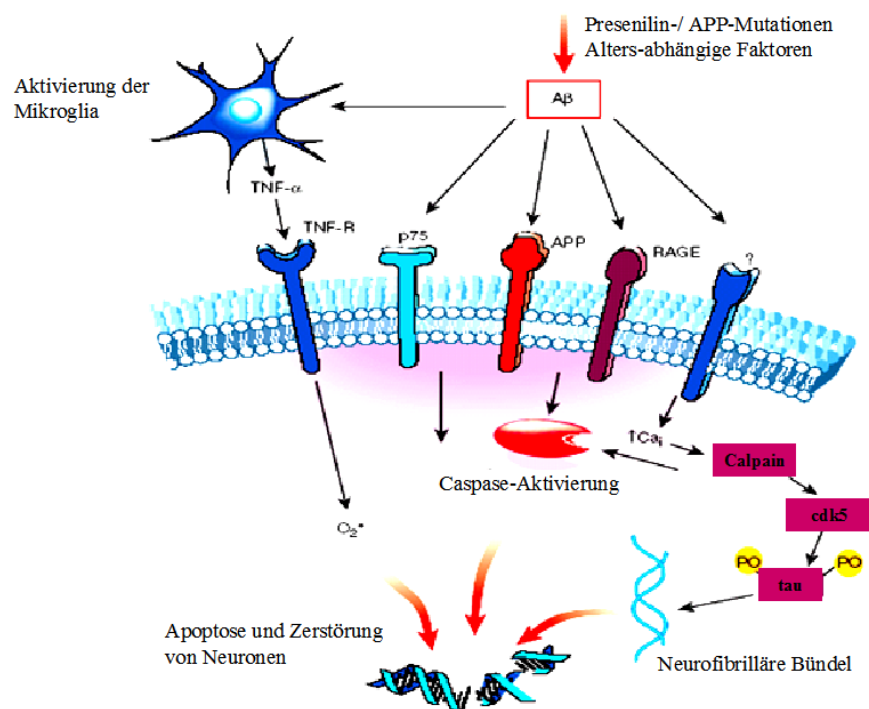


Abbildung 10: Zelluläre Wege der A β -vermittelten Neurotoxizität (verändert nach Yuan und Yankner, 2000)

A β -Aggregate interagieren mit verschiedenen Zelloberflächen-Rezeptoren und mit Mikroglia-Zellen. Dadurch werden Signaltransduktionskaskaden angeschaltet, die die Aktivierung von Caspasen, die Generierung freier Radikale und einen Calcium-Influx zur Folge haben. Der erhöhte Calcium-Spiegel wiederum führt zur Aktivierung von Calpain, das selbst auf Caspasen und die tau-Proteinkinase cdk5 wirkt.

Wenngleich sich in der Proteinsequenz der APLPs kein der A β -Sequenz homologer Bereich befindet (siehe 1.2.1), so ist nicht auszuschließen, dass auch diese Proteine oder bestimmte ihrer Spaltprodukte toxisches Potential und eine Verbindung zur

Alzheimerschen Krankheit besitzen. Zum einen finden sich sowohl APLP1- (Bayer et al., 1997) als auch APLP2-immunoreaktive Plaques in den Gehirnen von Alzheimer Patienten (Crain et al., 1996). Zum anderen ergab sich zumindest für APLP2 eine genetische Verknüpfung zur Demenzerkrankung (Wasco et al., 1993). Auch konnte gezeigt werden, dass fibrilläre Peptide wie das A β oder Abschnitte des Prionenproteins zu einer Akkumulation von rekombinatem APP und APLP2 führen (White et al., 2003), was einen möglichen Mechanismus der Pathogenese in neurodegenerativen Erkrankungen aufzeigt. Zudem sind beide APP-verwandten Proteine ebenso wie das APP potentielle Substrate für Caspasen (Galvan et al., 2002) und damit zwar nicht unbedingt Apoptose-auslösend aber doch zumindest von apoptotischen Vorgängen der Zelle direkt betroffen.

1.3 Das Prionenprotein

Das zelluläre Prionenprotein (PrP) (siehe Abbildung 11) ist zumeist über einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker mit der Plasmamembran verbunden, kann aber auch als topologische Variante durch Insertion der zentralen hydrophoben Domäne in die Membran vorliegen (Hedge et al., 1999). Eine „*octa-repeat*“-Einheit des Proteins enthält Kupfer-bindende Histidin-Reste (Hornshaw et al., 1995).

Die Funktion des PrP ist zwar noch nicht detailliert aufgeklärt und induzierte Knock-Outs blieben ohne prägnanten Phänotyp (Tremblay et al., 1998; Mallucci et al., 2002), aber die Kupfer-bindende Eigenschaft (Brown et al., 1997; White et al., 1999; Brown et al., 1999) könnte zumindest einen ersten Hinweis auf die biologische Funktion des Proteins liefern.

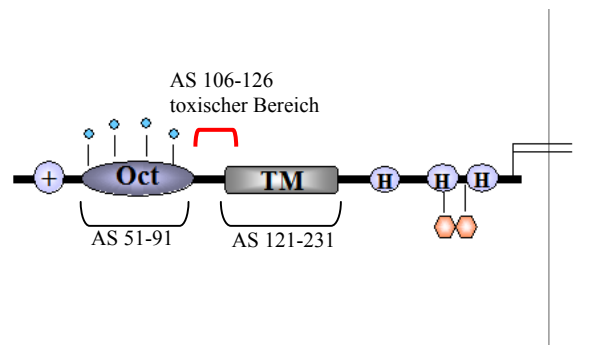


Abbildung 11: Struktur des zellulären Prionenproteins (nach Westaway und Carlson, 2002)

Ein + symbolisiert eine Ansammlung basischer Aminosäuren am N-Terminus. Daran schließt sich die *octa-repeat*-Region (Oct, hochkonserviertes Sequenzmotiv A-G-A-A-A-G-A) an, die kooperativ vier Kupfer-Ionen binden kann. Danach folgt die potentielle Transmembrandomäne (TM) mit einer Stop-Transfer-Effektor-Region. Drei α -helicale Bereiche (H), in denen die Glykosylierungsstellen liegen, schließen sich an. C-terminal wird das PrP durch einen GPI-Anker (||) in der Membran fixiert.

Prionenerkrankungen sind wie die Bildung der senilen Plaques bei Morbus Alzheimer die Konsequenz aus einer veränderten Proteinfaltung. Das endogene, zelluläre Prionenprotein (PrP^C) wird dabei in eine Infektions-assoziierte, proteaseresistente und aggregationsbereite Form (PrP^{Sc}, Sc: Scrapie, Krankheitsform beim Schaf) umgewandelt. Ähnlich wie bei der Alzheimerschen Krankheit existiert auch bei der humanen Prionenerkrankung eine genetisch verankerte Variante (Mutation im PrP-Gen auf Chromosom 20) und eine sporadische, die auf spontanen Faltungsfehlern beruht (Übersichtsartikel: Bueler et al., 1993; Cohen und Prusiner, 1998; Collinge, 2001). Hinweise auf eine veränderte proteolytische Prozessierung als Auslöser der Krankheit wurden durch Untersuchung der Spaltprodukte aus den Gehirnen gesunder und an Creutzfeld-Jakob erkrankter Menschen bzw. in Prionen-infizierten Zellen gefunden (Caughey et al., 1989; Chen et al., 1995; Parchi et al., 1999; Rachidi et al., 2003). Während die normale Spaltung zwischen den Aminosäuren 110/111 (112) erfolgt, scheint die pathologische Spaltung N-terminal verschoben (AS 90/91) stattzufinden. Diese Verschiebung belässt den als toxischen Kern des Proteins identifizierten Bereich (AS 106-126; Chen et al., 1995; Jimenez-Huete et al., 1998) intakt und kann so den Fortschritt oder die Entstehung der Krankheit fördern.

Das physiologisch „normale“ Spaltereignis scheint auf der Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und TACE zu beruhen. Neben der konstitutiven Spaltung des zellulären PrP in HEK 293-Zellen und murinen TSM1-Neuronen, induzierte PMA das Spaltereignis (Vincent et al., 2000). Zudem konnten Zink-Metalloproteinase-Inhibitoren wie BB3103 und TAPI die Entstehung des N-terminalen Spaltfragments reduzieren. Die Überexpression der Proteasen verstärkte die konstitutive bzw. regulierte (TACE) PrP-Prozessierung, während in Fibroblasten aus ADAM10- bzw. TACE-defizienten Mäusen die Spaltung vermindert war (Vincent et al., 2001).

1.4 Das Notch-System: Spaltung und Signaltransduktion

Weitere potentielle Substrate für die Metalloproteinasen ADAM10 und TACE finden sich in der Signaltransduktionskette, die über die Notch-Rezeptoren vermittelt wird und zahlreiche Aspekte der Entwicklung (Differenzierung, Proliferation, Überleben und Apoptose) von sowohl Invertebraten als auch Vertebraten kontrolliert (Greenwald, 1998; Lewis, 1998).

Die Notch-Rezeptoren, von denen mittlerweile vier Homologe in Vertebraten identifiziert sind (Notch-1 bis -4), besitzen extrazellulär ein dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF: *epidermal growth factor*) homologes, repetitives Sequenzmotiv (36 EGF-Motive; siehe Abbildung 12), das die Ligandenbindung vermittelt. An die EGF-Repeats anschließend findet sich eine cysteinreiche LNR-Region (Notch/lin12 repeats), die die ligandenunabhängige Proteolyse des Rezeptors verhindert (Sanchez-Irizarry et al., 2004). Die intrazelluläre Domäne von Notch enthält ein nukleäres Lokalisationssignal (Lieber et al., 1993), 6 Ankyrin-Motive (Interaktionsdomänen z.B. für das Deltex-Protein; Matsuno et al., 1995), eine sogenannte PEST-Region, die häufig in Proteinen mit hoher Umsatzrate zu finden ist, sowie eine Reihe von Polyglutaminen (OPA-Repeat). Die RAM-Domäne vermittelt die Wechselwirkung mit dem cytoplasmatischen Transkriptionsfaktor CSL. Die Bezeichnung CSL setzt sich dabei aus den Initialen der homologen Proteine verschiedener Spezies zusammen: CBF1 in Säugern, *suppressor of hairless* in *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* und Lag-1 in *C. elegans*.

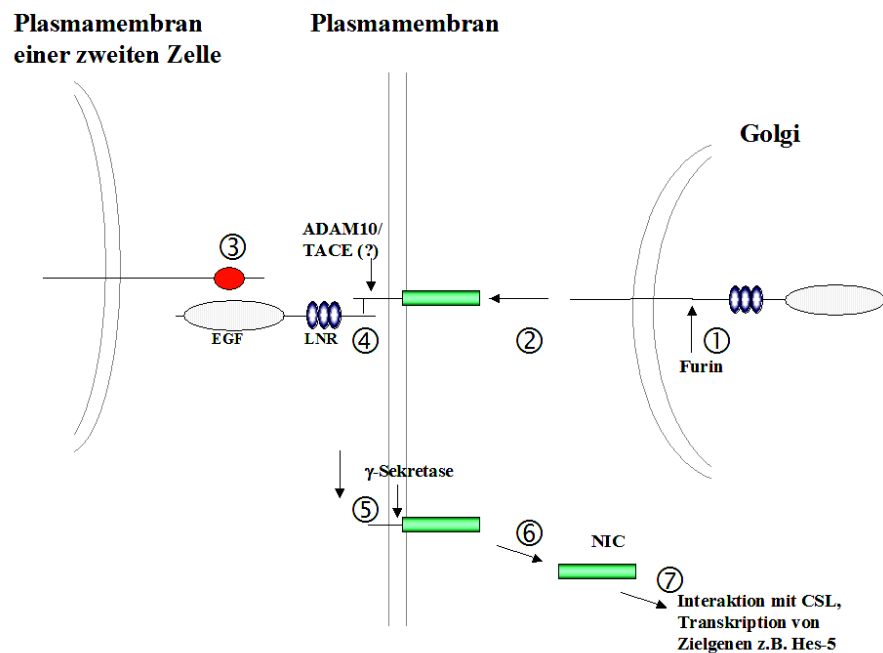


Abbildung 12: Proteolyse des Notch-Rezeptors

Die Notch-Rezeptoren bestehen aus einer N-terminalen EGF-Repeat-Domäne (EGF), einer cysteinreichen LNR-Region (LNR) und mehreren für die Interaktion mit Wechselwirkungspartnern relevanten cytoplasmatischen Domänen im intrazellulären Bereich (NIC). Nach der Synthese wird das Notch-Protein im Golgi-Apparat durch Furin in ein Heterodimer gespalten (1, S1-Spaltung). Nach Translokation an die Zelloberfläche (2) kann die Bindung eines Liganden über dessen DSL-Domäne (hier rot) erfolgen (3). Die Ligandenbindung ermöglicht die S2-Spaltung und führt zur Entfernung der Ektodomäne (4). Dies wiederum ist Voraussetzung für die Spaltung durch die γ -Sekretasen (5, S3-Spaltung), die letztlich die Freisetzung der intrazellulären Domäne NIC bewirkt (6). Nach Translokation in den Kern (7) und Wechselwirkung mit CSL wird die Transkription der Zielgene stimuliert.

Wie auch APP muss das Notch-Protein mehrere konsekutive Proteolysen durchlaufen, bevor es als aktiver Transkriptionsfaktor vorliegt (Artavanis-Tsakonas, 1999) (NIC; siehe Abbildung 12). Eine konstitutive Furin-Spaltung führt zur Präsentation reifer, heterodimerer Notch-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Blau Müller et al., 1997). Als Antwort auf die Bindung eines Liganden (Jagged-1 und -2 sowie Delta-1 bis -4 in Vertebraten) findet eine weitere als S2-Spaltung beschriebene Proteolyse nahe der Transmembrandomäne statt. Hierbei sind sowohl ADAM10 als auch TACE Kandidaten für die relevante Protease.

Für das *Drosophila*-Ortholog von ADAM10 (KUZ) konnte eine genetische Verknüpfung zwischen der Protease und dem Notch-Signalweg gezeigt werden (Rooke et al., 1998; Pan und Rubin, 1997). Auch zeigen Knock-Out-Mäuse, denen

Einleitung

ADAM10 fehlt, einen ähnlichen Phänotyp wie Notch-defiziente Tiere. Allerdings ist auch eine proteolytische Prozessierung des Notch-Liganden Delta durch ADAM10 denkbar. Qi und Mitarbeitern gelang der Nachweis, dass eine dominant negative *Drosophila*-Mutante für ADAM10 durch eine erhöhte Kopienzahl des Delta-Gens kompensiert werden konnte. Zudem erhöhte eine Überexpression der Protease die Freisetzung der Ektodomäne von Delta in das Kulturmedium transfizierter Zellen, während die dominant negative KUZ-Mutante (KUZDN) die Sekretion minderte. Unter gleichen Versuchsbedingungen zeigten weder KUZ noch KUZDN eine analoge Beeinflussung der proteolytischen Prozessierung von Notch (Qi et al., 1999). Die lösliche Form von Delta scheint antagonistische Auswirkung auf die Notch-Aktivität zu besitzen, da nur immobilisierte Delta-1-Ektodomänen zur Induktion von Notch-Aktivität führen, während nicht-immobilisierte extrazelluläre Domänen des Liganden eine Unterbindung der Funktion von Notch bewirken (Varnum-Finney et al., 2000).

Ein zweiter vielversprechender Kandidat für die ligandeninduzierte extrazelluläre Proteolyse von Notch ist TACE. Gereinigtes TACE spaltet Notch-1 der Maus an der *in vivo*-Spaltstelle (Brou et al., 2000), 13 Reste vor der Transmembranregion (Mumm et al., 2000; Schroeter et al., 1998). Zudem konnten TACE^{-/-}-Monozytenvorläuferzellen aus dem Knochenmark durch Transfektion mit TACE-cDNA rekonstituiert werden, so dass eine Differenzierung zu Makrophagen unterblieb (Brou et al., 2000). Problematisch ist die Beobachtung, dass TACE^{-/-}-Mäuse später sterben als Notch-1^{-/-}-Tiere (Brou et al., 2000). Es ist möglich, dass hier eine funktionale Redundanz greift, bei der ADAM10 oder eine andere Protease die proteolytische Prozessierung übernimmt.

Die Metalloproteinase-vermittelte S2-Spaltung von Notch ermöglicht nachfolgend eine weitere Spaltung in der Transmembrandomäne, die von Presenilinen abhängig ist, und den intrazellulären Bereich des Notch-Rezeptors (NIC) in das Cytoplasma entlässt (DeStrooper et al., 1999; Struhl und Greenwald, 2001).

Funktionell aktives NIC transloziert in den Zellkern und interagiert über die RAM-Domäne mit der Familie der CBF1-SuH-Lag1 (CSL)-Familie von Transkriptionsfaktoren (z.B. Tamura et al., 1995). Dies führt zu Aktivierung von

Genen, die die Antwortfähigkeit der Zelle auf verschiedene proliferative, differenzierende oder apoptotische Signale beeinflussen (Artavanis-Tsakonas, 1999; Sweeney et al., 2004). Ein Beispiel für ein solches Zielgen ist der Transkriptionsfaktor HES-5 (*hairy enhancer of split*) (Jarriault et al., 1995; Honjo, 1996). Des Weiteren sind heute zahlreiche Interaktionspartner des Notch-C-Terminus bekannt, die die Signaltransduktion modifizieren können. Beispiele hierfür sind die cytosolischen Adapter-Proteine Numb und Nbl („*numb-like*“), die als Inhibitoren des Signalweges fungieren (Dho et al., 1999; Zhong et al., 1997; Verdi et al., 1999).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob die α -Sekretasen ADAM10 und TACE die proteolytische Prozessierung des APP-verwandten Proteins APLP2 bewirken. Dazu wurden verschiedene Ansätze gewählt:

Zunächst sollte der Einsatz von Aktivatoren wie PMA und von Hydroxamsäure-Inhibitoren die Beteiligung der Metzincin-Familie, zu denen ADAM10 und TACE gehören, an der Prozessierung des APLP2 bestätigen. Da vorangegangene Versuche anderer Arbeitsgruppen oftmals an transfizierten Zellen durchgeführt wurden, sollte hier hauptsächlich die proteolytische Prozessierung des endogenen humanen APLP2 mit einem physiologischeren Substrat-Protease-Verhältnis untersucht werden. Zudem sollte die Untersuchung sowohl in peripheren (HEK 293) als auch neuronalen Zellen (SKNMC) durchgeführt werden, um mögliche Einflüsse des zellulären Hintergrundes zu prüfen.

Durch Überexpression beider ADAMs in HEK 293-Zellen sollte die Beteiligung der α -Sekretasen an der Spaltung des APLP2 verifiziert werden. Der Einsatz einer dominant negativen ADAM10-Mutante sollte die Befunde bekräftigen. Anhand der *in vitro*-Proteolyse eines APLP2-Peptids mit den rekombinanten Proteasen ADAM10 und TACE sollte das Spaltereignis mit definierten Bedingungen nachvollzogen werden. Mögliche Spaltfragmente sollten durch Aufreinigung näher charakterisiert werden.

Erst die Überprüfung eines Prozessierungsprozesses *in vivo* kann ein *in vitro* oder in der Zellkultur beobachtetes Spaltereignis als physiologisch relevante Reaktion bestätigen. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, die Proteolyseprodukte des endogenen APLP2 in transgenen Mäusen mit neuronaler Überexpression von ADAM10 bzw. einer dominant negativen ADAM10-Mutante zu analysieren.

Eine auf die Aktivität der α -Sekretasen gerichtete Therapie der Alzheimerschen Krankheit könnte auch die Prozessierung weiterer Substrate verstärken und dadurch unerwünschte Effekte erzielen. Ein besonders zu beachtendes Molekül ist dabei das Notch-Protein, das durch seine Spaltung intrazelluläre Aktivitäten entfaltet und konstitutiv aktiviert zu kanzerogener Transformation führen kann. Daher sollten in

dieser Arbeit begleitende Untersuchungen zur Spaltung des Notch-1 durch ADAM10 und TACE durchgeführt werden.

Auch das Prionenprotein (PrP) ist ein Kandidat für die Spaltung durch ADAM10 und TACE, wie vorangegangene Versuche in Zellkulturexperimenten zeigten. Anhand eines die Spaltsequenz umfassenden Prionenprotein-Peptids sollte die Spaltung *in vitro* untersucht werden. Analysen des C-terminalen Spaltproduktes aus ADAM10-transgenen Mäusen sollten die Versuche abrunden.

Da es inzwischen für eine stetig wachsende Zahl von Substraten Hinweise für eine Spaltung durch die α -Sekretasen ADAM10 und TACE gibt, ist es umso wichtiger zu verstehen, wie die einzelnen Spaltereignisse koordiniert werden. Besonders Ereignisse, die eine Umorganisation der Plasmamembran bzw. eine veränderte Sezernierung löslicher Faktoren erfordern, könnten Anhaltspunkte für die Koordination von Substraten und Proteasen liefern. In dieser Arbeit wurden zwei solche „Zellschicksale“ ausgewählt: Zum einen sollte die Regulation der APLP2-Prozessierung in Retinsäure-differenzierten Neuroblastoma-Zellen analysiert werden. Zum anderen sollte der Einfluss Apoptose-induzierender Substanzen in bezug auf die Sekretion des löslichen APLP2 untersucht werden. Da apoptotische Vorgänge mit der neuronalen Degeneration während der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht werden, ist es von besonderem Interesse zu verstehen, inwieweit während des programmierten Zelltods die katalytische Aktivität der α -Sekretasen beeinträchtigt wird bzw. eine Beeinträchtigung selbst dazu beitragen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Adresse
0,2 ml Thermo-Strip	ABgene	Surrey (UK)
AbiPrism7000	AppliedBiosystems	Bedford MA (USA)
Bio-Imaging Analyzer BAS-1800	Raytest Isotopenmeßgeräte	Straubenhardt
Blot-Apparatur	Biometra	Göttingen
CCD-Kamera	Raytest Isotopenmessgeräte	Straubenhardt
Cryoröhrchen	Greiner bio-one	Frickenhausen
DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer	Norwalk, CT (USA)
Doppelstrahlphotometer Hitachi U-200Colora	Meßtechnik GmbH	Lorch
Elektrophoreseapparaturen: Flachbettgelapparatur für DNA	Eigenbau	
Eppendorf-Gefäße	Sarstedt	Nümbrecht
FluoStarOptima	BMG Labtechnologies	Durham, NC (USA)
Glaspotter (Homogenisatoren)	GLW	Würzburg
Heizblock	Fisher Bioblock Scientific	Illkirch Cedex (F)
HPLC: L-4250UV-Vis Detector L-6220 Intelligent Pump +Mixer D-2500A ChromatoIntegrator	Merck-Hitachi	Tokyo (Japan)
Hyperfilm-βmax	Amersham Life Science	Braunschweig
Inkubationsschüttler MULTITRON	Infors GmbH	Einsbach
Lumineszenzmessplatten Lumitrac (96-Loch-Platte)	Greiner bio-one	Frickenhausen
Mikroskop	Carl Zeiss AG	Oberkochen
Mikrowelle	Panasonic	Hamburg
Minigel-Elektrophorese	Biometra	Göttingen
Netzgeräte für Gelelektrophorese	Biometra	Göttingen
Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH	Fernwald
Pipetten	Eppendorf AG Gilson	Hamburg Middleton, WI (USA)
Polystyrolküvetten	Sarstedt	Nümbrecht
PVDF-Membran	Millipore	Eschborn
Schüttelmixer	Laborfachhandel	
Sterilwerkbank	Nunc	Wiesbaden
ThermoFast 96 Detection Plate	ABgene	Surrey (UK)

Gerät	Hersteller	Adresse
Tischzentrifuge: Eppendorf 5415C	Eppendorf	Hamburg
Transilluminator 4000	Stratagene	Heidelberg
Ultra Clear Cap Strips	ABgene	Surrey (UK)
Ultraschallgerät (Branson Sonifier)	Heinemann	Schwäbisch-Gmünd
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman	München
VersaDoc Imaging System Model 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Versiegelungsfolie für 96-Loch-Platten	ABgene	Surrey (UK)
Wasserbad	B. Braun	Melsungen
Zellkulturbrutschrank	Heraeus	Hanau
Zellkulturmaterialien	Sarstedt Greiner bio-one	Nümbrecht Frickenhausen

Tabelle 1: Verwendete Geräte

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Adresse
Allgemeine Laborchemikalien	Roth Merck Sigma	Karlsruhe Darmstadt Deisenhofen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma	Deisenhofen
ATP	Pharmacia	Freiburg
Bacto-Trypton	Difco Laboratories	Detroit (USA)
Brij35, Protein Grade Detergent	Calbiochem	San Diego, CA (USA)
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth	Karlsruhe
BSA (bovines Serumalbumin, fettsäurefrei)	Roth	Karlsruhe
Camptothecin	Alexis Biochemicals	Grünberg
CAPE	Alexis Biochemicals	Grünberg
CDPStar	Applied Biosystems	Bedford, MA (USA)
DMEM (hoher Glukosegehalt)	Sigma PAA	Deisenhofen Cölbe
dNTPs	NEB	Frankfurt am Main
Doxorubicin	Alexis Biochemicals	Grünberg
Entwickler für ECL-Hyperfilm	Eastman Kodak Company	Rochester, NY (USA)
Fixierer für ECL-Hyperfilm	Eastman Kodak Company	Rochester, NY (USA)
Fötales Kälberserum	PAA	Cölbe
Fötales Kälberserum „GOLD“	PAA	Cölbe
Geneticin (G418)	PAA	Cölbe
Glutamin	PAA	Cölbe
Ham`s F12Medium	Sigma	Deisenhofen

Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller	Adresse
HygromycinB	Calbiochem	San Diego, CA (USA)
I-Block	Tropix	Bedford, MA (USA)
Lipofectamine2000	Invitrogen	Paisley (UK)
Milchpulver	Roth	Karlsruhe
Minimum Essentiell Medium (MEM)	Sigma	Deisenhofen
Natriumpyruvat-Lösung	PAA	Cölbe
OptiMem	Invitrogen	Paisley (UK)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA	Cölbe
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Calbiochem	Deisenhofen San Diego, CA (USA)
Poly-L-Lysin	Sigma	Deisenhofen
Ponceau S Lösung	Sigma	Deisenhofen
Retinsäure	Sigma	Deisenhofen
RotiQuant	Roth	Karlsruhe
Rotiphenol	Roth	Karlsruhe
SerumPlusMedium Supplement	JRH Biosciences	Lenexa, KS (USA)
TEMED	Sigma	Deisenhofen
Trifast	Peqlab	Erlangen
Trypsin EDTA	PAA	Cölbe

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

2.1.3 Kitsysteme

Caspase-3/7 Glo Test	Promega, Madison, WI (USA)
Dual-Luciferase Reporter Test	Promega, Madison, WI (USA)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab, Erlangen
QIAquick Spin Miniprep Kit,	
QIAquick Gel Extraction Kit,	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transkriptase	NEB, Frankfurt am Main
RnEasyKit	Qiagen GmbH, Hilden
SYBrGreenQuantiTec	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.4 Fertig-Gelsysteme

NuPAGE 4-12% BisTris (10 und 15 Taschen)
NuPAGE Mes SDS Laufpuffer
NuPAGE Transfer Buffer

NuPAGE-LDS-Auftragspuffer

XcellSureLock Mini-Cell

Invitrogen, Paisley (UK)

2.1.5 Inhibitoren, Enzyme und Peptidsubstrate

2.1.5.1 Inhibitoren

Complete Mini Protease-Inhibitoren-Cocktail

Roche, Mannheim

β -Sekretase-Inhibitor II

Calbiochem, San Diego, CA

(N-Benzoyloxycarbonyl-val-leu-leu-leucinal)Z-VLL-CHO)

(USA)

Galardin (GM6001)

Calbiochem, San Diego, CA

(USA)

Galardin-Negativkontrolle (GM6001NK)

Calbiochem, San Diego, CA

(USA)

GI254023X

Dr. I. Hussain, Glaxo SmithKline,

Harlow (UK)

GW280264X

Dr. I. Hussain, Glaxo SmithKline,

Harlow (UK)

DAPT

B. Schmitt, Darmstadt

Ro 31-9790

Hoffman-La Roche AG, Basel

(Schweiz)

BB3103

British Biotech, Oxford (UK)

2.1.5.2 Enzyme

Enzyme für molekulargenetisches Arbeiten

NEB, Bad Schwalbach

Amersham, Braunschweig

Gibco BRL, Eggenstein

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Rekombinantes humanes TACE

R&D Systems, Minneapolis, MN

(AS 215-671 mit 10fachem His-Tag)

(USA)

Rekombinantes humanes ADAM10

R&D Systems, Minneapolis, MN

(AS 214-672 mit 10fachem His-Tag)

(USA)

PNGaseF

NEB, Frankfurt am Main

Material und Methoden

2.1.5.3 Peptidsubstrate

Die Peptidsubstrate für die Analyse der *in vitro*-Spaltung durch rekombinantes ADAM10 und 17 wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Grzonka am Institut für Chemie, Universität von Gdansk (Polen) hergestellt. Die Peptide wiesen eine Reinheit von >95% (HPLC) auf, waren N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert:

hAPLP2 H₂N-EERESVGPLREDFSLSSS-CONH₂
 mNotch1 H₂N-YKIEAVKSEPVEPPLPSQ-CONH₂
 hNotch1 H₂N-YKIEAVQSETVEPPPPAQ-CONH₂
 hPrP H₂N-SKPKTNMKHMAGAAAAG-CONH₂

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Epitop	Verdünnung	Hersteller
12F10	Anti-PrP AS 140-160 Maus-IgG (monoklonal)	1/100	W. Bodemer, Deutsches Primatenzentrum Göttingen
192Wt	Anti-APPsβ Kaninchen IgG (polyklonal)	1/1000	S. Sinha, Elan Pharmaceuticals, SF (USA)
3B5	Anti-PrP Octarepeat Maus-IgG (monoklonal)	1/100	W. Bodemer, Deutsches Primatenzentrum Göttingen
6687	anti-APP-Kaninchen-IgG (polyklonal)	1/500	Prof. C. Haass, LM-Universität München
6E10	anti-APP Maus-IgG (monoklonal)	1/1000	Senetek, St. Louis (USA)
6H4	Anti-PrP AS 140-160 Maus-IgG (monoklonal)	1/2000	Prionics AG, Schlieren (Schweiz)
8G8	Anti-PrP AS 105-112 Maus-IgG (monoklonal)	1/100-150	W. Bodemer, Deutsches Primatenzentrum Göttingen
9E10	anti-myc Maus-IgG (monoklonal)	unverdünnt	Hybridomakulturmedium der Zelllinie MYC 1-9E10.2 (ATCC)
Anti-Actin	Anti-Actin Kaninchen IgG (polyklonal)	1/1000	Sigma, Deisenhofen
Anti-ADAM10	Anti-ADAM10-C-Terminus-Kaninchen-IgG (polyklonal)	1/1000	Chemicon, Temecula CA (USA)
Anti-ADAM17	Anti-ADAM10-C-Terminus-Kaninchen-IgG (polyklonal)	1/1000	Chemicon, Temecula CA (USA)
CT12	anti-β-Amyloid Precursor-Like Protein 2 C-Terminus Kaninchen-IgG (polyklonal)	1/1500-2000	Calbiochem, San Diego CA (USA)

Bezeichnung	Epitop	Verdünnung	Hersteller
D2II	anti-β-Amyloid Precursor-Like Protein 2-Kaninchen-IgG (polyklonal)	1/1500-2000	Calbiochem, San Diego CA (USA)
M2	anti-FLAG Maus-IgG (monoklonal)	1/300	Eastman Kodak, New Haven (USA)
Y-11	anti-HA Kaninchen-IgG (polyklonal)	1/1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tabelle 3: Verwendte Primärantikörper

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-Maus IgG aus Ziege	Tropix, Bedford, MA (USA)
Alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-Kaninchen IgG aus Ziege	Tropix, Bedford, MA (USA)
Peroxidase-gekoppelter anti-Maus IgG aus Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen IgG aus Ziege	Sigma, Deisenhofen
³⁵ S-anti-Kaninchen	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)
³⁵ S-anti-Maus	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)

Tabelle 4: Verwendte Sekundärantikörper

2.1.7 Häufig verwendete Puffer, Stammlösungen und Kulturmedien

Antibiotika-Stocklösungen: 100 mg/ml Ampicillin
25 mg/ ml Kanamycin
Lagerung bei -20°C

In vitro-Test-Puffer
für die Proteolyse von Peptiden: 25 mM Tris-HCl pH 9
2,5 μM ZnCl₂
0,005% Brij35

BBS: 50 mM BES
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
pH 6,95 exakt einstellen, sterilfiltrieren
bei +4°C lagern

Blocking-Puffer:
I-Block: 1xPBS
0,2% I-Block, Tropix (w/v)
0,1 % Tween20 (w/v)

Material und Methoden

Milchpulverpuffer:	1xTBS 7% Milchpulver 0,05% Tween20 (w/v)
CaCl ₂ :	1 M, sterilfiltriert
DNA-Probenauftragspuffer:	50% (v/v) Glycerin 0,2% (v/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 10 mM EDTA
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml EtBr lichtgeschützt bei 4°C lagern
Glycerin für Transfektion:	10% Glycerin in PBS (v/v)
Homogenisierungs-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 8,5 Proteaseinhibitorcocktail (1 Tablette/ 7 ml)
HygromycinB:	0,1 g/ ml
Laufpuffer für Gelelektrophorese: SDS-PAGEs:	25 mM Tris 192 mM Glycerin 0,1% SDS (w/v)
Nu-PAGEs:	MES-Puffer
LB-Medium (für 400 ml Flüssigkultur):	4 g NaCl 4 g Trypton 2 g Hefeextrakt (6 g Bactoagar als Zusatz bei Medium für festen Nährboden)
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
Medium für Proteinfällung:	DMEM/MEM/Ham`s F12 10 µg/ml BSA (fettsäurefrei) 2 mM Glutamin

Transfektions-Medium:	2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 10% Serum Plus in MEM bzw. OPTIMEM	
PBS:	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4	
PCI:	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v)	
Proteinauftragspuffer: Lämmli-Puffer:	3% (w/v) SDS 100 mM DTT 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 20% (w/v) Glycerin 0,01% (w/v) Bromphenolblau	
Nu-PAGE-Puffer:	50% Nu-PAGE-Puffer (4x) 100 mM DTT	
Proteingrößenstandard:	"SeeBlue <i>Pre-Stained Standard</i> " (Invitrogen, Paisley (UK))	
	Tris-Glycin	Nu-PAGE-MES
Myosin	250 kDa	188 kDa
PhosphorylaseB	148 kDa	98 kDa
BSA	98 kDa	62 kDa
Glutamat-Dehydrogenase	64 kDa	49 kDa
Alkohol-Dehydrogenase	50 kDa	38 kDa
Carbonyl-Anhydrase	36 kDa	28 kDa
Myoglobin	30 kDa	17 kDa
Lysozym	16 kDa	14 kDa
Aprotinin	6 kDa	6 kDa
Insulin, β-Kette	4 kDa	3 kDa
RNaseA-Lösung:	10 mg/ml in 100 mM Natriumacetat pH 5,2 DNasen durch 10-minütige Inkubation bei 100°C irreversibel denaturiert	
RNA-Größenstandard:	RNA Ladder, High Range (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200 bp	

Material und Methoden

SDS-Polyacrylamidgel (diskontinuierlich):

Gel	Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung	Puffer	H ₂ O	SDS (10%)	APS (10%)	Temed
7,5%	2,50 ml	1,25 ml 3M Tris-HCl pH 8,8	6,10 ml	0,1 ml	50 µl	5 µl
14%	4,67 ml	1,25 ml 3M Tris-HCl pH 8,8	3,93 ml	0,1 ml	50 µl	5 µl
Sammelgel (5%)	1,7 ml	1,25 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,7	6,80 ml	0,1 ml	100 µl	5 µl

STET-Puffer:

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

TAE-Puffer:

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA
pH 8,4

TBS:

20 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA

Towbin-Puffer (modifiziert):

25 mM Tris pH 8,3
192 mM Glycin
20% (v/v) Methanol
0,05% (w/v) SDS

Trypsin/EDTA-Lösung:

0,05% (w/v) Trypsin
0,54 mM EDTA
in PBS

Zellkulturmedium:

DMEM/ Ham`s F12/ MEM
2 mM Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 mg/ml Streptomycin
10% (v/v) (FCS)
1% Natrium-Pyruvat
(für SKNMC-/ U373-Zellen)
1% nicht-essentielle
Aminosäuren (für U373-Zellen)

2.1.8 Plasmide und Oligonukleotide

Plasmidkarten der kommerziell erhältlichen Vektoren finden sich im Anhang (7.4).

2.1.8.1 Plasmide

pcDNA3

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

pIRESHyg

der Firma BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA). pIRESHyg enthält die interne ribosomale Eintrittsseite (IRES) des Encephalomyocarditis-Virus, die die gemeinsame Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA erlaubt. Dadurch enthalten nach Selektion mit HygromycinB nahezu alle überlebenden Klone das transfizierte Zielgen. Die Expressionskassette des Vektors enthält den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, ein synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA, ein HygromycinB Phosphotransferase-Gen und ein Polyadenylierungssignal.

pEGFP-N3

der Firma BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA). Der Vektor enthält die cDNA einer rot-verschobenen Variante des Wildtyp GFP mit Anpassung an die humane Codon-Verwendung unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Zur Selektion in Pro- und Eukaryonten ist ein Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen eingefügt. Bei Insertion eines Fremd-Gens in die Klonierungsstelle des Vektors wird ein Fusionsprotein mit C-terminal angefügtem EGFP gebildet.

phRLSV40

von Promega (Madison, WI (USA)). Die phRL-Vektoren enthalten eine synthetische Renilla Gensequenz, die eine effiziente Expression in Säugerzellen gewährleistet. Das Gen steht unter der Kontrolle des SV40-Promotors.

pcDNA3-ADAM10-HA

Der Vektor (R. Postina, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) enthält die bovine cDNA für ADAM10 und wurde im 3`Bereich um die Sequenz für das Hämagglutinin-Epitop erweitert.

pcDNA3-ADAM10DN-HA

Der Vektor (R. Postina, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) enthält die bovine cDNA für ADAM10 mit der Punkt-Mutation E384A in der Zink-bindenden Region des ADAM10. Diese Mutation ist als dominant negative Form in *D. melanogaster* (Pan und Rubin, 1997) und in HEK 293 Zellen (Lammich et al., 1999) beschrieben. Die cDNA wurde im 3`Bereich um die Sequenz für das Hämagglutinin-Epitop erweitert.

pcDNA3-TACE-HA

Der Vektor (R. Postina, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) enthält die murine cDNA für ADAM17 und wurde im 3`Bereich um die Sequenz für das Hämagglutinin-Epitop erweitert.

pCB6-APLP2-763

Der Vektor (hergestellt durch G. Thinakaran, erhalten durch U. Müller, MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main) enthält die murine cDNA für APLP2, die in der 3`Region um die Sequenz für das Myc-Epitop erweitert wurde.

pIRESHyg-APLP2-763

Vor die murine cDNA für APLP2 (Isoform 763) in dem Vektor pCB6-APLP2-763 wurde durch Restriktionshydrolyse mit *KpnI* ein Oligonukleotid-Adapter (APLP2, siehe 2.1.8.2) inseriert. Dieser enthält eine *BamHI*-Schnittstelle.

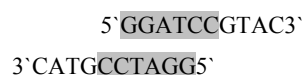


Abbildung 13: Oligonukleotid-Adapter zur Insertion einer *BamHI*-Schnittstelle in pCB6-APLP2-763

Grau unterlegt ist die inserierte *BamHI*-Schnittstelle, die 3`-Überhänge geben einen *KpnI*-Überhang wieder. Dieser wurde mit dem *KpnI* geschnittenen, linearisierten Vektor pCB6-APLP2-763 ligiert. Der Adapter wurde durch Dimerisierung des Oligonukleotids APLP2 (100 pmol/μl in Wasser) nach 5 min bei 95°C und nachfolgendem langsamen Abkühlen im Wasserbad gewonnen.

E. coli wurden mit dem ligierten Vektor transformiert und die APLP2-cDNA durch Inkubation der isolierten Plasmid-DNA mit den Enzymen *Xba*I und *Bst*XI ausgeschnitten. Die einzelsträngigen Überhänge wurden durch T4-DNA-Polymerase-Behandlung aufgefüllt. Der Zielvektor pIRESHyg wurde mit *Bst*XI und *Bam*HI geschnitten und die Überhänge ebenfalls mit T4-DNA-Polymerase behandelt. So konnte die isolierte cDNA in pIRESHyg eingefügt und *E. coli* transformiert werden. Durch Behandlung mit Restriktionsenzymen und Sequenzierung mit dem Oligonukleotid IRES_for (Genterprise, Mainz) wurde die aus den Klonen gewonnene Plasmid-DNA überprüft.

pCS2+FL6MT

pCS2+Vektor (R. Kopan, Dep. of Molecular Biology and Pharmacology and Dep. of Medicine, Washington University, St. Louis, MO (USA)) mit Insertion der murinen cDNA für Notch-1. Im 3`Bereich ist die Sequenz um ein Hexa-Myc-Epitop ergänzt.

pCS2+LNGCC>>SS

pCS2+Vektor (R. Kopan, Dep. Of Molecular Biology and Pharmacology and Dep. Of Medicine, Washington University, St. Louis, MO (USA)) mit Insertion der murinen cDNA für Notch-1 mit Deletion der EGFP-Repeat-Region und Punktmutationen (C1675S und C1682S). Die Punktmutationen sind als aktivierend beschrieben in *Drosophila melanogaster* (Lieber et al., 1993) und erzeugen somit ein Notch, das unabhängig von einer Ligandenbindung prozessiert wird. Im 3`Bereich ist die Sequenz um ein Hexa-Myc-Epitop ergänzt.

pHACS1-NIC

Der Vektor wurde freundlicherweise von Dr. M. Dichgans (Abteilung für Neurologie, Klinikum Großhadern, München) zur Verfügung gestellt. Er enthält die codierende Sequenz für die intrazelluläre Domäne des murinen Notch-1 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

RBPJ κ -Luc

Der Vektor wurde freundlicherweise von Dr. M. Dichgans (Abteilung für Neurologie, Klinikum Großhadern, München) zur Verfügung gestellt. Er enthält das Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines hexameren Bindungselements (RBPJ κ) für die freigesetzte intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors.

pTAL-Luc

von BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA). Der Vektor gehört zum Mercury Pathway Profiling System und dient als Negativ-Kontrolle für den Vektor pTAL-NF κ B-Luc.

pTAL-NF κ B-Luc

von BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA). Der Vektor gehört zum Mercury Pathway Profiling System und erlaubt den Nachweis einer NF κ B-Aktivierung *in vivo*. Der Vektor beinhaltet die *Firefly*-Luciferase (*Photinus pyralis*) unter der Kontrolle eines TATA-ähnlichen Promotors (*Herpes simplex* Thymidin-Kinase), der mit mehreren Kopien der NF κ B-Konsensus-Sequenz fusioniert ist. Ein synthetischer Transkriptionsblocker vor dieser Konsensus-Sequenz minimiert die nicht-spezifisch aktivierte Transkription.

Bei Bindung des endogenen NF κ B-Proteins an das κ -Enhancer-Element (κ B4) in transient transfizierten Zellen wird die Transkription der Luciferase induziert und kann anhand der beim Luciferin-Umsatz freigesetzten Photonen analysiert werden (siehe 2.3.7.2.1).

pTAL-EGFP

Modifikation des pTAL-Luc-Vektors, bei der die cDNA der Luciferase gegen die codierende Sequenz des EGFP ausgetauscht wurde. Die Luciferase-cDNA wurde durch Hydrolyse mit *Hind*III und *Xba*I aus dem Vektor pTAL-Luc deletiert und die EGFP-cDNA, die mit den selben Restriktionsenzymen aus pEGFP-N3 gewonnen wurde, eingefügt. Chemisch kompetente *E. coli* wurde mit dem ligierten Plasmid transformiert. Die aus den Klonen isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionshydrolyse kontrolliert.

pTAL-NFκB-EGFP

Modifikation des pNFκB-Luc-Vektors, bei der die cDNA der Luciferase gegen die codierende Sequenz des EGFP wie für pTAL-EGFP beschrieben ausgetauscht wurde.

2.1.8.2 Oligonukleotide

Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung aufgeführt. Nukleotide, die sich von der Originalsequenz unterscheiden, sind fett gedruckt. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die über Adapter eingeführt wurden, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Die Oligonukleotide wurden von ARK Scientific, Darmstadt oder Qiagen, Hilden bezogen. Die Oligonukleotide wurden entschützt und entsalzt geliefert und nicht weiter aufbereitet. Angegebene Schmelztemperaturen (TM) geben die Schmelztemperatur des hybridisierenden Bereiches an.

Die Schmelztemperatur wurde wie folgt berechnet:

$$T_m = (69,3 + 0,41 * GC \text{ in } \%) - (650 / \text{Länge des Oligonukleotids})$$

Oligonukleotide, die für die RealTime-RT-PCR verwendet wurden

Name	Sequenz	Lokalisation	Länge	GC in %	Tm
Hes5RT_for	5'GAAAAACCGACTGCGGAAGCC 3'	humanes und murines Hes-5	21	57	61,8
Hes5RT_rev	5'ACGGCCATCTCCAGGATGTC 3'	humanes und murines Hes-5	20	60	61,4
GAPDH_for	5'GAAGGGCTCATGACCACAGTCCAT 3'	humane und murine GAPDH	24	54	64,4
GAPDH_rev	5'TCATTGTCGTACCAGGAAATGAGCTT 3'	humane und murine GAPDH	26	42	61,6
mAPLP2_RT_for	5'CTCAGCGGATGATAATGAGCAC3'	murines APLP2	22	50	60,3
mAPLP2_RT_rev	5'GGTCTTGCTTGAAGTTCTGC3'	murines APLP2	22	50	60,3
hAD10ReTi_for	5'CTGGCCAACCTATTTGTGGAA 3'	humanes und bovines ADAM10	21	48	57,9
hAD10ReTi_rev	5'GACCTTGACTTGGACTGCACTG3'	humanes und bovines ADAM10	22	55	62,1

Material und Methoden

Name	Sequenz	Lokalisation	Länge	GC in %	Tm
hBACEReTi_for	5'GTTATCATGGAGGGCTTCTACGTT3'	humanes BACE-1	24	59	46,0
hBACEReTi_rev	5'GCTGCCGTCCTGAACTCATC3'	humanes BACE-1	20	59	60,0
hAPP695ReTi_for	5'GGAGAGGATGGATGTTTGCGA3'	humanes APP695	21	52	59,8
hAPP695ReTi_rev	5'GCAACATGCCGTAGTCATGCA3'	humanes APP695	21	52	59,8
Prp_RT_for	5'TTCAACCGAGCTGAAGCATTTC3'	murines PrP	21	48	58
Prp_RT_rev	5'AGGCCGACATCAGTCCACATA3'	murines PrP	21	52	60

Tabelle 5: Oligonukleotide für die RealTime RT-PCR

Oligonukleotide, die zur Klonierung verwendet wurden

Name	Sequenz	Lokalisation	Länge	GC in %	Tm
APLP2	5' <u>GGA TCC</u> GTA C 3'	das Oligonukleotiddimer beinhaltet eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle und einen 3'- <i>Kpn</i> I-Überhang	10	60	28,9

Tabelle 6: Oligonukleotide für die Klonierung

2.1.9 Versuchstiere, Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.9.1 Versuchstiere

Zucht und Haltung

Alle Verpaarungen und Sektionen wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Richtlinien zur Versuchstierhaltung durch eine Veterinärmedizinerin (A. Schröder, ZVTE, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Die cDNAs, die für das C-terminal HA-getaggte ADAM10 und die dominant negative Form ADAM10-E384A-HA (ADAM10-DN) codierten, wurden unter der Kontrolle eines neuronenspezifischen Thy-1-Promotors exprimiert (Herman van der Putten, Novartis, Basel (Schweiz)). Die transgenen Tiere wurden durch Mikroinjektion der Minigene in prenukleäre Embryonen hergestellt (Postina et al., 2004).

FVB/N- Mäuse

Der FVB/N-Inzucht Stamm (Taketo et al., 1991) ist aufgrund mehrerer Charakteristika ein vielgenutzter Maus-Stamm für die Produktion transgener Linien. Die Pronuklei der Zygoten sind groß und erleichtern daher die Mikroinjektion. Die Tiere sind relativ groß und liefern mit durchschnittlich 9,5 Mäusen pro Wurf überdurchschnittlich viele Nachkommen. Der Albino-farbene FVB/N-Stamm wurde ursprünglich aus einem Swiss-Stock entwickelt und aufgrund seiner Histamin-Sensitivität selektioniert. Der Name der Maus-Linie sagt aus, dass sie das Fv-1b Allel trägt, welches die Sensitivität für den B-Stamm des *Friend leukemia Virus* kontrolliert.

Transgene ADAM10-Mäuse Linie B

Transgener FVB/N-Maus-Stamm mit heterozygoter Expression des bovinen ADAM10 in mittlerer Expressionsstärke.

Transgene ADAM10-Mäuse Linie D

Transgener FVB/N-Maus-Stamm mit heterozygoter Expression des bovinen ADAM10 in hoher Expressionsstärke.

Transgene ADAM10-Mäuse Linie I:

Transgener FVB/N-Maus-Stamm mit heterozygoter Expression der bovinen dominant negativen Form von ADAM10.

APLP2-Knock-Out-Mäuse

Die Knock-Out-Mäuse wurden von U. Müller (MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Sie basieren auf dem Maus-Stamm C57/BL/6J (Von Koch et al., 1997).

Material und Methoden

2.1.9.2 Zelllinien

HEK 293

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC 1573-CRL (Graham et al., 1977).

Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch den humanen Adenovirus Typ5. Die Zellen wurden in DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 10 % Fötalem Kälberserum kultiviert und 1:8 bis 1:12 subkultiviert.

9E10

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC CRL-1729 (Evan et al., 1985).

Hybridomazelllinie für die Gewinnung des 9E10 anti-c-myc Maus-IgG.

NIH3T3

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC CRL-1658.

Murine embryonale Fibroblastenzelllinie, besonders geeignet für Transfektions - und Transformationsstudien. Die Zellen wurden in DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 10% FCS kultiviert.

SKNMC

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC HTB-10 (z.B. Barnes et al., 1981).

Humane Neuroblastomazelllinie, die aus einer Gehirn-Metastase (Supraorbital-Bereich) eines 14jährigen Mädchens isoliert wurde und eine epitheliale Morphologie aufweist. Die Zellen wurden in DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 10% fötalem Kälberserum und 1% Natriumpyruvat kultiviert und 1:3 bis 1:8 subkultiviert.

SH-SY5Y

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC CRL-2266 (J. L. Biedler et al., 1978).

Humane epitheliale Neuroblastomazelllinie, die durch dreifache Subklonierung aus der Zelllinie SK-N-SH (metastatischer Knochentumor, weiblich, 4 Jahre) etabliert wurde. Die Zellen wurden in phenolrot-freiem Ham's F12-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 10% fötalem Kälberserum und 1% Natriumpyruvat kultiviert und 1:2 bis 1:4 subkultiviert.

HEKst-ADAM10-HA

Einzelzellklon HEK 293, stabil transfiziert mit pcDNA3-ADAM10-HA, selektioniert mit G418 (S. Gilbert, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

HEKst-ADAM10-DN

Einzelzellklon HEK 293, stabil transfiziert mit pcDNA3-ADAM10DN-Flag, selektioniert mit G418 (S. Gilbert, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

HEKst-TACE-HA

Einzelzellklon HEK 293, stabil transfiziert mit pcDNA3-TACE-HA, selektioniert mit G418.

U373wthAPP

Humane epitheliale Glioblastoma/Astrocytoma-Zelllinie basierend auf der Zelllinie U373MG (Europäische Zellsammlung, Nr. ECACC 89081403 (J. Clarke, AVRI, Pirbright)), die stabil das humane Wildtyp-APP überexprimiert (K. Mendla und H. Romig, Boehringer Ingelheim). Die Zellen wurden in MEM-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 10% fötalem Kälberserum, 1% Natriumpyruvat und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert und 1:2 bis 1:4 subkultiviert.

2.1.9.3 Bakterienstämme

DH5 α

Escherichia coli, $\phi 80\delta$ lacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk⁻ mk⁺), supE44, relA1, deoR, D(lacZYA-argFV169), F⁻, λ ⁻; Clontech, Heidelberg. Der Stamm diente zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA.

SCS110

Escherichia coli, defizient für Dam- und Dcm-Methylase; Stratagene, Amsterdam (Niederlande). Der Stamm diente zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA, deren Restriktion durch Methylierungen erschwert war.

2.2 Bioinformatik

2.2.1 Anfertigen von Sequenz-Vergleichen

Die von der Firma Genterprise, Mainz, angefertigten Sequenzierungen wurden gegebenenfalls mit Chromas1.4 (Conor McCarthy, Griffith University, Brisbane (Australien)) überprüft. Dieses Programm ermöglicht die graphische Darstellung der bei der Sequenzierung detektierten Signale und kann zur Abklärung uneindeutiger Sequenzergebnisse herangezogen werden. Überprüfte Sequenzen wurden mit PCGene6.85 (IntelliGenetics Inc., Schweiz) komplementär umgeschrieben, wenn ein Reverse-Oligonukleotid zur Sequenzierung eingesetzt wurde. Das Programm erlaubte zudem Sequenzvergleiche zwischen sequenzierten Proben und der entsprechenden cDNA bzw. Vektorsequenzen.

2.2.2 Software zur Bilder-Digitalisierung

2.2.2.1 Photographische Darstellung von Ethidiumbromid-haltigen Nucleinsäuren in Agarosegelen

Agarosegele wurden unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe mit der CCD-Kamera abphotographiert. Die so entstandenen Aufnahmen konnten mit Hilfe des Software-Programms DianaV1.6 (Raytest, Straubenhardt) bearbeitet werden.

2.2.2.2 Photographische Darstellung von Proteinen im Western-Blot

Aus der Inkubation der Western-Blots mit Enzym-gekoppelten Zweitantikörpern resultierende Chemilumineszenz wurde mit dem Programm QuantityOne unter Verwendung des VersaDoc Imaging Systems (Model 3000, Biorad, München) detektiert. Wurde ein ³⁵S-markierter Zweitantikörper verwendet, so erfolgte die Aufnahme des radioaktiven Signals mit dem Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Raytest, Straubenhardt).

2.2.3 Auswertungssoftware für Western-Blots

Die densitometrische Auswertung der Western-Blots erfolgte mit der Software Aida 3.50 (Raytest, Straubenhardt).

2.2.4 Statistische und allgemeine Auswertung

Die graphische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism 4.02 (GraphPad Inc. (USA)). Für die statistische Auswertung wurden die Programme SigmaPlot 5.0 (Microsoft (USA)) bzw. GraphPadPrism 4.02 (GraphPad Inc. (USA)) verwendet. Für Mehrfachbestimmungen wurde zur Ermittlung eines Endergebnisses der Mittelwert berechnet, dargestellte Fehler beruhen auf der einfachen Standardabweichung für Stichproben. Die Signifikanzniveaus zur Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse wurden bei zwei korrespondierenden Wertereihen mit dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt (*unpaired* Student's t-Test). Wurden mehrere Behandlungen an einer Zelllinie gleichzeitig durchgeführt (z.B. verschiedene Inhibitor-Kombinationen wie in 3.1.2.3.3), so wurde die Berechnung der Signifikanzniveaus anhand eines One-way ANOVA durchgeführt, der mit adäquaten Post-Tests (Dunnetts's multiple comparison Post-Test, Turkeys multiple comparison Test bzw. Bonferroni Post-Test) kombiniert wurde.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1.1 Plasmidschnellpräparation zur Analyse von *E.coli*-Transformanden
Bei dieser Präparationsmethode (Holmes und Quigley, 1981) wird die Bakterienzellwand durch Lysozym angegriffen und nach kurzer Inkubationszeit durch Hitzeeinwirkung lysiert. Die Bakterien aus 1,5 ml Flüssigkultur wurden in 400 µl STET-Puffer durch Vortexen suspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym (20 mg/ml in H₂O) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min erfolgte der Zellaufschluss durch Erhitzen für 60 s im kochenden Wasserbad. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Zelldebris mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 40 µl 3 M NaOAc pH 4,8 und 420 µl Isopropanol aus der Lösung gefällt. Die DNA wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm sedimentiert und der Pellet durch Übersichten mit 70% wässrigem Ethanol und nochmaligem Zentrifugieren von Salzen befreit. Das DNA-Präzipitat wurde einige

Material und Methoden

Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Ein Zehntel dieser DNA-Lösung wurde für die analytische Restriktion der Plasmid-DNA eingesetzt.

2.3.1.2 Plasmidpräparation über Silika- Säulen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* für Klonierungen, Transfektionen und Sequenzierungen erfolgte über Peqlab- oder Qiagen-Säulen nach Angaben des Herstellers (Peqlab, Erlangen bzw. Qiagen, Hilden).

2.3.1.3 Plasmidgroßpräparation

Größere Mengen (1-2 mg) sauberer Plasmid-DNA für Transfektionen und Klonierungen wurde nach der folgenden Methode erhalten. Die im Protokoll angegebenen Volumenangaben gelten für 400 ml Bakteriensuspension. Nach Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 3000 g) wurde das Bakterienpellet in 8 ml Lösung P1 suspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien durch Zugabe von 8 ml Lösung P2, vorsichtigem Durchmischen und Inkubation bei RT für 7 min. Nach Zugabe von 8 ml eiskalter Lösung P3 und vorsichtigem Durchmischen wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (40 min, 4°C, 27000 g) sedimentiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 14,4 ml 0,6% (v/v) Isopropanol gefällt. Das Isopropanol wurde mit der DNA-Lösung gut durchmischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren durch Zentrifugieren pelletiert (20 min, 4°C, 27000 g). Das Sediment wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden danach in 3 ml H₂O gelöst. Nach Zugabe von 3,5 ml einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung pH 4,8 und gutem Durchmischen wurde der Hauptanteil der RNA durch 20-minütige Inkubation auf Eis gefällt. Die Sedimentierung der RNA erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 4°C und 14000 g). Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 4 ml Isopropanol, 20 min Inkubation bei 0°C und anschließender Zentrifugation gefällt (s.o.). Das Nukleinsäuresediment wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und dann in 500 µl H₂O gelöst. Restliche RNA wurde durch Behandlung mit RNaseA abgebaut, dazu wurden 4 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml; DNase-frei) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung von Proteinen wurde die

DNA-Lösung so lange mit PCI extrahiert, bis keine Zwischenphase nach Phasentrennung durch Zentrifugation (4 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge) mehr sichtbar war. Anschließend wurde noch zweimal mit wassergesättigtem Diethylether extrahiert und die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt. Nach Präzipitierung (20 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge) wurde das DNA-Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch wie in Abschnitt 2.3.1.6 beschrieben.

2.3.1.4 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Gewinnung der gesamten RNA aus eukaryontischen Zellen wurde der RNeasy Mini Kit von der Firma Qiagen (Hilden) nach Protokollangaben des Herstellers verwendet. Die Zellen von konfluenten 6 cm-Kulturschalen wurden für die RNA-Präparation eingesetzt. Die Menge der isolierten RNA betrug je nach Zelllinie 2,5 bis 10 µg.

2.3.1.5 Isolierung von RNA aus Maus-Gehirnen mit peqGOLDTriFast

peqGOLDTriFast (Peqlab, Erlangen) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen aus Geweben. Das Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung und führt nach Zugabe von Chloroform und nachfolgender Zentrifugation zur Ausbildung von drei Phasen: Die RNA ist in der wässrigen Phase enthalten, die DNA in der organischen und der Interphase und die Proteine sind in der organischen Phase. Für die Gewinnung der RNA und der Proteine aus Mausgehirnen wurde das Spezialprotokoll „Leber“ der Firma Peqlab angewandt. Hierzu wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet und die Gehirne ohne Cerebellum herauspräpariert. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme auf Trockeneis gelagert und dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Gewinnung der RNA und der Proteine wurden die Gehirnproben (1/2 Gehirn) mit 4 ml peqGOLDTriFast mit einem elektrischen Homogenisator (650 rpm, 10-15x) homogenisiert und dann dem Protokoll folgend weiter aufbereitet. Die erhaltenen RNA-Pellets wurden in 200 µl Formamid aufgenommen, 1 Stunde bei 55°C inkubiert, alle 10 min gevortext und dann bei -20°C eingefroren. Die Qualität der so gewonnenen RNA wurde durch

Material und Methoden

Probenauftrennung im formamidhaltigen Agarosegel untersucht. Bei intakter Gesamt-RNA ist mit einem ungefähren Verhältnis von 2 :1 bezüglich der 28 und der 18S rRNA zu rechnen (Palmer und Prediger, Ambion TechNotes 11). Diese liegt wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt in etwa vor.

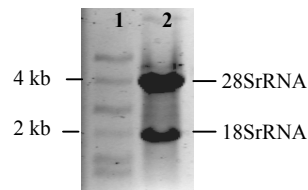


Abbildung 14: Auftrennung der mit TriFast isolierten RNA

Die RNA wurde auf einem 1%igen Formamid-haltigen Agarose-Gel aufgetrennt: 1: RNA-Marker, 2: isolierte RNA (1 μg).

Die DNA wurde gefällt und verworfen und die Proteine gemäß Protokoll extrahiert. Um die Proteinpellets gründlich zu reinigen, wurde der zweite Waschschrift mit Guanidinhydrochlorid über Nacht im Kühlraum auf einem Überkopf-Schüttler ausgeführt. Die Proteine wurden in 10% SDS aufgenommen (1 Inhibitortablette Complete Mini (Roche, Mannheim) pro 10 ml SDS-Lösung). Ungefähr die Hälfte der Proteinpellets ließ sich lösen, die verbleibenden unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert (1 min 1000rpm) und die Überstände abgenommen.

2.3.1.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung wurde durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Wert 1 der Extinktion bei 260 nm entspricht für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ und für einzelsträngige RNA einer Konzentration von 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Proteinverunreinigungen wurden durch Absorptionsmessungen bei 280 nm bestimmt. 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.

Bei gering konzentrierten DNA-Lösungen wurde eine Abschätzung der Menge durch den Vergleich mit einem Mengenstandard im Agarose-Gel durchgeführt. Hierzu wurde 1 μl der DNA-Lösung und 100, 200, 400 und 600 ng des Mengenstandards mit Wasser zu einem Endvolumen von 20 μl aufgefüllt und 2 μl des DNA-Auftragspuffers zugesetzt.

Die Proben wurden auf einem 1%igen ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel bei 100 mV und 100 mA aufgetrennt und die Konzentration der unbekanntes DNA-Lösung anhand des Standards auf dem UV-Transilluminator abgeschätzt.

2.3.1.7 Reinigung und Fällung von Nukleinsäuren

2.3.1.7.1 PCI-Extraktion

Die Proteinverunreinigungen in einer Nukleinsäurelösung wurden durch proteindenaturierende Phenolextraktion mit anschließender Fällung der Nukleinsäuren entfernt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen PCI gemischt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (3 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und nochmals mit PCI extrahiert. Die PCI-Extraktion wurde so oft wiederholt, bis nach der Zentrifugation keine Zwischenphase mehr zu sehen war.

Die Phenolreste wurden durch zweimalige Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether aus der wässrigen DNA-Lösung entfernt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (3 min, 14000 rpm, RT). Die Etherphase wurde danach verworfen und der restliche Ether verdampft.

2.3.1.7.2 Ethanolische Fällung von RNA

Für die Fällung von RNA aus einer wässrigen Lösung wurde Ethanol verwendet. Dazu wurde der RNA-Lösung zunächst 0,1 Volumen 3 M Kaliumacetat oder Natriumacetat pH 4,8 zugesetzt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe des dreifachen Volumens an absolutem Ethanol und einer Aufbewahrung des Gemisches für 1 h bei -20°C. Die RNA wurde durch eine Zentrifugation von 15 min bei 14000 rpm und RT (Tischzentrifuge) präzipitiert. Zur Entfernung von Salzen wurde auf das RNA-Präzipitat 70%iger Ethanol gegeben und nochmals für 10 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen der RNA für einige Minuten an der Luft wurde diese in einem für die anschließende Verwendung geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.3.1.7.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von Amplifikaten aus PCR-Ansätzen oder Fragmenten aus Restriktionen erfolgte entweder über die gelelektrophoretische Trennung und

Material und Methoden

anschließende Reinigung aus dem Gel unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kits oder mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden).

2.3.1.8 Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren
Zur Überprüfung von Restriktionen und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA auf 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Elektrolyt diente TAE-Puffer. Die Agarose wurde in TAE-Puffer durch Erhitzen in Lösung gebracht und nach Abkühlung auf unter 50°C in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Gele in einer Flachbettgelapparatur mit Elektrolytlösung (TAE-Puffer) überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einem Zehntel Volumen DNA-Probenauftragspuffer gemischt, in die Geltaschen gegeben und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde den Agarose-Gelen bei der Herstellung Ethidiumbromidlösung (1 µg Ethidiumbromid pro ml 1xTAE) zugesetzt. Die Interkalation von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren ermöglichte die Dokumentation durch Schwarzweißphotographie unter Verwendung eines Orange-Filters im UV-Durchlicht bei 312 nm.

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

GeneRuler 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, **2000**, 1500, 1000, 750, 500, 250

GeneRuler 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas):

1031, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100, 80

HyperLadder V (Bioline):

10000, 8000, 6000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, **1000**, 800, 600, 400, 200

HyperLadder V (Bioline):

500, 400, 300, 250, **200**, 175, 150, 125, **100**, 75, 50, 25

2.3.1.9 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Um die enzymatischen Modifikationen unter optimalen Reaktionsbedingungen, wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur zu gewährleisten, wurden die Enzyme unter den von den Herstellern angegebenen Reaktionsbedingungen und in den mitgelieferten Puffern verwendet.

Wurden unterschiedliche enzymatische Modifikationen nacheinander an den gleichen Nukleinsäuren durchgeführt, erfolgte zwischen den Reaktionen eine Reinigung der DNA (PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) zur Entfernung des nicht mehr benötigten Enzyms.

2.3.1.9.1 Restriktionshydrolyse

Für Restriktionshydrolysen (Nathans und Smith, 1975) zur Überprüfung von Plasmid-DNA aus Schnellpräparationen oder aus PCR-Ansätzen wurde zumeist eine DNA-Menge von 500 ng und 5 bis 10 Enzymeinheiten eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge hing jedoch auch von der Größe der erwarteten Fragmente ab, da das Interkalieren von Ethidiumbromid nicht nur von der Menge eines DNA-Fragments, sondern auch von seiner Länge abhängt. Bei kurzen Fragmenten (<500 bp) wurden daher zum Teil größere DNA-Mengen eingesetzt und die Enzymmenge entsprechend erhöht.

Für präparative Ansätze wurde die gewünschte Menge an DNA (je nach Anzahl der nötigen Restriktionen, Reinigungsschritte und DNA-Modifikationen 5 bis 10 µg) verwendet und die Zugabe von Restriktionsendonukleasen entsprechend variiert. Der Einsatz der Restriktionsenzyme wurde gemäß den Angaben der Hersteller gehandhabt.

2.3.1.9.2 Modifizierung von DNA-Enden

Die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen produzieren durch versetztes Schneiden in den zwei Strängen der DNA sogenannte „sticky ends“ mit 5'-Überhang. Da jedoch nicht alle daraus resultierenden Überhänge verschiedener Enzyme kompatibel sind, war für einige Ligationsreaktionen ein Auffüllen der Überhänge notwendig. Hierfür wurde die gewünschte DNA-Menge mit 1 µl T4-DNA-Polymerase (5U/µl) und 3 µl dNTPs (200 mM) in einem 50 µl-

Ansatz inkubiert (Inkubationszeit: 20 min bei 11°C). Der Reaktionspuffer wurde gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Polymerase wurde anschließend durch zehnmütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert.

2.3.1.9.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Bei der Ligation von Fragmentenden, die entweder aufgrund einer Restriktion keinen 5'-Überhang aufwiesen oder durch eine T4-DNA-Polymerase-Reaktion (siehe 2.3.1.9.2) modifiziert wurden, war eine Dephosphorylierung des Vektors vorteilhaft. Dabei werden die Phosphatreste an den 5'-Enden des Vektors durch eine Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt. Die entsprechenden Phosphatreste sind für den enzymatischen Mechanismus der kovalenten Verknüpfung von DNA-Enden (Ligation) essentiell, so dass nun eine Religation des Vektors nicht mehr möglich ist. Dazu wurde ein Aliquot des Vektors mit CIAP (1 U) nach den Angaben des Herstellers inkubiert.

2.3.1.9.4 Phosphorylierung der 5'-Enden von Oligonukleotiden

Die 5'-Enden synthetischer Oligonukleotide und die mit diesen Oligonukleotiden erzeugten PCR-Produkte besitzen keine Phosphatgruppen. Dies macht die Klonierung von PCR-Produkten uneffizient, bei dephosphorylierten linearisierten Vektoren sogar unmöglich. Mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase sind 5'-DNA-Enden phosphorylierbar. Dazu wurden 100 pmol Oligonukleotid in T4-Polynukleotidkinasepuffer (70 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,1 M KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM 2-Mercaptoethanol) mit 1 mM ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein) in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C wurde das Enzym inaktiviert. Die Lagerung der phosphorylierten Primer erfolgte bei -20°C.

2.3.1.9.5 Kovalente Verknüpfung von DNA-Molekülen (Ligation)

Für Ligationen wurden aufgereinigte Fragmente aus Restriktionen oder PCR-Reaktionen bzw. hybridisierte Oligonukleotide verwendet. Dabei wurde die Menge des Inserts 3 bis 5 mal so hoch gewählt wie die des Vektors.

Ligationsansatz: X µl Insert
X µl Vektor
2 µl Ligase-Puffer (10x, mitgeliefert vom Hersteller)
1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl)

Der Ansatz wurde mit Wasser auf 20 μ l aufgefüllt.

Bei der Ligation von glatten Enden wurde 1 μ l einer Enzymlösung mit 5 Weiss-Einheiten pro μ l eingesetzt, bei überstehenden Enden 1 μ l einer Lösung mit nur einer Weiss-Einheit pro μ l. Die Inkubation erfolgte bei 8°C über Nacht oder gegebenenfalls über das Wochenende. Die so erhaltenen Ligationen wurden direkt für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Es wurden 20 ng Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Von jedem nicht-phosphorylierten Oligonukleotid wurden 50 pmol eingesetzt, die Nukleotidkonzentrationen betragen jeweils 200 mM für jedes Nukleotid.

Die Reaktion wurde in dem vom Polymerase-Hersteller beigefügten Reaktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Der PCR-Programmzyklus (Denaturierung, Oligonukleotidanlagerung, Polymerisation) wurde nach Länge des Amplifikats, verwendeter DNA-Polymerase und erforderlicher Amplifikatmenge gewählt. Nach 30 bis 35 Zyklen wurde die Polymerisation durch eine zehnminütige Inkubation bei 72°C vervollständigt und dann durch Abkühlung auf 4°C gestoppt.

2.3.1.11 Lagerung von Nukleinsäuren

Sämtliche DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert und bei Verwendung möglichst auf Eis gehandhabt, RNA-Präparationen wurden ebenso auf Eis gehandhabt und in RNase-freiem Wasser bei -20°C gelagert.

2.3.2 *In-vitro*-Test zur Spaltung von Peptid-Substraten

Zum Nachweis einer *in vitro*-Spaltung von Peptiden aus potentiellen Substraten durch die löslichen, rekombinanten Metalloproteinasen ADAM10 und 17 (R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)) wurde eine HPLC mit einer Vydac C18-Säule (mit Vorsäule und Filter) gewählt. Die Peptide bzw. ihre Spaltprodukte wurden durch UV-Absorption bei 220 nm nachgewiesen.

Material und Methoden

Die Peptide wurden als Stammlösung in 10% DMSO in einer Konzentration von 3 mM angesetzt. Dann wurde die Reinheit der Peptide und ihre Retentionszeit durch einen Probelauf nach Injektion von 5 µl (15 µmol) der Peptidstammlösung überprüft. Zur Elution der Peptidfragmente wurde folgender Gradient eingesetzt:

5 min 100% Puffer A (0,1% TFA in MP-H₂O)
in 55 min auf 100 % Puffer B (0,1 % TFA in 90 % Acetonitril)
5 min 100 % Puffer B
dann innerhalb von 5 min auf 100 % Puffer A zurück
(Pumpgeschwindigkeit 1,5 ml/min)

Lagen keine bedeutenden Neben-Absorptionssignale vor, konnte die Analyse des *in vitro*-Verdaus durchgeführt werden.

In einem Vorversuch wurde von Dr. E. Kojro (Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) geklärt, ob die rekombinanten, löslichen ADAMs der Firma R&D Systems aktiv waren. Dazu wurde gemäß der Produktbeschreibung das Enzym rekonstituiert und eine Proteolyse mit einem Peptid aus der APP-Sequenz (APP-18) angesetzt. Für dieses Substrat war eine deutliche Spaltung durch aus Rinderniere gereinigtes ADAM10 beschrieben worden (Lammich et al., 1999), so dass es für das rekombinante Enzym ebenfalls ein gutes Substrat darstellen sollte. Die Reaktion wurde nach der Inkubation durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) abgestoppt.

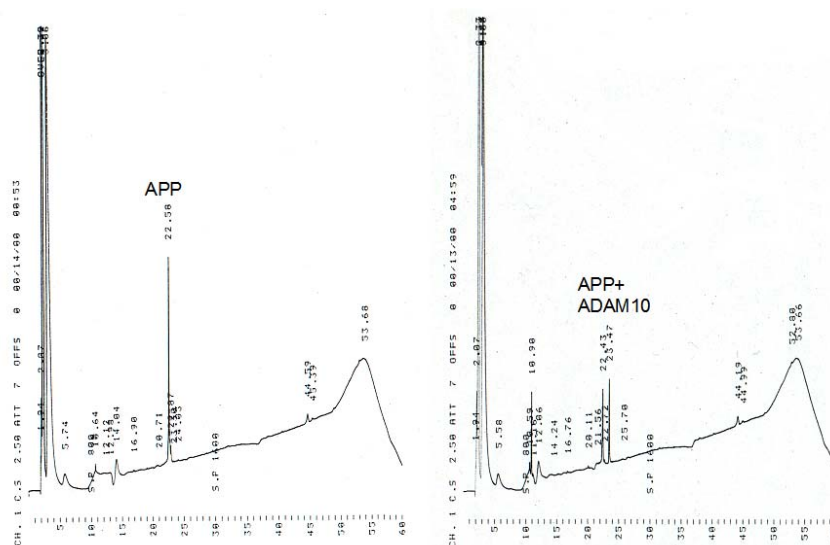


Abbildung 15: Elutionsprofile der HPLC zum Nachweis der proteolytischen Spaltung des APP-18-Peptids durch 100 ng rekombinantes ADAM10.

Es wurden 1,5 nmol Peptid mit 100 ng der rekombinanten Protease bzw. einem adäquaten Volumen an Test-Puffer 18 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit TFA abgestoppt und der gesamte Ansatz auf die HPLC aufgetragen. Das ungespaltene Peptid eluierte nach ca. 22,5 min, die Spaltfragmente bei 10 und 23,5 min.

100 ng rekombinantes ADAM10 führten zu einer ca. 50%igen Abnahme des ungespaltenen Peptids und zur Entstehung zweier Spaltfragmente (siehe Abbildung 15). Dadurch war gezeigt, dass das rekombinante ADAM10 unter den gewählten Bedingungen katalytisch aktiv war. Zudem schien die Spaltung an der physiologisch relevanten Spaltstelle erfolgt zu sein, da die beschriebenen Spaltfragmente (Lammich et al., 1999) entstanden.

Für die Analyse der Spaltung potentieller Substrate wurden die Peptide 1/10 in Test-Puffer vorverdünnt (25 mM Tris pH 9, 2,5 µM ZnCl₂, 0,005% Brij35). Dann wurden die Verdau-Ansätze wie folgt pipettiert:

5 µl Peptid (0,3 mM in Test-Puffer)
+ X µl Test-Puffer
+ X µl rekombinantes Enzym (100 ng/ µl) bzw. Testpuffer
<hr/>
50 µl

Die Ansätze wurden durch Vortexen durchmischt, abzentrifugiert und über Nacht (18 h) bei 37°C bzw. bei 25 °C (TACE, Angabe des Herstellers) im Wasserbad-Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1 µl TFA abgestoppt und die Proben analysiert. Durch Vergleich der Signal-Integrale und Retentionszeiten der Fragmente in den enzymhaltigen Versuchsansätzen mit den Ansätzen ohne Enzym konnte die Frage nach der *in vitro*-Spaltung der untersuchten Peptide durch rekombinantes ADAM10 und 17 geklärt werden.

2.3.3 Kultivierung von Bakterien- und Säugerzellen

2.3.3.1 Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

2.3.3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium, die von *E. coli*-Transformanten in Medium mit Ampicillin (100µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml). Die Vereinzelung von *E. coli*-Klonen erfolgte auf LB-Agarplatten. Für

Material und Methoden

Plasmidpräparationen wurden die Bakterien in Flüssigmedium unter Schütteln (120 rpm, Inkubationsschüttler) 15 h bei 37°C inkubiert.

2.3.3.1.2 Lagerung von *E. coli*

Die kurzzeitige Lagerung von Flüssigkulturen oder beimpften Agarplatten erfolgte im Kühlschrank. Für die dauerhafte Lagerung von Transformanden wurde der entsprechende Klon in LB-Selektionsmedium herangezogen (15 h, 37°C, 120 rpm, Inkubationsschüttler), anschließend die Bakteriensuspension mit sterilem Glycerin auf 20% (v/v) Glycerin eingestellt und nach eintägiger Zwischenlagerung bei –20°C bei –80°C dauerhaft gelagert.

2.3.3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien beruht auf der klassischen Calciumchlorid-Methode (Dagert und Ehrlich, 1979). Dazu wurden 400 ml Flüssigmedium mit 1 ml einer stationär gewachsenen Kultur von DH5 α -Zellen angeimpft. Das Wachstum der Bakterien wurde über eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀, Referenz: LB-Medium) verfolgt. Der OD₆₀₀-Wert sollte dabei einen Wert von 0,4 bis 0,6 für die Weiterbehandlung erreichen. Das Wachstum wurde dann durch Inkubation auf Eis abgestoppt und die Bakterien durch Zentrifugation bei 4°C pelletiert (10 min, 6000 rpm, JA-14-Rotor). Anschließend wurde das Pellet in 100 ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung suspendiert (50 mM CaCl₂). Nach erneuter Inkubation auf Eis (15 min) wurden die Bakterien wie beschrieben durch Zentrifugation pelletiert. Es folgte die Resuspendierung in 20 ml glycerinhaltiger Calciumchlorid-Lösung (10% Glycerin) und eine mindestens fünfstündige Inkubation auf Eis (währenddessen wurden die Bakterien bereits zu 200, 400 und 600 μ l aliquotiert). Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung bei –85°C. Die Bakterien wurden für die Transformation durch langsames Auftauen auf Eis reaktiviert.

2.3.3.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurden pro Ansatz 100 μ l der bei –85°C gelagerten Zellen mit 10 μ l eines Ligationsansatzes oder einer geringen Menge von Plasmid-DNA gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach

erfolgte ein Hitzeschock (90 sec bei 42°C) und eine erneute Inkubation auf Eis für 3 min. Anschließend wurden die Bakterien mit 800 µl eines glukosehaltigen Flüssigmediums (LB mit 20 mM Glukose) versetzt und nach mehrmaligem Invertieren für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und deutlicher Trübung des Mediums erfolgte das Ausplattieren des gesamten Ansatzes auf einem Antibiotika-haltigen Selektivnährboden. Nach 24 h Lagerung bei 37°C konnten die gewachsenen Klone zur Vereinzelung (fraktionierter Ausstrich) auf neue Agarplatten überimpft werden.

2.3.3.2 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

2.3.3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung adhärent wachsender Zellen erfolgte auf dafür geeigneten Plastikmaterialien mit Zellkulturmedium bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% wassergesättigter Luft in einem Zellkulturbrutschrank. Alle Arbeiten wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Lösungen, die mit Zellen in Berührung kamen, wurden durch Autoklavieren (30 min, 121°C) oder durch Filtration (Porengröße 0,2 µm), Glasmaterialien durch trockene Hitze (4 h, 180°C) sterilisiert.

2.3.3.2.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen konfluent bewachsener Gewebekulturschalen wurden abgelöst und mit frischem Kulturmedium auf neuen Kulturschalen ausgesät. 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 mit Kulturmedium verdünnt und die Zellen durch Zentrifugation (5 min, RT, 1000 rpm) sedimentiert. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium suspendiert und in geeigneten Verdünnungen auf neuen Kulturschalen verteilt.

2.3.3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO suspendiert. Die Zellsuspension (1 bis $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurde in 2 ml-Kryoröhrchen auf Eis bei -80°C eingefroren und nach ca. 24 h in die Stickstoff-Dampfphase überführt. Bei erneuter Aussaat wurden die Zellen möglichst schnell

Material und Methoden

aufgetaut und sofort mit dem 10-fachen Volumen Kulturmedium verdünnt. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und das Kulturmedium gegen frisches Medium ausgetauscht.

2.3.3.2.4 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Zellkulturschalen oder Deckgläschen

Bei Versuchsarrangements, die ein mehrmaliges Waschen der Zellen erforderlich machten (z.B. die Sekretion von Proteinen in den Kulturüberstand oder die Fixierung von Zellen) wurde die Adhäsionsfähigkeit der Zellen durch Vorbehandlung der Kulturgefäß- oder Deckgläschen-Oberflächen mit Poly-L-Lysin erhöht. Hierzu wurde ein der Fläche entsprechendes Volumen einer Poly-L-Lysin-Lösung (5 mg in 50 ml Wasser) – z.B. 5 ml bei einer 10 cm-Kulturschale – zugesetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte ein Waschschrift mit PBS und ein zweiter mit Wasser. Derart behandelte Materialien wurden mindestens eine Stunde, maximal jedoch eine Woche bei Raumtemperatur getrocknet bevor sie zur Aussaat von Zellen herangezogen wurden.

2.3.3.2.5 Transfektion von Zellen

Calciumphosphat-vermittelte Transfektion

Die durch Calciumphosphat-vermittelte Transfektion wurde zur Erzeugung stabil exprimierender Säugerzellen verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer adäquaten Zahl auf Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 20-stündiger Kultivierung der Zellen (50 bis 70%ige Konfluenz) wurde das Kulturmedium durch Transfektionsmedium ersetzt. Das Transfektionsmedium für eine 10 cm-Kulturschale enthielt 10 µg Expressionsplasmid, die mit 750 µl H₂O, 250 µl 1 M CaCl₂-Lösung und 1 ml BBS-Puffer kräftig durchmischt und 3 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde durch Mischen mit 8 ml MEM-Medium das Transfektionsmedium vervollständigt und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation für 4,5 h bei 37°C (in einer Atmosphäre von 3% CO₂ und 95% wassergesättigter Luft) wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen 3 min mit PBS/10% (v/v) Glycerin behandelt, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und frisches Medium zugesetzt. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Zugabe der Selektionssubstanzen. G418 wurde in den ersten drei Wochen nach der

Transfektion dem Kulturmedium in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben und danach für die Weiterkultivierung der Transfektanden auf eine Konzentration von 500 µg/ml herabgesetzt. Die Konzentration von HygromycinB im Kulturmedium betrug konstant 100 µg/ml.

Lipid-vermittelte Transfektion

Bei der Lipofektion binden die negativ geladenen DNA-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkung an kationische Lipide. Der DNA-Lipid-Komplex wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, die DNA gelangt in den Kern und führt nachfolgend zur Expression des gewünschten Proteins. Diese Methode ist abhängig von Faktoren wie der Zellteilung (Degradation der Kernmembran) und der Endozytose/Pinozytose-Aktivität der Zellen.

Es wurden verschiedene auf kationischen Lipiden basierende Transfektionsreagenzien auf Cytotoxizität und Effizienz getestet. Da Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Paisley (UK)) eine reproduzierbare, vergleichsweise hohe Transfektionseffizienz bei gleichzeitig niedriger Toxizität aufwies, wurde dieses Reagenz für alle transienten Transfektionen verwendet. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Teilungsgeschwindigkeit auf 24-Loch-Platten ausgesät, so dass nach 24 h 80-90% Konfluenz erreicht war. Dann wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 200 µl frisches, antibiotikafreies Medium ersetzt. Der DNA-Lipid-Komplex wurde wie folgt angesetzt: Es wurde pro Vertiefung der Loch-Platte 50 µl Transfektionsmedium (siehe 2.1.7) mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA versetzt, weiterhin wurden 50 µl Transfektionsmedium mit 1 µl Lipofectamine 2000 vermischt. Nach 5 min Equilibrierung bei Raumtemperatur wurden die beiden Ansätze gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben und für mindestens 5 h inkubiert. Bei Zellen, die mit Inhibitoren oder Aktivatoren über Nacht kultiviert werden sollten, erfolgte ein Mediumwechsel unter Zusatz von frischem Medium mit den entsprechenden Substanzen.

2.3.3.2.6 Mikroskopische Untersuchung von Zellen

Mikroskopie lebender Zellen

Die Zellen wurden auf 3,5 cm Kulturschalen ausgesät und entsprechend der Versuchsanordnung kultiviert. Dazu wurde farbloses, phenolrotfreies Medium

Material und Methoden

verwendet oder aber die Zellen vor der Mikroskopie mit farblosem Medium gewaschen und mit farblosem Medium überschichtet. Die Zellen wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie bei einer Vergrößerung von Faktor 100 oder 400 mikroskopiert und ausgewählte Bilder mit der am Mikroskop (Zeiss Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop, Metascan) installierten MicroMax CCD-Kamera fotografiert. Die Steuerung des Mikroskops und die Auswertung der Bilder erfolgte durch die Software MetaView Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA (USA)).

Fixierung und Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten 10-12 mm Deckgläschen in farblosem Medium ausgesät. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz bzw. nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgesaugt, pro Vertiefung 300 µl Paraformaldehyd (3,75% in PBS) zugesetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in 2 µl Mowiol (6 g Glycerin, 2,5 g Mowiol (Sigma, Deisenhofen), 6 ml Wasser, 2 h Rühren, Zugabe von 12 ml Tris-HCl (0,2 M, pH 8,5), Rühren bis zur vollständigen Lösung bei 53°C) auf einem Objektträger eingebettet. Nach mindestens 2 h Trocknungszeit bei Raumtemperatur war die Mikroskopie möglich.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Filter verwendet, die möglichst nahe an den Parametern für Exzitation und Emission der eingesetzten Fluorophore (DAPI: Excitation 350 nm; Emission 470 nm) lagen.

2.3.3.2.7 Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl wurde durchgeführt, um beim Einsatz verschiedener Zelllinien gleiche Ausgangsbedingungen für Versuche zu schaffen bzw. um adäquate Zellzahlen für die Tests zu erzielen. Hierzu wurden die Zellen nach der Trypsinierung in frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Dann wurde ein Aliquot entnommen und auf die Zählnetze einer Thoma-Kammer gegeben. Ein Zählnetz beinhaltet dabei 16 Gruppenquadrate, die Gesamtfläche beträgt 1 mm². Das Interferenzphänomen Newtonscher Ringe auf dem Deckglas der Zählkammer zeigt an, dass ein definierter Abstand vom Objektträger mit den Zählnetzen vorliegt, der 0,1 mm beträgt. Hieraus resultiert ein Volumen von 0,1 mm³ über dem Zählnetz, d.h.

$\frac{1}{10}$ μ l. Pro Zelllinie oder Behandlungsansatz wurden je zwei Zählnetze ausgezählt. Der erhaltene Mittelwert der Zellzahl wurde mit 10 multipliziert, so dass sich die Zellzahl/ μ l ergab.

2.3.3.2.8 Differenzierung neuronaler Zellen mit Retinsäure

Zur Differenzierung der Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y wurden die Zellen entsprechend der Kulturschalenfläche ausgesät. Die als Kontrolle mit Lösungsmittel behandelten Zellen wurden in entsprechend niedrigerer Dichte ausgesät, da sie ein schnelleres Teilungsvermögen aufwiesen als die differenzierten Zellen. Alle Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Kulturschalen ausgesät, um eine Ablösung der Zellen aufgrund des häufigen Mediumwechsels zu vermeiden. Die Zellen wurden 72 h in ihrem üblichen Kulturmedium inkubiert, dann wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium, supplementiert mit 1 μ M all-trans-Retinsäure (RA) oder dem entsprechenden Volumen an Lösungsmittel (DMSO), ersetzt. Da RA lichtempfindlich und temperaturlabil ist, wurde die Stammlösung (2 mM in DMSO) erst kurz vor der Zugabe aufgetaut und im Dunkeln dem Medium zugesetzt. Aufgrund der genannten Eigenschaften der RA wurde das Medium jeden Tag gewechselt, die Differenzierung erfolgte insgesamt über vier Tage. Das Ausdifferenzieren der Zellen war phänotypisch unter dem Lichtmikroskop zu verfolgen: Für SH-SY5Y-Zellen zeigten sich ab dem zweiten Tag der RA-Zugabe lange Zellausläufer, für SKNMC-Zellen hingegen zeigten sich nur im geringen Maße Änderungen der Zellmorphologie, jedoch kam es zu einer starken Proliferationsinhibierung begleitet von einem verminderten Adhäsionsvermögen.

2.3.3.2.9 Nachweis apoptotischer Eigenschaften von Zellen

Apoptotische Kernfragmentierung

Bei der Apoptose von Zellen kommt es als ein morphologisches Phänomen zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der Zellkerne. Zum Nachweis dieser apoptotischen Veränderung wurden die Kerne mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Bei Bindung von DAPI an die DNA kommt es zu einer Fluoreszenzverstärkung, die aufgrund der hohenenergetischen, interkalativen Art der Wechselwirkung zustande kommt. Eventuell ist auch eine Bindung des DAPI an die kleine Furche der DNA verantwortlich, die durch Wasserstoff-

Material und Methoden

Brückenbindungen mit Akzeptorgruppen der DNA stabilisiert wird. Für die Färbung wurden die auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesäten Zellen wie unter 2.3.3.2.6 beschrieben fixiert. Den Waschsritten nach der Paraformaldehyd-Inkubation schloss sich eine Inkubation mit 0,1% TritonX-100 (in PBS) zur Permeabilisierung der Zellen an. Es wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen dann für 2 Minuten in DAPI-Lösung (0,2 µg/ml) eingelegt. Nach kurzem Eintauchen in Wasser wurden die Zellen wie beschrieben eingebettet und mikroskopiert (siehe 2.3.3.2.6).

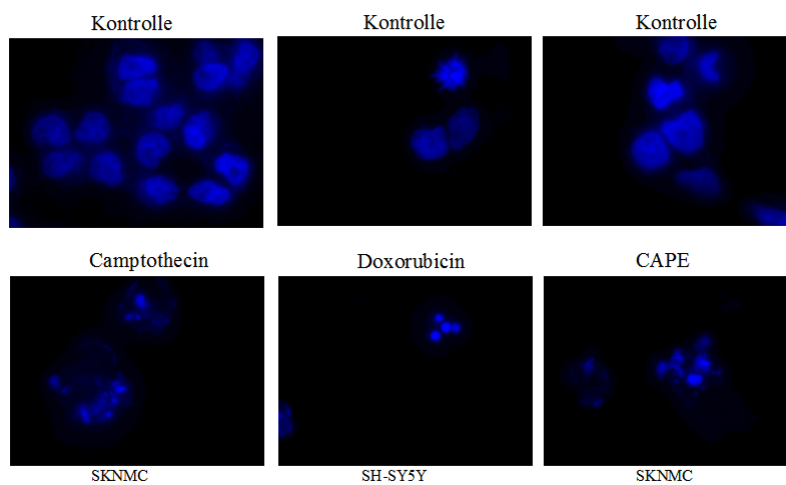


Abbildung 16: Nachweis apoptotischer Zellkerne in SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen durch DAPI-Färbung

Die Zellen wurden 20 h mit Camptothecin (2 µM in DMSO), CAPE (25 µg/ml in 50% Ethanol) oder Doxorubicin (0,5 µg/ml in Wasser) bzw. der entsprechenden Kontrolle inkubiert. Dann wurden die Zellen fixiert und mit DAPI die Kerne bzw. Kernfragmente angefärbt.

Kerne apoptotischer Zellen (siehe Abbildung 16) zeigten ein kondensiertes Chromatin an der Peripherie der Kernmembran oder eine vollständige Fragmentierung, während Kerne ungeschädigter Zellen eine homogene Färbung oder kondensiertes Chromatin verschiedener Mitose-Stadien aufwiesen.

Caspase-3/7-Aktivität

Der Caspase-Glo™ 3/7 Test (Promega, Madison, WI (USA)) ist ein homogener Lumineszenz-Test, der die Aktivität der Caspasen 3 und 7 quantitativ erfasst. Der Test beinhaltet ein Caspase-3/7-DEVD-Aminoluciferin-Substrat und eine thermostabile Luciferase in einem für die Luciferaseaktivität und für die Zellyse

optimierten Puffer. Bei Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch proapoptotische Signale wird das Substrat gespalten und anschließend unter ATP- und Sauerstoff-Verbrauch von der Luciferase unter Generierung von Photonen umgesetzt (siehe Abbildung 17). Das entstehende Signal ist proportional zur Aktivität der im Zelllysate enthaltenen aktivierten Caspasen 3 und 7.

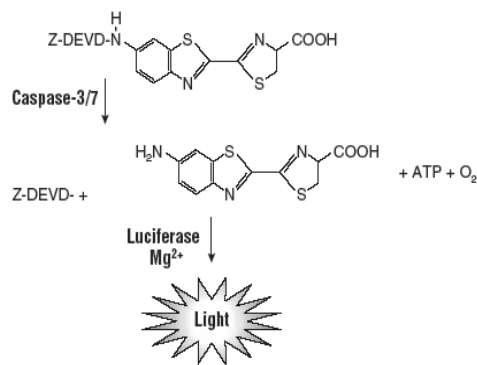


Abbildung 17: Entstehung der Biolumineszenz durch aktivierte Caspase3/7 im Caspase-Glo™ 3/7 Test (Substrat: Ac-DEVD-pNa, Promega, Madison, WI (USA)).

Für den Test wurden Zellen in 96-Loch-Platten so ausgesät, dass am Versuchstag eine Zelldichte von 20 000 Zellen pro Vertiefung erzielt wurde. Die Zellen wurden in farblosem Medium (50 µl Medium pro Vertiefung) unter Zusatz der Apoptose-induzierenden Substanzen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte auf Raumtemperatur equilibriert. Je zwei Vertiefungen pro Ansatz und Inkubationszeitraum dienten der Bestimmung der Zellzahl als Normierungsfaktor für die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU). Die Zellen dieser Vertiefungen wurden Kulturüberstand und Trypsin suspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.3.3.2.7). In die übrigen Vertiefungen wurden jeweils 50 µl der Test-Reagenz zugesetzt, die Platte 30 sec bei 650 rpm auf dem Rotierer zur Unterstützung der Lyse inkubiert und im Dunkeln 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Dann wurde die Emission der Photonen mit dem Luminometer FluoStarOptima (BMG, Durham; NC (USA)) gemessen. Von allen Ansätzen wurden Duplikate gemessen. Als Werte für den Hintergrund wurde Medium, das mit den entsprechenden Lösungsmitteln oder Reagenzien versetzt war, analog zu den Zellproben behandelt. Die so erhaltenen Werte wurden von den RLU-Werten abgezogen.

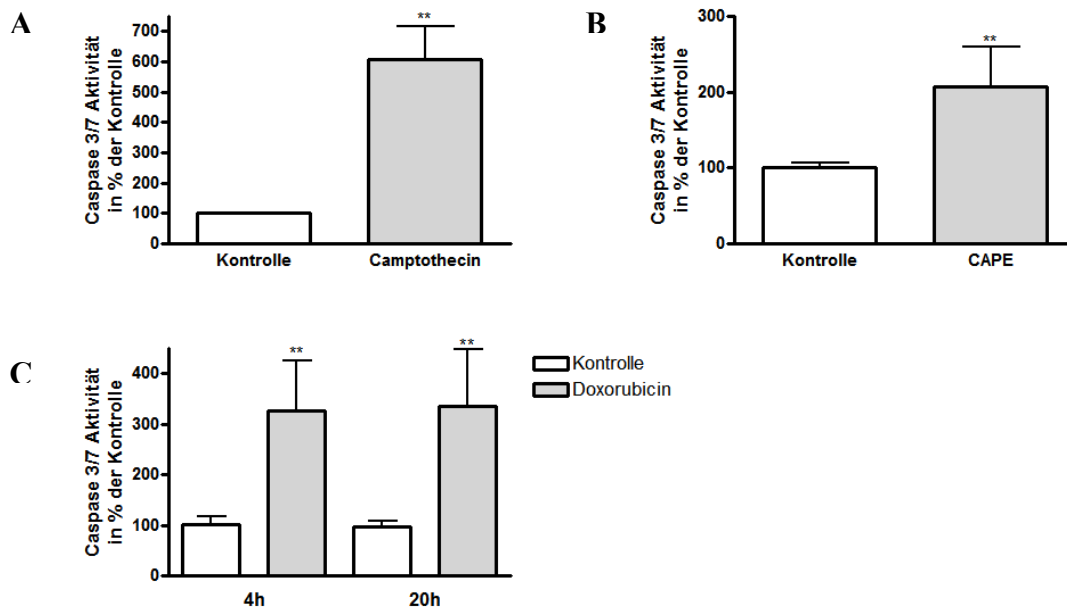


Abbildung 18: Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch exogen applizierte Apoptose-Induktoren

Die Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und nachfolgend in der angegebenen Zeit mit den Topoisomerase-Hemmern Camptothecin (A, 6 h, SKNMC-Zellen) und Doxorubicin (C, SH-SY5Y-Zellen) bzw. dem NFκB-Inhibitor CAPE (B, 20 h, SKNMC-Zellen) inkubiert. Durch Zugabe des Test-Reagenz wurden die Zellen lysiert und nach 1 h die Luciferase-Aktivität gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche in Duplikaten. Die Luciferase-Meßwerte wurden auf die Zellzahl analog inkubierter Zellen bezogen.

Die tatsächliche Aktivität der Caspasen unter dem Einfluss von CAPE dürfte größer sein, da sich herausstellte, dass CAPE die katalytische Aktivität der Luciferase inhibiert (siehe 2.3.7.2.2) und damit auch dieses Testsystem beeinträchtigt.

2.3.4 Gewinnung von sekretierten und membranständigen Proteinen aus Säugerzellen

2.3.4.1 Sekretion von Proteinektodomänen in den Kulturüberstand

Für die Bestimmung der Protein-Sekretion von Zellen in das Kulturmedium wurden Zellen auf Poly-L-Lysin-vorbehandelten 10 cm-Kulturschalen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Die konfluenten Zellen wurden nach entsprechender Vorinkubation zunächst zweimal mit je 5 ml Medium ohne Zusätze gewaschen. Die Sekretion der Proteinektodomänen erfolgte für 4,5 h im Brutschrank unter Inkubation

der Zellen mit 5 ml Kulturmedium ohne FCS, jedoch mit 2 mM Glutamin und 10 µg/ml fettsäurefreiem BSA als Zusätze. Gegebenenfalls wurden entsprechende Aktivatoren oder Inhibitoren hinzugefügt. Nach 4,5 h wurde das Zellkulturmedium in Zentrifugenröhrchen überführt, zum Entfernen von abgelösten Zellen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und während der anschließenden Proteinfällung auf Eis gelagert.

2.3.4.2 Proteinfällung aus Zellkulturmedium

1500 µl Zellkulturmedium wurden mit 170 µl eiskalter 100% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) unter mehrmaligem Invertieren des 2 ml-Reaktionsgefäßes gemischt und 4 min bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Vorgang im gleichen Reaktionsgefäß mit dem restlichen Zellkulturmedium wiederholt. Anschließend erfolgte zum Entfernen der Säure eine zweimalige Waschung der Proteinpellets mit -20°C kaltem Aceton. Jeweils 500 µl Aceton wurden in das Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert (s.o.). Das Proteinpräzipitat wurde an der Luft getrocknet, in 40 µl Proteinauftragspuffer unter Vortexen gelöst, 10 min bei 95°C erhitzt und bis zum Auftragen auf ein Polyacrylamidgel (siehe 2.3.6.3) bei -20°C gelagert. Zur Normierung der gefällten Proteine wurden Aliquots der Zellen zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt (siehe 2.3.6.1). Als maximales Volumen auf einem SDS-Gel wurden 20 µl der gefällten Proteine aus der Probe mit dem geringsten Proteingehalt der Zellen eingesetzt, alle anderen Proben wurden entsprechend dazu umgerechnet und geringere Volumina auf dem Gel aufgetrennt.

2.3.4.3 Gewinnung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden die Zellen nach Abnahme des Kulturüberstandes einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit einem der Fläche der Kulturplatte angepassten Volumen an PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers abgelöst. Handelte es sich um die Herstellung von Lysaten partiell apoptotischer Zellen, so wurden diese mit dem Kulturmedium abgelöst, da hierbei die Adhärenz z.T. deutlich beeinträchtigt war und daher beim Waschvorgang viele Zellen verloren gegangen wären.

Material und Methoden

Die Zellen wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 3000 rpm, 4°C pelletiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und ein 200 µl Aliquot zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford entnommen. Sowohl das 800 µl als auch das 200 µl Aliquot wurden 3 min bei 5000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Beide Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. War die Proteinmenge anhand des 200 µl Aliquots bestimmt, so wurde das Pellet des 800 µl Aliquots in einem entsprechenden Volumen Auftragspuffer aufgenommen, so dass sich eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl ergab. Als Auftragspuffer wurde entweder zweifach Lämmli-Puffer oder Nu-PAGE-Puffer (Invitrogen, Paisley (UK)) eingesetzt, beide Auftragspuffer wurden mit 10% DTT (v/v, 1M) komplettiert. Der Nu-PAGE-Auftragspuffer basiert im Gegensatz zum Lämmli-Puffer nicht auf SDS sondern auf LDS und wirkt dadurch protektiv für wenig stabile Proteine. Beim Nachweis der C-terminalen Fragmente von APLP2 war es entscheidend, die Zellen in Nu-PAGE-Auftragspuffer zu lysieren, da das enthaltene Detergens LDS im Gegensatz zum SDS des ansonsten eingesetzten Lämmli-Puffers stabilisierend auf diese Proteolyseprodukte wirkte und erst deren Nachweis ermöglichte. Die Lysate wurden 10 min bei 95°C (Lämmli-Puffer) oder 10 min bei 74°C (Nu-PAGE-Puffer) unter Vortexen inkubiert und dann bis zur Auftragung auf ein Gel bei -20°C gelagert.

2.3.5 Gewinnung von sekretierten und membranständigen Proteinen aus Mausgehirn-Präparationen

2.3.5.1 Sektion und Gehirn-Präparation transgener Mäuse

Die Gehirn-Hemisphären (ohne Cerebellum) wurden bei der Sektion auf Trockeneis eingefroren und anschließend bis zur Aufbereitung bei -80°C gelagert. Die Transgenität der Tiere wurde mittels einer PCR an chromosomaler DNA aus einer Schwanz- oder Ohrbiopsie überprüft (A. Schröder, ZVTE Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

2.3.5.2 Gewinnung von löslichen und membranständigen Proteinen aus Mausgehirnen

Vor der Aufbereitung wurden die Gehirnhälften gewogen. Dann wurde das 6,5fache (abzüglich 300 µl) Gewicht der jeweiligen Gehirnprobe an eiskaltem Homogenisierungspuffer in das eisgekühlte Pottergefäß vorgelegt und das Gewebe

zugegeben. Mittels eines Teflon-Stempels und eines elektrischen Homogenisators wurde das Gewebe homogenisiert (650 rpm 15x). Das Homogenisat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und das Pottergefäß mit 300 µl kaltem Homogenisierungspuffer nachgespült. Durch Ultrazentrifugation bei 35000 rpm, 4°C für 1h 45 min (Beckman-Zentrifuge L7-65, Rotor:45TJ) wurden nun die löslichen Proteine von den Membranfraktionen getrennt. Nach Abnahme des Überstandes wurde die Membranfraktion in 500 µl kaltem TBS-Puffer (inklusive Proteaseinhibitorcocktail, 1 Tablette/7 ml) durch wiederholtes Aufziehen mit Kanülen unterschiedlicher Stärke resuspendiert. Aliquots beider Proteinfractionen (lösliche und Membranfraktion) wurden zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Adäquate Volumina der Proteinlösungen wurden dann mit Nu-PAGE-Auftragspuffer versetzt.

2.3.6 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen

2.3.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250 bei Bindung an ein Protein. Durch die Bindung wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt, die Absorption verschiebt sich in den längerwelligen Bereich und kann bei 595 nm photometrisch detektiert werden.

Proben für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden als Aliquot aus einer PBS-Suspension von Zellen abgenommen und die Zellen in 100% Ameisensäure lysiert. Entstammten die Proben einem Promotor-Test (siehe 2.3.7.2), dann lagen die Zellen bereits in passivem Lysispuffer (Promega, Madison, WI (USA)) vor und konnten direkt eingesetzt werden.

Durch Vortests wurde das geeignete einzusetzende Probenvolumen bestimmt, eventuell eine Vorverdünnung vorgenommen und dann mit Wasser und 100%iger Ameisensäure zu 100 µl 50%iger Ameisensäure ergänzt.

Bsp.:

10 µl eines in 100%iger Ameisensäure lysierten Zellaliquots

40 µl 100%ige Ameisensäure

50 µl Wasser

100 µl

Material und Methoden

Die Proben wurden in Duplikaten oder Triplikaten zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt. Als externe Bezugsgröße wurde eine BSA-Standardreihe verwendet. Hierzu wurde eine wässrige BSA-Stammlösung von 0,5 µg/µl eingesetzt, die mit Wasser und 100%iger Ameisensäure auf ein Probenvolumen von 100 µl ergänzt wurde, so dass sich Proteinkonzentrationen von 2, 4, 6, 8 und 10 µg/100 µl ergaben. Die Standards wurden in Duplikaten eingesetzt. Sowohl die Proben als auch die Standards wurden nach dem Ansetzen 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine durch die Ameisensäure zu erzielen.

Die Färbelösung (Roth, Karlsruhe) wurde frisch durch 1/5-Verdünnung mit Wasser angesetzt, 900 µl pro Probe und Standard zugesetzt und durch Invertieren gemischt. Nach 20 min wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Konzentrationswerte, die sich aus der BSA-Standardkurve ergaben, wie folgt berechnet:

Ermittelte Konzentration x reziproker Verdünnungsfaktor / eingesetztes Volumen = Proteinkonzentration [µg/µl]

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde durchgeführt, um gleiche Proteinmengen von Lysaten bei der Gelelektrophorese einsetzen zu können bzw. im Western-Blot detektierte Signale darauf normieren zu können. Zudem wurden die Messwerte der Promotorversuche teilweise auf die Proteinkonzentration der Proben bezogen.

2.3.6.2 Deglykosylierung des Prionproteins

Durch eine Chloroform-Methanol-Fällung wurden zunächst die störende Lipide und Salze abtrennt und das Probenvolumens eingeengt: Zu 50 µl wässriger Probe wurden 400 µl Methanol zugegeben und gevortext, dann wurden 100 µl Chloroform zugesetzt, erneut gevortext und schließlich 300 µl Wasser (erneutes Vortexen) zupipettiert. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm, RT wurde die obere Phase abgenommen und die verbleibende wässrige Phase und die Interphase mit 400 µl Methanol versetzt. Bei erneuter Zentrifugation pelletieren die Proteine und können nach Trocknen bei RT enzymatisch verdaut werden.

Hierzu wurden die Pellets (50 - 100 µg) Protein nach der Chloroform-Methanol-Fällung in 5 µl 10fachem Denaturierungspuffer (NEB, Frankfurt am Main) aufgenommen, 5 µl Wasser zugesetzt und 10 min bei 100°C inkubiert. Diese Denaturierung ermöglicht den freien Zugang der Glykosydase zu allen Zuckerresten in den enthaltenen Proteinen. Dann wurden die Proben 1/5 mit Wasser verdünnt (40 µl) und 5 µl NP40 (10%) und 5 µl G7-Puffer (10fach) zugesetzt. Die Proben wurden nach kurzem Anzentrifugieren mit PNGaseF (1 µl pro 50 µg Protein, 500000 U/ml) oder Wasser als Negativkontrolle versetzt und 3 h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Chloroform-Methanol-Fällung konnten die Proben mit Proteinauftragspuffer gemischt und gelelektrophoretisch aufgetrennt werden.

2.3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western-Blot

Denaturierte Proteine in SDS- bzw. LDS-haltigem Probenpuffer aus TCA-Fällung, Zellyse oder Membranpräparation wurden durch vertikale Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (DTT) aufgetrennt. Als Größenmarker wurden je Gel 5 µl See BluePlus2 Prestained Standard eingesetzt (siehe 2.1.7).

Beim Einlaufen der Proben in das Sammelgel von SDS-PAGEs wurde eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt, bei Eintreten in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Bei Nu-PAGEs wurde eine Stromstärke von 30-60 mA gewählt. Die Länge des Laufs richtete sich nach der Prozentigkeit des Gels und der Größe der zu erwartenden Fragmente, in der Regel wurde der Lauf jedoch bei Auslaufen des Probenpuffer-Farbstoffs Bromphenolblau aus dem Gel beendet. Die Gele wurden mittels einer Semi-Dry-Apparatur (Biometra, Göttingen) auf PVDF-Membranen geblottet, als Transferpuffer diente Towbin-Puffer bzw. Nu-PAGE-Transferpuffer. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte für 1,75 h bei konstanter Stromstärke von 200 mA und Raumtemperatur. Anschließend erfolgte das Blocken der Membran für 1 h bei RT, um einer späteren unspezifischen Bindung der verwendeten Antikörper an die Membran vorzubeugen. Dazu wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern I-Block (Tropix, Bedford, MA (USA)) oder Milchpulver-Puffer verwendet. Die Inkubation mit dem Erstantikörper in entsprechender Blocking-Lösung erfolgte für 1 h bei RT in der vorgesehenen

Material und Methoden

Verdünnung (siehe Tabelle 3) und nachfolgend über Nacht im Kühlschrank. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit PBS/Tween- oder TBS/Tween-Puffer unter häufigem Wechsel der Waschlösung entfernt, bevor der Zweitantikörper in frischer Blocking-Lösung zugesetzt und 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen konnte der Blot entwickelt werden.

Der Protein-Nachweis auf der Membran des Western-Blots richtete sich nach dem verwendeten Zweitantikörper:

Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper

Der Blot wurde zweimal mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) gewaschen und anschließend für 5 min mit dem ECL-Reagenz inkubiert. Dieses setzte sich aus 5 ml der Tris-HCl-Lösung, 25 µl Luminol (250 mM in DMSO), 25 µl p-Cumarsäure (40 mM in DMSO) und 1,35 µl H₂O₂ (37%) zusammen. Dieses Reagenz bewirkt die Umsetzung des zyklischen Diacylhydrazids Luminol durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase. Die emittierte Chemilumineszenz lässt sich anhand der Schwärzung eines aufgelegten Films oder durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera nachweisen.

Alkalische Phosphatase-gekoppelter Zweitantikörper

Die Membran wurde mit dem CDP-Star Western-Blotting System nach Angabe des Herstellers (Tropix, Bedford, MA (USA)) entwickelt. Da dieses Reagenz nach Dephosphorylierung zu einer relativ starken und anhaltenden Lichtemission führt, ist es für die Aufnahme des emittierten Lichts mit der CCD-Kamera besonders geeignet.

³⁵S-markierter Zweitantikörper

Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte hierbei durch Auflegen einer lichtsensitiven Platte (Screen) nach der zweiten Waschprozedur und einer anschließenden einstündigen Trocknung an der Luft. Je nach zu erwartender Intensität der Signale und Aktivität des Antikörpers wurde der Screen für vier bis fünf Tage exponiert und dann mittels der BAS-Software ausgewertet (siehe 2.2.3).

Um die Auftragung gleicher Proteinmengen und die Effizienz des Western-Blot-Transfers zu überprüfen, wurden die Proteine auf der Membran nach der Entwicklung angefärbt. Dazu wurde die Membran 2 min mit dem Farbstoff Ponceau

(Roth, Karlsruhe) inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Wasser der Hintergrund entfärbt.

2.3.7 Quantifizierung von spezifischen mRNAs

2.3.7.1 RealTime-RT-PCR

Zur Quantifizierung von mRNA durch RealTime-RT-PCR wurde der QuantiTect-SYBR-Green One-Step-RT PCR-Kit (Qiagen, Hilden) in Kombination mit dem ABIPrism 7000 Cycler (Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)) eingesetzt.

Die RealTime Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ermöglicht die Darstellung eines PCR-Prozesses in Echtzeit, d.h. während der laufenden Reaktionszyklen (z.B. Bustin 2002). Eine Quantifizierung entstandener Amplifikate kann daher in der exponentiellen Phase der PCR, in der noch keine Substratlimitierung und Produkthemmung vorliegen, erfolgen.

Im hier verwendeten Kit wird die mRNA zunächst mittels spezifischer Oligonukleotide in cDNA umgeschrieben und dann durch PCR amplifiziert. Die Amplifikatsmenge wird dabei nach jedem Elongationsschritt der PCR quantifiziert. Hierzu dient der Farbstoff SYBR-Green, der an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet und in Abhängigkeit zur Menge der DNA zu einem Fluoreszenzsignal führt. Je stärker die zu messende mRNA Spezies in einer Probe vertreten ist, desto schneller entsteht eine über dem Hintergrund messbare Fluoreszenzemission bedingt durch die entstandenen Amplifikate. Der PCR Zyklus, bei dem ein Überschreiten der Basislinie erreicht wird, wird als „*threshold cycle*“ (Ct) bezeichnet. Er ist umso kleiner je mehr von der mRNA des Zielgens in einer Probe enthalten ist (siehe Abbildung 19).

Da der Farbstoff SYBRGreen sequenzunspezifisch an alle Fragmente doppelsträngiger DNA bindet, muss die Entstehung unspezifischer PCR-Produkte bzw. deren Detektion vermieden werden. Daher wurden die Oligonukleotide für die RealTime-RT-PCR mit der Software Primer Express (1.5 Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)) so ausgewählt, dass sie intronüberspannend waren. Dies verhindert PCR-Reaktionen an möglicherweise aus der Extraktion stammender chromosomaler DNA, da die Amplifikatlänge bei Miteinbeziehung des Introns zu

groß wäre, um effizient von den im Kit enthaltenen Polymerasen amplifiziert zu werden. Zudem wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass möglichst wenige Sekundärstrukturen ermöglicht wurden, auch dies dient der Vermeidung unspezifischer Nebenprodukte.

2.3.7.1.1 RT-PCR, Schmelzkurvenanalyse und Kontrolle der entstandenen Amplifikate im analytischen Agarose-Gel

Der Reaktionsmix (QuantiTect-SYBR-Green One-Step-RT PCR-Kit) wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) angesetzt, das Ansatzvolumen betrug 30 μ l. Es wurden Gemische der "forward"- und "reverse"-Oligonukleotide eingesetzt, so dass sie jeweils in einer Konzentration von 5 μ M vorlag. Pro Ansatz wurden 250 ng RNA ausgehend von Vorverdünnungen (50 ng/ μ l) zugesetzt.

Das PCR-Programm wurde wie folgt gewählt:

- (1) 30 min 50°C (Reaktion der reversen Transkriptase)
- (2) 15 min 95°C (Aktivierung der HotStartPolymerase)
- (3) 15 sec 94°C (Denaturierung)
- (4) 30 sec 55°C (Oligonukleotidanlagerung)
- (5) 30 sec 72°C (Polymerisationsreaktion)

Die Schritte 3-5 wurden zyklisch 45-mal wiederholt. Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgt während des Elongationsschrittes 5. Daher war die Oligonukleotidauswahl darauf auszurichten, dass die Amplifikate eine Schmelztemperatur von deutlich mehr als 72°C aufwiesen (zumeist 85°C).

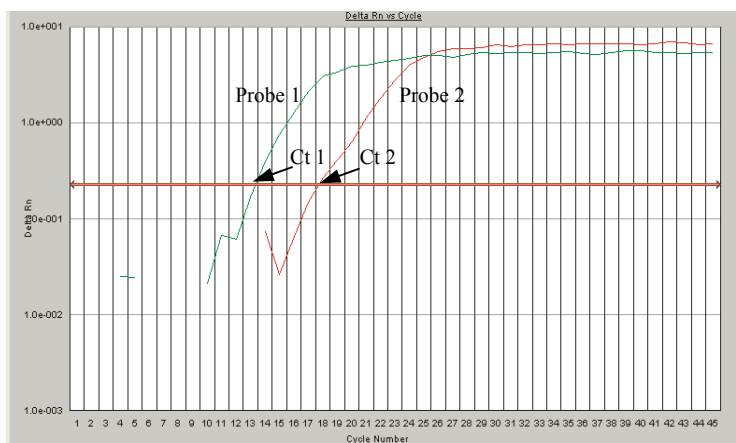


Abbildung 19: beispielhafte Darstellung eines PCR-Verlaufs bei der RealTime-RT-PCR

Die Abbildung zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität in logarithmischer Darstellung für zwei unterschiedliche Proben gegenüber der Zyklenzahl der ablaufenden PCR. Bei Durchkreuzen des manuell gesetzten „threshold“ (rot) durch die Intensitätskurven wird der „threshold-cycle“ (Ct) abgelesen, der ein Maß für die in der Probe enthaltene spezifische mRNA darstellt. Ein niedriger Ct (z.B. Probe 1: Ct 13) zeigt eine hohe

Konzentration der mRNA in der Probe an, während ein hoher Ct (z.B. Probe 2: Ct 17) eine niedrigere Ausgangskonzentration wiedergibt.

Zur Qualitätskontrolle wurden alle Proben eines RealTime-RT-PCR-Experiments einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen (siehe Abbildung 20). Bei Entstehung eines einzelnen spezifischen Amplifikats ist dabei lediglich ein Absorptionsmaximum durch die Freisetzung des SYBR-Green bei Aufschmelzen des doppelsträngigen Amplifikats definierter Länge zu erwarten.

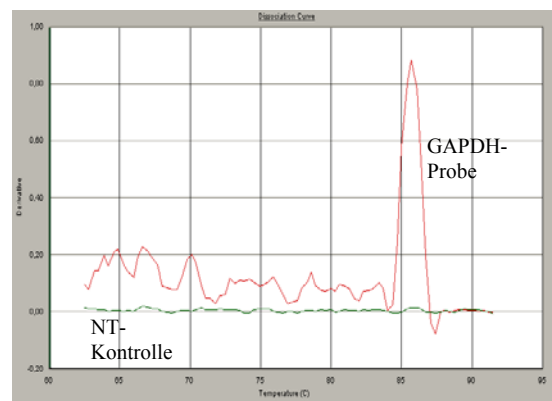


Abbildung 20: beispielhafte Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse zweier RealTime-RT-PCR-Probe

Dargestellt ist die Schmelzkurvenanalyse einer GAPDH-Probe und ihre zugehörige „no-template“-Kontrolle (NT, ohne Zusatz von RNA). Während im mRNA-haltigen Ansatz deutlich das Aufschmelzen des singulären DNA-Amplifikats als einzelnes Maximum zu erkennen ist, tritt bei der NT-Kontrolle lediglich ein Rausch-Signal auf, hier ist kein Amplifikat bei der PCR entstanden.

Zudem wurden exemplarische Proben und „no-template“-Kontrollen (ohne RNA-Zusatz) auf 1%igen Agarose-Gelen auf die Größe und Spezifität des Amplifikats untersucht.

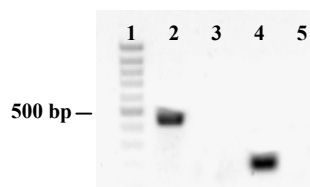


Abbildung 21: Beispiel einer Analyse von RealTime-RT-PCR-Proben auf einem 1%igen Agarose-Gel

Aufgetragen wurden je 10 µl aus einer RealTime-RT-PCR an Maus-Gehirn-mRNA (transgen für ADAM10) mit den Oligonukleotidpaaren GAPDH_for/rev (Spur 2) und hAD10ReTi_for/rev (Spur 4) bzw. die entsprechenden RNA-freien Negativkontrollen (3 und 5).

2.3.7.1.2 Effizienzermittlung aus Standardkurven und Auswertung

Effizienzermittlung der eingesetzten Oligonukleotide aus Standardkurven

Zur Auswertung einer RealTime-RT-PCR ist es notwendig zu wissen, ob alle eingesetzten Oligonukleotidpaare eine optimale Effizienz in der PCR-Reaktion aufweisen. Nur dann sind die erhaltenen Ct-Werte einer zu untersuchenden mRNA unmittelbar mit der RNA des Kontrollgens (GAPDH) zu korrelieren. Zur Beurteilung der Oligonukleotid-Effizienz wurden Standardkurven aufgenommen. Diese wurden anhand einer RNA-Probe des zu untersuchenden Materials (Maus-Gehirn bzw. Zellen) angefertigt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe mit Faktor 1/10 aus der unverdünnten RNA in der RealTime-RT-PCR mit den zu untersuchenden Oligonukleotidpaaren analysiert. Aus den ermittelten Ct-Werten wurde eine Standardkurve erstellt und die Steigung der Geraden berechnet (siehe Abbildung 22).

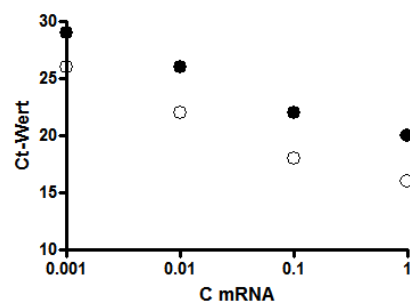


Abbildung 22: Standardkurve der Ct-Werte einer Verdünnungsreihe von zellulärer mRNA

Die Messreihe wurde ausgehend von unverdünnter RNA aus SH-SY5Y-Zellen mit den Oligonukleotidpaaren für humanes ADAM10 (●) und GAPDH (○) aufgenommen. Es wurden Duplikate jeder Verdünnungsstufe gemessen. Gleichungen der Regressionsgeraden: hADAM10: $y = -3,21x + 35,51$; GAPDH $y = -3,23x + 32,85$.

Bei der Annahme einer Verdopplung der Amplifikate pro PCR-Zyklus ergibt sich aus dem Faktor 10 zwischen den Verdünnungsstufen: $10 = 2^{(-x)}$, wobei x die Anzahl der Zyklen angibt. Bei einer optimalen (100%igen) Effizienz, muss eine solche Standardkurve eine Steigung von $-3,2$ bis $-3,3$ aufweisen, da $10 \approx 2^{(-(-3,3))}$ (siehe Geradengleichungen der Abbildung 22).

War die Effizienz anhand der Standardkurve als ausreichend ermittelt, so konnte die Auswertung durch direkte Korrelation der Ct-Werte des Zielgens mit dem Normalisierungsgen (GAPDH) anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode erfolgen (siehe

nachfolgenden Abschnitt). Wicht die Effizienz jedoch zu stark von dem geforderten Optimum ab, so musste die Auswertung anhand einer bei der Proben-Analyse jeweils zeitgleich durchgeführten Standardkurve erfolgen. Die relative Menge an einer Zielgen-mRNA wurde dann über die aus der Standardkurve resultierenden Geradengleichung berechnet.

Bsp.

Ct-Wert Zielgen: $y = 8$

ermittelte Gleichung der Standardkurve: $y = -2,9335 x + 17,281$

Relative Menge an mRNA

$$x = 10^{(8-17,281)/-2,9335} = 1500$$

Aus dieser relativen mRNA-Menge wurde ein Quotient mit der ebenso ermittelten relativen Menge an Normalisierungsgen-mRNA gebildet:

$$Q = \text{Relative Menge an mRNA Zielgen} / \text{relative mRNA GAPDH}$$

Die so berechneten Quotienten von Kontrollzellen und behandelten Zellen bzw. Kontrolltieren und transgenen Tieren konnten nun verglichen werden.

Auswertung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Bei ausreichender Effizienz der Oligonukleotidpaare konnte die Auswertung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode erfolgen. Hierbei werden die Ct-Werte der Kontrollgruppe und die der behandelten Gruppe direkt miteinander wie folgt verrechnet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-((\text{Ct ZielgenA}-\text{Ct NormatorA})-(\text{Ct ZielgenB}-\text{Ct NormatorB}))}$$

Bsp.: A: Retinsäure-behandelte Zellen, B: Kontrollzellen

Zielgen: ADAM10, Normator: GAPDH

Ct-Wert ADAM10 für A: 20

Ct-Wert ADAM10 für B: 21

Ct-Wert GAPDH für A: 16

Ct-Wert GAPDH für B: 16

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-((20-16)-(21-16))} = 2$$

$$\Delta\Delta\text{Ct in \%} = 200$$

In dem vorangestellten Beispiel ergäbe sich aus der Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes, dass in Retinsäure-behandelten Zellen die ADAM10-mRNA auf 200% im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist.

Material und Methoden

2.3.7.2 Promotor-Test zum Nachweis transkriptioneller Aktivität von Reporterkonstrukten

2.3.7.2.1 Luciferase-Reporter-Test

Zum Nachweis der Genexpression nach Aktivierung des Notch-Signalweges oder nach Einsatz NFκB-modulierender Substanzen wurden sogenannte Reporter-Konstrukte verwendet. Hierzu wurde die cDNA für die Luciferase aus *Photinus pyralis* unter die Kontrolle eines spezifischen Promotors oder aber unter die Kontrolle eines TATA-Box-ähnlichen Promotors in Kombination bestimmter regulatorischer Elemente wie z.B. der NFκB-Bindungsstelle gestellt. Die Luciferase des Glühwürmchens (*Firefly*) ist ein 61 kDa großes monomeres Protein, das nicht posttranslational prozessiert wird und daher direkt als Reporter für Genaktivität nach der Translation fungieren kann. Dabei werden Photonen durch Oxidation des Käfer-Luciferins (*Beetle Luciferin* in Abbildung 23) unter Umsatz von ATP und Sauerstoff emittiert.

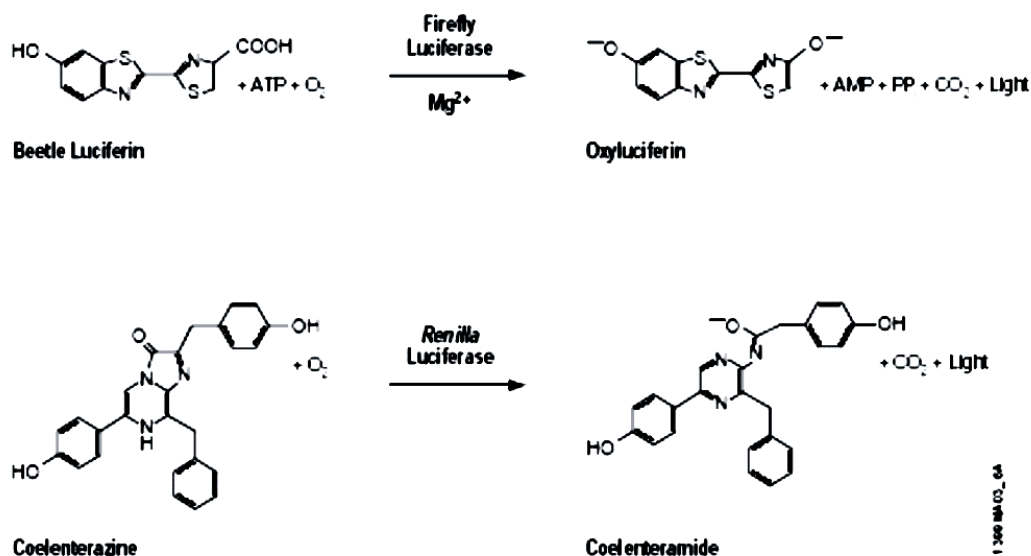


Abbildung 23: Luciferase-katalysierte biolumineszente Reaktionen im dualen Luciferase-Reporter-Test (Promega, Madison, WI (USA))

Zur Bestimmung der Genexpression wurden Zellen auf 24 Loch-Platten ausgesät und nach Adhärenz und Erreichen von ca. 80% Konfluenz mit dem entsprechenden Luciferase-Konstrukt unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Paisley (UK), siehe 2.3.3.2.5) transfiziert. Es wurden 400 ng des Reporterkonstrukts eingesetzt, gleichzeitig konnten weitere cDNAs cotransfiziert werden, um einen

regulatorischen Einfluss zu überprüfen. Es wurden Duplikate oder Triplikate jedes Ansatzes im Versuch eingesetzt. 6 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium ausgetauscht und eventuell Expressions-modulierende Substanzen für eine Übernacht-Inkubation zugesetzt.

24 bzw. 48 h nach Transfektion wurde der Kulturüberstand abgesaugt, die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit 100 µl passivem Lysispuffer (Dual Luciferase Reporter Test System; Promega, Madison, WI (USA)) lysiert. Zur Unterstützung der Lyse wurde die 24 Loch-Platte für mindestens 1 h bei -20°C gelagert. Nach diesem Gefrierzyklus konnten die Lysate zur Detektion der gebildeten Luciferase-Menge anhand der katalytischen Aktivität in den Lysaten eingesetzt werden.

Hierzu wurde das Luciferase Reporter-Test-System von Promega verwendet. 5 bis 10 µl der Lysate wurden in Triplikaten in die Vertiefungen einer weißen Lumitrac-Platte (96-Loch-Platte; Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Dann wurden durch den Injektor des Luminometers FluoStarOptima (BMG, Bedford, MA (USA)) 40 µl *Firefly*-Luciferase-Substrat (LARII) zugesetzt, durch orbitales Schütteln der Platte mit dem Lysat vermischt und die Photonenemission gemessen.

Zur Normierung der so erhaltenen RLU (relative Lichteinheiten) konnte zum einen die Proteinmenge im jeweiligen Lysat herangezogen werden. Eine weitere Möglichkeit bot die Normierung auf eine zweite unabhängige Reporter-Aktivität. Dafür wurde der Renilla-Luciferase-Reporter-Vektor phRL-SV40 (Promega, Madison, WI (USA)) verwendet. 200 ng dieses Vektors wurden mit den *Firefly*-Luciferase-Konstrukten cotransfiziert. Der Kontroll-Reporter-Vektor enthält die für Säugerzellen Codon-optimierte cDNA für die Luciferase aus der Weichkoralle *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Dieser erlaubt die starke, konstitutive Expression in einer Vielzahl von Zelllinien. Durch die Abstammung dieser Luciferase aus einer evolutiv betrachtet weit entfernten Tiergruppe, unterscheidet sich das Enzym in seiner Struktur und den Ansprüchen an das Substrat und Cofaktoren ausreichend, um sequentiell die enzymatische Aktivität der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase in einem Ansatz zu bestimmen. Dazu wird im Dualen Luciferase Reporter Test zunächst LARII als Substrat der *Firefly*-Luciferase zugesetzt und die Photonenemission bestimmt. Dann wird das Substrat für die *Renilla*-Luciferase

Material und Methoden

zugesetzt. Dieses beinhaltet neben dem Coelenteraten Luciferin (*Coelenterazine* in Abbildung 23) auch EDTA, das durch Chelatisieren der für die Katalyse notwendigen Magnesiumionen die *Firefly*-Luciferase-Reaktion vollständig stoppt. Dadurch wird die Detektion von Photonen allein aus der Reaktion der *Renilla*-Luciferase ermöglicht.

2.3.7.2.2 EGFP-Reporter-Test

Das Luciferase-Reporter-System (siehe 2.3.7.2.1) war nicht für den Nachweis der NFκB-Aktivitätshemmung durch CAPE geeignet, da der Apoptose-Induktor zu einer Inhibierung der katalytischen Aktivität der Luciferase (siehe nachfolgende Abbildung) unabhängig von der Transkription führte.

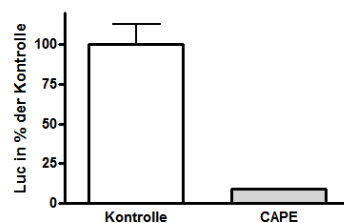


Abbildung 24: Inhibitorischer Einfluss von CAPE auf die enzymatische Aktivität der *Firefly*-Luciferase

Zu den Lysaten von unbehandelten Kontrollvektor (pTAL-Luc)-transfizierten Zellen wurde CAPE (25 µg/ml) bzw. das Lösungsmittel zugesetzt. Dann erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität im Promotor-Test (Promega, Madison, WI (USA)).

Daher wurde hierfür ein EGFP-Reporter-Test angewandt, der nicht durch CAPE beeinflusst wurde (Klonierung der EGFP-Konstrukte, siehe 2.1.8.1). Hierzu wurde die cDNA für das rot-verschobene EGFP aus der Qualle *Aequora victoria* unter die Kontrolle eines TATA-Box-ähnlichen Promotors in Kombination mit einer NFκB-Bindungsstelle gestellt. SKNMC-Zellen wurden mit den EGFP-Konstrukten wie unter 2.3.7.2.1 beschrieben transfiziert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand abgesaugt und die Zellen wie für den Luciferase-Test beschrieben geerntet. Die Messung erfolgte mit 30 µl der Lysate in Duplikaten in schwarzen 96-Loch-Platten (Greiner, Frickenhausen). Die Proben wurden mit Licht einer Anregungswellenlänge von 485 nm im Fluometer FluoStarOptima (BMG, Bedford, MA (USA)) bestrahlt und die emittierte Fluoreszenz bei 530 nm detektiert. Zur Normierung der so erhaltenen Fluoreszenzen wurde die Proteinmenge im jeweiligen Lysat herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Spaltung des APP-verwandten APLP2 durch die α -Sekretasen ADAM10 und 17

3.1.1 *In vitro*-Spaltung eines APLP2-Peptids

Für eine erste Untersuchung der Proteolyse von APLP2 durch die α -Sekretasen wurde ein HPLC-basierender *in vitro*-Test eingesetzt. Das APLP2-Peptid wurde in Analogie zu dem in Lammich et al. (1999) beschriebenen APP18-Peptid ausgewählt und umfasst die 18 Aminosäuren vor dem Transmembranbereich des humanen Proteins: **NH₂-EERESVGPLREDFSLSSS-CONH₂**.

Das Peptid wurden mit den rekombinanten Enzymen ADAM10 bzw. TACE (siehe 2.1.5.2) inkubiert und die mögliche Proteolyse durch UV-Absorption im Elutionsprofil verfolgt.

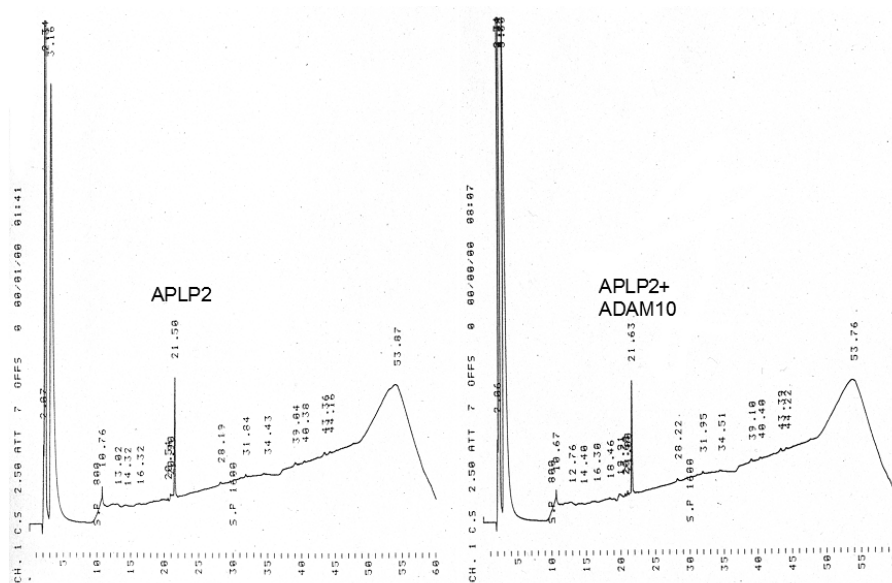


Abbildung 25: Elutionsprofile der HPLC zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des APLP2-Peptids durch 100 ng rekombinantes ADAM10

1,5 μ mol Peptid wurden mit 100 ng des rekombinanten ADAM10 bzw. einem adäquaten Volumen an Test-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde mit TFA abgestoppt und der gesamte Ansatz auf die HPLC aufgetragen. Die Retentionszeiten betragen 21,5 min für das APLP2-Peptid im Kontrollansatz und 21,63 min für das Peptid im ADAM10-haltigen Ansatz.

Durch Zusatz von 100 ng des rekombinanten Enzyms nahm weder das ungespaltene Peptid ab, noch waren neue Absorptionssignale nachzuweisen, die das Vorliegen einer Proteolyse angezeigt hätten (siehe Abbildung 25). Daher wurde ein weiterer Ansatz mit erhöhter Enzym-Menge (500 ng) und ein paralleler Ansatz mit rekombinantem TACE (500 ng) durchgeführt. Auch durch eine erhöhte Menge an rekombinanten Proteinasen wurde das APLP2-Peptid nicht gespalten, was an den unveränderten Integralen des ungespaltenen Peptids und am Fehlen neuer Fragmente mit abweichender Retentionszeit zu erkennen war (nicht abgebildet).

3.1.2 Spaltung von endogenem und überexprimiertem APLP2 im zellulären System

Eine deutlich physiologischere Umgebung zur Untersuchung proteolytischer Prozesse - insbesondere für membranständige Proteine - bietet die Zellkultur. Anhand von Inhibitoren, Stimulatoren, Überexpression oder gezieltem Ausschalten eines Genprodukts, können hier die funktionellen Zusammenhänge eines Prozessierungsereignisses untersucht werden. Zudem kann die Bedeutung eines Spaltereignisses vor dem Hintergrund verschiedener Zellarten (z.B. peripher oder neuronal) beurteilt werden.

3.1.2.1 Induktion der Proteolyse von APLP2 durch den Phorbol-ester PMA

Ein wichtiger Hinweis für die Beteiligung von Metalloproteinasen an einer proteolytischen Prozessierung ist die Induzierbarkeit der Proteolyse durch Phorbol-ester. Für zahlreiche Substrate der ADAMs und MMPs ist eine Steigerung über das Maß der konstitutiven Proteolyse hinaus durch z.B. PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetat) beschrieben. So führte die Inkubation von HEK 293 mit PMA zu einer starken Induktion der APP α -Sekretion (Lammich et al., 1999) und auch andere Substrate wie z.B. VCAM-1 (Garton et al., 2003) oder pro-EGF (Le Gall et al., 2003) werden bei Applikation von Phorbol-estern vermehrt sekretiert. Die Wirkungsweise der Phorbol-ester ist dabei nicht im Detail aufgeklärt, man vermutet jedoch, dass die Rekrutierung der Proteinkinase C (PKC) an die Membran durch diese Substanzgruppe eine Rolle spielt.

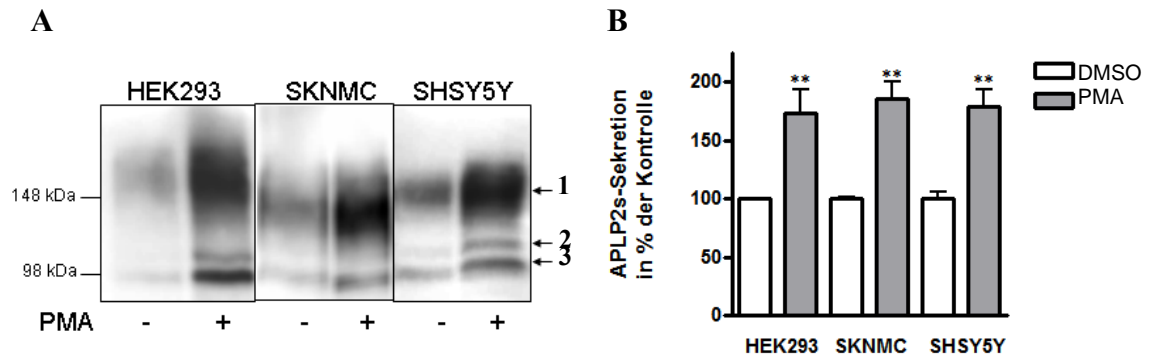


Abbildung 26: Einfluss von PMA auf die Sekretion von endogenem APLP2 in HEK 293-, SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden 4,5 h mit 1 μ M PMA bzw. dem adäquaten Volumen DMSO in FCS-freiem Medium inkubiert. Die TCA-gefällten Proteine der Kulturüberstände wurden in Volumina entsprechend der Proteinkonzentration der zugehörigen Zelllysate auf einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des sekretierten APLP2s erfolgte durch den Antikörper D2II und einem alkalische-Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper (1: CS-GAG-modifiziert; 2: glykosyliert; 3: unmodifiziert). B) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot bestimmten Mengen an sekretiertem APLP2: Die Quantifizierung wurde anhand digitalisierter Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

In allen drei Zelllinien waren zwei hauptsächliche Isoformen des löslichen APLP2 (APLP2s) zu beobachten: Die Bande mit der größten Laufweite im SDS-Gel (95 kDa) (siehe Abbildung 26 A/3) entspricht dem unmodifizierten Protein, die heterogenen Polypeptide von 150 bis 200 kDa (siehe Abbildung 26 A/1) sind der CS-GAG-modifizierten Form (siehe Abbildung 8) zuzuordnen. Zudem findet sich eine schwächere Bande bei 120 kDa (Abbildung 26 A/2), die der glykosilierten, aber nicht-CS-GAG-modifizierten Proteinform entspricht.

Sowohl in der embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 als auch in den Neuroblastoma-Zellen (SKNMC und SH-SY5Y), war eine Induktion der APLP2s-Sekretion durch PMA feststellbar (siehe Abbildung 26). Diese betraf alle drei Proteinformen und führte zu einer signifikanten Erhöhung der Ektodomänenmenge im Zellkulturüberstand (ca. 180% verglichen mit den Kontrollzellen).

Ergebnisse

3.1.2.2 Einfluss von Hydroxamsäure-basierenden Inhibitoren auf die Proteolyse von überexprimiertem APLP2

Durch Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem Vektor pIREShyg-APLP-2-763 (siehe 2.1.8.1) und nachfolgende Selektion mit HygromycinB wurde eine stabile Zellpopulation etabliert, die als HEK-APLP-2-763 bezeichnet wurde. Die Überexpression des murinen APLP2 wurde im Western-Blot nachgewiesen.

Um zu überprüfen, ob Metalloproteinasen an der Sekretion von überexprimiertem APLP2 beteiligt sind, wurden Hydroxamsäure-Inhibitoren eingesetzt, welche die Mehrzahl der Metalloprotease-vermittelten Ektodomänen-Freisetzungen unterbinden (z.B. Arribas et al., 1997; Lum und Blobel, 1997).

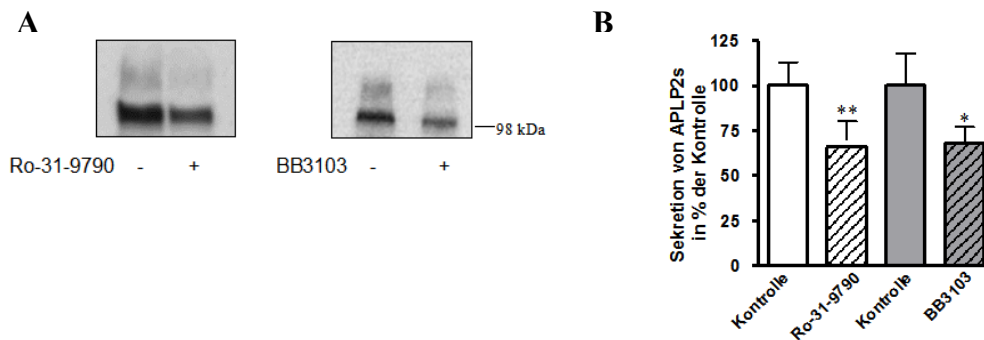


Abbildung 27: Einfluss der Hydroxamsäure-Inhibitoren BB3103 und Ro-31-9790 auf die Sekretion von überexprimiertem APLP2-763 in HEK 293-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots zum Nachweis von APLP2s: Die Zellen wurden mit den Inhibitoren für 4,5 h inkubiert (für Ro-31-9790 (30 μ M) erfolgte eine 18stündige Vorinkubation; BB3103 (100 μ M) wurde direkt zugesetzt). Die TCA-gefällten Proteine der Kulturüberstände wurden auf einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch den Antikörper D2II und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der Mengen an sekretiertem APLP2 aus drei unabhängigen Experimenten: Die Quantifizierung wurde anhand digitalisierter Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, die Signifikanzniveaus wurden mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

Die Abbildung 27 zeigt, dass das in den Zellüberstand sezernierte murine APLP2-763 in den selektionierten Zellen im wesentlichen aus den glykosylierten Formen besteht. Die CS-GAG-Modifikation tritt in den Hintergrund und beruht vermutlich auf dem endogen exprimierten mit-detektierten humanen Protein. Dies stimmt mit Angaben aus der Literatur überein (Thinakaran et al., 1995; Sandbrink et al., 1994),

denen zufolge die neuronal dominierende Isoform 763 des APLP2 nicht durch Chondroitinierung modifiziert wird.

Für beide Inhibitoren ergab sich eine signifikante, wenn auch relativ geringe Inhibition der APLP2s-Freisetzung auf ca. 70% der Kontrolle (siehe Abbildung 27). Das geringe Ausmaß des inhibitorischen Einflusses der Hydroxamsäure-Derivate auf die Proteolyse von APLP2 könnte daran liegen, dass zum einen ein starkes Überangebot an APLP2 als potentiellm Substrat für die Metalloproteinasen vorlag. Zum anderen könnten aber auch andere Proteasen an der APLP2-Prozessierung beteiligt sein, die insensitive für die eingesetzten Inhibitoren sind.

3.1.2.3 Inhibitor-Spektrum der Proteolyse von endogenem APLP2

Um genauer einzugrenzen, welche Proteasen an der Sekretion der APLP2-Ektodomäne beteiligt sind, wurden die Inhibitionsversuche an endogenem APLP2 fortgesetzt. Dies entspricht eher der physiologischen Bedingung als dem Überangebot des untersuchten Substrates durch Überexpression (siehe 3.1.2.2). Die Untersuchungen wurden an zwei Zelllinien durchgeführt: Zum einen an der peripheren Nieren-Zelllinie HEK 293 und zum anderen an der Neuroblastoma-Zelllinie SKNMC. Aus Vergleichszwecken und als interne Kontrolle wurde auch die Prozessierung von APP untersucht.

3.1.2.3.1 Anreicherung der C-terminalen Spaltfragmente durch Inhibition der γ -Sekretase

Neben dem freigesetzten, löslichen APLP2 (siehe z.B. Abbildung 26) entstehen durch die Proteolyse auch in der Membran verbleibende C-terminale Fragmente. Um zu überprüfen, ob die zu detektierenden C-terminalen Spaltfragmente nicht auf die Aktivität von γ -Sekretasen zurückzuführen waren, die bereits als APLP2-spaltende Proteasen identifiziert sind (Scheinfeld et al., 2002; Walsh et al., 2003), wurde in HEK 293- und SKNMC-Zellen der γ -Sekretase-Inhibitor DAPT eingesetzt.

Ergebnisse

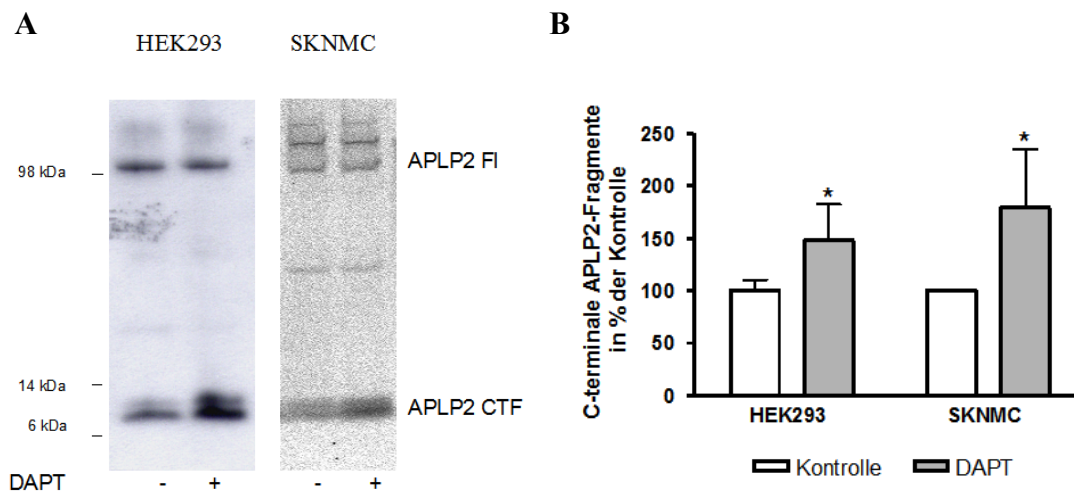


Abbildung 28: Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT auf die membranständigen Proteinspezies von APLP2 in HEK 293- und SKNMC-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots zum Nachweis der membranständigen APLP2-Proteinspezies: Die Zellen wurden 18 h mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (2 μ M) bzw. dem adäquaten Volumen an DMSO in Kulturmedium vorinkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und entsprechend ihrem Proteingehalt in Nu-PAGE-Auftragspuffer lysiert. Die Proteine wurden auf einer 4-12%igen Nu-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis erfolgte durch den Antikörper CT12 und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten (für HEK 293) bzw. einen 35 S-markierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper (für SKNMC). B) Quantifizierung der APLP2-C-terminalen Fragmente aus drei unabhängigen Experimenten: Die Quantifizierung wurde anhand der mit der CCD-Kamera oder dem BAS-Reader aufgenommenen Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

Sowohl in HEK 293 als auch der neuronalen Zelllinie SKNMC sind neben der ungespaltenen Form des APLP2 (APLP2FL) auch Proteinfragmente von einer Größe zwischen 6 und 14 kDa nachzuweisen (siehe Abbildung 28). Dabei sind zwei C-terminale Fragmente (CTF) zu erkennen, die jedoch aufgrund sehr ähnlicher Größe als Doppelbande im Gel erscheinen.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine deutliche Zunahme der beiden C-terminalen Spaltfragmente bei Inkubation mit dem γ -Sekretase-Inhibitor: In HEK 293-Zellen erhöhte DAPT die CTF auf 150%, in SKNMC-Zellen auf ca. 175%. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen C-terminalen Spaltfragmenten um Substrate der γ -Sekretase, nicht aber um deren Spaltprodukte handelt. In Analogie zu APP könnten diese Spaltfragmente durch die Aktivität sowohl der α - als auch der β -Sekretase zustande kommen.

In einer neueren Publikation (Eggert et al., 2004) wurde versucht die Spaltstellen der einzelnen Proteasen, die vermutlich an der Prozessierung von APLP2 beteiligt sind, durch Größenvergleich mit Deletionsmutanten des APLP2 zu identifizieren.

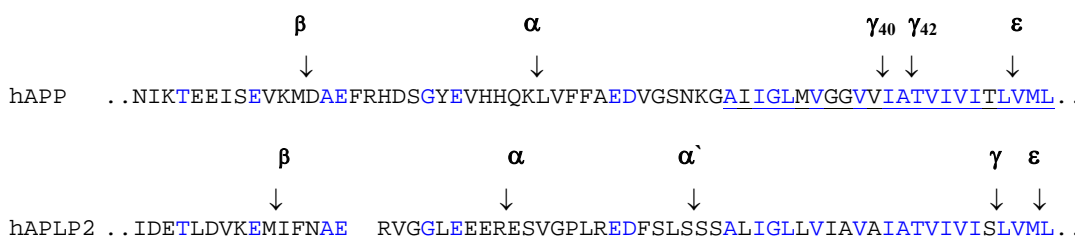


Abbildung 29: Spaltstellen von APP und APLP2 (nach Eggert et al., 2004)

Die Abbildung zeigt die potentiellen Protease-Spaltstellen im APLP2 (Eggert et al., 2004) und stellt diese den Spaltstellen im APP gegenüber. Die γ -Sekretase-Spaltstelle im APLP2 entstammt der Publikation von Gu et al. (2001).

Um die im Western-Blot an endogenem APLP2 beobachteten C-terminalen Spaltfragmente besser zuordnen zu können, wurden die theoretischen Molekulargewichte der einzelnen C-terminalen Fragmente bestimmt.

C-terminales Fragment	Aminosäuresequenz	Molekulare Masse [kDa]
α -ähnlich	ESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIAVAIATVIVISLVMLRKRQYGTISHGIVEVDPMLTPEERHLNKMQNHGYENPTYKYLEQMQI	9,6
α' -ähnlich	SSALIGLLVIAVAIATVIVISLVMLRKRQYGTISHGIVEVDPMLTPEERHLNKMQNHGYENPTYKYLEQMQ	8
β -ähnlich	IFNAERVGGLEEEERESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIAVAIATVIVISLVMLRKRQYGTISHGIVEVDPMLTPEERHLNKMQNHGYENPTYKYLEQMQI	11
ϵ -ähnlich	LRKRQYGTISHGIVEVDPMLTPEERHLNKMQNHGYENPTYKYLEQMQI	5,8

Tabelle 7: Molekulargewichte der C-terminalen Spaltfragmente des humanen APLP2

Dargestellt sind die von Eggert et al. (2004) vermuteten C-terminalen APLP2-Spaltfragmente und die aus der Aminosäuresequenz resultierenden Molekulargewichte (berechnet mit dem Programm *Peptide Properties Calculator* (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/proteincalc.html>)).

Die Berechnung der Molekulargewichte (siehe Tabelle 7) berücksichtigt keine potentiellen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen, sondern basiert rein auf dem Molekulargewicht der enthaltenen Aminosäuren. Dennoch kann man schlussfolgern, dass die beobachteten C-terminalen Fragmente vermutlich nicht das ϵ -ähnliche Spaltprodukt darstellen, da dieses unterhalb der 6 kDa-Markerbande

Ergebnisse

laufen sollte. Beide C-terminalen Proteolyseprodukte laufen im SDS-Gel zwischen der 6 und der 14 kDa-Bande sehr dicht beieinander (siehe Abbildung 28). Dies legt nahe, dass es sich um die beiden α - und α' -ähnlichen Stubs handeln könnte, die rechnerisch lediglich um 1,6 kDa differieren. Allerdings weicht auch das β -ähnliche Fragment im Molekulargewicht nur um ca. 1,4 kDa vom α -ähnlichen Fragment ab und kommt damit auch als Kandidat für den größeren der beiden Proteinfragmente in Frage. Eine genauere Charakterisierung der beiden Spaltprodukte sollte sich aus den nachfolgenden Experimenten mit dem β -Sekretase-Inhibitor ergeben.

3.1.2.3.2 Inhibition der APLP2-Proteolyse durch den β -Sekretase-Inhibitor II
Bei Nachweis des löslichen APLP2 in Zellkulturüberständen ergibt sich die Schwierigkeit, dass das Epitop des eingesetzten Antikörpers D2II N-terminal zur vermeintlichen α - und β -ähnlichen-Spaltstelle liegt und daher keine Diskriminierung zwischen dem Spaltprodukt der β - und der α -Sekretase erlaubt.

```
mAPLP2      EIQEEIDELLQEQRADMDQFTSSISENPVDVRSSEEESEIIPPFHPLHFPFSLSENE
hAPLP2      EIQEEIDELLQEQRADMDQFTASISETPVDVRSSEEESEIIPPFHFPFHPALPENE

mAPLP2      GSGMA-----EQDGGGIGAEKVINSKNKMDENMVIDETLDVKEM#IFNAE
hAPLP2      DTQPELYHPMKKGGVGEQDGGGIGAEKVINSKNKVDENMVIDETLDVKEM#IFNAE

mAPLP2      RVGGLEEEP*ESVGPLREDFSLSSNALIGLLVIAVAIATVIVISLVMLRK
hAPLP2      RVGGLEER*ESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIAVAIATVIVISLVMLRK
```

Abbildung 30: Lage des Epitops des Primärantikörpers D2II und der potentiellen α - und β -ähnlichen Spaltstellen (siehe Abbildung 29) in murinem und humanem APLP2

Dargestellt ist eine Teilsequenz beider Proteine, die das Antikörper-Epitop (grau unterlegt) und die potentiellen Spaltstellen (* α -ähnlich; # β -ähnlich) beider Proteine sowie die Transmembrandomäne (unterstrichen) beinhaltet.

Daher ist bei Untersuchungen zur Spaltung des APLP2 zu berücksichtigen, dass das freigesetzte APLP2 aus verschiedenen Spaltereignissen stammen kann.

Der zur Untersuchung der Beteiligung der β -Sekretase BACE an der APLP2-Proteolyse eingesetzte zellpermeable Inhibitor ist ein Tripeptid (Z-VLL-CHO), das mit der β -Sekretase-Spaltstelle aus der Schwedischen Mutante des APP (VNL-DA)

übereinstimmt und effizient die β -Spaltung von wt-APP751 in CHO-Zellen inhibiert (Abbenante et al., 2000).

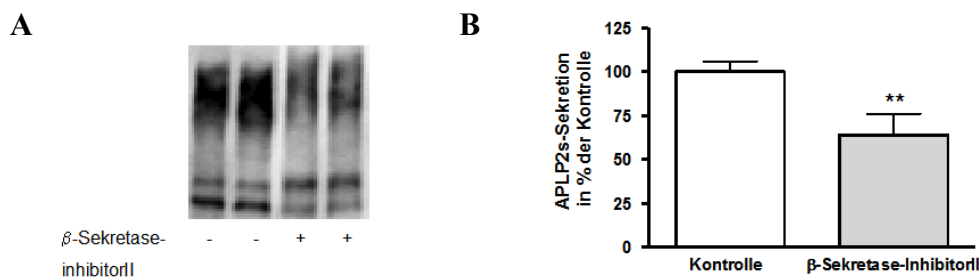


Abbildung 31: Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II auf APLP2s in HEK 293-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden 18 h mit 25 μ M des β -Sekretase Inhibitors II bzw. dem adäquaten Volumen DMSO in Kulturmedium vorinkubiert, dann erfolgte die Sekretion für 4,5 h unter Zusatz von frischem Inhibitor. Der Nachweis des sekretierten APLP2s erfolgte wie in Abbildung 27 beschrieben durch den Antikörper D2II und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der ermittelten Mengen an sekretiertem APLP2: Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

Der gegen die β -Sekretase gerichtete Inhibitor II führte bei Inkubation von HEK 293-Zellen zu einer signifikanten Verminderung des sekretierten APLP2s auf ca. 70% (siehe Abbildung 31). Dies ergänzt Angaben aus der Literatur, die durch Überexpression von BACE-1 eine Steigerung des löslichen Spaltprodukts in APLP2-überexprimierenden COS-7-Zellen (Pastorino et al., 2004) bzw. von C-terminalen Spaltprodukten in HEK 293 (Li und Sudhof, 2004) zeigten.

Um zu überprüfen, ob APLP2 auch in Zellen neuronalen Ursprungs durch BACE-1 gespalten wird, wurde die Astroglioma-Zelllinie U373-hwtAPP unter dem Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II untersucht. Diese Zelllinie wurde verwendet, da sie humanes APP überexprimiert und daher die Auswirkung des Inhibitors auf die APPs β -Entstehung verdeutlichen kann. In neuronalen Zellen ist das Verhältnis von β - zu α -Spaltung von APP ca. 1:10, so dass der Nachweis des APPs β ohne vorherige Aufkonzentrierung schwer möglich ist.

Ergebnisse

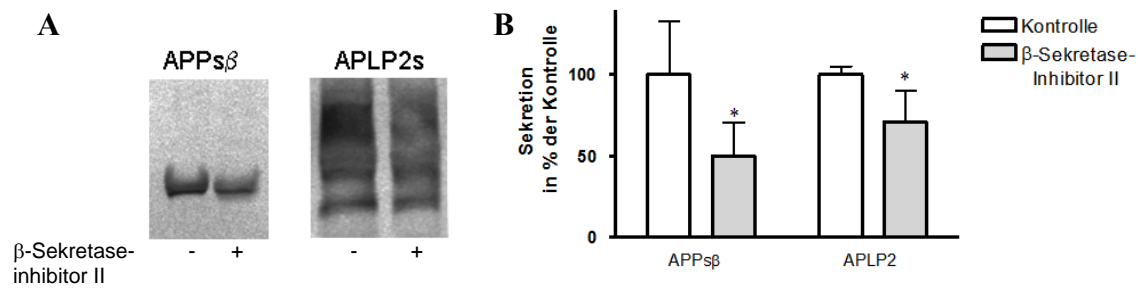


Abbildung 32: Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II auf APPs β und APLP2s in U373hwtAPP-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden wie in Abbildung 31 beschrieben inkubiert. Der Nachweis des sekretierten APPs β und APLP2s erfolgte durch die Antikörper 192Wt bzw. D2II und einen ^{35}S -markierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot ermittelten Mengen an sekretiertem APPs β und APLP2: Die Quantifizierung wurde anhand der mit BASReader aufgenommenen Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$) bestimmt.

Die Verminderung von APPs β in den Astroglioma-Zellen auf 50% im Vergleich zu Kontrollzellen verdeutlichte die inhibitorische Aktivität des Tripeptids (siehe Abbildung 32). Die Sekretion des APLP2s war - wie auch in HEK 293-Zellen (siehe Abbildung 31) - auf 70% verringert. Das erzielte Ergebnis lässt jedoch keine Aussage über die Präferenz der β -Sekretase in Bezug auf die Substrate APP und APLP2 zu, da wie bereits beschrieben (siehe Abbildung 30) das sekretierte APLP2 hier als Summe der α - und β -Spaltung nachgewiesen wird. Dennoch zeigte der Einsatz dieses Inhibitors, dass die β -Sekretase an der Prozessierung des APLP2 in Astrogliazellen beteiligt ist.

Der Einsatz des β -Sekretase-Inhibitors sollte zudem eine Zuordnung der C-terminalen Spaltfragmente, die als Substrate der γ -Sekretase identifiziert worden waren (siehe 3.1.2.3.1), ermöglichen. Um den Nachweis der C-terminalen Spaltfragmente zu verbessern, wurden sowohl die Kontroll- als auch die β -Sekretase-Inhibitor-behandelten Zellen zeitgleich mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT vorinkubiert.

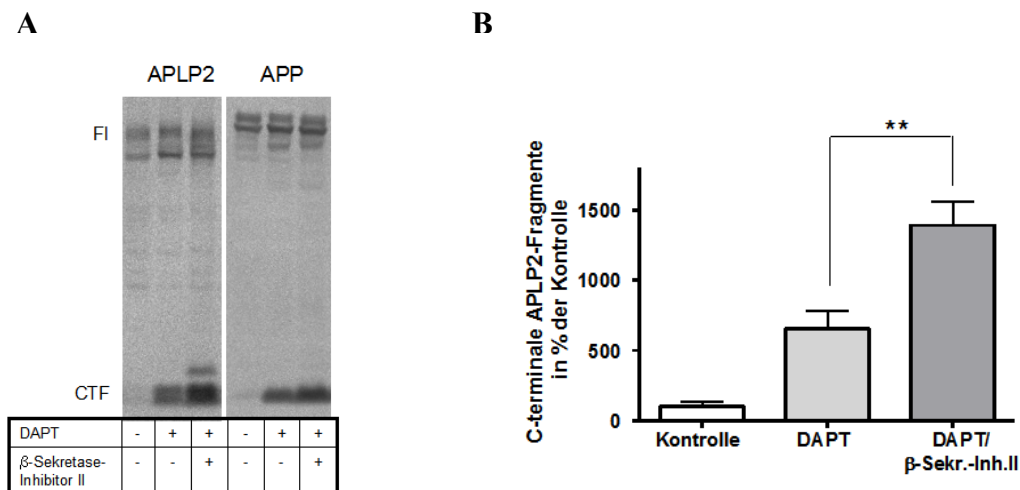


Abbildung 33: Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II auf die C-terminalen membranständigen Proteinspezies von APP und APLP2 in U373hwtAPP-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden 18 h mit 25 μ M des β -Sekretase Inhibitors II und/oder 2 μ M DAPT bzw. dem adäquaten Volumen DMSO in Kulturmedium vorinkubiert. Dann wurden die Zelllysate auf einer 4-12%igen Nu-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des zellulären APLP2 und APP erfolgte durch die Antikörper CT12 bzw. 6687 und 35 S-markierte anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot nachgewiesenen Mengen an zellulärem APLP2. Die Quantifizierung wurde mit der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

Bei Untersuchung der membranständigen Proteinfragmente zeigte sich eine Zunahme der C-terminal nachzuweisenden α -Spaltprodukte des APP unter dem Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors (siehe Abbildung 33, rechter Abschnitt des Western-Blots). Eine parallele Abnahme des β -Spaltprodukte war nicht zu verzeichnen, da bereits in den DMSO-behandelten Kontrollzellen trotz Einsatz des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT ein solches Fragment nicht nachweisbar war. Auch die zwei Spaltprodukte des APLP2 nahmen deutlich zu bei Einsatz des β -Sekretase-Inhibitors (siehe Abbildung 33, linker Abschnitt des Western-Blots), wenngleich auch hierbei keine Abnahme eines entsprechenden β -Proteolyseprodukte nachzuvollziehen war. Das Fehlen der β -Sekretase-generierten membranständigen Spaltfragmente für beide Proteine - sowohl APP als auch APLP2 - könnte darauf beruhen, dass nur sehr wenig in den Zellen vorlag und bei gleichzeitiger starker Akkumulation der α -Spaltfragmente nicht mehr davon getrennt darzustellen war.

Ergebnisse

Oder aber die Stabilität der β -Spaltprodukte ist geringer als die der α -Spaltung, so dass die Fragmente bei der Aufbereitung oder bei der Inkubation der Lysate abgebaut werden. Die Zunahme beider C-terminaler Spaltfragmente des APLP2 bei Inhibition der β -Sekretase zeigte jedoch, dass sie nicht durch Spaltung durch BACE entstanden sind. Auffällig für APLP2 war zudem, dass ein weiteres Spaltprodukt bei Einsatz des Inhibitors entstand, das aus einer alternativen Proteolyse hervorgehen muss.

3.1.2.3.3 Inhibition des APLP2-Proteolyse durch das nicht-selektive Hydroxamsäure-Derivat Galardin

Der Breitspektrum Hydroxamsäure-Inhibitor GM6001 (Galardin, Galardy et al., 1994) lässt keine Diskriminierung zwischen Matrixmetalloproteinasen und ADAMs zu, ermöglicht aber zumindest die grobe Zuordnung eines Spaltereignisses zu der Proteasenfamilie der Metzincine.

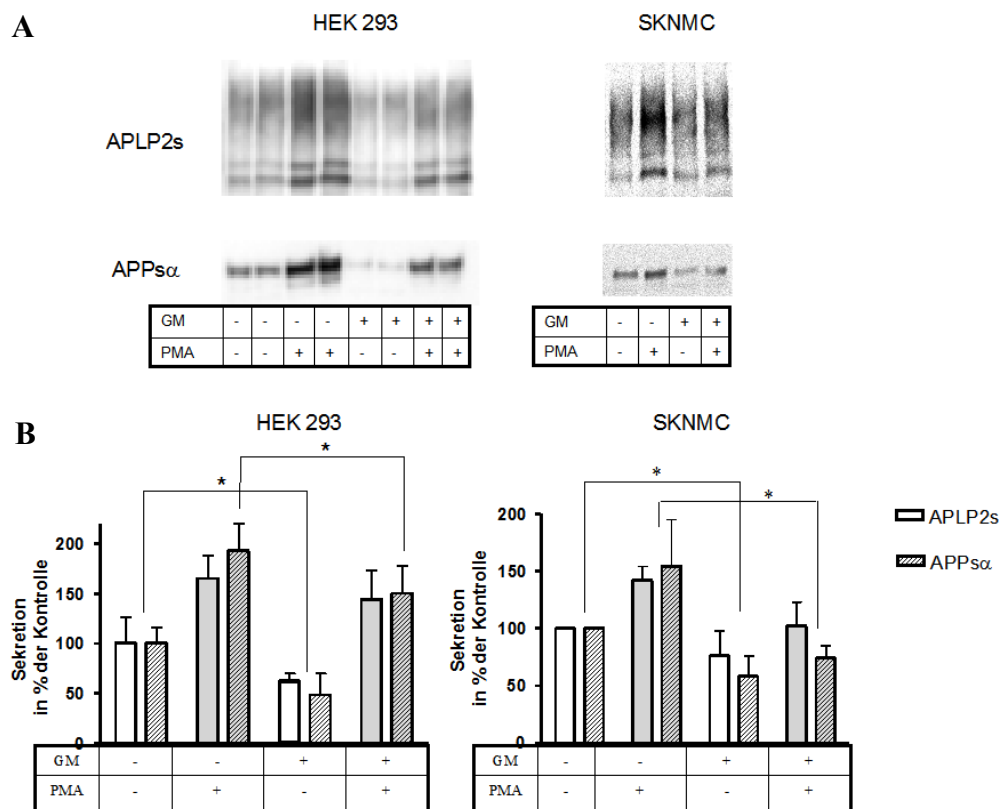


Abbildung 34: Einfluss des MMP- und ADAM-Inhibitors GM6001 auf die konstitutive und stimulierte Sekretion von APPs α und APLP2s in HEK 293- und SKNMC-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden 18 h mit 10 μ M GM6001 (GM) bzw. dessen inaktiven, modifizierten Analogon (GMNK, hier als GM- gekennzeichnet) in Kulturmedium vorinkubiert, dann erfolgte die Sekretion für 4,5 h unter Zusatz von frischem Inhibitor. Während der Sekretion wurde PMA (1 μ M) bzw. ein entsprechendes Volumen DMSO zugesetzt. Der Nachweis des sekretierten APLP2s und APPs α erfolgte durch

die Antikörper D2II bzw. 6E10 und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelte (für HEK 293) bzw. ^{35}S -markierte Zweitantikörper (für SKNMC). B) Quantifizierung der Mengen an sekretierten Proteinen: Die Quantifizierung wurde mittels der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit GraphPad Prism (One-way ANOVA, Bonferroni Post-Test *, $p < 0,05$) bestimmt.

In beiden Zelllinien führte der Inhibitor zu einer Reduktion der konstitutiven Ektodomänenfreisetzung sowohl für APP als auch für APLP2 (siehe Abbildung 34). Darüber hinaus reduzierte GM6001 auch die PMA-induzierte, regulierte Spaltung beider Substrate. Dies lässt den Schluss zu, dass wie für APP beschrieben sowohl an der konstitutiven als auch an der regulierten Proteolyse des APLP2 ADAMs und/oder MMPs beteiligt sind. Ergänzend wurde die Entstehung der C-terminalen Spaltprodukte des APLP2 in SKNMC-Zellen untersucht (siehe nachfolgende Abbildung).

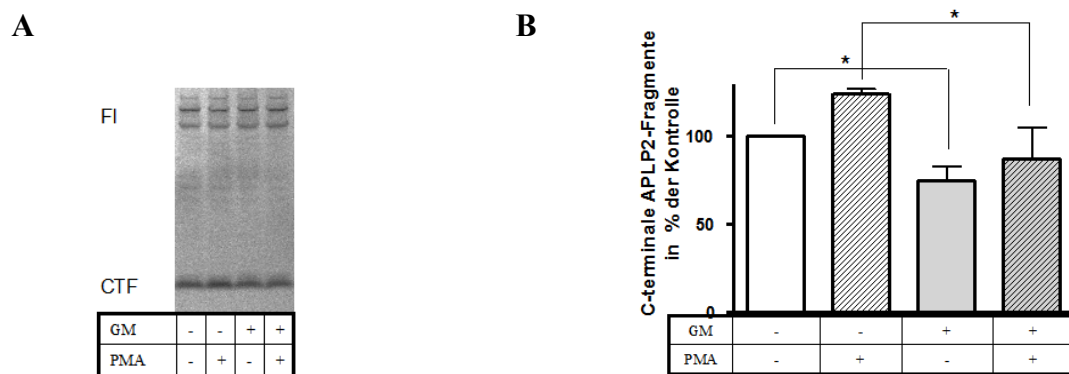


Abbildung 35: Einfluss des MMP/ADAM-Inhibitors GM6001 auf die C-terminalen Spaltfragmente von APLP2 in SKNMC-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden wie in Abbildung 34 beschrieben inkubiert, die Zellysate auf einer 4-12%igen Nu-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des membranständigen APLP2 erfolgte durch den Antikörper CT12 und einen ^{35}S -markiertem Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot ermittelten Menge an C-terminalen Spaltfragmenten: Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit GraphPad Prism (One-way ANOVA, Turkeys multiple comparism test *, $p < 0,05$) bestimmt.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen waren insgesamt recht schwach ausgeprägt (siehe Abbildung 35): So führte die Inkubation mit PMA lediglich zu einer Erhöhung der C-terminalen Spaltfragment-Menge auf 120%. Dennoch zeigte sich für die unstimulierte Situation eine Reduktion der C-terminalen Fragmente durch den Inhibitor Galardin und eine Verminderung der PMA-induzierten

Ergebnisse

Proteolyse. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen der sekretierten APLP2-Spezies (siehe Abbildung 34) prinzipiell überein. Eine Zuordnung der C-terminalen Proteolyseprodukte zu einem Spaltereignis durch eine Metalloproteinase erscheint damit plausibel. Die deutlich geringere Effizienz des Inhibitors auf die Menge an C-terminalen Fragmenten könnte auf der Tatsache beruhen, dass die membranständigen Proteolyseprodukte selbst ein Substrat für eine weitere Prozessierung durch die γ -Sekretasen darstellen (siehe 3.1.2.3.1). Daher wäre es möglich, dass die Gesamtmenge an C-terminalen APLP2-Fragmenten durch eine Koordinierung beider Spaltereignisse auf einem annähernd gleichbleibenden Niveau gehalten wird.

3.1.2.3.4 Inhibition der APLP2-Prozessierung durch die Hydroxamsäure-Derivate GW280264X und GI254023X

Nachdem der Einsatz des Inhibitors GM6001 die Spaltung des APLP2 durch Metalloproteinasen bestätigte (siehe 3.1.2.3.3), sollte nun eine nähere Eingrenzung durch den Einsatz zweier selektiverer Inhibitoren für ADAMs - GW280264X und GI254023X - erfolgen. Diese Inhibitoren basieren ebenfalls auf der Hydroxamsäure-Grundstruktur (siehe 7.3), sind aber *in vitro* als selektiv inhibierend für ADAM10 und TACE beschrieben (Hundhausen et al., 2003), wobei der Inhibitor GI254023X eine deutlich höhere Effizienz für ADAM10 zeigte.

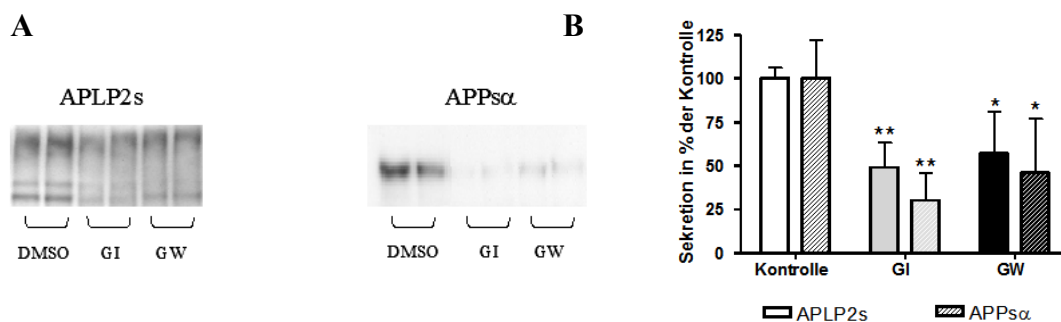


Abbildung 36: Einfluss der ADAM-Inhibitoren GW280264X und GI254023X auf die Sekretion von APPs α und APLP2s in HEK 293-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden 18 h mit 10 μ M GI254023X bzw. GW280264X in Kulturmedium vorinkubiert, dann erfolgte die Sekretion für 4,5 h unter Zusatz von frischem Inhibitor. Der Nachweis des sekretierten APLP2s und APPs α erfolgte durch die Antikörper D2II bzw. 6E10 und 35 S-markierte Zweitantikörper. B) Quantifizierung der im Western-Blot (drei unabhängige Versuche) ermittelten Mengen an sekretierten Proteinen: Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit GraphPad Prism (One-way ANOVA, Bonferroni Post-Test *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

Beide Inhibitoren reduzierten die konstitutive Sekretion von APPs α und APLP2s in den humanen embryonalen Nierenzellen HEK 293 (siehe Abbildung 36). Dabei war zu verzeichnen, dass das inhibitorische Potential des ADAM10-spezifischen Inhibitors GI254023X für die Sekretion beider Proteine vergleichbar war mit der ADAM10 und TACE inhibierenden Komponente GW280264X. Da für APP bereits bekannt ist, dass beide Proteasen an der konstitutiven Proteolyse partizipieren, erscheint dies zunächst nicht plausibel. Es bleibt ungeklärt, welche der beiden Substanzen eine höhere Permeationsfähigkeit bzw. Stabilität *in vivo* aufweist, so dass sich auch hieraus Unterschiede in der inhibitorischen Effizienz ergeben könnten.

Bei Einsatz des ADAM10 spezifischen Inhibitors GI254023X in SKNMC-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 37) wie bei der peripheren Zelllinie HEK 293. Neben der Sekretion der Ektodomänen wurde in dieser neuronalen Zelllinie ergänzend die Entstehung der C-terminalen Proteolyseprodukte untersucht.

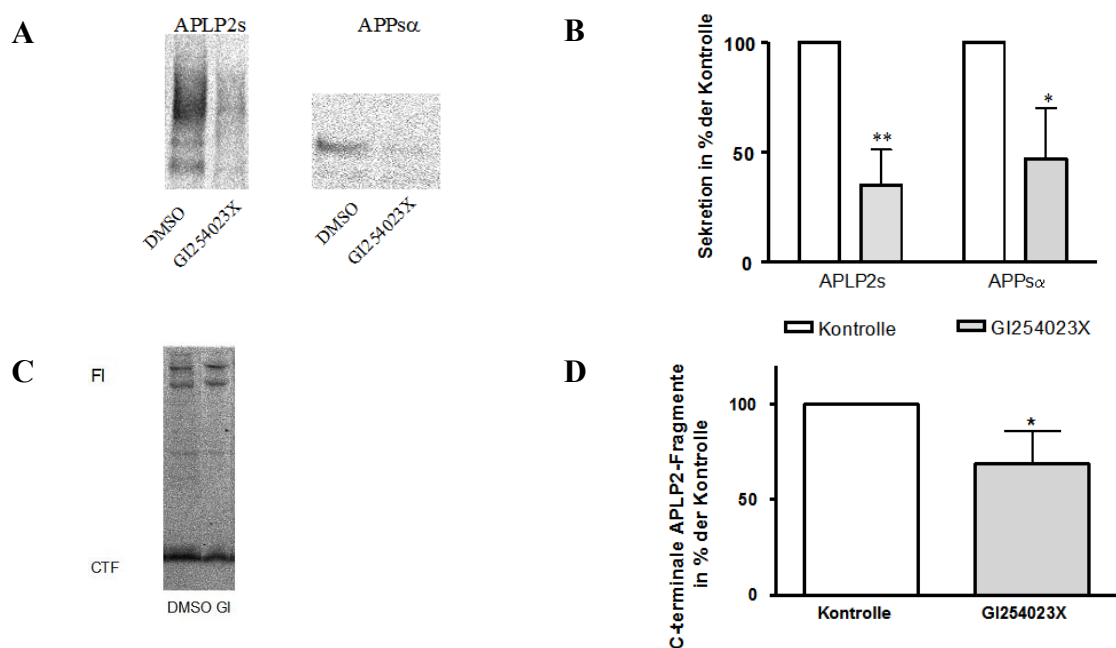


Abbildung 37: Einfluss des ADAM10-Inhibitors GI254023X auf die Sekretion von APPs α und APLP2s und die Entstehung C-terminaler Fragmente des APLP2 in SKNMC-Zellen

Die Zellen wurden wie in der Legende zur Abbildung 36 beschrieben inkubiert. A) Exemplarische Western-Blots: Der Nachweis des sekretierten APLP2s und APPs α erfolgte durch die Antikörper D2II bzw. 6E10 und ³⁵S-markierte Zweitantikörper. B) Quantifizierung der Mengen an sekretierten Proteinen aus drei unabhängigen Experimenten: Die Quantifizierung wurde anhand der mit BASReader aufgenommenen Bilder und der Software

Ergebnisse

Aida 3.50 durchgeführt. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung wiedergegeben, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

C) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden lysiert und auf einer 4-12%igen Nu-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der membranständigen Proteine erfolgte durch den Antikörper CT12 und einen ^{35}S -markierten Zweitantikörper. D) Quantifizierung der im Western-Blot bestimmten Mengen an membranständigen C-terminalen Spaltfragmenten: siehe B.

Sowohl die Sekretion von APPs α als auch von APLP2s war durch den Inhibitor Gi254023X deutlich gemindert (siehe Abbildung 37 A und B). Analog dazu waren auch die C-terminalen Fragmente des APLP2 reduziert (siehe Abbildung 37 C und D), wenngleich der Effekt wie bereits für den unspezifischen Inhibitor GM6001 beschrieben (siehe Abbildung 35) deutlich geringer war als der Einfluss auf die sekretierten Proteinspezies.

Aus den Befunden mit den ADAM-selektiveren Inhibitoren ergibt sich eine Beteiligung von ADAM10 und 17 an der Prozessierung von APLP2, wenngleich eine Beteiligung von MMPs oder anderen ADAMs nicht auszuschließen ist, da die Inhibierung niemals vollständig gelang. Bei APLP2 tritt erschwerend hinzu, dass bei Reduktion der Spaltung durch ADAMs eine erhöhte Spaltung durch BACE aufgrund des erhöhten Substratangebots nicht auszuschließen ist, wenngleich eine direkte Konkurrenz beider Proteolyseereignisse nicht gezeigt wurde.

3.1.2.4 Einfluss von überexprimiertem ADAM10, ADAM10DN und TACE auf die proteolytische Prozessierung von APLP2

Um der Frage nach den bei der APLP2-Proteolyse partizipierenden ADAMs weiter nachzugehen, wurde der Einfluss von stabil überexprimiertem bovines ADAM10 bzw. seiner dominant negativen Mutante (ADAM10DN) und von murinem TACE auf die Proteolyse des endogenen APLP2 in HEK 293 Zellen untersucht.

Die Zellen wurden mit Protease-codierenden cDNAs im Vektor pcDNA3 transfiziert und durch Selektion mit G418 stabile Zellpopulationen etabliert. Aus diesen wurden Einzelzellklone herangezogen, die durch eine prominente Überexpression der Proteasen gekennzeichnet waren. Als Kontrollzelllinie diente ein Einzelzellklon, der lediglich mit dem leeren Vektor pcDNA3 transfiziert worden war. Die Expression der Proteasen wurde im Western-Blot anhand der angefügten Epitope (HA für ADAM10 und TACE, Flag für ADAM10DN) überprüft (siehe Abbildung 38).

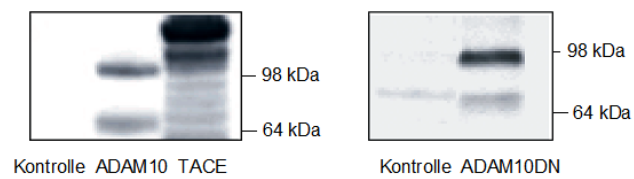


Abbildung 38: Nachweis der überexprimierten Proteasen ADAM10, TACE und ADAM10DN in stabilen HEK 293-Einzelzellklonen

Die Zellen wurden lysiert und je 50 µg Protein auf einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Proteasen erfolgte im Western-Blot. ADAM10 und TACE wurden durch das dem Protein angefügte HA-Epitop (Antikörper Y11) und ADAM10DN durch das Flag-Epitop (Antikörper M2) nachgewiesen. Als Zweitantikörper wurde ein Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper verwendet. Zur Kontrolle dienten die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Für alle drei Proteasen wurde eine starke Expression nachgewiesen (siehe Abbildung 38). Es waren jeweils zwei Banden im Western-Blot zu erkennen: Die größere mit ca. 94 kDa (ADAM10/ADAM10DN) bzw. 120 kDa (TACE) entspricht der Proform, die jeweils kleinere mit ca. 62 bzw. 100 kDa der prozessierten, aktiven Proteaseform.

Die Funktionalität der überexprimierten Proteasen war bezüglich der Proteolyse bereits an APP und anderen Substraten demonstriert worden. Die Überexpression von bovinem ADAM10 steigerte die Sekretion von APPs α um das Vierfache (Lammich et al., 1999), während ADAM10DN die Sekretion deutlich reprimierte. Die Aktivität des überexprimierten murinen TACE wurde in eigenen Untersuchungen (Diplomarbeit: „Der Einfluss der Domänenstruktur von ADAM10 und TACE (ADAM17) auf die Proteolyse des β -Amyloid-Vorläuferproteins“, 2001) an APP und am *Vibrio cholera* Pro-Cytolysin (Valeva et al., 2004) gezeigt.

Ergebnisse

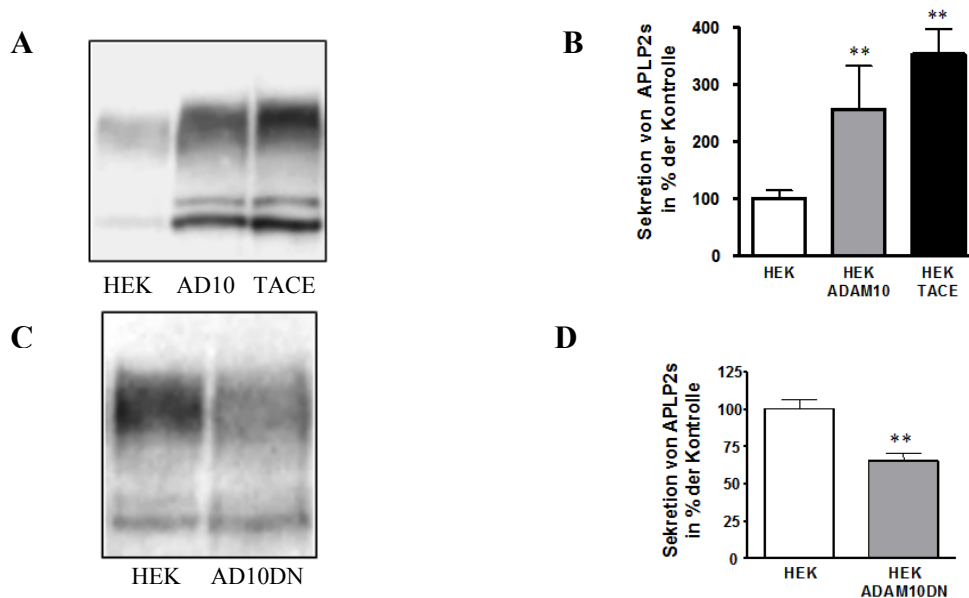


Abbildung 39: Einfluss der überexprimierten Proteasen ADAM10, TACE und ADAM10DN auf die Sekretion von APLP2s in stabilen Einzelzellklonen

A) und C) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät und 24 h kultiviert. Als Kontrolle dienten HEK pcDNA3-Zellen (hier als HEK bezeichnet). Dann erfolgte die Sekretion in einem Zeitraum von 4,5 h und der Nachweis des sekretierten APLP2s wie in Abbildung 26 beschrieben. B) und D) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot ermittelten Mengen an sekretiertem APLP2s: Die Quantifizierung wurde anhand digitalisierter Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

Sowohl ADAM10 als auch TACE führten bei Überexpression zu einem signifikanten Anstieg des APLP2s im Zellkulturüberstand (250 bzw. 350%, siehe Abbildung 39 A und B), während die dominant negative Mutante des ADAM10 (ADAM10DN) die Sekretion der APLP2-Ektodomäne auf ca. 60% reduzierte (siehe Abbildung 39 C und D). Die Unterschiede in der Sekretion waren nicht auf Veränderungen in der APLP2-Expression zurückzuführen, da diese zeitgleich untersucht wurde und in allen Zelllinien vergleichbar war (siehe Abbildung 40).



Abbildung 40: Expression von APLP2 in ADAM10-, ADAM10DN- und TACE-überexprimierenden stabilen Einzelzellklonen

Der Nachweis des zellulären APLP2 erfolgte nach der Auftrennung der Zelllysate auf einer 4-12%igen Nu-PAGE durch den Antikörper CT12 und Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper.

3.1.2.5 Einfluss von ADAM10 auf die *in vivo*-Prozessierung von APLP2

3.1.2.5.1 Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper CT12 und D2II für APLP2 in Mausgehirn-Proben

Die Isolate aus den Mausgehirnen stellen wesentlich komplexere Proben dar als die zuvor beschriebenen Lysate oder Kulturüberstände einzelner Zellspezies. Um eventuelle Artefakte im Nachweis des APLP2 durch Kreuzreaktion mit anderen Proteinen oder Störungen durch Lipide oder niedermolekulare Substanzen ausschließen zu können, wurde zunächst die Spezifität der beiden Antikörper CT12 und D2II überprüft.

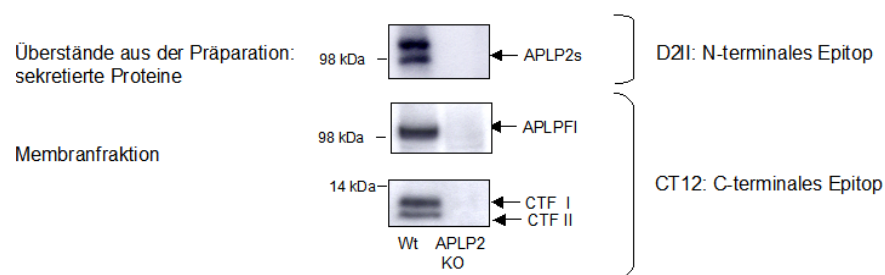


Abbildung 41: Nachweis der Spezifität der Antikörper CT12 und D2II für APLP2 in Gehirn-Proben von Mäusen

Gleiche Proteinmengen von Überständen bzw. Membranfraktionen von Mausgehirn-Homogenaten wurden auf einer 7,5%igen SDS-PAGE bzw. auf einer 4-12%igen Nu-PAGE aufgetrennt. Der Antikörper D2II detektiert im Western-Blot alle Proteine mit vollständigem N-Terminus, der Antikörper CT12 hingegen alle Proteine in denen die letzten 12 Aminosäuren des Proteins enthalten sind. Zum Nachweis wurde ein Alkalische Phosphatasegekoppelter Zweitantikörper verwendet. KO: APLP2-Knock-Out-Maus, 7 Wochen; Wt: FVB/N-Maus, 7 Wochen; FL („*full length*“): ungespaltenes zelluläres APLP2; CTF I und II: C-terminale Spaltfragmente; APLP2s: lösliches APLP2

In der Gehirn-Membranfraktion der Wildtyp-Maus war deutlich das Vorhandensein eines ungespaltenen („*full length*“) APLP2-Proteins zu verzeichnen (siehe Abbildung 41, Mitte). Zudem waren zwei C-terminale Spaltfragmente und das lösliche APLP2s zu identifizieren (siehe Abbildung 41). Sowohl das ungespaltene als auch die durch proteolytische Prozessierung entstandenen Fragmente waren bei der Knock-Out-Maus nicht nachzuweisen. Damit war eine ausreichende Selektivität der beiden APLP2-Primärantikörper für die Verwendung an Gehirnproben gegeben.

Ergebnisse

3.1.2.5.2 Einfluss von überexprimiertem ADAM10 auf die APLP2-Prozessierung *in vivo*

Auch wenn die Spaltung des APLP2 durch den Einsatz von Inhibitoren und durch die Überexpression im zellulären System ein Ereignis darzustellen scheint, an dem ADAMs maßgeblich beteiligt sind, kann doch nur die Überprüfung im ganzen Organismus eine tatsächliche Substrat-Protease-Relation sicherstellen.

Hierzu wurden Mäuse untersucht, die ADAM10 bzw. seine dominant negative Mutante ADAM10DN transgen exprimieren (siehe 2.1.9.1). Die Mäuse wurden durch Mikroinjektion von cDNA-Konstrukten, die unter Kontrolle eines deletionsmutierten Thy1-Promotors stehen, etabliert (Postina et al., 2004). Dieser Promotor beschränkt die Expression des bovinen ADAM10 und der dominant negativen Mutante auf Neuronen, so dass periphere Effekte auszuschließen sind.

Transgene Mäuse mit ADAM10-Überexpression

Die Transgenität aller verwendeten Tiere wurde anhand von Western-Blots der Membranfraktionen der Hirn-Homogenate verifiziert. Beide Formen des ADAM10, sowohl die Proform als auch die katalytisch aktive reife Form, waren nachzuweisen, wobei die reife Form in ADAM10-transgenen Mäusen dominierte.

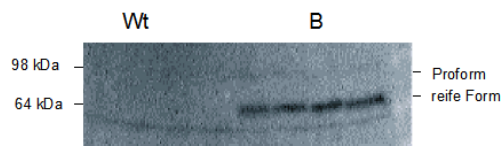


Abbildung 42: Nachweis der Transgenität der untersuchten Mäuse am Beispiel von Tieren der B-Linie

Es wurden 50 µg der Membranfraktionen auf einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das überexprimierte ADAM10 im Western-Blot detektiert. Der Nachweis erfolgte über den anti-HA-Antikörper Y-11 und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. Dargestellt ist der beispielhafte Nachweis an je vier Proben von Tieren der B-Linie und vier der Wildtypelinie (Wt: FVB/N).

Um den Einfluss des überexprimierten ADAM10 auf die Prozessierung des endogenen APLP2 zu untersuchen, wurden sowohl die Membranfraktionen als auch die Überstände mit den löslichen Proteinen aus den Gehirnen ADAM10-transgener Mäuse auf die enthaltenen APLP2-Proteine hin im Western-Blot untersucht.

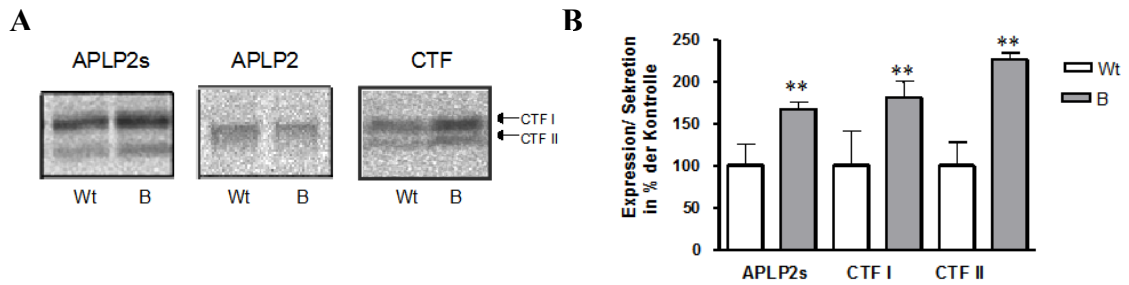


Abbildung 43: Nachweis des Einflusses von überexprimiertem ADAM10 (moderate Expression) auf die APLP2-Prozessierung in transgenen Mäusen

A) Exemplarische Western-Blots: Es wurden 50 μ g der Überstände der Gehirnpräparationen auf 7,5%igen SDS-PAGE bzw. 50 μ g der Membranfraktionen auf 4-12%igen Nu-PAGES aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf PVDF-Membran wurde das endogene APLP2s und die membranständigen APLP2-Proteine im Western-Blot nachgewiesen. Hierzu wurden die Antikörper D2II für das lösliche APLP2s und CT12 für membrangebundene APLP2-Protein und 35 S-markierte Zweitantikörper verwendet. (Wt: FVB/N, 10 Wochen; n = 8; B: FVB/N-ADAM10, 10 Wochen, n = 8) B) Quantifizierung der im Western-Blot evaluierten Mengen an sekretiertem APLP2s und membranständigen APLP2-Proteinen: Es wurden mindestens zwei unabhängige Western-Blots aller Proben durchgeführt. Die Quantifizierung wurde anhand der mit dem BAS-Reader aufgenommenen Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Die Werte für das lösliche APLP2s und die C-terminalen Fragmente (C-StubI und II) wurden auf die Menge an „full-length“-Protein normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

Die ADAM10 moderat überexprimierenden Mäuse der Linie B wiesen eine im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikante Erhöhung des löslichen APLP2 in den Gehirnpräparationen auf (170%, siehe Abbildung 43). Gleichzeitig nahmen beide C-terminaler Spaltfragmente auf 175 bzw. 225% zu. Da die Expression des ungespaltenen APLP2 in beiden Mauslinien nicht signifikant voneinander abwich (siehe Abbildung 43), zeigte sich hierin eine Partizipation von ADAM10 an der Proteolyse des APLP2 *in vivo*. Um zu untersuchen, ob eine stärkere Überexpression des ADAM10 zu einer weiteren Verstärkung der APLP2-Prozessierung führt, wurden Tiere der Linie D ausgewählt. Diese Linie zeigt in Relation zur Linie B eine in etwa doppelt so starke Expression des transgenen ADAM10.

Ergebnisse

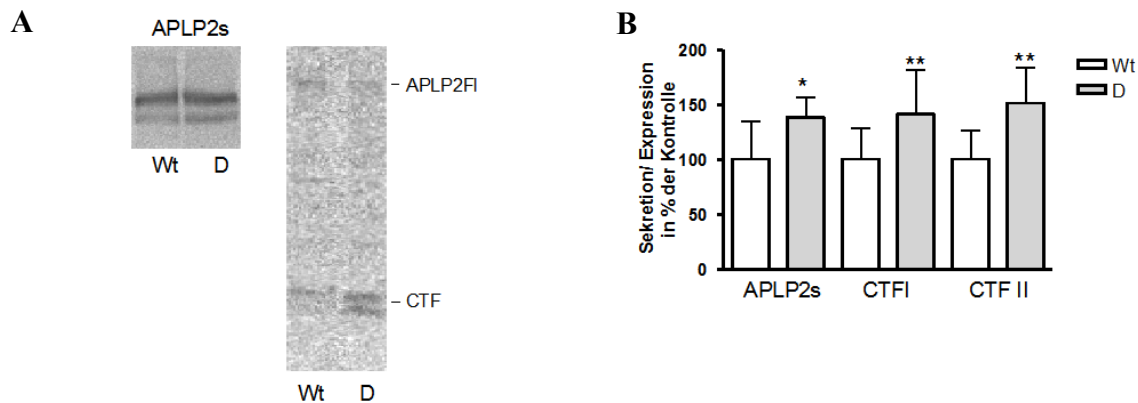


Abbildung 44: Nachweis des Einflusses von stark überexprimiertem ADAM10 auf die APLP2-Prozessierung in transgenen Mäusen

A) Exemplarische Western-Blots: Der Nachweis des endogenen APLP2 und seiner Spaltprodukte erfolgte wie in Abbildung 43 beschrieben durch den Antikörper D2II für APLP2s und den Primärantikörper CT12 für membrangebundene APLP2-Protein und ^{35}S -markierte Zweitantikörper. (Wt: FVB/N, 7 Wochen, n = 4; D: FVB/N-ADAM10, 7 Wochen, n = 4) B) Quantifizierung der im Western-Blot evaluierten Mengen an sekretiertem APLP2s und membranständigen APLP2-Proteinen: Quantifiziert wurde anhand der mit dem BAS-Reader aufgenommenen Bilder und der Software Aida 3.50. Die Werte für APLP2s und die C-terminalen Fragmente (CTF I und II) wurden auf die Menge an „full-length“-Protein normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

Die Untersuchung von Mäusen mit starker Überexpression von ADAM10 führte zu einer deutlichen Verstärkung der APLP2s-Sekretion in der löslichen Proteinfraction des Gehirns (140%, siehe Abbildung 44). Ebenso waren die C-terminalen Spaltfragmente im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrolltieren auf ca. 150% erhöht. Allerdings zeigte sich keine weitere Steigerung der Prozessierung des APLP2 durch die stärkere Überexpression der Protease ADAM10 verglichen mit moderat überexprimierenden Mäusen (siehe Abbildung 43). Eventuell stellte die mit moderater Überexpression erzielte Beeinflussung der APLP2-Prozessierung in den Tieren der B-Linie bereits ein Limit dar, das z.B. durch die Menge des endogenen Substrats erreicht wird.

Transgene Mäuse mit Überexpression des dominant negativen ADAM10

Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung der Bedeutung für ADAM10 für die APLP2-Prozessierung bot die Suppression der endogenen ADAM10-Aktivität in Mäusen durch Überexpression einer dominant negativen Mutante der Protease. Diese Mutante hatte bereits in der Zellkultur zu einer Verminderung des APLP2s im

Zellkulturüberstand geführt (siehe 3.1.2.4). Für diese Untersuchung wurde die transgene Maus-Linie I verwendet.

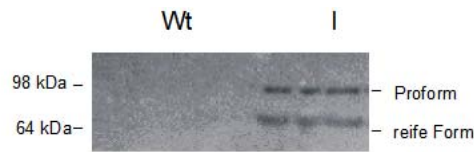


Abbildung 45: Nachweis der Transgenität der Tiere der I-Linie

Der Nachweis der Protease erfolgte wie in Abbildung 42 beschrieben. Gezeigt sind beispielhaft die Proben von drei FVB/N (Wt)- und drei ADAM10DN-transgenen Mäusen (I).

Im Western-Blot wurde die Transgenität der ausgewählten Tiere bestätigt, im Vergleich zu den Western-Blots zum Nachweis des überexprimierten ADAM10 lag jedoch keine Dominanz der reifen Proteaseform vor.

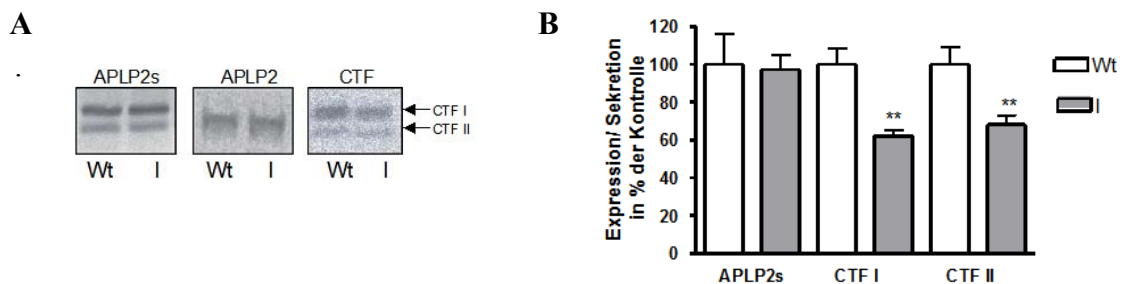


Abbildung 46: Nachweis des Einflusses von überexprimiertem dominant negativem ADAM10 auf die APLP2-Prozessierung in transgenen Mäusen

Die Detektion der APLP2-Spezies im Western-Blot (A) und die Quantifizierung (B) erfolgten analog zu Abbildung 44 (Wt: FVB/N, 7 Wochen, n = 7; I: FVB/N-ADAM10DN, 7 Wochen, n = 7).

Bei den Mäusen mit Überexpression der dominant negativen Mutante des ADAM10 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Sekretion der löslichen APLP2-Ektodomäne (siehe Abbildung 46). Die Menge an C-terminalen Spaltfragmenten hingegen war signifikant (60% der Kontrolle) erniedrigt. Die Veränderung in der Menge der membranständigen Fragmente des APLP2 bestätigt die proteolytische Prozessierung des APLP2 durch ADAM10. Die unveränderte Menge an APLP2s könnte auf eine verstärkte Aktivität von BACE-1 zurückzuführen sein, das an der APLP2-Ektodomänensekretion in Mäusen beteiligt ist (Pastorino et al., 2004).

Für APP wurde in ADAM10DN-transgenen Mäusen eine erhöhte Aktivität der β -Sekretase verzeichnet, die sich z.B. in einer erhöhten Menge des A β widerspiegelte (Postina et al., 2004). Sollte es durch das mutierte ADAM10 ebenfalls zu einer vermehrten Spaltung des APLP2 an der β -ähnlichen Spaltstelle kommen, so könnte die Gesamtmenge an löslichem APLP2 insgesamt erhalten bleiben, wenngleich sich das Verhältnis der Spaltprodukte zueinander ändern würde. Ein dazu korrespondierender β -ähnliches membranständiges Spaltprodukt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

3.1.2.6 Koregulation von APP und APLP2 mit ihren Proteasen ADAM10 und TACE während der Neuroblastoma-Differenzierung

Für die ADAMs werden immer mehr potentielle Substrate bekannt, daher erscheint die gemeinsame Regulation von Substrat und Protease eine Möglichkeit, um zu einer zeitlich koordinierten Proteolyse zu gelangen. Eine solche gemeinsame Regulation könnte zum Beispiel dann sinnvoll sein, wenn weitreichende morphologische Veränderungen die Entfernung von Oberflächenrezeptoren oder die Freisetzung von löslichen Liganden erfordern. Als ein Beispiel für eine solche Phase der morphologischen Veränderung von Zellen wurde in dieser Arbeit die neuronale Differenzierung von Neuroblastoma-Zellen gewählt und die Expression von APLP2 und seiner Proteinase untersucht.

3.1.2.6.1 Phänotypischer Nachweis der Neuroblastoma-Differenzierung

Durch Zusatz bestimmter Substanzen lassen sich immortalisierte Zellen in Kultur zu spezifischen Phänotypen ausdifferenzieren. Dabei verändern sich zum einen die Morphologie der Zellen, zum anderen aber auch ihr Expressionsmuster oder aber ihre proliferativen Fähigkeiten. Ein Beispiel einer solchen Differenzierung ist die Verwendung von Retinsäure zur Ausbildung eines neuronalen Phänotyps in Neuroblastoma-Zelllinien. Durch andauernde Gabe von Retinsäure werden diese Zellen z.B. dazu angeregt, Neuriten-ähnliche Ausläufer zu bilden und sich somit einem neuronalen Erscheinungsbild und Verhalten anzunähern.

Um eine mögliche Regulation der APLP2-Spaltung während der Neuroblastoma-Differenzierung zu untersuchen, wurden SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen in farblosem, phenolrotfreiem Medium mit 1 μ M Retinsäure behandelt. Farbloses

Medium wurde eingesetzt, da der normalerweise im Medium enthaltene pH-Indikator Phenolrot östrogen-artige Eigenschaften besitzt und damit zur Interferenz mit den nukleären Rezeptoren für Retinsäure führen könnte (Ernst et al., 1989; Welshons et al., 1988). Es erfolgte täglich ein Mediumwechsel, um die temperatur- und lichtlabile Retinsäure im Medium auf einem möglichst konstanten Level aktiv vorliegen zu haben. Der Differenzierungsstatus der untersuchten Neuroblastoma-Zelllinien wurde durch mikroskopische Phänotypisierung festgestellt (siehe Abbildung 47).

Für die neuronalen SH-SY5Y-Zellen (N-Typ) zeigten sich nach Induktion der Differenzierung mit Retinsäure (RA) lange zelluläre Ausläufer. Die eher Schwann-(S)-Typ-artigen SKNMC-Zellen wiesen nur leichte morphologische Veränderungen wie eine tendenzielle Zellstreckung auf, zeigten dafür jedoch eine deutliche Einbuße proliferativer Fähigkeiten (eine nähere Charakterisierung beider Zelllinien bei der Differenzierung bietet Voigt et al., 2003).

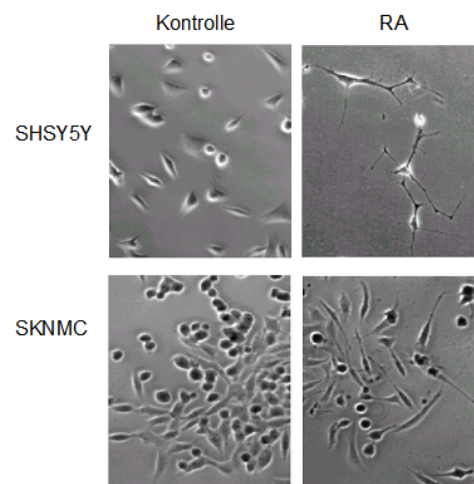


Abbildung 47: RA-induzierte Differenzierung der Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y

Die Zellen wurden durch Lebendmikroskopie (100fache Vergrößerung) nach 4 Tagen Differenzierung mit 1 μ M Retinsäure (RA) dargestellt.

3.1.2.6.2 Quantifizierung der Substrat- und Proteasen-mRNA

Von verschiedenen Genen ist bekannt, dass sie in ihrer Expression durch Retinsäure gesteuert werden. Ein Beispiel dafür ist das APP selbst, dessen Promotor durch Retinsäure aktiviert wird (Ruiz-Leon und Pascual, 2003; Lahiri und Nall, 1995). Des

Ergebnisse

weiteren war bekannt, dass sowohl APP als auch APLP2 auf der Proteinebene durch RA induziert werden können (Beckman und Iverfeld, 2001; Adlerz et al., 2003). Um zu überprüfen, ob auch ADAM10 als Protease Teil eines potentiellen regulatorischen Zusammenhanges von Substraten und Enzymen ist, wurde die mRNA von ADAM10 und seinen beiden Substraten APP und APLP2 durch RealTime RT-PCR in differenzierten SH-SY5Y- und SKNMC-Zellen quantifiziert. Für APP wurde die neuronale Isoform APP695 bestimmt.

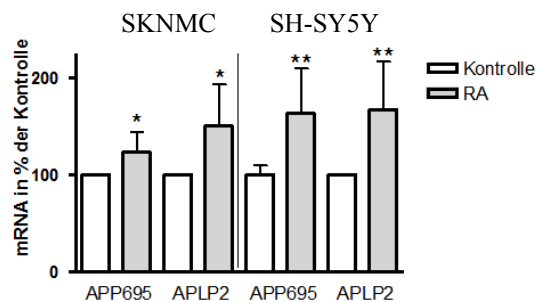


Abbildung 48: mRNA von APP und APLP2 in den Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y nach RA-Differenzierung

Die RNA differenzierter Zellen wurde isoliert und mittels RealTime RT-PCR analysiert. Die mRNA von APP695 und APLP2 wurde in zwei separaten Experimenten in Triplikaten bestimmt und auf die GAPDH-mRNA normiert. Quantifiziert wurde mittels der Software ABIPrism durch manuelle Wahl des „*threshold*“ (siehe 2.3.7.1). Die so erhobenen Ct-Werte wurden in Excel in prozentuale Werte umgerechnet und mit SigmaPlot 5.0 auf Signifikanz hin untersucht (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Für die APP695- und die APLP2-mRNA ergab sich eine signifikante Steigerung durch die Differenzierung mit Retinsäure (siehe Abbildung 48). Dies ist konform mit Angaben in der Literatur. So zeigten z.B. Ruiz-Leon und Pascual (2003) eine Steigerung der APP-mRNA um 100% nach vier Tagen Inkubation mit RA. Diese Induktion ist deutlich stärker als die hier beschriebene, umfasste aber auch alle Isoformen des APP.

Auch für ADAM10 wurde eine Quantifizierung der mRNA vorgenommen. Da jedoch auch andere Proteasen an der Prozessierung von APP und APLP2 teilnehmen, wurde gleichzeitig als ein Beispiel für solche Proteasen die mRNA von BACE-1 quantifiziert.

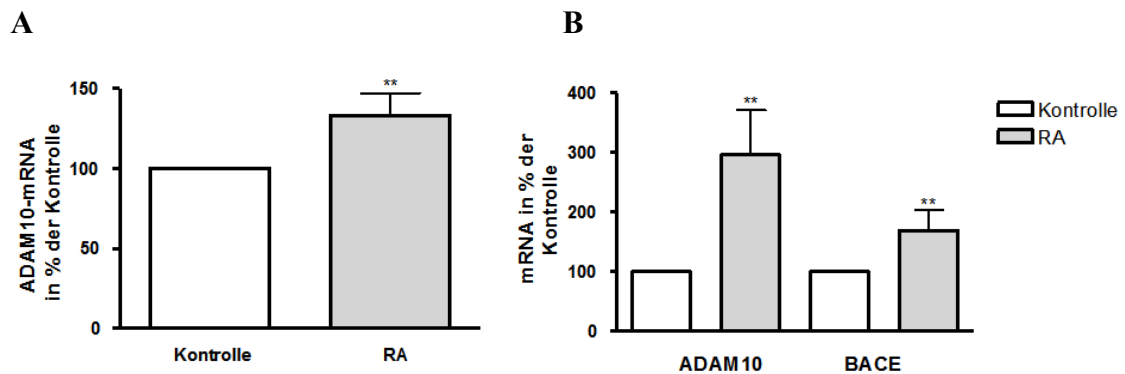


Abbildung 49: mRNA von ADAM10 und BACE in den Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y nach RA-Differenzierung

A) Quantifizierung der ADAM10-mRNA in SKNMC-Zellen. B) Quantifizierung der ADAM10- und BACE-1-mRNA in SH-SY5Y-Zellen. Die mRNA wurde in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten bestimmt und wie in Abbildung 48 beschrieben quantifiziert (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$).

Für ADAM10 findet sich in beiden Zelllinien eine signifikante Erhöhung der mRNA auf ca. 150% für SKNMC- und 300% für SH-SY5Y-Zellen (siehe Abbildung 49). Die parallel untersuchte BACE-1-mRNA in SH-SY5Y-Zellen wurde ebenfalls verstärkt gebildet, wenn auch nicht so dominierend wie die mRNA von ADAM10 (siehe Abbildung 49 B).

3.1.2.6.3 Quantifizierung der Substrat- und Proteasen-Expression im Western-Blot

Eine Regulation auf mRNA-Ebene muss sich nicht zwangsläufig zeitgleich in einer Veränderung auf Proteinebene widerspiegeln. Lange Halbwertszeiten des Proteins oder instabile mRNA-Spezies können zu einem deutlichen zeitlichen Versatz beider Regulationsebenen führen. Daher wurde nun auf Proteinebene geprüft, ob sich die Erhöhung der mRNA auch in einer zeitnahe zur Differenzierung erfolgenden Erhöhung der Proteinmengen wiederfindet. Dazu wurden SH-SY5Y- und SKNMC-Zellen wie beschrieben neuronal differenziert und im Western-Blot sowohl zelluläre als auch sekretierte Proteine bestimmt.

Ergebnisse

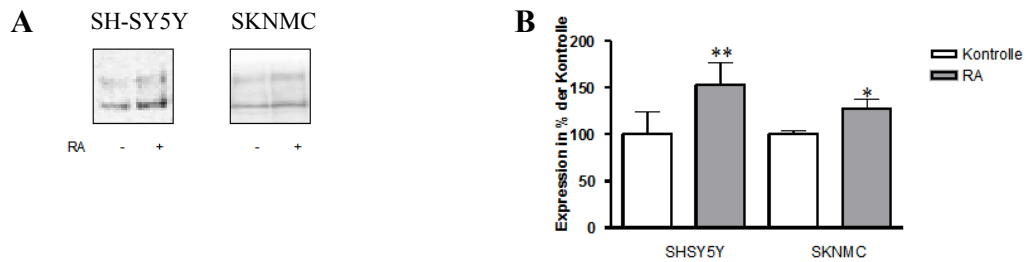


Abbildung 50: Einfluss der Differenzierung von SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen auf die Expression von APLP2

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden wie unter 2.3.3.2.8 beschrieben differenziert. Dann wurden die Zellen lysiert und im Western-Blot auf die Expression von APLP2 hin untersucht. Der Nachweis erfolgte durch den Antikörper CT12 und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot bestimmten Mengen an APLP2: Die Quantifizierung wurde anhand digitalisierter Bilder und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

In beiden Zelllinien wird die Expression des APLP2 durch den Einsatz von Retinsäure signifikant gesteigert (siehe Abbildung 50). Dabei ist die Expression in SH-SY5Y-Zellen (150% im Vergleich zu Kontrollzellen) höher als in SKNMC-Zellen (125%). Ein Nachweis des membranständigen ungespaltenen APP gelang aufgrund der geringen Expressionsstärke nicht in einer für Quantifizierungszwecke ausreichenden Qualität.

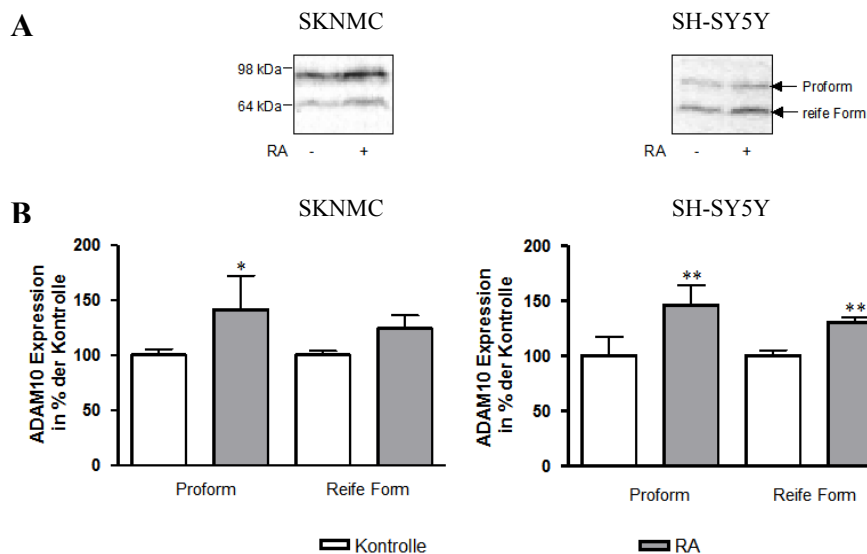


Abbildung 51: Einfluss der Differenzierung von SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen mit RA auf die Expression von ADAM10

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden nach erfolgter Differenzierung lysiert und im Western-Blot auf die Expression von ADAM10 hin untersucht. Der Nachweis sowohl der Pro- als auch der reifen ADAM10-Form erfolgte durch den Antikörper von Chemikon und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-

Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der Menge an ADAM10: Die Quantifizierung wurde unter Berücksichtigung dreier unabhängiger Versuche durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

In beiden Neuroblastoma-Zelllinien war ein Anstieg beider Proteinformen von ADAM10 zu verzeichnen (Proform ca. 150% der Kontrolle, reife Form ca. 130%, siehe Abbildung 51). Es findet sich also eine mit der Zunahme der mRNA korrelierende Steigerung der ADAM10-Expression auf der Protein-Ebene.

Da auch TACE als potentielle Protease für APLP2 in dieser Arbeit identifiziert werden konnte (siehe 3.1.2.4), sollte auf Proteinebene die Expression dieser Metalloproteinase überprüft werden. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben differenziert und die TACE-Expression im Western-Blot untersucht.

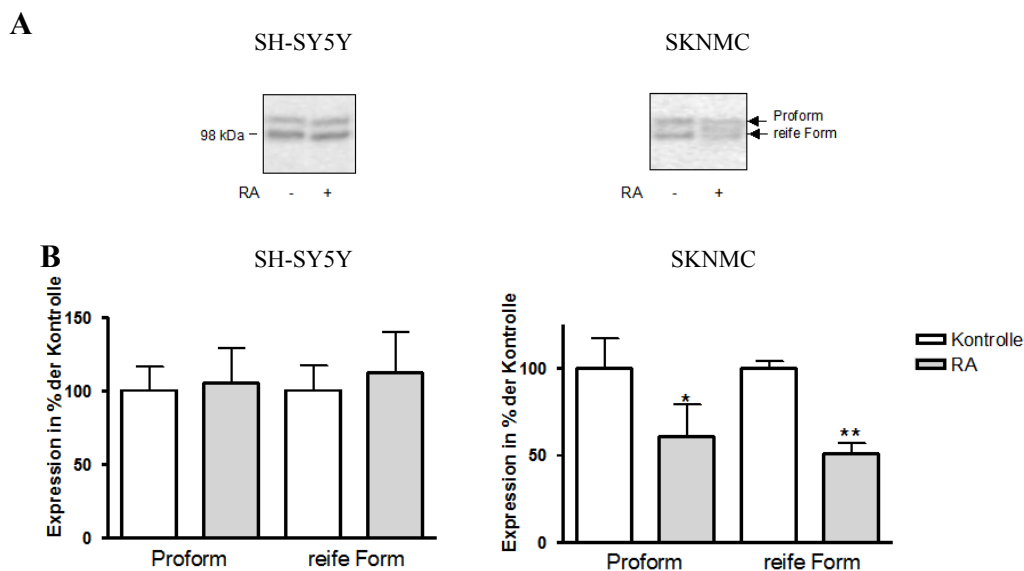


Abbildung 52: Einfluss der Differenzierung von SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen mit RA auf die Expression von TACE (ADAM17)

A) Exemplarischer Western-Blots: Die Zellen wurden wie in 2.3.3.2.8 beschrieben inkubiert und auf die Expression von endogenem TACE hin untersucht. Der Nachweis der Protease-Formen erfolgte durch den Antikörper von Chemikon und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot nachgewiesenen Mengen an ADAM17: Die Quantifizierung wurde anhand der densitometrischen Auswertung der Western-Blots mit der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

Für TACE ergab sich eine unveränderte Expression sowohl der Pro- als auch der reifen Form in SH-SY5Y-Zellen (siehe Abbildung 52). In SKNMC-Zellen fand sich eine deutliche Verminderung beider Proteaseformen. D.h., dass zumindest in den hier untersuchten Neuroblastoma-Zellen keine gemeinsame Hochregulation von TACE und seinen möglichen Substraten während der Retinsäure-induzierten Differenzierung erfolgt.

Eine Beeinflussung der β -Sekretase als einer weiteren APP- und APLP2-prozessierenden Protease ist jedoch nicht auszuschließen. Zwar fand sich in bezug auf die mRNA nur eine deutlich geringere Steigerung der BACE-mRNA im Vergleich zur ADAM10-mRNA (siehe Abbildung 49), aber eine Quantifizierung auf Proteinebene gelang am endogenen Protein mit den zu Verfügung stehenden Antikörpern nicht. Demnach ist nicht auszuschließen, dass auch das BACE-Protein unter dem Einfluss von RA verstärkt in den neuronal differenzierten Zellen gebildet wird.

3.1.2.6.4 Quantifizierung der Sekretion von APPs α und APLP2s im Western-Blot

Sowohl für die Substrate APP und APLP2 als auch für die an ihrer Prozessierung beteiligten Protease ADAM10 war eine Erhöhung der mRNA-Menge nach Differenzierung mit Retinsäure festzustellen (siehe 3.1.2.6.2). Diese setzte sich bis auf die Proteinebene durch (siehe 3.1.2.6.3), so dass eine parallele Steigerung der Proteolyse-Produkte im Zellkulturüberstand zu erwarten wäre.

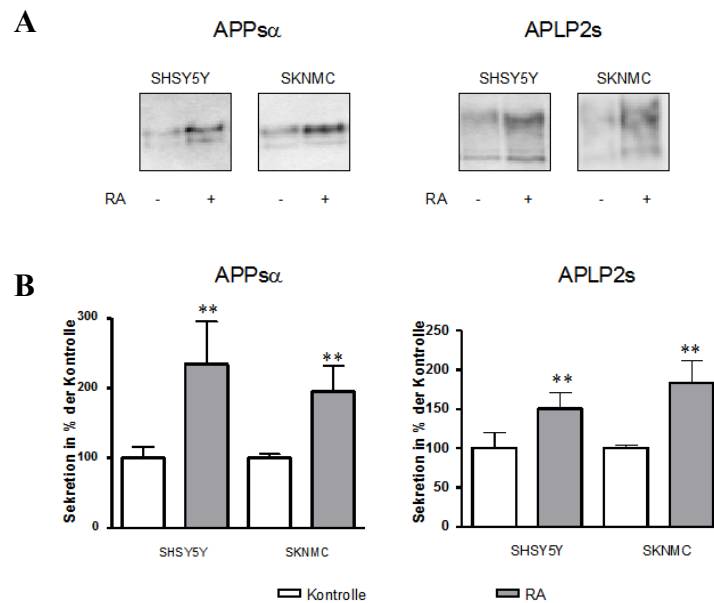


Abbildung 53: Einfluss der Differenzierung mit RA auf die Sekretion von APP α und APLP2s in SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: In den TCA-gefällten Proteinen der Kulturüberstände wurden im Western-Blot APP α und APLP2s nach 4,5 h Sekretion detektiert. Der Nachweis der beiden Ektodomänen erfolgte durch die Antikörper 6E10 und D2II und entsprechende Alkalische Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper. B) Quantifizierung der im Western-Blot ermittelten Mengen an APP α und APLP2s: Die Quantifizierung wurde anhand digitalisierter Bilder aus drei unabhängigen Versuchen und der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine signifikante Erhöhung der APP α -Sekretion auf annähernd 200% im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle (siehe Abbildung 53). Aufgrund der geringen Expressionsstärke konnte nicht nachgewiesen werden, in welchem Maße sich die APP-Menge auf der Proteinebene durch RA steigern lässt. Demnach ist nicht genau zu klären, welchen Anteil an der erhöhten Proteolyse definitiv der Expressions-Erhöhung der α -Sekretase ADAM10 zukommt. Da jedoch die Anhebung der mRNA-Menge an APP695 zwar signifikant war, aber lediglich 120 (SKNMC) bzw. 150% (SH-SY5Y) im Vergleich zur Kontrolle betrug, ist zu vermuten, dass ein Großteil der gesteigerten Proteolyse auf die gesteigerte Menge an katalytisch aktivem ADAM10 zurückzuführen ist. Die APLP2s-Sekretion wurde ebenfalls in beiden Zelllinien durch die Behandlung mit RA erhöht. Allerdings wurde hier nur ein Anstieg des APLP2s auf ca. 160% im Vergleich zur Kontrolle

verzeichnet. Dies bedeutet vor dem Hintergrund der auf ca. 150% erhöhten APLP2-Expression in SH-SY5Y-Zellen einen nur geringen Anstieg der Sekretion. Sollte jedoch wie in Parvathy et al. (1999) für APP beschrieben nur ein geringer Teil des exprimierten Substrats an der Zelloberfläche zur Prozessierung zur Verfügung stehen, so läge hier unabhängig von der Expressionssteigerung eine deutliche Induktion der Proteolyse vor. In SKNMC-Zellen, in denen die Expression des zellulären APLP2 lediglich auf 125% gegenüber der Kontrolle zunahm, kam es analog zum APP α zu einer deutlichen Verstärkung der APLP2-Ektodomänen-Freisetzung (ca. 170%, siehe Abbildung 53).

3.1.2.6.5 Einfluss des Metalloproteinase-Inhibitors Ro-31-9790 auf die Neuroblastoma-Differenzierung

Während der Differenzierung der Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y wurde eine verstärkte Sekretion der APLP2- und APP-Ektodomäne verzeichnet (siehe 3.1.2.6.4). Daher sollte nun geklärt werden, ob die Differenzierung von dieser gesteigerten Proteolyse abhängig ist oder ob es sich dabei um einen Folgeeffekt handelt. Hierzu wurden SH-SY5Y-Zellen, deren morphologische Veränderungen bei der Differenzierung prägnanter sind, über 4 Tage mit Retinsäure differenziert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Metalloproteinase-Inhibitor Ro-31-9790 oder mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Nach Ablauf der Inkubationen wurden die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt. Da der Inhibitor Ro-31-9790 in einer Konzentration von 30 μ M apoptotisch wirkte (siehe 3.1.2.7.4) wurden für die Untersuchung morphologischer Veränderungen niedrigere Konzentrationen von 5 und 10 μ M verwendet.

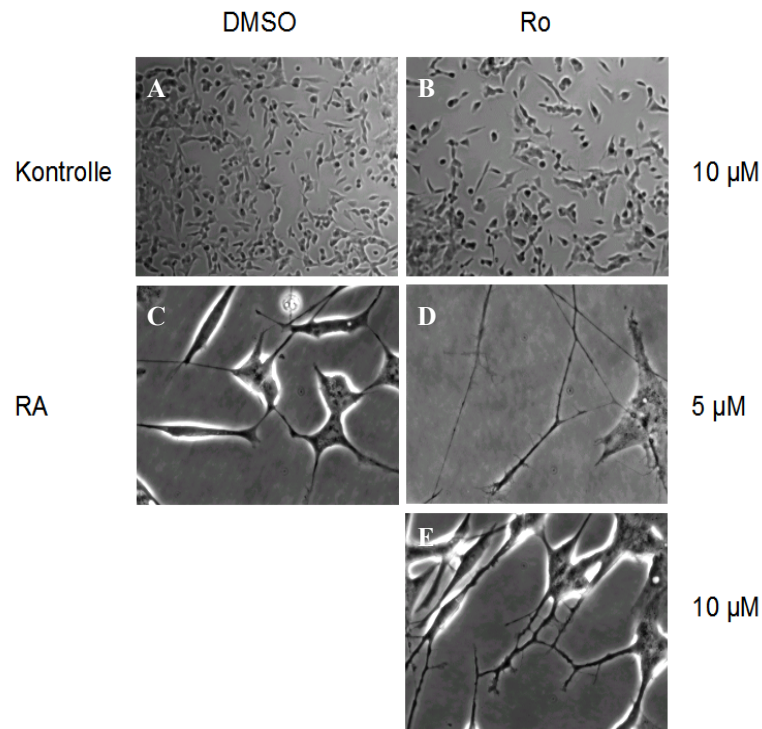


Abbildung 54: Einfluss von gleichzeitiger Applikation des Metalloproteinase-Inhibitors Ro-31-9790 und RA auf die Morphologie von SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden über vier Tage mit RA differenziert, zeitgleich wurden die Zellen mit 5 bzw. 10 μM Ro-31-9790 behandelt. Die Kontrollzellen erhielten entsprechende Volumina des Lösungsmittels DMSO. Die Zellen wurden lebend mikroskopiert. Die Abbildungen zur Wirkung von DMSO und Ro-31-9790 alleine wurden mit 100facher, die Abbildungen zu RA und dem Inhibitor bzw. der Lösungsmittelkontrolle mit 400facher Vergrößerung aufgenommen.

Bei alleiniger Applikation des Lösungsmittels DMSO bzw. von 10 μM Ro-31-9790 (siehe Abbildung 54 A und B) zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Zellmorphologie der SH-SY5Y-Zellen. Lediglich die Zahl apoptotischer Zellen nahm durch Zugabe des Metalloproteinase-Inhibitors leicht zu, dies war an der Zunahme abgekugelter Zellen zu erkennen. Bei kombinatorischer Inkubation mit RA und dem Inhibitor zeigte sich zunächst das typische Bild differenzierter neuronaler Zellen. Wie auch bei den RA-behandelten Kontrollzellen streckten sich die SH-SY5Y-Zellen unter dem Einfluss von RA mit Ro-31-9790 und generierten lange Zellausläufer. Bei weiterer Vergrößerung zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen der DMSO-Kontrolle und den Inhibitor-behandelten Zellen (siehe Abbildung 54 C und D): Die bei der RA-induzierten Differenzierung gebildeten Zellfortsätze waren in den Kontrollzellen (siehe Abbildung 54 C) relativ glatt und wenig verzweigt. Bei den mit Ro-31-9790 inkubierten Zellen waren die Zellausläufer mit zahlreichen

Ergebnisse

„Dornenartigen“ Strukturen besetzt und neigten stärker zur Verzweigung, was vor allem anhand der mit 10 μM Inhibitor behandelten Zellen (siehe Abbildung 54 E) deutlich wurde.

Insgesamt zeigte sich also, dass die Differenzierung durch Metalloproteinasen nicht zu blockieren ist, jedoch eine Modifikation der morphologischen Ausprägung erzielt wird.

3.1.2.7 Koregulation von APP und APLP2 mit ihren Proteasen ADAM10 und TACE während der Apoptose in Neuroblastoma-Zellen

Während der Retinsäure-induzierten Differenzierung von Neuroblastoma-Zellen war eine Koregulation von APP, APLP2 und ADAM10 zu beobachten (siehe 3.1.2.6), die zu einer verstärkten Freisetzung der neuroprotektiven Ektodomänen des APP und des APLP2 führte. Eine ebenso starke morphologische und biochemische Veränderung von Zellen wie beim Differenzierungsprozess ist auch bei Induktion der Apoptose zu beobachten, die den Tod der Zellen bewirkt. Um in diesem Zusammenhang eine mögliche gemeinsame Regulation von APLP2 und den prozessierenden Proteasen aufzuklären, wurden Neuroblastoma-Zellen durch die Einwirkung der Apoptose-induzierender Substanzen Camptothecin, Phenylethylcaffeinsäure (CAPE) und Doxorubicin in den programmierten Zelltod geführt.

Substanz	Lösungsmittel	eingesetzte Konzentration
Camptothecin	DMSO	2 μM
CAPE	50 % Ethanol	25 $\mu\text{g/ ml}$
Doxorubicin	Wasser	0,5 $\mu\text{g/ ml}$

Tabelle 8: Übersicht über die eingesetzten Apoptose-auslösenden Substanzen

Camptothecin und Doxorubicin gehören zu der Klasse der Topoisomerase-Hemmer und führen über die Störung der DNA-Replikation Zellen in den programmierten Zelltod. CAPE hingegen inhibiert den NF κ B-Signalweg und löst dadurch die Apoptose aus (Watabe et al., 2004; Natarajan et al., 1996). CAPE und Camptothecin wurden an SKNMC-Zellen und Doxorubicin an SH-SY5Y-Zellen eingesetzt. Die apoptotische Wirkung der drei Substanzen wurde durch die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 bzw. über die Bildung fragmentierter Kerne nachgewiesen (siehe 2.3.3.2.9).

3.1.2.7.1 Einfluss des Apoptose auf die Morphologie von Neuroblastoma-Zellen

Durch Apoptose-auslösende Substanzen verändern sich sowohl biochemische Komponenten der Zelle wie z.B. die Membranzusammensetzung als auch ihre Morphologie. Ein charakteristisches Kennzeichen ist dabei die Abschnürung apoptotischer Vesikel, was als sogenanntes „*membrane-blebbing*“ bezeichnet wird. Die freigesetzten Membranvesikel können nachfolgend von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden. Dies verhindert entzündliche Prozesse im Verlauf des programmierten Zelltods. In der nachgestellten Abbildung ist die Abschnürung von Vesikeln unter dem Einfluss von Camptothecin gezeigt.

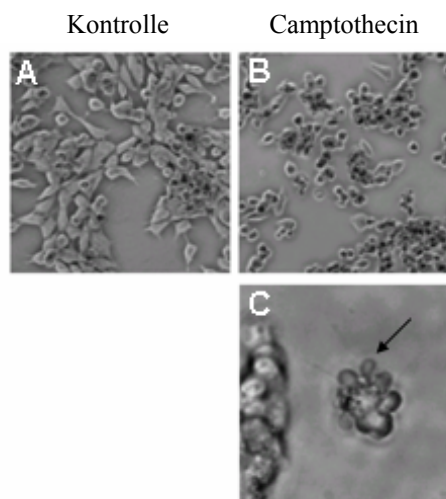


Abbildung 55: Abschnürung apoptotischer Vesikel in SKNMC-Zellen nach Camptothecin-Behandlung

SKNMC-Zellen wurden für 6 h mit Camptothecin behandelt (B und C). Die Kontrollzellen (A) erhielten entsprechende Volumina des Lösungsmittels DMSO. Die Zellen wurden lebend mikroskopiert (100fache (B) bzw. 400fache Vergrößerung (C)). Der Pfeil kennzeichnet ein abgeschnürtes Membranvesikel.

3.1.2.7.2 Quantifizierung der Substrat- und Proteasen-Expression im Western-Blot

Um zu prüfen, ob die apoptotische Veränderung von Neuroblastoma-Zelllinien einen Einfluss auf die Expression von ADAM10 und seines Substrats APLP2 besitzt, wurden SKNMC-Zellen wie beschrieben (siehe Tabelle 8) mit Camptothecin und CAPE und SH-SY5Y-Zellen mit Doxorubicin inkubiert. Lysate der Zellen wurden im Western-Blot auf die Expression der Protease und des Substrats hin untersucht.

Ergebnisse

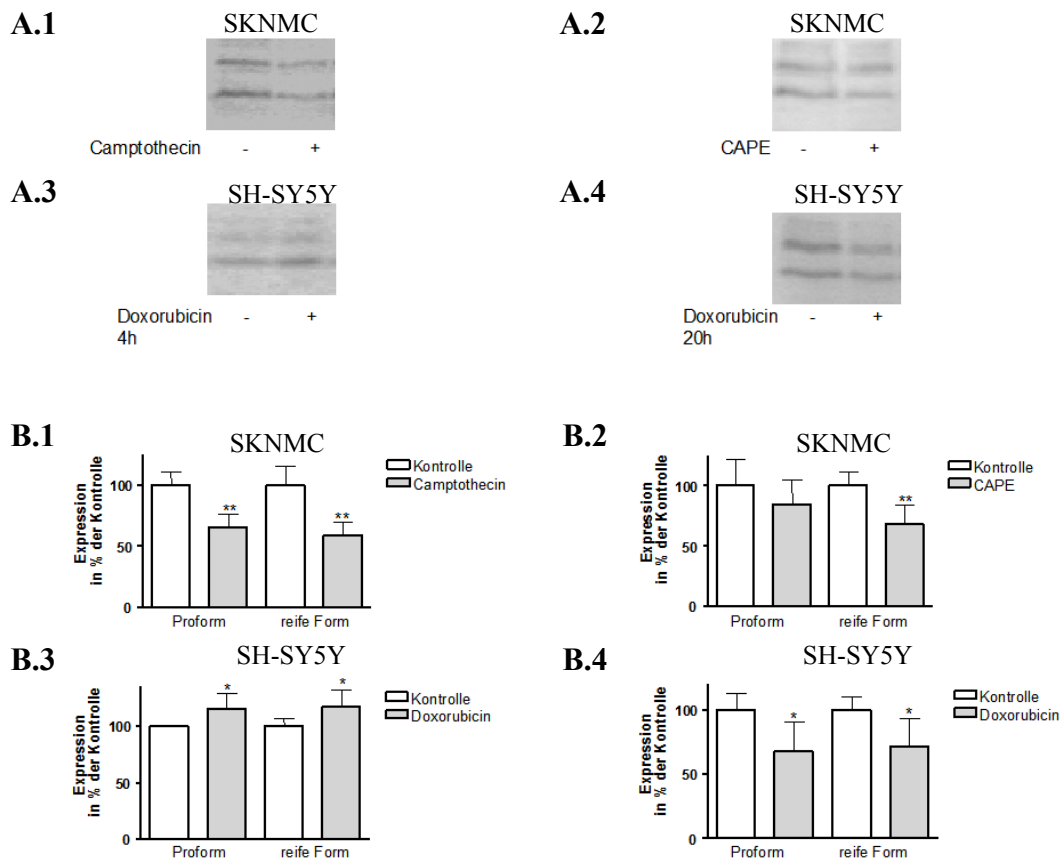


Abbildung 56: Expression von ADAM10 unter dem Einfluss apoptose-induzierender Substanzen in Neuroblastoma-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden mit den Apoptose-Induktoren wie beschrieben inkubiert (A.1: Camptothecin SKNMC 6 h; A.2: CAPE SKNMC 20 h; A.3: Doxorubicin SH-SY5Y 4 h; A.4: Doxorubicin SH-SY5Y 20 h). Dann wurden die Zellen lysiert und im Western-Blot auf die Expression von ADAM10 hin untersucht. Der Nachweis sowohl der Pro- als auch der reifen Protease-Form erfolgte durch den Antikörper von Chemikon gegen den C-Terminus der Protease und einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot bestimmten Mengen an ADAM10 (B.1: Camptothecin SKNMC 6 h; B.2: CAPE SKNMC 20 h; B.3: Doxorubicin SH-SY5Y 4 h; B.4: Doxorubicin SH-SY5Y 20 h). Die Quantifizierung wurde für die Pro- und die reife Form separat durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Mittelwert der Lösungsmittel-behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

Sowohl Camptothecin als auch CAPE führten in der Zelllinie SKNMC zu einer Verminderung sowohl der Pro- als auch der reifen Form von ADAM10 (siehe Abbildung 56 A.1, A.2, B.1 und B.2). Doxorubicin führte in SH-SY5Y-Zellen nach kurzer Inkubationszeit (4 h) zu einem leichten Anstieg beider Proteaseformen (siehe Abbildung 56 A.3 und B.3) und erst nach 20 h Inkubation zu einer Abnahme analog zu den beiden anderen Apoptose-Induktoren (siehe Abbildung 56 A.4 und B.4). Um

zu überprüfen, ob auch das ADAM10-Substrat APLP2 von apoptotischen Vorgängen betroffen war, wurde auch die APLP2-Expression untersucht.

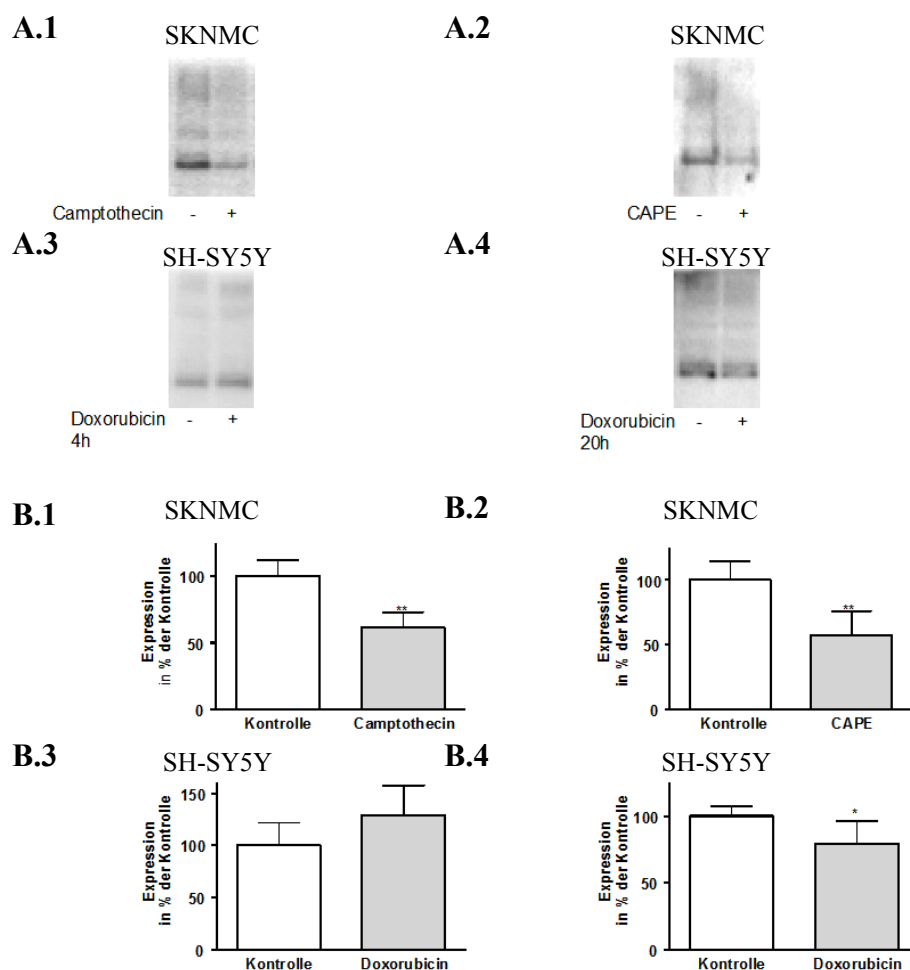


Abbildung 57: Expression von APLP2 unter dem Einfluss apoptose-induzierender Substanzen in Neuroblastoma-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden mit den Apoptose-Induktoren wie beschrieben inkubiert (A.1: Camptothezin SKNMC 6 h; A.2: CAPE SKNMC 2 20 h; A.3: Doxorubicin SH-SY5Y 4 h; A.4: Doxorubicin SH-SY5Y 20 h). Dann wurden die Zellen lysiert und im Western-Blot mit dem Erstantikörper CT12 auf die Expression von APLP2 hin untersucht. B) Quantifizierung des zellulären APLP2 (B.1: Camptothezin SKNMC 6 h; B.2: CAPE SKNMC 2 20 h; B.3: Doxorubicin SH-SY5Y 4 h; B.4: Doxorubicin SH-SY5Y 20 h). Die Quantifizierung wurde mit der Software Aida 3.50 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Mittelwert der Lösungsmittel-behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (Student's t-Test für unabhängige Stichproben *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) bestimmt.

Camptothezin und CAPE führten in der Zelllinie SKNMC zu einer signifikanten Verminderung der APLP2-Expression (siehe Abbildung 57 A.1, A.2, B.1 und B.2). Analog zur ADAM10-Expression führte Doxorubicin in SH-SY5Y-Zellen nach

Ergebnisse

kurzer Inkubationszeit (4 h) zu einem leichten, aber nicht-signifikanten Anstieg von APLP2 (siehe Abbildung 57 A.3 und B.3) und nach 20 h Inkubation zu einer Abnahme (siehe Abbildung 57 A.4 und B.4). Wenn sowohl die Substrate als auch die prozessierende Protease bei Induktion der Apoptose abnehmen, so sollten auch die Proteolyseprodukte im Kulturüberstand abnehmen. Dies wurde beispielhaft für die Inkubation von SKNMC-Zellen mit Camptothecin überprüft. Neben dem löslichen APLP2s wurde auch APPs α als ein Produkt der α -Sekretasen-Spaltung analysiert.

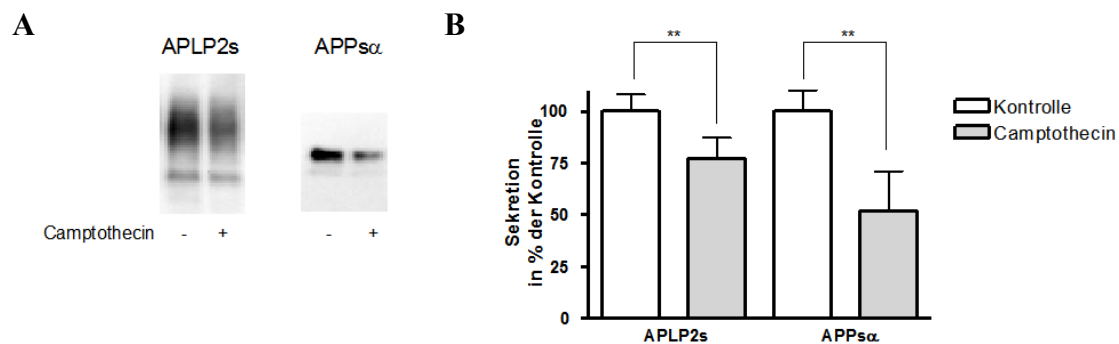


Abbildung 58: Sekretion von APLP2s und APPs α unter dem Einfluss von Camptothecin in SKNMC-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden mit Camptothecin (2 μ M) inkubiert. Da in einer Zeitreihe festgestellt wurde, dass die Induktion der Apoptose zwischen 2 und 4 h nach Beginn der Camptothecin-Inkubation einsetzte (nachgewiesen durch die Caspase-Aktivität, nicht gezeigt), wurden die Zellen 2 h vorbehandelt und erst dann nach einem Mediumwechsel für 4,5 h die sekretierten Proteine gesammelt. Die Proteine der Kulturüberstände wurden mit TCA gefällt und auf 7,5%igen SDS-PAGEs aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch die Antikörper D2II bzw. 6E10 und Alkalische Phosphatase-gekoppelte Zweitantikörper. B) Quantifizierung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot evaluierten Mengen an APLP2s und APPs α . Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Mittelwert der Lösungsmittel-behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt.

Sowohl für APLP2s als auch für APPs α ergab sich aus der Inkubation der Zellen mit Camptothecin eine signifikante Reduktion (siehe Abbildung 58). Diese betrug für APPs α ca. 50% und für APLP2s ca. 75% im Vergleich zur Kontrolle. Da jedoch die Expression des APP nicht untersucht wurde, ist ein direkter Vergleich zwischen den beiden Spaltprozessen während der Camptothecin-induzierten Apoptose hier nicht möglich. Zudem ist hierbei zu bedenken, dass lösliches APLP2 auch durch BACE erzeugt werden kann (siehe 3.1.2.3.2). Eine Untersuchung der BACE-1-mRNA in der RealTime RT-PCR zeigte, dass zumindest die Transkription von BACE durch

Apoptose nicht beeinflusst wird. Eine ausgleichende Spaltung durch diese Protease bei geminderter ADAM10-Aktivität könnte demnach zur Abschwächung des Apoptose-Effekts auf die APLP2s-Freisetzung geführt haben (siehe Abbildung 59). Für APLP2 und ADAM10 bestätigte die Quantifizierung der mRNA die auf Proteinebene nachgewiesene Verminderung. Daher muss eine Beeinflussung der Genregulation während der Apoptose vorgelegen haben.

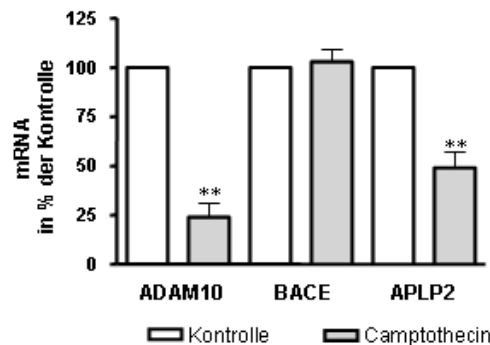


Abbildung 59: mRNA von ADAM10, APLP2 und BACE in apoptotischen SH-SY5Y-Zellen

Die mRNA von ADAM10, APLP2 und BACE wurde in Camptothecin-behandelter SKNMC-Zellen in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten bestimmt und wie in Abbildung 48 beschrieben quantifiziert (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$).

Insgesamt wurde für ADAM10 und sein Substrat APLP2 eine geminderte Expression im Verlauf der Apoptose durch die drei Substanzen Camptothecin, CAPE und Doxorubicin festgestellt.

Auffällig jedoch war, dass zu einem frühen Zeitpunkt der Doxorubicin-Inkubation ADAM10 verstärkt in den SH-SY5Y-Zellen vorlag. Auch das Substrat APLP2 nahm leicht, wenn auch nicht signifikant unter dem Einfluss der kurzen Doxorubicin-Behandlung zu. Bereits bei der 4 h-Inkubation mit dem Topoisomerase-Hemmer Doxorubicin war jedoch eine zu der 20 h-Inkubation vergleichbare Aktivität der Caspasen 3 und 7 zu verzeichnen (siehe 2.3.3.2.9). D.h. sowohl bei 4 als auch bei 20 h Inkubation mit Doxorubicin sind die Zellen apoptotisch. Dennoch muss es einen zwischen den beiden Ansätzen differierenden Faktor geben, der zu den Expressionsunterschieden für ADAM10 und APLP2 führte. Da Doxorubicin nicht nur die Aktivität der Topoisomerase hemmt, sondern auch NF κ B induzieren kann (Bian et al., 2001), sollte nun nachfolgend untersucht werden, ob ein Zusammenhang

zwischen der Aktivität des zellulären NF κ B und den Expressionseinflüssen der Apoptose-Induktoren bestehen könnte.

3.1.2.7.3 Untersuchung der Abhängigkeit der Koregulation von APLP2 und ADAM10 während der Apoptose vom NF κ B-Signalweg

Ein wichtiger Signalweg zur Vermeidung des apoptotischen Untergangs von Zellen ist der NF κ B-Signalweg. NF κ B liegt in der Zelle als cytoplasmatischer Komplex mit dem natürlichen Inhibitor I κ B α vor. Wird der Inhibitor I κ B α durch Aktivierung einer Kinase (I κ K) phosphoryliert, verliert er seine NF κ B-Bindungs-fähigkeit und der Transkriptionsfaktor wird freigesetzt. Er transloziert in den Kern und induziert die Transkription anti-apoptotischer Gene wie z.B. bcl-xL oder bcl-2.

Um zu überprüfen, inwieweit die Aktivität von NF κ B durch Camptothecin und Doxorubicin beeinflusst wird, wurde ein NF κ B-Luciferase-Reporterkonstrukt (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA)) eingesetzt. Der Vektor wurde transient in den entsprechenden Zellen exprimiert und die Menge an Luciferase anhand der emittierten Chemilumineszenz bestimmt. Für CAPE, das bekanntermaßen als NF κ B-Repressor fungiert, wurde ein EGFP-Reporter-Konstrukt verwendet, da CAPE die katalytische Aktivität der Luciferase hemmt (siehe 2.3.7.2.2).

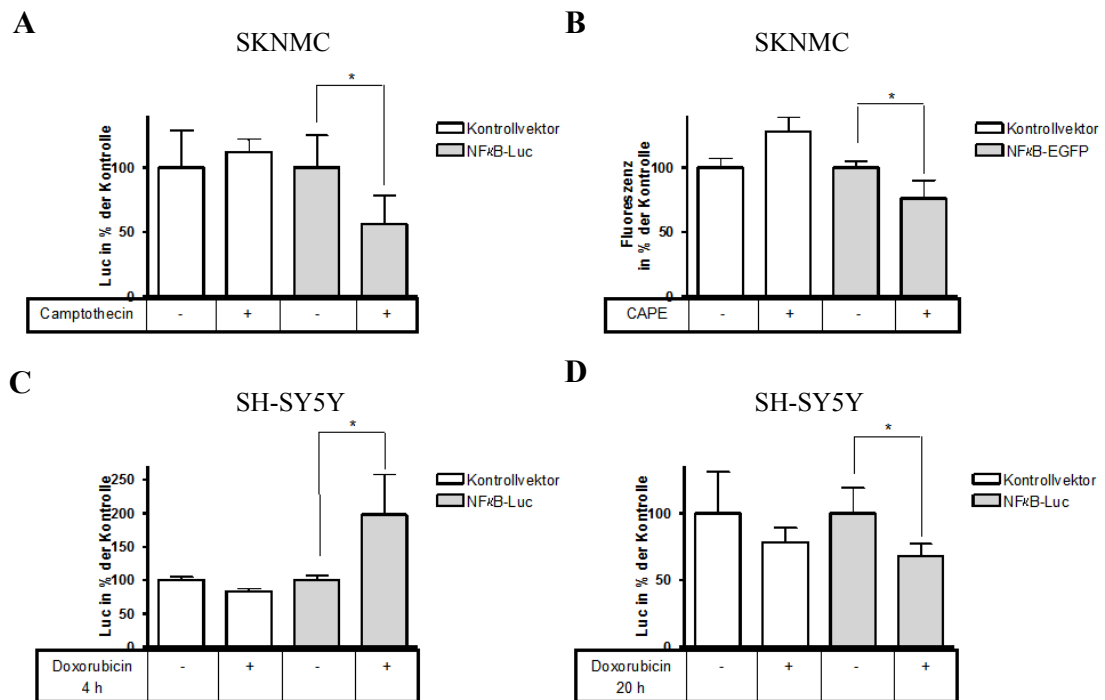


Abbildung 60: Einfluss der Apoptose-Induktoren Camptothecin, CAPE und Doxorubicin auf die NFκB-Aktivität in Neuroblastoma-Zellen

Die Zellen wurden mit 400 ng DNA (Kontrollvektor pTal oder NFκB-Luciferase/EGFP-Reporterkonstrukt) in 24-Loch-Platten transfiziert. Nach Ablauf der Transfektion wurden die Zellen mit den Substanzen inkubiert, dann in passivem Lysispuffer aufgenommen und die Luciferase-Aktivität im Promotor-Test bzw. die EGFP-basierende Fluoreszenz bestimmt. Es wurden drei Versuche in Duplikaten durchgeführt. A) SKNMC-Zellen wurden 6 h mit Camptothecin oder B) für 20 h mit CAPE inkubiert. SH-SY5Y-Zellen wurden 4 (C) bzw. 20 (D) h mit Doxorubicin behandelt. Die Werte aus der Lumineszenzmessung bzw. aus der Fluoreszenzemission wurden auf die Proteinmenge der Lysate normiert. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (Student's t-Test für unabhängige Stichproben * $p < 0,05$) ermittelt.

Für Camptothecin ergab sich eine signifikante Reduktion der NFκB-Aktivität nach 6 h Inkubation in SKNMC-Zellen (siehe Abbildung 60 A). Auch CAPE führte zu einer Verminderung der NFκB-abhängigen Transkription des EGFP (siehe Abbildung 60 B). Hierbei wurde die Fluoreszenz ausgehend vom Kontrollvektor durch Behandlung mit CAPE signifikant erhöht (Signifikanz in der Abbildung nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass ein NFκB-unabhängiger Effekt auf den Expressionsvektor vorliegt. Da dieser aktivierend ist, bleibt zu vermuten, dass die eigentliche inhibitorische Potenz des CAPE auf NFκB noch stärker ist und sich in der Transkription des Reporterplasmids zwei gegenläufige Effekte überlagern.

Ergebnisse

Für Doxorubicin in SH-SY5Y-Zellen zeigte sich eine zirka zweifache Verstärkung der Luciferase-Aktivität nach 4 h, so dass eine deutliche Aktivierung von NFκB vorlag (siehe Abbildung 60 C). Nach 20 h hingegen ist eine solche Aktivierung nicht mehr zu beobachten, es zeigte sich vielmehr eine inhibitorische Tendenz (siehe Abbildung 60 D). Diese ist jedoch vor dem Hintergrund, dass auch der Kontrollvektor (wenn auch nicht-signifikant) gehemmt wurde, kritisch zu betrachten. Insgesamt deutete sich an, dass eine Stimulation des NFκB-Weges aktivierend auf ADAM10 und sein Substrat APLP2 wirken könnte, während die Inhibition des Transkriptionsfaktors die Expression beider Proteine eher hemmt.

3.1.2.7.4 Einfluss von ADAM10- und TACE-Inhibitoren auf die Apoptose in Neuroblastoma-Zellen

Aus den vorangegangenen Versuchen zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der ADAM10-Expression, der Expression des Substrats APLP2 und daraus resultierend auch eine Reduktion der Katalyseprodukte von ADAM10 während der Apoptose. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob die reduzierte Aktivität der Protease eine Folge der Apoptose oder aber einen apoptose-auslösenden Faktor per se darstellt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen mit den Inhibitoren Ro-31-9790, GI254023X und GW280264X inkubiert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 als Apoptose-Marker in diesen Zellen bestimmt.

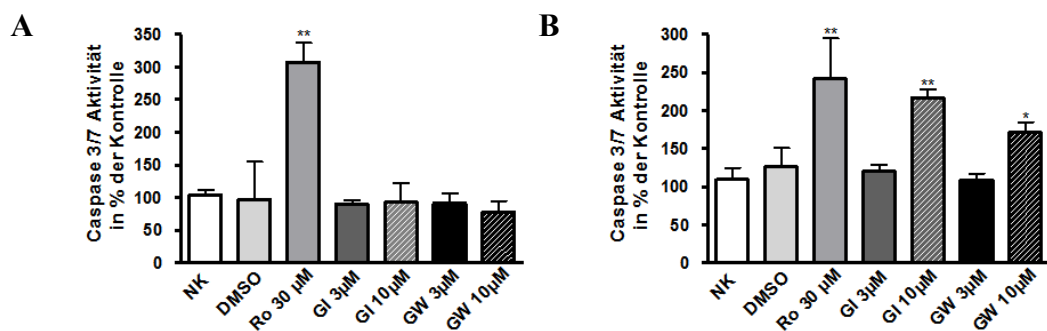


Abbildung 61: Einfluss einer verminderten MMP- bzw. ADAM10/17-Aktivität in Neuroblastoma-Zellen auf die Induktion der Apoptose

A) SKNMC-Zellen wurden mit den Inhibitoren in der angegebenen Konzentration für 20 h inkubiert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 anhand der entstandenen Lumineszenz ermittelt. B) SH-SY5Y-Zellen wurden analog behandelt und dem Caspase 3/7-Test unterzogen. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, normiert wurde auf die Zellzahl und der Wert für die unbehandelten Kontrollzellen (NK) auf 100% gesetzt. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (One-Way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$) ermittelt, als Kontrollwert diente dabei die Lösungsmittelkontrolle (DMSO).

Der unspezifische MMP- und ADAM-Inhibitor Ro-31-9790 erzielte in beiden Zelllinien eine deutliche Induktion der Apoptose, erkennbar an der Erhöhung der Caspase-Aktivität auf 300 bzw. 240% im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen (siehe Abbildung 61 A und B). Die zwei spezifischeren ADAM10/ADAM17-Inhibitoren GI254023X und GW280264X hatten in SKNMC-Zellen auch in der höheren Konzentration keine Apoptose-induzierende Wirkung. In den SH-SY5Y-Zellen zeigten beide Inhibitoren in geringer Konzentration (3 μ M) ebenfalls keinen Effekt, in erhöhter Konzentration (10 μ M) fand sich jedoch eine signifikante Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich ein gewisser Vorbehalt gegenüber Inhibitionsversuchen mit Ro-31-9790 in bezug auf die katalytische Aktivität der α -Sekretase. Da der Inhibitor derart stark Apoptose hervorruft, kann seine Wirkung nicht allein der Inhibition der katalytischen Aktivität zugeschrieben werden, sondern könnte ebenso auf einer Apoptose-begleitenden Reduktion in der Expression von ADAM10 und potentiellen Substraten beruhen, wie sie für die Apoptose-Induktoren in Kapitel 3.1.2.7.2 beschrieben wurde. Warum die spezifischeren ADAM-Inhibitoren GI254023X und GW280264X nur in SH-SY5Y-Zellen Apoptose auslösten, scheint zunächst unplausibel. Eventuell spielt hier jedoch die unterschiedliche Typologie der Neuroblastoma-Zelllinien eine Rolle: Während die SKNMC-Zellen dem Schwann-ähnlichen Typus zugeordnet werden, sind die SH-SY5Y-Zellen vom neuronalen Typ. Daraus könnten sich unterschiedliche Sensitivitäten und Ansprüche der Zellen an die katalytische Präsenz der ADAMs ergeben.

3.2 Untersuchungen zur Spaltung des Notch-Rezeptors durch die α -Sekretasen

3.2.1 *In vitro*-Spaltung von Notch-1-Peptiden

Notch-1 ist ein potentieller Kandidat für die Spaltung durch ADAM10 und/oder TACE (siehe 1.4). Um eine *in vitro*-Spaltung durch die rekombinanten Proteasen zu überprüfen, wurde je ein Peptid aus dem humanen und dem murinen Notch-1-Protein gewählt.

Ergebnisse

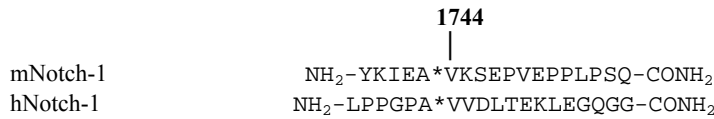


Abbildung 62: Vergleich der Proteinsequenzen des humanen und des murinen Notch-1-Peptids
Das humane Notch-1-Peptid wurde in der Annahme einer Konservierung der Spaltstelle (A*V) ausgewählt.

Das murine Notch-1-Peptid beinhaltet die Spaltstelle, die von Schroeter et al. (1998) für das überexprimierte murine Notch-1 identifiziert wurde. Die Peptidsequenz für das humane Notch-1 wurde analog dazu ausgewählt, da das V1744 der Spaltstelle in allen bekannten Notch-Proteinen konserviert ist und daher eine gemeinsame Spaltsequenz darstellen könnte.

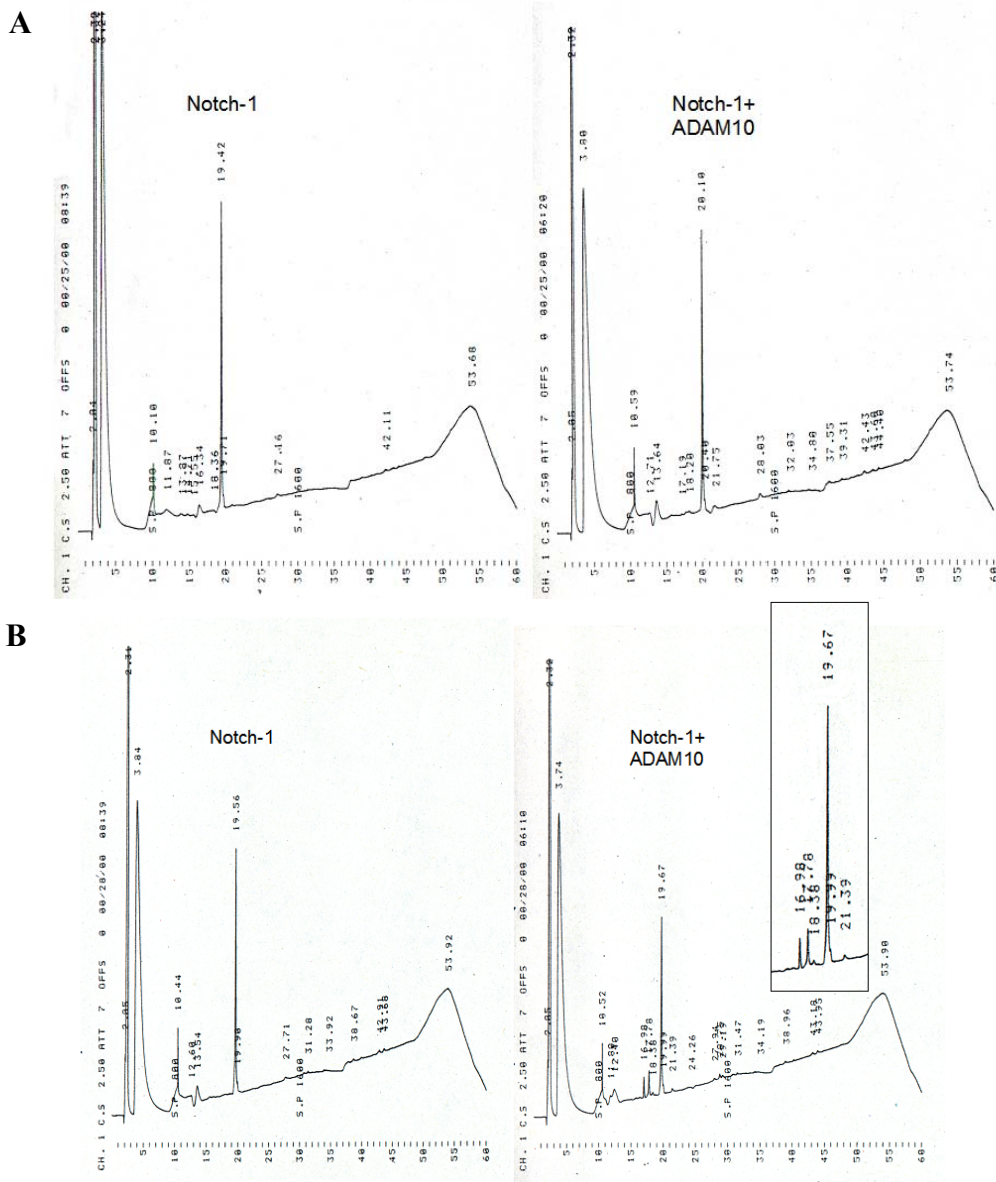


Abbildung 63: Elutionsprofile der HPLC zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des murinen Notch-1-Peptids durch rekombinantes ADAM10

Es wurden 1,5 μmol Peptid mit 100 ng (A) bzw. 500 ng (B) der rekombinanten Protease bzw. einem adäquaten Volumen an Test-Puffer inkubiert. A) Die Retentionszeiten betragen 19,42 min für das mNotch-1-Peptid im Kontrollansatz und 20,1 min für das Peptid im ADAM10-haltigen Ansatz. B) Die Retentionszeiten betragen 19,56 min für das mNotch-1-Peptid im Kontrollansatz und 19,67 min für das Peptid im ADAM10-haltigen Ansatz. Zudem traten zwei Peaks bei 16,98 und 17,78 min auf (vergrößerter Ausschnitt).

ADAM10 führte in geringer Konzentration (siehe Abbildung 63 A) zu keiner Abnahme des ungespaltenen Peptids und auch zu keinen neuen Fragmenten. Erst bei erhöhter Menge an ADAM10 zeigte sich eine proteolytische Spaltung des Peptids (siehe Abbildung 63 B). Dies war zum einen an der Verminderung des Absorptionssignals des ungespaltenen Peptids auf ca. 75% im Vergleich zum Kontrollansatz zu erkennen. Zum zweiten wurden neue Fragmente mit differierenden Retentionszeiten eluiert (16,98 und 17,78 Minuten, siehe vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 63 B), die als Spaltfragmente aus dem Verdau mit ADAM10 resultierten. Die Spaltfragmente aus der Proteolyse mit ADAM10 wurden von Dr. E. Kojro (Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) isoliert und mittels Massenspektrometrie (MALDI-FTICR-MS, M. Przybylski, Labor für Analytische Chemie und Biopolymer Struktur-Analyse, Universität Konstanz) charakterisiert: Es wurden zwei Peptide, die durch Spaltung zwischen den Aminosäuren A und V entstanden waren (siehe Abbildung 62), identifiziert. Diese Spaltstelle ist identisch mit der in der Literatur beschriebenen (Schroeter et al., 1998).

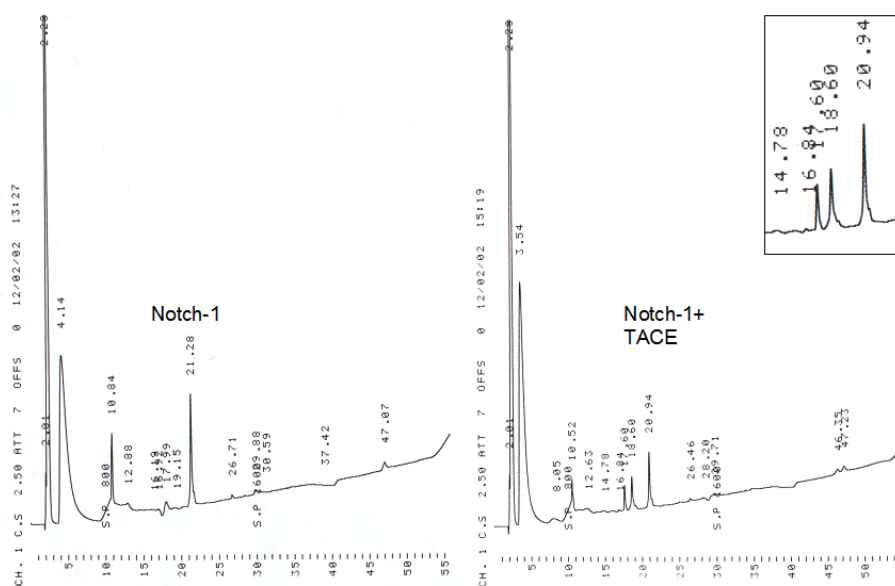


Abbildung 64: Elutionsprofile der HPLC zum Nachweis einer proteolytischen Spaltung des murinen Notch-1-Peptids durch rekombinantes TACE

Ergebnisse

Es wurden 1,5 μmol Peptid mit 350 ng der rekombinanten Protease bzw. einem adäquaten Volumen an Test-Puffer 6 h bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit TFA abgestoppt und der gesamte Ansatz auf die HPLC aufgetragen. Die Vergrößerung in der Abbildung rechts zeigt das verbliebene ungespaltene Peptid und die entstandenen Proteolyseprodukte nach Inkubation mit der Protease. Die Retentionszeiten betragen 21,28 min für das mNotch-1-Peptid im Kontrollansatz und 20,94 min für das Peptid im TACE-haltigen Ansatz. Zudem traten zwei neue Peaks bei 16,84 und 18,60 min auf.

Bei Inkubation des Peptids mit rekombinantem TACE ergab sich bereits nach 6 h eine deutliche Reduktion des Peptid-Peaks auf ca. 50% (siehe Abbildung 65). Zudem traten neue, den Proteolyseprodukten entsprechende Absorptionsmaxima auf (Retentionszeit 17,6 und 18,6 min), so dass auch TACE das Notch-1-Peptid *in vitro* zu spalten vermag.

Das Peptid aus der humanen Sequenz wurde ebenso wie beschrieben im *in vitro*-Test mit beiden rekombinanten Proteasen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind zusammen mit den Ergebnissen der Proteolyse des murinen Notch-1-Peptids in der folgenden Abbildung zusammengefasst:

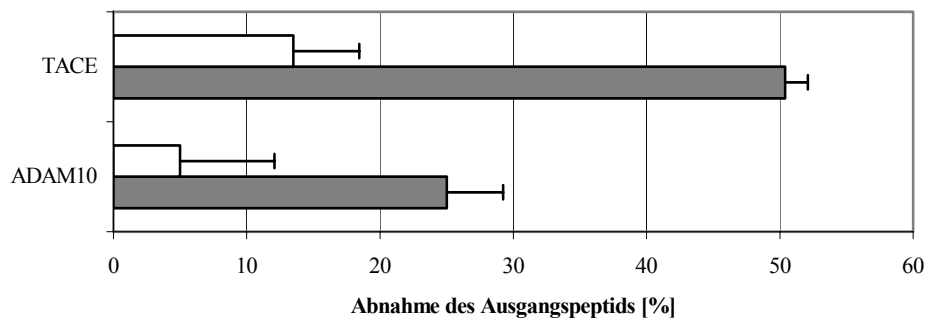


Abbildung 65: Quantifizierung der Proteolyse der Notch-1-Peptide durch die rekombinanten Proteasen ADAM10 bzw. TACE

Die Inkubation mit den rekombinanten Enzymen erfolgte für 20 h mit Ausnahme der Proteolyse des murinen Notch-1-Peptids durch TACE. Hier betrug die Inkubationszeit lediglich 6 h. Es wurden mindestens zwei unabhängige Versuche durchgeführt (weiße Balken: hNotch-1-Peptid, graue Balken: mNotch1-Peptid).

Während das murine Notch-1-Peptid sowohl durch ADAM10 als auch TACE gespalten wurde (siehe Abbildung 65), zeigte sich bei dem Peptid aus der humanen Proteinsequenz keine Spaltung durch ADAM10 (Abnahme des Peptids um $5 \pm 7\%$) und nur eine sehr geringe Spaltung durch TACE ($14 \pm 5\%$).

3.2.2 Einfluss der α -Sekretasen auf die Aktivierung des Notch-Systems in NIH3T3-Zellen

Endogenes Notch-1 war in verschiedenen Zelllinien durch kommerziell erhältliche Antikörper nicht nachweisbar. Daher wurde die Beeinflussung des Notch-Signalweges durch die α -Sekretasen in NIH3T3-Zellen mit transienter Überexpression eines Notch-1-Konstrukts untersucht. Da die zu untersuchende S2-Spaltung, die den α -Sekretasen zugeschrieben wird (siehe Abbildung 12 und 66) erst nach Ligandenbindung erfolgen kann, wurde hier mit dem Konstrukt Notch-1-LNG gearbeitet. Diese mutierte Form des Notch-1 weist eine Deletion der EGF-Repeats im N-Terminus und zwei Cystein-Serin-Austausche auf, die zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivierung führen (siehe Plasmidbeschreibung S. 41). Als Positivkontrolle für die Aktivierung der Notch-Zielgene wurde ein Deletionskonstrukt verwendet, das dem löslichen Spaltprodukt nach der S3-Spaltung entspricht (NIC). Es wirkt daher unabhängig von einer Ligandenbindung und unabhängig von proteolytischen Spaltungen aktivierend. Eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte und die Proteolysen gibt die nachfolgende Abbildung.

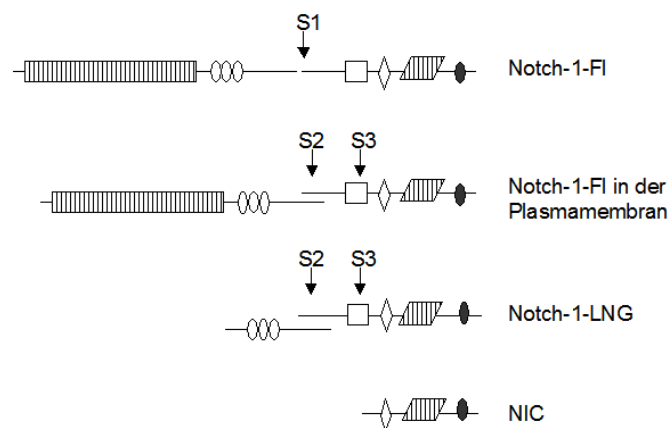


Abbildung 66: Notch-1-Konstrukte und proteolytische Prozessierungen

Die S1-Spaltung erfolgt durch Proproteinkonvertasen bei der Translokalisierung des Notch-1 zur Plasmamembran. An dem entstehenden Heterodimer kann nach Ligandenbindung die S2-Spaltung erfolgen, die wiederum Voraussetzung für die S3-Spaltung durch die γ -Sekretasen ist. Das Konstrukt Notch-1-LNG ist unabhängig von der Ligandenbindung, muss aber S2- und S3-gespalten werden, während das NIC direkt die Transkription nachgeschalteter Zielgene aktivieren kann.

Ergebnisse

3.2.2.1 Untersuchungen zur Notch-Aktivierung mittels eines Promotor-Tests

Die Aktivierung des Notch-1-Signalwegs wurde indirekt über einen Reporter-Test nachgewiesen. Hierzu wurden NIH3T3-Zellen mit den jeweiligen Notch-Konstrukten und dem RBPJ κ_6 -Luciferase-Konstrukt kotransfiziert. Das RBPJ κ_6 -Luciferase-Konstrukt beinhaltet die „*Firefly*“-Luciferase-cDNA unter der Kontrolle eines sechsfachen Bindungselements für das CSL/NIC-Heterodimer. Substanzen, die eine inhibitorische Funktion auf die α -Sekretasen besitzen, sollten demnach zu einer geminderten Expression der Luciferase (geminderte Lichtemission) und induzierende Agenzien zu einer Steigerung führen. Eine gleichzeitige Transfektion mit einem Renilla-Luciferase-Reporterkonstrukt diente der Normierung der erhaltenen Messwerte (siehe 2.3.7.2.1).

Zunächst wurde überprüft, ob der Notch-Signalweg in den verwendeten Zellen durch Prozessierung des überexprimierten Notch-1-LNG durch endogene Proteasen aktiviert wird.

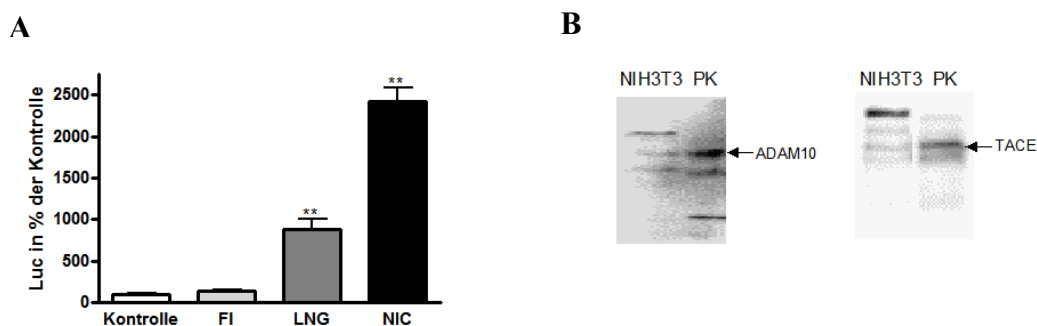


Abbildung 67: Aktivierung des RBPJ κ_6 -Luciferase-Reporters in NIH3T3-Zellen durch transient überexprimierte Notch-1-Konstrukte und Nachweis der endogenen Proteasen ADAM10 und TACE

A) Quantifizierung der Luciferase-Aktivität: Eingesetzt wurde das vollständige Notch-1 (FI), das konstitutiv aktive Notch-1-LNG (LNG) und das völlig spaltungsunabhängige NIC, das dem Spaltprodukt nach der Presenilin-Spaltung entspricht. Es wurden 400 ng des jeweiligen Notch-Konstrukts, 400 ng des RBPJ κ_6 -Konstrukts und 200 ng phRL-SV40 pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem leeren Vektor pcDNA3 transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert und in Triplikaten auf die katalytische Aktivität der Luciferase im Promotor-Test (Promega, Madison, WI (USA)) hin untersucht. Das dargestellte Diagramm gibt die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung der emittierten Lichteinheiten von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten wieder. Die Messwerte wurden auf die Renilla-Luciferase-Meßwerte normiert. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (One-way Anova, Dunnett's multiple comparison Post-Test **, $p > 0,01$) ermittelt. B) Lysate von NIH3T3-Zellen wurden auf 7,5%igen SDS-PAGEs aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und die endogenen Proteasen mit

Primärantikörpern gegen die C-Termini in Kombination mit Alkalische Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpern detektiert. Als Positivkontrollen (PK) dienten jeweils Lysate von HEK-Zellen mit stabiler Überexpression der Proteasen (siehe 3.1.2.4).

Aus dem Promotor-Test (siehe Abbildung 67 A) ging hervor, dass das vollständige Notch-1-Protein (FI) bei transienter Überexpression nicht in der Lage ist, das Reporterkonstrukt zu aktivieren. Da dieses Protein nach Bindung eines Liganden zwei konsekutive proteolytische Spaltungen durchlaufen muss, bevor es zur Freisetzung der C-terminalen Domäne (NIC) kommt, ist es alleine nicht aktiv. Das NIC hingegen, das dem Produkt des letzten Proteolyseschritts entspricht und daher völlig unabhängig von einer Prozessierung ist, führte zu einer deutlichen, etwa 25fachen Aktivierung des RBPJK₆-Luciferase-Reporters. Auch das Notch-1-LNG führte zu einer signifikanten Steigerung der Luciferase-Expression. Diese war mit ca. 900% jedoch geringer als die durch NIC induzierte. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass dieses Protein zwar unabhängig von einer Ligandenbindung ist, aber dennoch zwei Proteolysen durchlaufen muss, bevor das als Transkriptionsfaktor wirksame NIC daraus entstehen kann. Damit war ebenfalls gezeigt, dass die benötigten Proteasen für diese zwei Proteolyseereignisse in den Zellen vorliegen müssen. Durch Immunoblot-Analyse ließen sich sowohl ADAM10 als auch TACE in den Zellen nachweisen, so dass beide als potentielle Kandidaten für das S2-Spaltereignis zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 67 B).

Für die auf die S2-Spaltung folgende S3-Spaltung werden die Preseniline (γ -Sekretasen) verantwortlich gemacht. Um zu überprüfen, ob die Entstehung des NIC in NIH3T3-Zellen von diesen Proteasen abhängt, wurde der γ -Sekretase-Inhibitor DAPT eingesetzt.

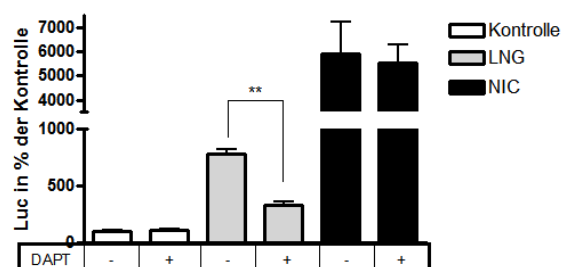


Abbildung 68: Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT auf verkürzte Notch-1-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Zellen

Die Zellen wurden wie in Abbildung 67 beschrieben transfiziert. Nach 48 h Inkubation mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (2 μ M) wurden die Zellen lysiert. Eingesetzt wurde das konstitutiv aktive Notch-1-LNG (LNG)

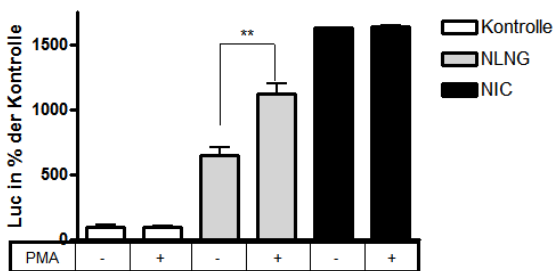
Ergebnisse

und das völlig spaltungsunabhängige NIC. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem leeren Vektor pcDNA3 transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte (RLU *Firefly*/RLU *Renilla*) und die einfache Standardabweichung von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) ermittelt.

Während die NIC-transfizierten Zellen keine Abhängigkeit der Luciferase-Aktivität von dem eingesetzten γ -Sekretase-Inhibitor zeigten, reduzierte sich die Luciferase-Aktivität in Notch-1-LNG transfizierten Zellen auf ca. 50% (siehe Abbildung 68). Damit bestätigt sich die Abhängigkeit dieses mutierten Notch-1 von der S3-Spaltung.

Um eine mögliche Abhängigkeit von der S2-Spaltung und damit von den Metalloproteinasen ADAM10 und TACE zu demonstrieren, wurde nun die Stimulierbarkeit der Notch-induzierten Transkription der Luciferase durch den Phorbolster PMA und die Inhibierbarkeit durch Hydroxamsäure-Verbindungen geprüft.

A



B

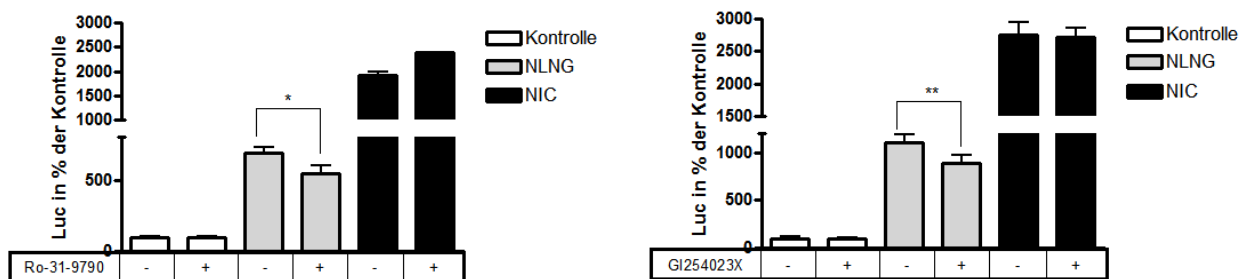


Abbildung 69: Einfluss des Phorbolsters PMA und der Hydroxamsäureinhibitoren Ro-31-9790 und GI-254023X auf verkürzte Notch-1-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Zellen

Die Zellen wurden wie in Abbildung 67 beschrieben transfiziert. A) Die Zellen wurden 44 h nach der Transfektion mit 1 μ M PMA für 4 h inkubiert und dann lysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Messwerte wurden auf die Renilla-Luciferase-Messwerte normiert. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (One-way-ANOVA, Bonferroni Post-Test **, $p < 0,01$) ermittelt. B) Die Zellen wurden 48 h lang nach der Transfektion mit 30 μ M Ro-

31-9790 bzw. 44 h nach der Transfektion für 4 h mit 3 μ M GI254023X inkubiert und dann lysiert. Die Auswertung erfolgte wie in A beschrieben.

Durch Inkubation der transient mit Notch-1-LNG transfizierten Zellen mit PMA ließ sich die Luciferase-Aktivität von 650% im Vergleich zur Negativkontrolle auf 1100% steigern (siehe Abbildung 69 A). Diese annähernde Verdopplung der Luciferase-Aktivität zeigte, dass die durch Notch-1-LNG vermittelte Signaltransduktion von Phorbolestern induzierbar ist. Dies kann als ein Indiz für die Beteiligung von Metalloproteinasen am Spaltereignis gewertet werden. Das spaltungsunabhängige NIC hingegen war in seiner Funktionalität unabhängig von PMA. Zudem zeigten die beiden Hydroxamsäureverbindungen Ro-31-9790 und GI254023X eine mindernde Wirkung auf die Notch-1-LNG-vermittelte Luciferase-Transkription (siehe Abbildung 69 B). Beide Inhibitoren reduzierten die Luciferase-Aktivität auf ca. 80%, wobei zu bedenken ist, dass der ADAM10-preferierende Inhibitor GI254023X in deutlich geringerer Konzentration und kürzer eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse stützen die mit PMA erzielten Effekte in der Hinsicht, dass die S2-Spaltung des Notch-1 in NIH3T3-Zellen von Metalloproteinasen abhängig ist. Allerdings waren die mit den Inhibitoren erzielten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle relativ gering. Daher sollte die Koexpression der Proteasen ADAM10 bzw. TACE klären, inwieweit sie an der S2-Spaltung beteiligt bzw. dafür notwendig sind.

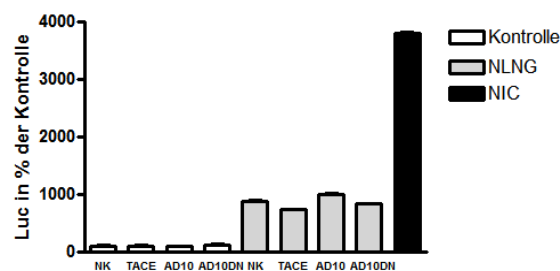


Abbildung 70: Einfluss transient überexprimierter Proteasen auf verkürzte Notch-1-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Zellen

Die Zellen wurden mit 400 ng RBPJ κ_6 -Luciferase-Reporter, 400 ng des jeweiligen Notch-Konstrukts, 400 ng der Protease-Konstrukte (basierend auf dem Vektor pcDNA3, der leere Vektor diente als Nullkontrolle (NK)) und 200 ng des Renilla-Luciferase-Normierungsvektors (phRL) transfiziert. Das dargestellte Diagramm gibt die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung der auf die Renilla-Luciferase normierten Lichteinheiten der *Firefly*-Luciferase an. Signifikanzniveaus wurden nicht ermittelt, da es sich um einen Einzelversuch in Triplikaten handelte.

Ergebnisse

Die transiente Überexpression der Proteasen – sowohl der funktionellen als auch des dominant negativen ADAM10 – führte zu keiner veränderten Luciferase-Aktivität in den NIH3T3-Zellen (siehe Abbildung 70). Daher wurde der Versuch mit einer erhöhten Protease-Konstrukt-Menge wiederholt, um eventuell durch eine stärkere Expression der Proteasen Effekte evaluieren zu können.

Jedoch konnte auch durch eine Erhöhung der Expressionsvektoren der Proteasen bei der Transfektion keine Induktion der Notch-1-LNG-abhängigen Luciferase-Transkription erzielt werden (nicht gezeigt). Durch Überprüfung im Western-Blot wurde nachgewiesen, dass lediglich TACE in den Zellen transient überexprimiert wurde, während sowohl ADAM10 und ADAM10DN unter der Nachweisgrenze lagen oder gar nicht exprimiert wurden. Daher lässt sich aus diesem Versuch lediglich schließen, dass TACE vermutlich nicht direkt verantwortlich für die Spaltung von Notch-1 ist. Die Rolle von ADAM10 konnte nicht geklärt werden.

3.2.2.2 Untersuchungen der Notch-1-Proteolyse im Western-Blot

Zur Absicherung der Ergebnisse aus den Promotor-Experimenten wurde die Spaltung des transient exprimierenden Notch-1-LNG in NIH3T3-Zellen im Western-Blot untersucht.

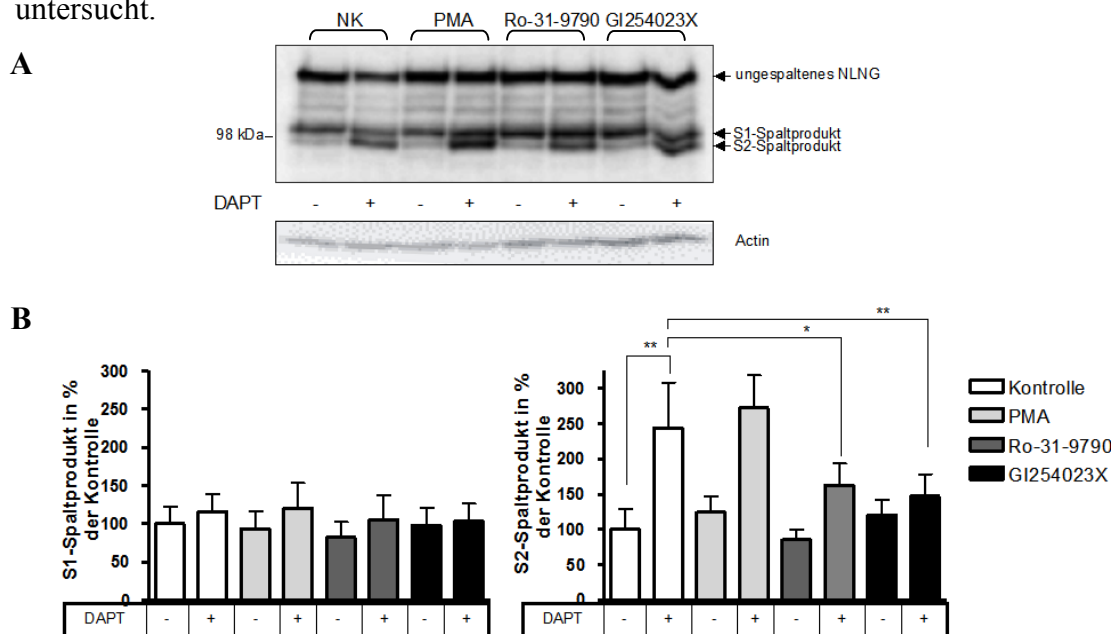


Abbildung 71: Einfluss des Phorbolesters PMA und der Hydroxamsäureinhibitoren Ro-31-9790 und GI254023X auf die Prozessierung des transient überexprimierten Notch-1-LNG in NIH3T3-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot. Die Zellen wurden mit 400 ng des ligandenunabhängigen Notch-1-LNG-Konstrukts in 6-Loch-Platten transfiziert und unmittelbar nach der Transfektion mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (2 μ M) für 24 h inkubiert. Dann wurden die Inhibitoren Ro-31-9790 (30 μ M) bzw. GI-254023X (3 μ M) zugesetzt und weitere 20 h inkubiert. PMA (1 μ M) wurde den Zellen für 4 h zugesetzt. Als Negativkontrolle (NK) dienen analog mit Lösungsmitteln behandelte Zellen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und auf einer 7,5%igen SDS-PAGE 1/3 der Lysate aufgetrennt. Notch-1-LNG und seine Spaltprodukte wurden über das der Proteinsequenz angefügte Myc-Epitop nachgewiesen. Als Zweitantikörper wurde ein Alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Zur Normierung der densitometrischen Messwerte wurde Actin in den Western-Blots nachgewiesen. Es wurden drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt. B) Quantitative Analyse der Notch-Prozessierung: Quantifiziert wurden die Spaltprodukte der S1- und der S2-Spaltung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Spaltprodukte, die auf die Actin-Werte normiert wurden, und die einfache Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus wurden mit GraphPad Prism (Bonferroni's Multiple Comparism Test *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) ermittelt. Die nur mit Lösungsmitteln behandelten Zellen ohne DAPT wurden auf 100% gesetzt.

Anhand der Western-Blots (siehe Abbildung 71) war deutlich zu erkennen, dass das S2-Spaltprodukt erst nach Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT ausreichend stabilisiert wird, um es gut nachweisen zu können. In den DAPT-behandelten Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen das ca. 80 kDa-große S2-Spaltprodukt auf ca. 250% erhöht (rechtes Diagramm der Abbildung 71 B). Das S1-Spaltprodukt, das durch die erste Prozessierung des 130 kDa-großen Notch-1-LNG durch Proproteinkonvertasen entsteht, war hingegen nicht durch Inkubation der Zellen mit DAPT in seiner Menge beeinflusst (linkes Diagramm der Abbildung 71 B). Ebenso führten sowohl PMA als auch die Hydroxamsäureinhibitoren Ro-31-9790 und GI254023X zu keiner signifikanten Veränderung der S1-Prozessierung des Notch-1-LNG. PMA führte alleine und auch in Kombination mit DAPT zu einer lediglich leichten Verstärkung des S2-Spaltprodukts auf ca. 120% im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant.

Der Einsatz der Hydroxamsäureverbindungen alleine hatte gegenüber der Kontrolle keinen eindeutigen Effekt. Beim Vergleich der Zellen, die mit DAPT behandelt wurden und denen, die DAPT in Kombination mit den Hydroxamsäureinhibitoren erhielten, zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion des S2-Spaltprodukts (DAPT: 244 ± 64 ; Ro/DAPT: 162 ± 31 ; GI/DAPT: 147 ± 31).

Somit ergab auch die Untersuchung der Notch-1-LNG-Prozessierung im Western-Blot in bezug auf die Hydroxamsäure-Inhibitoren eine Abhängigkeit des

Spaltereignisses von Metalloproteinasen, wie sie bereits in den Untersuchungen mit dem Notch-1-abhängigen Promotorkonstrukt gezeigt wurde (siehe 3.2.2.1).

3.2.3 Einfluss der ADAM10- und ADAM10DN-Überexpression auf das Notch-System in transgenen Mäusen

Die Rolle von Notch-1 als potentielles Substrat für ADAM10 wurde in Inhibitor-Versuchen in dieser Arbeit bekräftigt (siehe 3.2.2). Daher sollte untersucht werden, ob die ADAM10- bzw. ADAM10DN-transgenen Mäuse durch vermehrte Spaltung von Notch-1 eine Aktivierung von nachgeordneten Signalwegen zeigen. Die Beeinflussung des Notch-1-Signalweges wurde indirekt über die Aktivierung der Transkription des Zielgens Hes-5 untersucht. Dazu wurde die Menge der Hes5-mRNA aus dem Gehirn 10 Wochen alter ADAM10 mäßig überexprimierender Tiere (Linie B) mit der Menge in nicht-transgenen Kontrolltieren (FVB/N) verglichen.

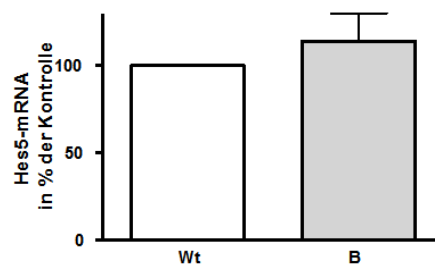


Abbildung 72: Quantifizierung der Hes-5-mRNA in mRNA-Isolaten aus Maus-Gehirnen der Linie B (10 Wochen)

Aus den Gehirn-Hemisphären von 10 Wochen alten Mäusen der Linie B bzw. nicht-transgener Mäusen (Wt: FVB/N, n = 5) wurde die RNA isoliert und in der RealTime RT-PCR auf die Menge an Hes-5-mRNA untersucht. Die RNA wurde in Triplikaten analysiert und auf die GAPDH-mRNA normiert. Die Werte der transgenen Tiere wurden auf den Mittelwert des ΔCt -Werts aller Kontrolltiere nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert der einzelnen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte und die einfache Standardabweichung.

Die Quantifizierung der Hes-5-mRNA in den RNA-Isolaten der B-Linie mit mittlerer ADAM10-Überexpression ergab keine signifikante Steigerung der mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abbildung 72). Da in der Literatur eine starke Aktivität des Notch-Signalweges hauptsächlich embryonal bzw. geburtsnah beschrieben ist (z.B. Fischer et al., 2004; Irvin et al., 2003; Kostyszyn et al., 2001) wurden weitere Untersuchungen an Mäusen im Alter von 15 Tagen durchgeführt. In diesem Alter ist die Expression des transgenen ADAM10 bereits präsent und auf

einem stabilen Niveau (mündliche Mitteilung durch Dr. R. Postina, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

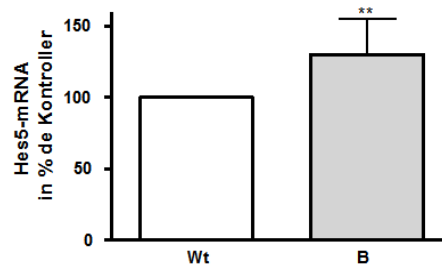


Abbildung 73: Quantifizierung der Hes-5-mRNA in RNA-Isolaten aus Maus-Gehirnen der Linie B (15 Tage)

Die Menge an Hes-5-mRNA wurde wie in Abbildung 72 beschrieben analysiert (B: n = 5, Wt: FVB/N, n = 10). Dargestellt ist der Mittelwert der einzelnen $\Delta\Delta Ct$ -Werte und die einfache Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 ermittelt (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$).

In den Gehirnen 15 Tage alter Mäuse führt die Überexpression von bovinem ADAM10 zu einer leichten, aber signifikanten Steigerung der Hes-5-mRNA auf ca. 130% im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abbildung 73). Um eine Beeinflussung des Notch-1-Signalweges durch ADAM10 zu verifizieren, wurde nachfolgend eine Quantifizierung der Hes-5-mRNA in den Gehirnen 15 Tage alter ADAM10DN-transgener Mäuse vorgenommen.

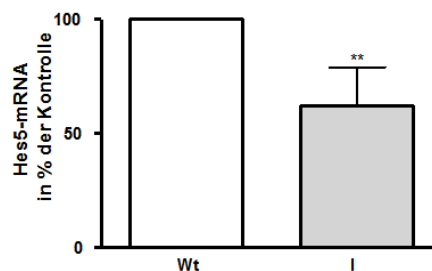


Abbildung 74: Quantifizierung der Hes-5-mRNA in mRNA-Isolaten aus Maus-Gehirnen der Linie I (15 Tage)

Die RNA-Isolate wurden analog zu Abbildung 72 auf die Menge an HES-5-mRNA hin analysiert (n = 5 für Linie I; n = 10 für FVB/N).

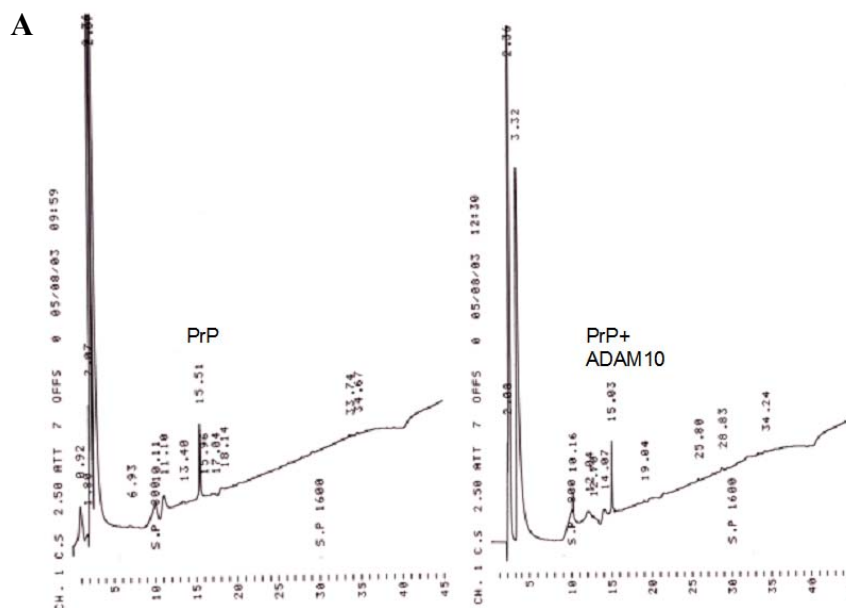
Das dominant negative ADAM10 führte im Gehirn der 15 Tage alten transgenen Mäuse zu einer signifikanten Reduktion der Hes-5-mRNA auf ca. 60% der Kontrolltiere (siehe Abbildung 74). Damit zeigte sich, dass das Notch-1-System tatsächlich *in vivo* von der Aktivität von ADAM10 abhängt, da es bei Überexpression der katalytisch aktiven Protease aktiviert und bei Überexpression des dominant negativen ADAM10 inhibiert wurde. Allerdings ist das Ausmaß der

Beeinflussung eher gering und zudem stark vom Alter der untersuchten Tiere abhängig, so dass sich bereits 10 Wochen nach der Geburt kein aktivierender Einfluss durch ADAM10 mehr nachweisen ließ (siehe Abbildung 72). Dieser Befund der nur schwachen Modifikation des Notch-1-Signalweges deckt sich mit der phänotypischen Untersuchung der Mäuse, die keine gesteigerte Tumorneigung aufweisen (mündliche Mitteilung durch Dr. A. Schröder, ZVTE Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Da konstitutiv aktiviertes Notch-1 tumorinduzierend wirkt (z.B. Weng et al., 2004; Kiaris et al., 2004), sollte eine starke Induktion des nachgeschalteten Signalweges zu Tumoren bei den Mäusen führen.

3.3 Einfluss der α -Sekretasen auf das Prionenprotein

3.3.1 Spaltung eines vom humanen Prionprotein abgeleiteten Peptids

Ein weiteres potentiell Substrat für ADAM 10 und TACE stellt das Prionprotein (PrP) dar. In Zellkulturversuchen mit überexprimiertem murinen PrP wurde gezeigt (Vincent et al., 2001), dass das N-terminale Spaltfragment des PrP durch unspezifische Metalloproteinase-Inhibitoren reduziert wird und durch Überexpression von ADAM10 und TACE zunimmt. Die Spaltung erfolgte zwischen den Aminosäuren 110/111 und 112. Daher wurde das PrP-Peptid aus der humanen Sequenz so gewählt, dass die potentielle Spaltstelle zentral lag und von 8 bzw. 7 Aminosäuren flankiert wurde: **SKPKTNMKH**MAGAAAAG*** (die Spaltstelle 110/111 ist durch ein * gekennzeichnet).



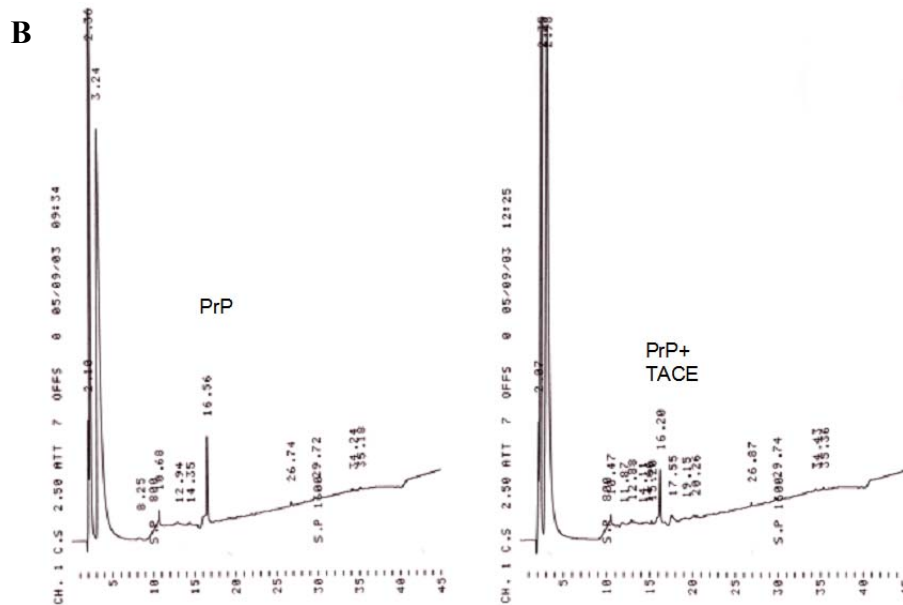


Abbildung 75: Elutionsprofile der HPLC zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des PrP-Peptids durch 500 ng rekombinantes ADAM10 (A) bzw. TACE (B)

Es wurden 1,5 μmol Peptid mit der rekombinanten Protease bzw. einem adäquaten Volumen an Test-Puffer inkubiert. A) Inkubation mit ADAM10: Die Retentionszeiten betragen 15,51 min für das PrP-Peptid im Kontrollansatz und 15,03 min für das Peptid im ADAM10-haltigen Ansatz. B) Inkubation mit TACE: Die Retentionszeiten betragen 16,56 min für das PrP-Peptid im Kontrollansatz und 16,20 min für das Peptid im TACE-haltigen Ansatz.

Für beide Ansätze mit den rekombinanten Enzymen ADAM0 bzw. TACE ergab sich kein von PrP in der Retentionszeit abweichendes Peptidfragment (siehe Abbildung 75). Für den Ansatz mit ADAM10 war die Signal-Fläche für das PrP-Peptid identisch mit der des Kontrollansatzes. Bei Zusatz von rekombinantem TACE erschien das PrP-Peptid um 20% gemindert: Dies könnte auf einer Proteolyse des Peptids durch TACE beruhen. Da jedoch korrespondierende Spaltfragmente fehlten, wurde der Verdau mit TACE wiederholt. Hierzu wurden erneut 500 ng rekombinantes Enzym eingesetzt, die Peptidmenge wurde jedoch auf 3 μmol erhöht, so dass eventuell entstehende Spaltprodukte ebenfalls in größerer Menge gebildet werden sollten (siehe Abbildung 76).

Ergebnisse

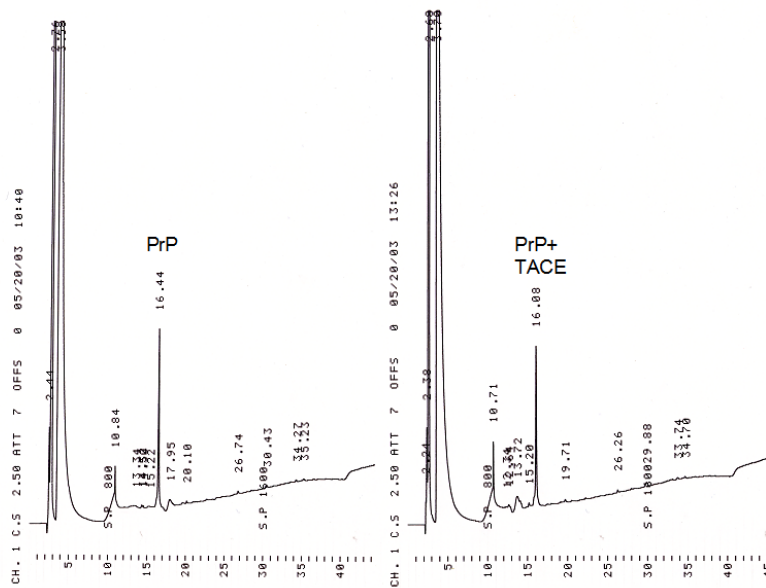


Abbildung 76: Elutionsprofile der HPLC zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des PrP-Peptids durch 500 ng rekombinantes TACE

Es wurden 3 μmol Peptid mit 500 ng der rekombinanten Protease bzw. einem adäquaten Volumen an Test-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde mit TFA abgestoppt und der gesamte Ansatz auf die HPLC aufgetragen. Die Retentionszeiten betragen 16,44 min für das PrP-Peptid im Kontrollansatz und 16,08 min für das Peptid im TACE-haltigen Ansatz.

Auch bei Verdopplung der Peptidmenge trat kein Spaltfragment des PrP-Peptids auf (siehe Abbildung 76), wenngleich die Peptidmenge im Vergleich zum enzymfreien Ansatz erneut um 10% abnahm. Möglich wäre eine völlige Degradation der entstehenden Spaltfragmente, so dass kein einheitliches Spaltfragment im HPLC-Lauf zu detektieren war.

3.3.2 Einfluss von ADAM10- und ADAM10DN-Überexpression in transgenen Mäusen auf die Spaltung des PrPc

Zur Untersuchung der Spaltung des endogenen Prionproteins im Gehirn ADAM10-transgener Mäuse wurde die Linie D mit hoher Ausprägung der Überexpression herangezogen.

Zunächst wurde in einem Vorversuch die Nachweisbarkeit des endogenen PrP im Mausgehirn geprüft. Dazu wurden Membranfraktionen eines ADAM10-transgenen

Tieres (D-Linie) und einer Kontrollmaus (Wt: FVB/N) im Western-Blot mit verschiedenen Erstantikörpern untersucht.

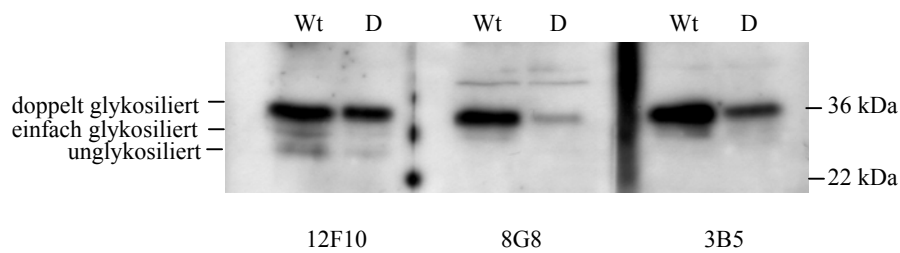


Abbildung 77: Nachweis des endogenen PrP in Maushirn-Homogenaten

Auf einer 14%igen SDS-PAGE wurden je 50 µg Protein der Membranfraktion aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den Antikörpern 12F10, 8G8 und 3B5 und Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörpern das endogene PrP nachgewiesen. Das Chemilumineszenz-Signal wurde durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films visualisiert.

Mit allen drei Primärantikörper war das endogene Prionenprotein nachzuweisen (siehe Abbildung 77). Dabei eignete sich besonders der Antikörper 12F10, der ein sehr C-terminal gelegenes Epitop erkennt, für den Nachweis der unterschiedlichen Glykosilierungsformen. Des weiteren war auffällig, dass in der Probe der Wildtyp-Maus erheblich größere Mengen des PrP nachzuweisen waren. Eine solch starke Reduktion des ungespaltenen Vorläufer-Proteins kann einen Hinweis auf eine sehr starke proteolytische Degradation geben.

Um eine generelle Beeinflussung des PrP durch ADAM10 nachzuweisen, wurde das endogene PrP in ADAM10-transgenen Mäusen untersucht.

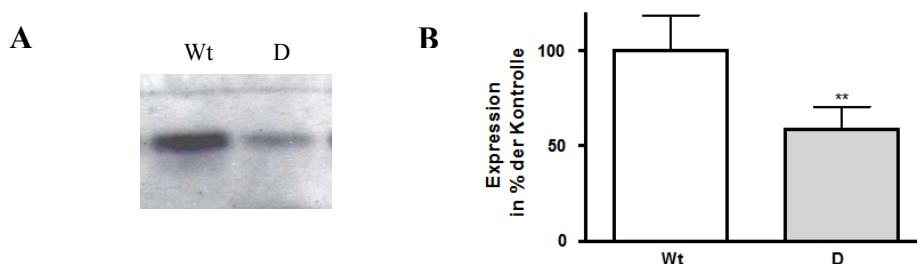


Abbildung 78: Einfluss von überexprimiertem ADAM10 auf die PrP-Expression

A) Exemplarischer Western-Blot: Auf einer 14%igen SDS-PAGE wurden je 50 µg Protein der Membranfraktion aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und mit dem Antikörper 8G8 und Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus-Zweitantikörper durch Auflegen eines Films das endogene PrP detektiert. B) Quantifizierung: Die erhaltenen Filme wurden eingescannt und densitometrisch mit Aida 3.50 analysiert. Dargestellt sind die

Ergebnisse

Mittelwerte mit Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mit SigmaPlot 5.0 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$) bestimmt (Wt: FVB/N: 7 Wochen, $n = 4$; D: 7 Wochen, $n = 4$).

Die Quantifizierung des PrP ergab eine deutliche Reduktion des ungespaltenen PrP in den ADAM10-transgenen Tieren auf 60% der Kontrolle (siehe Abbildung 78). Um eine mögliche artifizielle Reduktion der PrP-Expression durch die Insertion der Fremd-DNA bei der Erzeugung der transgenen Tiere auszuschließen, wurde eine weitere Maus-Linie untersucht. Die Expression des PrP wurde in Gehirn-Homogenaten von Tieren der Linie B mit moderater Überexpression von ADAM10 analysiert. Auch hierbei ergab sich eine Reduktion der PrP-Expression auf ca. 50% der nicht-transgenen Kontrolltiere ($51,2 \pm 7,4\%$, $n = 3$, $p < 0,01$), so dass es sich bei dem expressionsmodulierenden Effekt des überexprimierten ADAM10 nicht um ein Artefakt zu handeln scheint.

Eine weitere Möglichkeit zu klären, ob ADAM10 in transgenen Mäusen zur Proteolyse des PrP beiträgt, bot die Untersuchung der transgenen Mäuse mit dominant negativer ADAM10-Mutante (ADAM10DN).

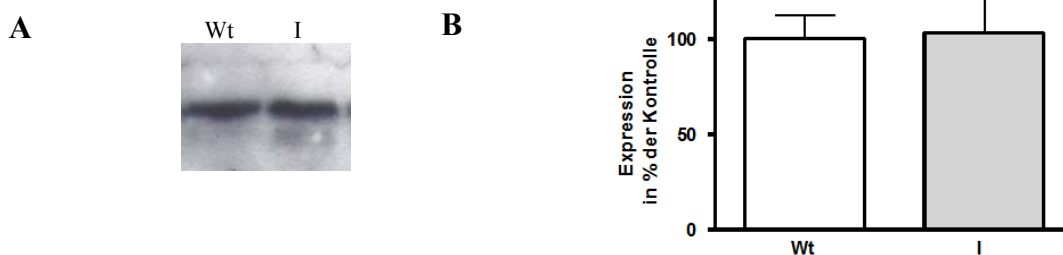


Abbildung 79: Nachweis des endogenen PrP in Maushirn-Homogenaten der Linie I

A) Exemplarischer Western-Blot: Der Nachweis des endogenen PrP erfolgte wie in Abbildung 78 beschrieben.

B) Quantifizierung: Die erhaltenen Filme wurden eingescannt und densitometrisch analysiert mit Aida 3.50. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (Wt: FVB/N, $n = 4$; I, $n = 4$).

Zwischen den Proben der Tiere mit Überexpression des ADAM10DN und den nicht-transgenen Kontrolltieren fanden sich keine signifikanten Expressionsunterschiede bezüglich des PrP (siehe Abbildung 79). Dies könnte darauf hindeuten, dass weitere Proteasen an der PrP-Prozessierung beteiligt sind und die Inhibierung des ADAM10 ausgleichen.

Um zu prüfen, ob die Reduktion des ungespaltenen PrP in den ADAM10-transgenen Mäusen tatsächlich auf eine Proteolyse zurückzuführen ist, wurde das C-terminale

Spaltfragment nachgewiesen. Dies wird erst durch Deglykosylierung der Proteine der Membranfraktion ermöglicht, die zu einer Demaskierung des Antikörper-Epitops im C-terminalen Spaltfragment führen (z.B. Mange et al., 2004).

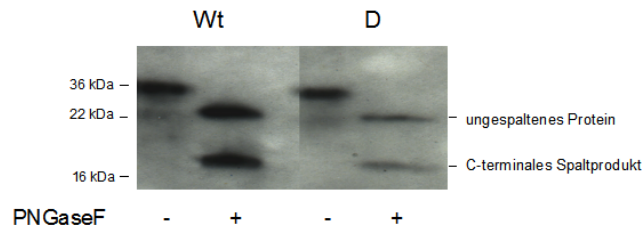


Abbildung 80: Nachweis des endogenen PrP und seines C-terminalen Spaltfragments in Maushirn-Homogenaten der Linie D nach Deglykosylierung

Auf einer 14%igen SDS-PAGE wurden die unbehandelten bzw. PNGaseF-behandelten Membranfraktionen aus dem Gehirn einer ADAM10-überexprimierenden Maus (D) bzw. einer Kontrollmaus (Wt: FVB/N) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf PVDF-Membran wurde das endogene PrP mit dem Antikörper 12F10 und Peroxidasegekoppeltem anti-Maus-Zweitantikörper nachgewiesen.

Durch Einsatz der PNGaseF wurde sowohl in der Gehirn-Membranfraktion des ADAM10-transgenen Tieres als auch der nicht-transgenen FVB/N-Maus zusätzlich zum ungespaltenen PrP ein C-terminales Spaltfragment von ca. 18 kDa nachweisbar (siehe Abbildung 80). Bei einer Spaltung des PrP durch ADAM10, die sich in der starken Abnahme des ungespaltenen Proteins anzudeuten schien, sollte dieses Spaltfragment deutlich zunehmen. Wie aus dem gezeigten Western-Blot nachzuvollziehen, nahmen jedoch das ungespaltene und auch das Spaltfragment des PrP in der ADAM10 überexprimierenden Maus im Vergleich zu der Kontrollmaus ab. Würde das entstehende C-terminale Spaltfragment nach der Prozessierung durch ADAM10 sofort weiter abgebaut, so dass es nicht akkumulieren kann, dann wäre zu erwarten, dass es auf dem Niveau der Kontrollmaus bleibt. Da jedoch das Verhältnis von Spaltprodukt zu ungespaltenem PrP in beiden Tieren vergleichbar erscheint, ist eine Beeinflussung der Proteolyse eher unwahrscheinlich. Da vielen ADAM10-zugeordnete Substraten bzw. deren C-terminalen Spaltfragmenten transkriptionsregulierende Eigenschaften zugeschrieben werden, wäre eine indirekte Beeinflussung der PrP-Expression ebenfalls denkbar.

Ergebnisse

Die Untersuchung der mRNA des PrP in ADAM10-überexprimierenden Mäusen erbrachte zumindest für die untersuchte Maus-Linie (B) eine deutliche Reduktion im Vergleich zu den Kontrolltieren, wie die folgende Abbildung zeigt:

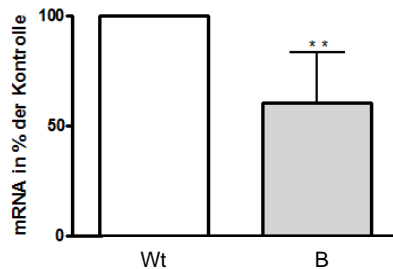


Abbildung 81: Quantifizierung der PrP-mRNA in transgenen Mäusen

Aus den Gehirn-Hemisphären von 10 Wochen alten Mäusen der Linie B bzw. nicht-transgener FVB/N-Mäusen ($n = 5$) wurde die RNA isoliert und in der RealTime RT-PCR auf die Menge an Hes-5-mRNA untersucht. Die RNA wurde gepoolt, in Triplikaten analysiert und auf die Menge an GAPDH-mRNA normiert. Die Werte der transgenen Tiere wurden auf den Mittelwert des ΔCt -Werts aller Kontrolltiere nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert der einzelnen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte und die einfache Standardabweichung (Student's t-Test für unabhängige Stichproben **, $p < 0,01$).

Die in Abbildung 81 demonstrierte Abhängigkeit der PrP-mRNA (Abnahme auf 60% im Vergleich zur Kontrolle) von der Überexpression von ADAM10 deutet eine Beeinflussung des Prionenproteins unabhängig von einer potentiellen Proteolyse an.

4 Diskussion

In der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit ist das Amyloid-Vorläufer-Protein APP von evidenter Bedeutung, da nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese eine Verschiebung der Prozessierung dieses Proteins zugunsten des amyloiden Weges den initialen Schritt der Demenzerkrankung darstellt. Das APP ist Teil einer Proteinfamilie, die sich durch starke Homologien der Proteinsequenz und konservierte Domänen auszeichnet. Ein therapeutischer Ansatz, der auf einer Aktivierung der α -Sekretase beruht, könnte daher auch Einfluss auf die übrigen Familienmitglieder APLP1 und APLP2 nehmen, wenn diese in gleicher Weise wie das APP Substrate für die α -Sekretasen darstellen. Da das APLP2 wie auch APP ubiquitär im Körper exprimiert wird und Doppel-Knock-Out-Versuche von APLP2 kombiniert mit APP oder APLP1 letale Effekte erzielen, kommt dem APLP2 dabei eine herausragende Rolle zu. Die Aktivität der α -Sekretasen umfasst jedoch auch noch weitere Substrate wie die Notch-Rezeptoren oder das zelluläre Prionenprotein, die mit einer Therapie interferieren könnten.

4.1 Interaktion des zellulären Prionproteins mit den α -Sekretasen ADAM10 und TACE

4.1.1 *In vitro* erfolgt keine Spaltung des Prionproteins durch die beiden Proteasen

Durch *in vitro*-Proteolyse eines der humanen PrP-Sequenz entnommenen Peptids durch rekombinantes ADAM10 bzw. TACE und anschließende Auftrennung der Produkte mittels HPLC sollte die Spaltung des zellulären PrP durch die beiden Proteasen untersucht werden. In keinem der Versuche konnte jedoch eine Proteolyse des Peptids beobachtet werden (siehe 3.3.1). Entweder ist das humane Protein damit nicht analog zum murinen durch die α -Sekretasen spaltbar oder aber das Peptid wurde nicht den erforderlichen strukturellen Eigenschaften gerecht. Da für die α -Sekretasen bislang keine Konsensus-Spaltsequenz beschrieben ist und vielmehr ein gewisser Anspruch an die Sekundärstruktur (α -helicaler Bereich) im Spaltbereich gestellt wird, könnte das Peptid den Anforderungen durch zu geringe Länge oder ähnliches nicht genügen.

4.1.2 ADAM10 beeinflusst die Expression des Prionproteins in transgenen Mäusen

Während *in vitro* eine Beteiligung der α -Sekretasen an der Prionenprotein-Prozessierung nicht aufzuklären war, zeigte sich *in vivo* - in den transgenen Mäusen mit neuronaler Überexpression

Diskussion

von ADAM10 - eine deutliche Beeinflussung des endogenen PrP. In zwei transgenen Maus-Linien war das ungespaltene PrP signifikant reduziert (Linie D: starke ADAM10-Überexpression; Linie B: moderate ADAM10-Überexpression; siehe 3.3.2).

Auch das C-terminale Spaltfragment, welches aus der Spaltung zwischen den Aminosäuren 110/111 (112) hervorgeht, war in der Maus-Linie D signifikant reduziert. Dieser Befund widerspricht einer Beteiligung von ADAM10 an der PrP-Proteolyse insoweit, als dass man eine Erhöhung des C-terminalen Proteolyseprodukts hätte erwarten dürfen. Vielmehr scheint ADAM10 einen Einfluss auf die Expression des Prionenproteins auszuüben, was anhand der Quantifizierung der PrP-mRNA der moderat ADAM10-überexprimierenden Maus-Linie B demonstriert wurde (siehe Abbildung 81). Ob es sich dabei um eine direkte Beeinflussung handelt oder um eine eher indirekte, ist aus diesen Untersuchungen nicht zu schließen. Vorstellbar wäre z.B. eine Einflussnahme über die C-terminalen Spaltfragmente von ADAM10-Substraten wie dem APP oder APLP2.

Untersuchungen an Ratten-Pheochromocytoma- und Gliomazellen mit einem PrP-Promotor-Luciferase-Reportersystem (Cabral et al., 2002) zeigten, dass die Aktivität des Promotors stark von der Chromatin-Konformation der DNA abhängig war: Trichostatin A, ein Histon-Deacetylase-Inhibitor, führte zu einer vermehrten transkriptionischen Aktivität des PrP-Promotors. Nach Spaltung des APP durch die γ -Sekretasen, die abhängig von der vorangegangenen α -Sekretase-Spaltung erfolgt, wird der Transkriptionsfaktor AICD freigesetzt. Dieser interagiert nach Translokation in den Zellkern mit einer Histonacetylase (TIP60; Cao und Sudhof, 2004). Steht diese dadurch nicht mehr für die Acetylierung der Histone im Bereich des Prionprotein-Promotors zur Verfügung, könnte dies zu einer Transkriptionsblockade führen (siehe Abbildung 82). Gleichermäßen ist eine inhibitorische Wirkung der Retinsäure beschrieben worden. In der hier vorgelegten Arbeit konnte nachgewiesen werden (siehe 3.1.2.6), dass Retinsäure zu einer verstärkten Bildung α -sekretorischer Spaltprodukte führt, so dass auch dies nach dem oben beschriebenen Mechanismus zur verminderten PrP-Expression unter dem Einfluss von Retinsäure beitragen könnte.

Neueste Untersuchungen konnten eine Substrat-Protease-Interaktion für N-Cadherin mit ADAM10 aufzeigen (Reiss et al., 2005). Die Spaltung von N-Cadherin führte dabei zu einer Rekrutierung cytoplasmatischen beta-Catenins, das zusammen mit dem Spleißfaktor Galectin-3 regulatorischen Einfluss auf bestimmte Zielgene besitzt (Shimura et al., 2004). Ein für Galectin-3 beschriebener Interaktionspartner ist die Prionenprotein-mRNA (Muller et al., 1997), so dass auch hierin eine indirekte Beeinflussung von ADAM10 auf die Prion-Protein-Expression begründet sein könnte.

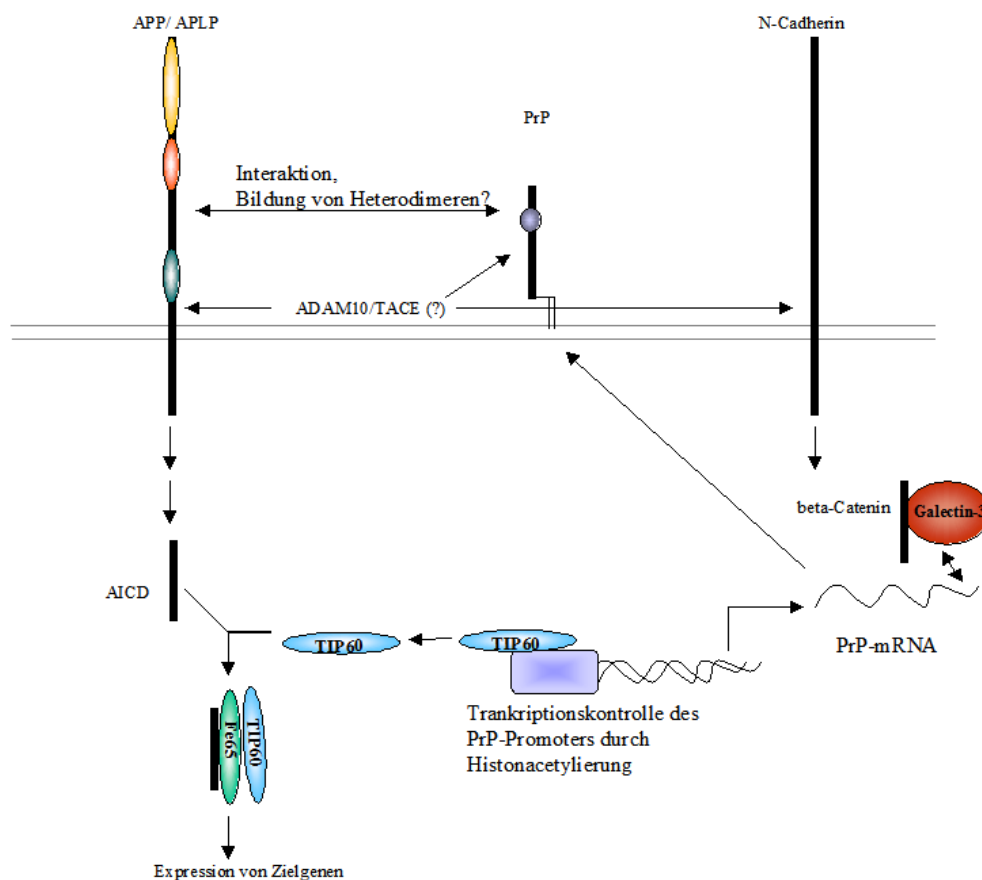


Abbildung 82: Mögliche Wechselwirkungen von ADAM10 mit dem Prionprotein

Eine Wechselwirkung von APP oder APLP2 mit dem PrP, wie sie für die rekombinanten Proteine gezeigt werden konnte (White et al., 2003), könnte die Stabilität des PrP beeinflussen. Eine weitere mögliche Interaktion bietet der PrP-Promotor, der durch Histoneacetylierung reguliert wird. Wird im Bereich des Promotors durch Freisetzung der intrazellulären Domänen von APP/APLP und Translokation in den Zellkern der Acetylierungsstatus der Histone erniedrigt, so würde dies zu einer geminderten PrP-Expression führen. Auch die Interaktion von Galectin-3 mit der PrP-mRNA könnte indirekt durch die ADAM10-vermittelte Proteolyse von N-Cadherin Einfluss nehmen. Eine direkte Beeinflussung des PrP durch ADAM10- bzw. TACE-vermittelte Proteolyse konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Eine entgegengesetzte Beobachtung in den Mäusen der Linie I mit Überexpression des dominant negativen ADAM10 - also ein Anstieg der PrP-Expression - war nicht zu verzeichnen. Hier war die Expression des PrP im Vergleich mit nicht-transgenen Kontrolltieren unverändert. Dies könnte auf der Redundanz der Proteasen ADAM10 und TACE beruhen, die eine starke Überlappung ihres Substratspektrums aufweisen.

Insgesamt widersprechen die hier *in vivo* erzielten Befunde den Untersuchungen von Vincent et al. (2000 und 2001), da sie keine Beteiligung von ADAM10 an der PrP-Proteolyse zeigen konnten. Ein evidenter Unterschied zwischen den experimentellen Ansätzen besteht darin, dass in den Publikationen von Vincent et al. (2000 und 2001) die Proteolyse anhand des nur durch Immunpräzipitation nachzuweisenden N-terminalen PrP-Spaltfragmentes aus kultivierten Zellen untersucht wurde, während in dieser Arbeit direkt das C-terminale Fragment nachgewiesen wurde. Zudem wurde in den Experimenten von Vincent et al. (2000 und 2001) murines PrP zusammen mit den Proteasen überexprimiert, was vermutlich der physiologischen Situation weniger entspricht als die Untersuchung des endogenen Substrats.

Ob nun ADAM10 durch Spaltung des endogenen Prionenproteins dessen cytotoxische Domäne zerstört oder aber die Menge an zellulärem PrP reduziert ist sekundär. In beiden Fällen würde ein therapeutischer Ansatz, der sich die Aktivierung der α -Sekretase zum Ziel gesetzt hat, auch protektiv in bezug auf eine Prionen-Infektion auswirken: Die Konzentration an endogenem zellulärem PrP bestimmt maßgeblich die Scrapie-Inkubationszeit (Carlson et al., 1994), so dass jegliche Reduktion des transformationsfähigen Proteins den Ausbruch der Krankheit bzw. deren Pathogenese verzögert.

4.2 Beeinflussung des Notch-Systems durch die α -Sekretasen ADAM10 und TACE

Die tatsächliche Beteiligung der α -Sekretasen ADAM10 und TACE an der Prozessierung der Notch-Rezeptoren ist immer noch nicht abschließend geklärt. Zwar gibt es viele Hinweise darauf, dass beide Proteasen an der Spaltung von Notch partizipieren (siehe 1.4), aber es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass dies auch z.B. durch Interaktion der Liganden des Notch-Signalsystems mit ADAM10 und/oder TACE vermittelt sein könnte. Um zu klären, inwieweit eine direkte Spaltung von Notch durch die beiden Metalloproteinasen erfolgt, wurden

verschiedene Ansätze wie die *in vitro*-Spaltung oder aber die Transkriptionsaktivität nachgeschalteter Zielgene gewählt.

4.2.1 *In vitro* stellt Notch-1 ein Substrat für beide Proteasen dar. Die *in vitro*-Proteolyse eines von Notch-1 abgeleiteten Peptids durch rekombinantes ADAM10 bzw. TACE bot die Möglichkeit, das Spaltereignis mit exakt definierten Reaktionspartnern durchzuführen. Hierbei ist die Reaktion vollständig unabhängig von einer Ligandenbindung, der umgebenden Membrantopologie oder der nachgeschalteten γ -Sekretase-Spaltung. Bei Untersuchung der Spaltung des murinen Notch-1 ergab sowohl die Inkubation mit ADAM10 als auch mit TACE eine Spaltung in zwei Proteolyseprodukte (siehe Abbildung 63 und 64). Für ADAM10 wurde zusätzlich verifiziert, dass es sich um die beschriebene Spaltstelle (V1744) handelte.

Während TACE bereits nach 6 h zu einer 50%igen Abnahme des Peptids führte, konnte für ADAM10 erst nach 18 h eine 30%ige Degradation verzeichnet werden. Daher könnte man für TACE eine höhere Katalysefähigkeit für das Peptid vermuten. Da die rekombinanten Proteasen jedoch in ihrer Qualität zwischen einzelnen Chargen deutlich voneinander abwichen, könnte es sich auch um einen hieraus resultierenden Effekt handeln.

Die Spaltung des Peptids aus der humanen Sequenz war wesentlich uneffektiver als die des murinen Peptids (siehe Abbildung 65). Dies könnte bedeuten, dass humanes Notch-1 durch andere Proteasen prozessiert wird als murines Notch-1. Diese Vermutung erscheint jedoch aufgrund des hohen Grades der Konservierung des Signalweges in Säugern recht unwahrscheinlich. Vielleicht ist aber auch die Wahl des Peptids ursächlich: Zwar wurde die vermutete Spaltstelle A*V im humanen Peptid berücksichtigt, es könnte jedoch sein, dass topologische Kriterien nicht ausreichend erfüllt wurden.



Abbildung 83: Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen Notch-1-Peptids

Grün markiert sind identische, rot markiert sind in ihrer Ladung oder sterischen Ansprüchen abweichende Aminosäuren.

Während die beiden Aminosäuren, die die potentielle Spaltstelle flankieren, identisch sind (A*V in Abbildung 83), finden sich N- und C-terminal dazu sowohl Aminosäuren unterschiedlicher Ladung (z.B. K1745V) oder unterschiedlicher sterischer Ansprüche (z.B. E1742P). Damit ist es schwierig aus den *in vitro*-Spaltversuchen eine Aussage über die Proteolyse des humanen Notch-1 durch ADAM10 bzw. TACE zu treffen.

4.2.2 Beeinflussung des Notch-Systems durch ADAMs in der Zellkultur

Zur weiteren Klärung der Beteiligung von ADAM10 und/oder TACE an der Prozessierung von Notch-1 wurde ein ligandenunabhängiges Notch-1 (N-LNG) in NIH3T3-Zellen überexprimiert. Diese Zellen exprimieren endogen ADAM10 und TACE (siehe Abbildung 67 B), so dass eine Untersuchung der Notch-Spaltung durch die beiden Proteasen (S2-Spaltung) ermöglicht war. Die proteolytische Prozessierung wurde indirekt in einem Reporter-Test analysiert. Dieser Test basiert auf der Expression der *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle von Notch-Zielgen-Promotoren (RBPJκ). Wird Notch-1 gespalten, so transloziert die intrazelluläre Domäne NIC in den Kern und induziert die Translation durch Bindung an die Promotor-Elemente. Zudem wurde anhand von Western-Blots die Entstehung der Notch-1-Spaltprodukte verfolgt.

Die Versuche ergaben, dass in beiden Systemen PMA zu einer Induktion der S2-Spaltung des ligandenunabhängigen Notch-1 führt. Dabei war der im Reporter-Test erzielte Effekt (siehe Abbildung 69) deutlich größer als der im Western-Blot beobachtete (siehe Abbildung 71). Da der genaue Wirkmechanismus von Phorbolestern bislang nicht geklärt ist, könnte hier auch ein vom Spaltprozess unabhängiges Ereignis oder die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung eines Notch-Interaktionspartners eine Rolle spielen. Zudem könnte auch das endogene Notch-System der Zellen betroffen sein und eine Aktivierung des Reporters hervorrufen. Im Western-Blot hingegen wurde durch das dem überexprimierten Notch angefügte Myc-Epitop nur die Spaltung des exogenen Rezeptors untersucht.

Der Einsatz der Hydroxamsäure-Inhibitoren führte in beiden experimentellen Ansätzen zu einer Reduktion der Notch-LNG-Spaltung (Abbildung 69 und 71). Aus beiden Befunden ergibt sich, dass die Spaltung des Notch-1-LNG direkt von Metalloproteinasen abhängig ist. Die mit der ADAM10-selektiveren Hydroxamsäure-Verbindung GI254023X erzielten Effekte waren dabei gleich oder sogar stärker als die mit dem Breitband-Inhibitor Ro-31-9790 erzielten, so dass eventuell eine besondere Beteiligung dieser Protease gegeben sein könnte.

Daher sollte die Überexpression der beiden Proteasen Gewissheit über die Rolle in der Notch-Signaltransduktion schaffen. Sowohl TACE als auch ADAM10 bzw. seine dominant negative Mutante führten bei transienter Koexpression mit N-LNG zu keiner Modifizierung der Notch-abhängigen Reporter-Aktivität. Ein Nachweis der Proteasen im Western-Blot konnte jedoch bei der transienten Transfektion auch nur eine deutliche Expression von TACE bestätigen, so dass vielleicht die Proteasen-Überexpression insgesamt zu schwach war, um Effekte zu erzielen. Hier könnte die Etablierung stabil exprimierender Zellen Abhilfe schaffen.

4.2.3 Transkription des Notch-Zielgens Hes-5 in ADAM10-transgenen Mäusen

In vivo wurde die spaltungsabhängige Aktivität der Notch-Rezeptoren anhand der mRNA des Zielgens Hes5 untersucht. Je mehr Notch-Proteine durch proteolytische Prozessierung gespalten werden, umso mehr NIC (intrazelluläre Domäne des Notch) wird freigesetzt. Diese aktiviert im Zellkern die Translation von Zielgenen wie z.B. Hes-5.

In Tieren im Alter von zehn Wochen wurde keine Beeinflussung der Hes-5-mRNA-Menge durch moderat überexprimiertes ADAM10 gefunden (siehe 3.2.3). Die Untersuchung von Mäusen 15 Tage nach der Geburt ergab eine Erhöhung der mRNA-Menge auf 130% verglichen mit den Kontrolltieren, während in gleichaltrigen Tieren mit ADAM10DN-Überexpression eine Reduktion auf 60% zu verzeichnen war. Damit wurde gezeigt, dass die Beeinflussung des Notch-Systems durch ADAM10 in Mäusen insgesamt altersabhängig ist und nicht bis ins Adultstadium anhält. Zudem ist der Einfluss für die Überexpression des aktiven ADAM10 insgesamt relativ gering. Warum nur eine solch geringe Einflussnahme der Protease auf das Signaltransduktions-System besteht, konnte hier nicht geklärt werden. Zu vermuten wäre eine Beschränkung der Signalkaskade durch den Einfluss der Liganden, eine Spaltung der Liganden selbst oder aber eine potentielle rückkoppelnde Regulation durch ADAM10-abhängige Spaltprodukte. So ist z.B. eine Interaktion des Proteins Numb mit dem nach γ -Sekretase-Spaltung freigesetzten APP-Fragment AICD beschrieben (Roncarati et al., 2002; Merdes et al., 2004), die inhibierende Wirkung auf den Notch-Signalweg zeigte.

Die Tatsache, dass der Notch-1-Rezeptor zwar potentiell durch ADAM10 bzw. TACE spaltbar ist, aber *in vivo* nur eine relativ geringe Beeinflussung durch die ADAM10-Überexpression resultierte, bietet eine günstige Perspektive für eine therapeutische Aktivierung der α -Sekretasen.

Da in den häufigsten Fällen des Morbus Alzheimer eine sporadische Erkrankung älterer Patienten vorliegt, die auch erst in höherem Lebensalter diagnostiziert werden kann, könnte und sollte eine solche Therapie erst am adulten Patienten erfolgen. Sollte das menschliche Notch-System analog zu dem der Maus reguliert werden, bestünde kein Risiko für kanzerogene Nebenwirkungen. Eine Gentherapie für die erbliche Variante der Krankheit muss jedoch kritisch betrachtet werden, wenn sie z.B. pränatal erfolgen soll und sollte auf jeden Fall auf potentielle Störungen der Embryogenese und der frühen postnatalen Phase geprüft werden.

4.3 Proteolytische Prozessierung von APLP2 durch ADAM10 und TACE

Während die Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP durch die α -Sekretasen ADAM10 und TACE intensiv erforscht wurde, war die proteolytische Prozessierung der APP-verwandten Proteine APLP1 und APLP2 bislang kaum Ziel biochemischer Untersuchungen. Zwar fehlt den APP-ähnlichen Proteinen die A β -Sequenz, in der die einzelnen Spaltungen im APP stattfinden, ihre allgemeine Sequenzhomologie und das überlappende Expressionsmuster legen jedoch eine vergleichbare posttranslationelle proteolytische Prozessierung nahe (siehe 1.2.1 und 1.2.2).

4.3.1 *In vitro* erfolgt keine Spaltung eines APLP2-Peptids durch die Proteasen ADAM10 und TACE

Die Inkubation eines APLP2-Peptids aus der humanen Proteinsequenz mit den rekombinanten Proteasen ADAM10 und TACE führte nicht zur Generierung von Spaltprodukten (siehe 3.1.1). Das Peptid wurde in Analogie zu dem spaltbaren APP18-Peptid ausgewählt, so dass es die 18 Aminosäuren vor der Transmembrandomäne enthielt. Da die Spaltstelle durch die α -Sekretasen jedoch näher am N-Terminus als zunächst vermutet identifiziert wurde (Eggert et al., 2004), ist sie im Peptid zwar enthalten, liegt aber nur zwei Aminosäuren vom Peptidende entfernt:

NH₂-EE[§]RESV*GPLREDFSLSSS-CONH₂

Abbildung 84: Sequenz des verwendeten APLP2-Peptids mit APP-analoger (*: 12 AS vor der Transmembrandomäne) und durch Deletionsmutanten eingegrenzter Spaltstelle (§: Eggert et al., 2004).

Daher könnte die benötigte Spaltumgebung für die rekombinanten Proteasen fehlen und so die Proteolyse verhindern.

4.3.2 In der Zellkultur stellt APLP2 ein Substrat für ADAM10 und TACE dar

Während die *in vitro*-Versuche keinen Aufschluss über eine Interaktion von ADAM10 bzw. TACE mit APLP2 liefern konnten, ließen sich aus den Zellkulturversuchen zahlreiche Argumente für die Spaltung des APLP2 durch die beide Proteasen ableiten: Neben der konstitutiven Prozessierung des endogenen APLP2 war sowohl in peripheren Zellen (HEK 293) als auch in Neuroblastoma-Zellen eine stimulierbare Proteolyse durch den Einsatz des Phorbolesters PMA feststellbar (siehe Abbildung 26). Dies korreliert mit der induzierbaren Prozessierung von APP durch die α -Sekretasen, die ebenfalls in beiden Zelltypen erfolgt (z.B. Endres et al., 2003). Die Chondroitin-Glucosaminoglykan-Modifikation des APLP2 hatte dabei keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit der Spaltung, da sowohl die CS-GAG-modifizierten als auch die nur glykosylierten APLP2-Spezies vermehrt sekretiert wurden.

Zudem führte der Einsatz von Hydroxamsäure-Inhibitoren zu einer verminderten proteolytischen Freisetzung von überexprimiertem und auch endogenem löslichen APLP2 in den Zellkulturüberstand. Während unspezifischere Inhibitoren wie Ro-31-9790, BB3103 oder GM6001 die proteolytische Prozessierung auf 60% reduzierten (siehe 3.1.2.2 und 3.1.2.3.3), führten die ADAM10 und/oder 17 selektiveren Komponenten GW280264X und GI254023X zu einer Verminderung der APLP2s-Freisetzung auf 40-50% im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe 3.1.2.3.4). Die Effekte auf das lösliche APLP2 waren sowohl in HEK 293-Zellen als auch in der Neuroblastoma-Zelllinie SKNMC zu beobachten, so dass das zugrunde liegende Spaltereignis in beiden Zelltypen vertreten ist. Auch waren alle Modifikationsvarianten des APLP2 von der Inhibition gleichermaßen betroffen, so dass ein regulatorischer Einfluss durch die CS-GAG-Ketten oder die Glykosylierung nicht gegeben war. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, die zwar für die N-Glykosylierung des APLP1 nicht aber für die des APLP2 eine regulatorische Bedeutung enthüllten (Eggert et al., 2004).

Die zusätzliche Untersuchung der C-terminalen Spaltprodukte, die durch den Einsatz eines β - und eines γ -Sekretase-Inhibitors als Proteolyseprodukte der ADAMs identifiziert wurden (siehe 3.1.2.3.1 und 3.1.2.3.2), zeigte ebenfalls eine inhibitorische Auswirkung der Hydroxamsäure-Verbindungen. Zwar war diese deutlich geringer als der Einfluss auf das sekretierte APLP2s, bezeugte aber erneut die Beteiligung von Metalloproteinasen wie ADAM10 und/oder TACE an der APLP2-Prozessierung. Der geringere Einfluss mag auf der weiterführenden Proteolyse durch

Diskussion

die γ -Sekretasen beruhen. Eine Verminderung der α -ähnlichen Spaltprodukte könnte in einer Verminderung der nachfolgenden γ -Sekretase-Spaltung resultieren und somit die Menge an C-terminalen membranständigen Spaltfragmenten stabilisieren.

Die stabile Überexpression der Proteasen ADAM10 bzw. TACE führte zu einer 2,5 bis 3,5fachen Verstärkung der konstitutiven APLP2-Ektodomänenfreisetzung und belegte damit deutlich die Beteiligung beider Proteasen an der APLP2-Prozessierung. Die stabil überexprimierte dominant negative Mutante des ADAM10 (ADAM10DN) hingegen reduzierte die APLP2s-Sekretion auf 60% (siehe Abbildung 39). Damit konnte gezeigt werden, dass APLP2 ebenso wie APP nicht nur von der β - und γ -Sekretase prozessiert wird (Pastorino et al., 2004; Li und Sudhof, 2004; Scheinfeld, 2002; Walsh et al., 2003), sondern auch einer α -ähnliche Proteolyse durch ADAM10 bzw. TACE unterliegt.

4.3.3 APLP2 wird *in vivo* durch ADAM10 in transgenen Mäusen prozessiert

Neben der in der Zellkultur nachgewiesenen α -Sekretase-ähnlichen Spaltung des APLP2 wurde die Proteolyse auch in transgenen Mäusen untersucht. Eine bereits moderate Überexpression von ADAM10 (siehe 3.1.2.5.2), führte zu einer signifikanten Erhöhung von APLP2s in der Fraktion löslicher Proteine aus Mausgehirn-Homogenaten. Ebenso nahm die Menge an C-terminalen membranständigen Fragmenten im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren zu. Eine Erhöhung der ADAM10-Überexpression vermochte nicht die Proteolyse darüber hinaus noch weiter zu induzieren. Ein ähnliches Phänomen war in Mäusen auch für die α -Sekretase-Spaltung des APP zu beobachten (Postina et al., 2004) und könnte auf einer Substratlimitierung beruhen. Da die verstärkte APLP2-Prozessierung jedoch in zwei unabhängigen ADAM10-transgenen Mauslinien beobachtet wurde, ist ein durch die Fremdgen-Insertion erzeugtes Artefakt auszuschließen. Vielmehr stellt APLP2 auch *in vivo* ein Substrat für ADAM10 dar. Die dominant negative Mutante ADAM10DN führte bei Überexpression in transgenen Mäusen zu einer Verminderung der C-terminalen Spaltfragmente auf 60% im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren. Eine analoge Reduktion des löslichen APLP2s war jedoch nicht festzustellen. Dies könnte auf einer erhöhten β -Sekretase-Spaltung des Proteins beruhen. Wie in Abbildung 30 gezeigt, erlaubt der Antikörper D2II keine Diskriminierung zwischen α - und β -ähnlicher Spaltung des APLP2. Daher könnte bei Konkurrenz beider Proteasen die inhibierte ADAM10-Spaltung zu einer verstärkten β -Sekretase-Aktivität führen. Dieses Phänomen wurde in APP/ADAM10DN-

Mäusen beobachtet, die bei einer Abnahme des APP α auch zeitgleich eine erhöhte A β -Peptid-Menge aufwiesen (Postina et al., 2004). Ein korrespondierendes membranständiges APLP2-Spaltprodukt aus der Proteolyse durch BACE konnte in den transgenen Mäusen nicht nachgewiesen werden. Dies korreliert mit Untersuchungen in der Zellkultur, die auch nach Einsatz des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT keinen Nachweis eines solchen Fragments erbringen konnten (siehe Abbildung 33). Da die β -Sekretase in den untersuchten Zellen aktiv war, wie die APLP2s- und APP β -Reduktion bei Inkubation mit einem β -Sekretase-Inhibitor bestätigte (siehe Abbildung 32), muss dieses C-terminale Fragment äußerst labil und schwer nachzuweisen sein.

Die Mäuse mit transgener Überexpression von ADAM10 zeigten neben einer Reduktion der Plaques auch eine verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung (Postina et al., 2004), was sich sowohl an isolierten Hirnschnitten durch gesteigerte LTP als auch an besseren Ergebnissen im Morris-Water-Maze-Test zeigte. Der Beitrag des durch ADAM10 proteolytisch prozessierten APLP2 an der Steigerung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse konnte von den Einflüssen der APP-Prozessierung nicht separiert werden. Dennoch bleibt zu vermuten, dass auch das neuroprotektive und neurotrophe APLP2 eine positive Wirkung ausübte.

Während die APP/APLP2-Defizienz in Mäusen bei früheren Untersuchungen zwar zu Letalität führte, die Mäuse aber phänotypisch unauffällig waren (Von Koch et al., 1997), zeigen aktuelle Studien, dass das Fehlen beider Proteine zu einer Fehlpositionierung präsynaptischer Markerproteine mit postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren, einer verminderten Zahl synaptischer Vesikel und einer gestörten Neurotransmitterausschüttung führt (Wang et al., 2005). Inwieweit die fehlenden Spaltprodukte Anteil an der Ausbildung der strukturellen Abnormitäten haben, ist unklar. Durch den Thy1-Promotor kommt es in den Mäusen, die in der hier vorgelegten Arbeit untersucht wurden, erst zu einer postnatalen Expression von ADAM10 bzw. ADAM10DN. Daher konnten keine Auswirkungen der veränderten APP/APLP2-Prozessierung auf die neuronale Entwicklung beobachtet werden. Eine Beteiligung anderer potentieller Substrate für ADAM10 an der Regulation der kognitiven Fähigkeiten ist nicht auszuschließen, wurde hier jedoch nicht weiter untersucht.

4.3.4 Die physiologische Situation der Zelle nimmt Einfluss auf die proteolytische Prozessierung von APLP2 in Neuroblastoma-Zellen
Zahlreiche Substrate werden mittlerweile den Metalloproteinasen ADAM10 und TACE zugeordnet. Da die resultierenden Spaltprodukte jedoch sehr unterschiedliche Funktionen

Diskussion

ausüben bzw. durch Freisetzung intrazellulärer Domänen sehr unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden können, ist es wichtig, die zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen der Proteolyse zu verstehen. Ein regulatorischer Faktor ist z.B. die Induktion der Proteolyse durch Phorbolester, weitaus wichtiger ist es jedoch physiologische Situationen aufzudecken, die Einfluss auf die Proteolyse nehmen.

4.3.4.1 Die Retinsäure-induzierte Differenzierung führt zu einer konzentrierten Hochregulation von ADAM10 und seinem Substrat APLP2

Retinsäure (RA) entsteht durch aus der Nahrung aufgenommenes Retinol (Vitamin A) über ein Retinaldehyd-Intermediat. Durch die Aktivierung der Transkription spezifischer Zielgene sind die Retinsäure bzw. ihre Derivate essentiell für die embryonale Entwicklung (Maden et al., 1996; Gale et al., 1999; Maden und Holder, 1991), aber auch den Status des adulten Gehirns (Misner et al., 2001; Cocco et al., 2002).

Die Induktion der APP-Expression durch Retinsäure wurde in verschiedenen Zellen neuronalen und nicht-neuronalen Ursprungs beschrieben (Lahiri und Nall, 1995; Beckman und Iverfeldt, 1997; Ruiz-Leon und Pascual, 2003). Ebenso konnte eine verstärkte Expression der APP-verwandten Proteine APLP1 und APLP2 in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden (Beckman und Iverfeldt, 1997; Adlerz et al., 2003).

Um zu klären, ob nicht nur die Expression von APP und APLP2 sondern auch die der Proteasen ADAM10 und TACE während der RA-vermittelten Differenzierung von Neuroblastoma-Zellen induziert wird, wurden sowohl die mRNAs als auch die Proteine und die Proteolyseprodukte analysiert. In beiden untersuchten Zelllinien (SKNMC und SH-SY5Y) wurde sowohl eine vermehrte Menge an APP695-mRNA als auch an APLP2-mRNA verzeichnet (siehe 3.1.2.6.2). Im Vergleich zu den Kontrollzellen war die ADAM10-mRNA auf 150 (SKNMC) bzw. 300% (SH-SY5Y) erhöht. Auffällig war vor allem, dass die mRNAs für alle drei untersuchten Gene in den SH-SY5Y-Zellen stärker induziert waren als in den Schwanzzellen-ähnlichen SKNMC-Zellen. Da SH-SY5Y-Zellen besonders hohe Mengen der Retinsäure-Rezeptoren RAR (*retinoic acid receptor*) (Lovat et al., 1993) besitzen, könnte hierin der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien begründet sein.

Sowohl für APLP2 als auch ADAM10 wurde die verstärkte Expression auf Proteinebene bestätigt (siehe 3.1.2.6.3). Resultierend aus der erhöhten Menge an Substraten und der Protease ADAM10

kam es in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Verstärkung der proteolytischen Prozessierung: APPs α wurde auf ca. 200% erhöht, während APLP2s auf 150 bis 160% anstieg. Dies bedeutet, dass nicht nur die Expression der Substrate APP und APLP2 durch RA-Inkubation verstärkt wird, sondern auch deren Prozessierung durch eine verstärkte ADAM10-Expression.

Auch TACE ist in der Lage APP (Slack et al., 2001) und APLP2 (siehe 3.1.2.4) konstitutiv zu spalten. Anders als bei ADAM10 fand sich auf Proteinebene in SH-SY5Y-Zellen jedoch eine von der RA-Behandlung gänzlich unbeeinflusste TACE-Expression. In SKNMC-Zellen kam es sogar zu einer Reduktion sowohl der Pro- als auch der reifen Form von TACE (siehe Abbildung 52). Damit ist die gemeinsame Regulation von Substraten und Protease spezifisch für ADAM10 und es liegt ein Unterschied in der Stabilität der beiden Proteasen vor: Zwar sind ADAM10 und TACE unter den ADAMs am nächsten miteinander verwandt (Stone et al., 1999), aber bereits die Behandlung von HEK 293- und SH-SY5Y-Zellen mit PMA deckte einen bedeutenden Unterschied auf: Während die ADAM10-Expression und Reifung von der Phorbol ester-Behandlung unbeeinflusst blieb, wurde die reife Form von TACE durch die Inkubation verstärkt degradiert (Endres et al., 2003; Doedens et al., 2000). Aus der Retinsäure-Behandlung ergab sich nun erneut ein Stabilitäts- bzw. Regulationsunterschied: Während ADAM10 vermehrt gebildet wird, bleibt die Menge an TACE unter dem Einfluss von RA stabil oder wird sogar reduziert. Eine unveränderte Expression von TACE wurde auch in humanen Monocyten-ähnlichen Zellen (THP-1; Worley et al., 2003) beschrieben, wenngleich dabei 9-cis-Retinsäure über den bedeutend kürzeren Zeitraum von 6 bzw. 9 h angewandt wurde.

4.3.4.2 Mechanismus der konzertierten Hochregulation von ADAM10 und seiner Substrate und deren Bedeutung für das Auswachsen von Neuriten

Wie genau die Retinsäure in den beiden Neuroblastoma-Zelllinien zu einer Expressionssteigerung von APP, APLP2 und ADAM10 führte, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Erschwert wird die Untersuchung durch die mögliche Metabolisierung der Retinsäure und durch verschiedene Wege der Transkriptionsregulation.

Ein Großteil der vielfältigen Wirkungen der Retinoide - insbesondere der Retinsäuren - wird über nukleäre Transkriptionsfaktoren vermittelt. Zwei Familien nukleärer Retinoid-Rezeptoren sind bekannt: Die Retinsäure-Rezeptoren (RAR: *retinoic acid receptors*) und die Retinoid X-Rezeptoren (RXR: *retinoid X receptors*). Sie sind Mitglieder einer Superfamilie, zu denen der

Diskussion

Thyroidhormon-Rezeptor (THR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und der Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptor (PPAR) sowie einige Rezeptoren mit bisher noch nicht identifizierten Liganden (*orphan receptors*) zählen.

Retinoid-Rezeptoren wirken als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren dadurch, dass sie an bestimmte DNA-Sequenzen (Response-Elemente) in der Promotorregion von Zielgenen binden. Die in dieser Arbeit verwendete all-trans-RA ist ein hochaffiner Ligand für den RAR, aber nicht für den RXR, während z.B. 9-cis-RA an beide Rezeptor-Familien bindet (Levin et al. 1992; Heyman et al. 1992).

Beim Vergleich der Aktivität eines APP-Promotor-CAT-Konstrukts mit einem RA-Luciferase-Kontrollreporter (Ruiz-Leon und Pascual, 2003) fiel eine zeitliche Verzögerung der APP-Promotor-Antwort auf die Retinsäure auf. Während das als Kontrolle verwendete Fragment des RAR β 2-Promotors bereits nach zwei Tagen deutlich induziert wurde, reagierte der APP-Promotor erst nach vier Tagen. Zudem enthält der APP-Promotor keine konservierte RARE-Konsensus-Sequenz, so dass eher eine indirekte Beeinflussung zu vermuten ist. Der APLP2-Promotor und der APP-Promotor weisen keine signifikante Sequenzhomologie auf, sind aber zumindest beide ohne TATA-Box und weisen einige gemeinsame Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf (siehe Abbildung 85), über die eine indirekte RA-gesteuerte Transkriptionsregulation erfolgen könnte.

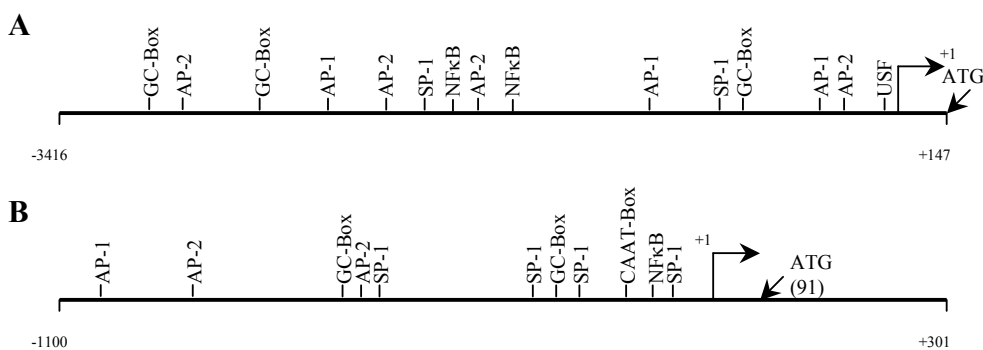


Abbildung 85: Transkriptionsfaktor-Bindestellen im APP- und APLP2-Promotor

Dargestellt sind die Sequenz und einige Transkriptionsfaktor-Bindestellen des APP-Promotors aus dem Rhesusaffen (A: nach Ge et al., 2004) und der 5'-regulatorischen Region des murinen APLP2-Gens (B: nach Von Koch et al., 1995). Der Rhesusaffen-APP-Promotor ist in hohem Maße homolog zum murinen APP-Promotor (Adroer et al., 1997) und daher direkt mit dem des murinen APLP2 vergleichbar. Zusätzlich zu den publizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen ist eine der potentiellen NFκB-Bindungsstellen im 5'-Bereich des APLP2-Gens (Analyse der Nukleotidsequenz mit <http://tfbind.ims.u-tokyo.ac.jp> und TF Search 1.3 (Yutaka Akiyama, Universität von Kyoto (Japan))) eingezeichnet. Gemeinsame Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind: AP-1, AP-2, GC-Box, Sp-1 und NFκB.

Für eine indirekte Beeinflussung spricht der Effekt, den Curcumin auf die mRNA der APP-verwandten Gene ausübt (Adlerz et al., 2003): In Anwesenheit von Curcumin während der Differenzierung mit RA wurde der mRNA-Level von APP, APLP1 und APLP2 nahezu auf dem Niveau undifferenzierter SH-SY5Y-Zellen gehalten. Curcumin (Diferuloylmethan) ist ein Inhibitor für NF κ B, AP-1 und die c-Jun N-terminale Kinase (Chen et al., 1998; Singh et al., 1995; Huang et al., 1991). Da NF κ B durch Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen induziert wird (Feng und Porter, 1999), könnte der Einfluß auf die APP/APLP2-Expression auch indirekt über diesen Transkriptionsfaktor vermittelt werden.

Gleichzeitig führte Curcumin zu einer Retraktion bereits gebildeter Neuriten in differenzierten SH-SY5Y-Zellen (Adlerz et al., 2003), wenn es am letzten Tag der RA-Behandlung zugesetzt wurde. Dies spricht für eine Beteiligung der APP-Proteinfamilie bzw. ihrer Spaltprodukte am Neuritenwachstum während der Neuroblastoma-Differenzierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss einer geminderten APP/APLP2-Proteolyse auf die Neuriten differenzierter SH-SY5Y-Zellen geprüft. Der Metalloproteinase-Inhibitor Ro-31-9790 wurde dazu zeitgleich mit der Retinsäure den Zellen zugesetzt und diese mikroskopisch phänotypisiert (siehe Abbildung 54). Zwar führte der Inhibitor nicht zu einer verminderten Neuritenlänge oder Zahl, bewirkte aber konzentrationsabhängig eine erhöhte Verzweigung der Ausläufer. Dies könnte bedeuten, dass die Spaltprodukte der APP-Proteinfamilie notwendig sind für ein gerichtetes, zielorientiertes Auswachsen neuronaler Zellausläufer. Es ist jedoch zu bedenken, dass auch andere Substrate von Metalloproteinasen diesem Phänomen zugrunde liegen könnten, wie z.B. EphrinA2, das nachgewiesenermaßen das Axonwachstum reguliert (Hattori et al., 2000).

Die Abbildung 86 auf der nachfolgenden Seite fasst die Überlegungen zur Regulation der α -Sekretase-Aktivität durch Retinsäure zusammen:

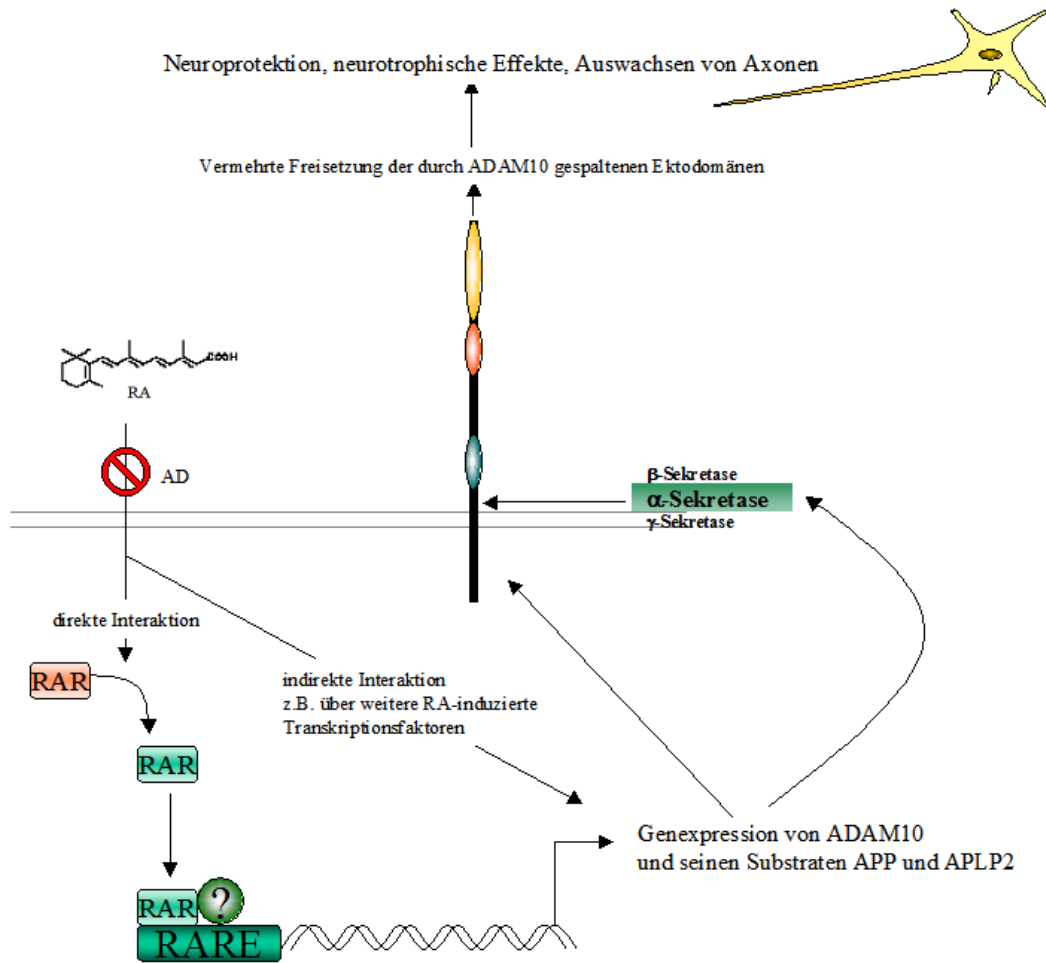


Abbildung 86: möglicher Mechanismus der Retinsäure-induzierten Regulation der α -Sekretase-Aktivität in differenzierten Neuroblastoma-Zellen

Die Aufnahme von Retinsäure (RA) in die Zelle könnte einerseits direkt durch Aktivierung des nukleären Rezeptors RAR und Bindung an ein RAR-Element (RARE) stimulierend auf die Expression der Gene für APP, APLP2 und ADAM10 wirken. Die nukleären Rezeptoren kommen als Homo- oder Heterodimere vor, so dass ein modulierender Einfluss eines weiteren Bindungspartners nicht auszuschließen ist. Denkbar wäre jedoch auch die indirekte Regulation über RA-abhängige Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, die erst in einem zweiten Schritt auf die Expression einwirken. Aus der gemeinsamen Hochregulation der Substrate und der Protease resultiert eine erhöhte Menge an neurotrophischen, neuroprotektiven Proteinen im Zellüberstand. Der aufgezeigte Signalweg könnte in AD-Patienten gestört sein, da es zahlreiche Hinweise auf einen veränderten RA-Transport bzw. Metabolismus im Zusammenhang mit der Demenzerkrankung gibt (siehe 4.3.4.3).

4.3.4.3 Bedeutung der regulativen Rolle der Retinsäure für die Alzheimersche Krankheit

Von der Retinsäure wird angenommen, dass sie die Neurogenese bzw. die neuronale Differenzierung im Embryo reguliert (Maden und Holder, 1991; Maden et al., 1996). Untersuchungen des Hippocampus und der subventrikulären Zone ergaben jedoch, dass dieselben Prozesse in den neurogenen Arealen des adulten Gehirns ablaufen (Takahashi et al., 1999). Im Hippocampus werden zahlreiche Rezeptoren wie der RAR α (Zetterstrom et al., 1999) exprimiert und das cerebrale Retinsäure-bindende Protein (CRBP) liegt in großen Mengen im Hippocampus vor (Zetterstrom et al., 1994). Eine RA-Reporter-Maus, die transgen für eine LacZ-Expressionskassette unter der Kontrolle eines RA-sensiblen Promotors war (Rossant et al., 1991), zeigte ein hohes Maß an RA-induzierter Signaltransduktion im Hippocampus (Wagner et al., 2002). Diese Notwendigkeit von Vitamin A bzw. Retinsäure für eine normale hippocampale Funktion wurde bestätigt durch RAR-defiziente Mäuse, die einen Abfall in der hippocampalen LTP (*long term potentiation*) und LTD (*long term depression*) zeigten und zudem Störungen im Morris-Water-Maze-Test aufwiesen (Chiang et al., 1998). Eine ähnliche Störung der Lern- und Gedächtnisleistung ließ sich auch durch Vitamin A-Defizienz in Ratten auslösen (Misner et al., 2001). Des Weiteren konnte die Applikation von RA den altersbedingten Gedächtnisverlust in Mäusen abmildern (Etchamendy et al., 2001) bzw. die Menge an mRNA für die nukleären Rezeptoren RAR und RXR erhöhen (Enderlin et al., 1997).

Da die Alzheimersche Krankheit u.a. von einer progressiven Degeneration hippocampaler Hirnareale gekennzeichnet ist und von massiven Störungen der Lern- und Gedächtnisfähigkeit begleitet wird, könnte hier eine Beziehung zum RA-Signalweg bestehen. Dies wird dadurch gestützt, dass zahlreiche Berichte eine signifikante Reduktion der Plasma-Konzentration von Vitamin A in AD Patienten aufzeigen (Zaman et al., 1992; Jimenez-Jimenez et al., 1999; Mecocci et al., 2002; Bourdel-Marchasson et al., 2001). Zudem finden sich erhöhte Level an Retinaldehyd-Dehydrogenase in AD-Gehirnen, die aufgrund einer rückkoppelnden Reaktion wie sie in Retinoid-defizienten neuronalen Zellen beobachtet wurde (Connor et al., 1997) zustande kommen könnte.

Aktuelle Untersuchungen konnten eine antiamyloidogene und Fibrillen-destabilisierende Wirkung für Vitamin A und seine Derivate *in vitro* nachweisen (Ono et al., 2004) und in RA-depletierten Ratten resultierte aus der Defizienz eine erhöhte Plaqueablagerung in Gehirngefäßen

(Corcoran et al., 2004). Damit ergibt sich aus der Verknüpfung des RA-Signalwegs mit der Alzheimerschen Demenz ein potentieller Therapieansatz, der sich durch Expressionsverstärkung RA-abhängiger Genprodukte wie APP, APLP2 und ADAM10, aber auch z.B. des Plaque-degradierenden Enzyms IDE (RA-induzierbar; Melino et al., 1996; Bertram et al., 2000; Edbauer et al., 2002; Leissring et al., 2003) positiv auf den Krankheitsverlauf bzw. die Pathogenese auswirken könnte.

4.3.4.4 Die Induktion der Apoptose durch exogen zugeführte Substanzen resultiert in einer verminderten ADAM10-Aktivität

Während Retinsäure zu einer Induktion der α -Sekretase-Aktivität und einer vermehrten Bildung der davon abhängigen Spaltprodukte APPs α und APLP2s führte, resultierte die Induktion der Apoptose in einem gegenteiligen Effekt. Alle apoptotischen Situationen, in denen eine Verminderung der NF κ B-Aktivität zu verzeichnen war (siehe 3.1.2.7), führten zu einer verminderten Expression von ADAM10 und seinem Substrat APLP2. Nur die Applikation von Doxorubicin für 4 h, die nachweislich NF κ B-induzierend wirkte, führte zu einer Steigerung der Expression beider Proteine. Die geminderte Expression bei Apoptose setzte sich in einer verminderten Sekretion der neuroprotektiven Ektodomänen APPs α und APLP2s fort, wie sie für die Inkubation mit Camptothecin gezeigt wurde (siehe Abbildung 58).

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF κ B für neuronale Zellen zu beurteilen ist schwierig, da die Funktion des Faktors vom jeweiligen Zelltyp abhängt. Es wurde jedoch beschrieben, dass nach Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure NF κ B transient aktiviert wurde (Feng und Porter, 1999) und dass eine Repression des Signalweges durch einen dominant negativen Inhibitor die Differenzierung der Zellen unterband. Zudem wurde gezeigt, dass NF κ B die neuroprotektive Wirkung von APPs α gegen A β -Peptide vermittelt (Guo et al., 1998). In den Gehirnen von AD Patienten fand sich sowohl der NF κ B Vorläufer p105 als auch der NF κ B-Inhibitor I κ B γ verstärkt exprimiert (Huang et al., 2005). Ebenso zeigte sich in frühen Plaques von Alzheimer-Patienten eine Aktivierung der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors (Kaltschmidt et al., 1997). Die Expression eines NF κ B-Repressors führte in hippocampalen Kulturen transgener Mäuse nach neurotoxischen Stimuli zu einem stark ausgeprägten Zelltod (Fridmacher et al., 2003).

Hingegen korreliert eine verstärkte NF κ B-Aktivierung in Glia-Zellen mit entzündlichen oder proapoptotischen Prozessen (Sekido et al., 2004; Fujioka et al., 2004), die zum Fortschreiten der Neurodegeneration führen können. Ob NF κ B neurodegenerativ- oder protektiv wirkt, scheint daher stark Zelltyp-abhängig zu sein. Zudem könnte auch die Zeitdauer der Aktivierung entscheidend sein (Kaltschmidt et al., 2002; Kaltschmidt et al., 2000). Eine kurzzeitige Aktivierung scheint eher protektiv zu sein, da nur sehr frühe Plaques von Neuronen mit NF κ B-Aktivierung umgeben sind, während chronische Stimulation neuronenerstörend wirkt (Kaltschmidt et al., 1997). Während APP bereits als NF κ B-Zielgen identifiziert wurde (Grilli et al., 1995), ist die Regulation von ADAM10 und seinem Substrat APLP2 bislang nicht gezeigt worden.

Für APP konnte *in vitro* eine Spaltung durch die Caspasen 3 und 6 gezeigt werden und auch in der Zellkultur waren Caspase-erzeugte Spaltprodukte nachweisbar (Galvan et al., 2002; Gervais et al., 1999; LeBlanc et al., 1999; Pellegrini et al., 1999; Lu et al., 2000). Die Proteolyse des APP durch Caspasen scheint aber allein nicht maßgeblich für die vermehrte Entstehung von toxischen A β -Peptiden während der Apoptose zu sein. Mutationen der Caspase-Spaltstellen im APP führten zu einer Blockade der Spaltung in transfizierten apoptotischen CHO-Zellen, induzierten aber dennoch erhöhte Mengen an A β (Tesco et al., 2003). Damit erscheint die Partizipation einer potenzierten β - und γ -Sekretase-Aktivierung oder aber eine geminderte α -Sekretase-Aktivität wahrscheinlich.

Für eine Verschiebung der Balance zwischen α - und β -Sekretase-Spaltung als Auslöser der Apoptose spricht auch, dass die Aktivierung des APP-BP1-Komplexes in lipidreichen Regionen - sogenannten Rafts - erfolgt (Chen et al., 2003). Der Komplex ist in Gehirnen von Alzheimer-Patienten angereichert und führt über die Degradation von beta-Catenin zur Induktion von Apoptose (Chen, 2004). Wenngleich nicht gezeigt wurde, ob die APP-Spaltung durch BACE die Voraussetzung für die Aktivierung ist, besteht diese Möglichkeit jedoch durch die Raft-Lokalisation von BACE-1 und der dort im Gegensatz zur α -Sekretase-Spaltung stattfindenden β -Sekretase-Spaltung des APP (Riddell et al., 2001; Simons et al., 1998; Tun et al., 2002; Eehalt et al., 2003; Kojro et al., 2001). Zudem konnte für SH-SY5Y-Zellen eine β -Sekretase-abhängige Bildung eines APP-ShcA-Grb2-Komplexes (ShcA: *Src homology and collagen A*; Grb2: *growth*

Diskussion

factor receptor-bound protein 2) nachgewiesen werden (Venezia et al., 2004), der den Level des apoptotischen Zelltods maßgeblich beeinflusst.

Zwar konnte nur für einige Zellen eine direkte Konkurrenz zwischen α - und β -Sekretase-Aktivität gezeigt werden (z.B. Skovronsky et al., 2000), es besteht jedoch zumindest die Möglichkeit einer Apoptose-Induktion durch Verminderung der neuroprotektiven Substratfragmente im Zellkulturüberstand. Eine mögliche direkte Beeinflussung der Apoptose in neuronalen Zellen durch Metalloproteinasen zeigte auch die Messung der Caspase-3/7-Aktivität nach Inkubation von Neuroblastoma-Zellen mit Metalloproteinase-Inhibitoren in dieser Arbeit (siehe Abbildung 61). Der allgemeine Inhibitor Ro-31-9790 löste sowohl in SKNMC- als auch SH-SY5Y-Zellen eine 2,5 bis 3fache Induktion der Effektor-Caspasen aus. Die ADAM10 und/oder ADAM17-spezifischeren Inhibitoren GI254023X und GW280264X führten nur in den N-Typ SH-SY5Y-Zellen zur Induktion der Apoptose, was auf eine höhere Sensitivität der Zellen zurückzuführen sein könnte.

Eine Therapie der AD durch Beeinflussung der NF κ B-Signaltransduktion erscheint schwieriger als z.B. die Aufhebung der Retinsäure-Defizienz. Eine allgemeine Aktivierung würde zu erheblichen inflammatorischen Prozessen im gesamten Organismus führen und die zielgerichtete Applikation in einzelnen Zellpopulationen erscheint schwierig. Zudem kann NF κ B mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und somit unerwünschte Signalketten induzieren.

5 Zusammenfassung

Die im Laufe der Evolution konservierte Genfamilie des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP beinhaltet sowohl bei der Maus als auch beim Menschen die beiden APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2. Ziel dieser Arbeit war es, die proteolytische Prozessierung des APLP2 zu charakterisieren und die beteiligten Proteasen aufzuzeigen. Ausgehend von Stimulations- und Inhibitionsversuchen wurde die Metzincin-Familie der Metalloproteinasen als APLP2-Proteasen identifiziert. Durch Überexpression von ADAM10 und TACE (ADAM17) konnten zwei wichtige Prozessierungs-Enzyme des APLP2 charakterisiert werden. Damit wurde zum ersten Mal eine α -Sekretase-ähnliche Enzymaktivität analog zu der Spaltung des APP an APLP2 beschrieben. Untersuchungen an ADAM10-transgenen Mäusen bestätigten die proteolytische Prozessierung des APLP2 *in vivo*. Durch die Untersuchung neuronaler Differenzierung mit Retinsäure und Apoptose in Neuroblastoma-Zellen gelang der Nachweis einer funktionellen Koregulation von APLP2 und seiner Protease ADAM10, die zu einer erhöhten Freisetzung des neurotrophen löslichen APLP2 bei der Differenzierung und zu einer Reduktion bei Apoptose führt. In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten gibt es sowohl Hinweise auf einen gestörten Vitamin A-Metabolismus als auch auf verstärkte apoptotische Vorgänge, so dass hier erstmalig eine Verknüpfung der APLP2-Proteolyse mit zwei pathogenen Prozessen des Morbus Alzheimer gezeigt werden konnten.

Eine therapeutische Aktivierung der α -Sekretasen hätte die verstärkte Bildung von neurotrophem APP α und APLP2s zur Folge. Es bestünde jedoch gleichzeitig die Gefahr von Nebenwirkungen durch die Spaltung weiterer Substrate wie des Notch-Rezeptors oder des Prionenproteins. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Notch-1 prinzipiell ein Substrat für ADAM10 darstellt, die Auswirkungen *in vivo* jedoch begrenzt und altersabhängig sind. Für das Prionenprotein ergab sich keine direkte Beeinflussung durch eine Spaltung, sondern vielmehr eine Expressionsminderung durch die Überexpression von ADAM10 in Mäusen. Die Inkubationszeit bei der Prionenerkrankung hängt von der Menge des endogenen zellulären Prionenproteins ab. Daher ergibt sich aus einer Steigerung der α -Sekretase-Aktivität eine potentielle Prävention gegenüber einer Infektion mit der pathogenen Scrapie-Form des Prionenproteins.

6 Literaturverzeichnis

- Abbenante, G., Kovacs, D. M., Leung, D. L., Craik, D. J., Tanzi, R. E., Fairlie, D. P. (2000) Inhibitors of beta-amyloid formation based on the beta-secretase cleavage site. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 268, 133-135
- Adlerz, L., Beckman, M., Holback, S., Tehranian, R., Cortes, T., V, Iverfeldt, K. (2003) Accumulation of the amyloid precursor-like protein APLP2 and reduction of APLP1 in retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells upon curcumin-induced neurite retraction. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 119, 62-72
- Adroer,R., Lopez-Acedo,C., & Oliva,R. (1997) Conserved elements in the 5' regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primates. *Neurosci. Lett.* 226, 203-206.
- Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., Prochiantz, A. (1995) Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J.Cell Biol.* 128, 919-927
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., Murtagh, F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin.Anat.* 8, 429-431
- Annaert, W., de, S. B. (2002) A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 18, 25-51
- Arribas, J., Lopez-Casillas, F., Massague, J. (1997) Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J.Biol.Chem.* 272, 17160-17165
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M. E. (1995) Notch signaling. *Science* 268, 225-232
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110, 55-67
- Barnes, E. N., Biedler, J. L., Spengler, B. A., Lyser, K. M. (1981) The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC. *In Vitro* 17, 619-631
- Bayer, T. A., Paliga, K., Weggen, S., Wiestler, O. D., Beyreuther, K., Multhaup, G. (1997) Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.(Berl)* 94, 519-524
- Beckman,M. & Iverfeldt,K. (1997) Increased gene expression of beta-amyloid precursor protein and its homologues APLP1 and APLP2 in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid. *Neurosci. Lett.* 221, 73-76.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C. L., Multhaup, G. (1996) Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J.Biol.Chem.* 271, 1613-1620
- Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M. G., Go, R. C., Vekrellis, K., Selkoe, D. J., Saunders, A. J., Tanzi, R. E. (2000) Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290, 2302-2303
- Bian, X., Iister-Lucas, L. M., Shao, F., Schumacher, K. R., Feng, Z., Porter, A. G., Castle, V. P., Opipari, A. W., Jr. (2001) NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J.Biol.Chem.* 276, 48921-48929
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L. S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38, 3751-3757
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L. S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38, 3751-3757
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., rtavanis-Tsakonas, S. (1997) Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291

- Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E., Margolis, B. (1996) The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol. Cell Biol.* 16, 6229-6241
- Borg, J. P., Yang, Y., de Taddeo-Borg, M., Margolis, B., Turner, R. S. (1998) The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 14761-14766
- Bourdel-Marchasson, I., mas-Beauvieux, M. C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J. P., Rainfray, M. (2001) Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 30, 235-241
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Breen, K. C., Bruce, M., Anderton, B. H. (1991) Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* 28, 90-100
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., Israel, A. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207-216
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B., Kretschmar, H. A. (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* 146, 104-112
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J., Jones, I. M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* 344 Pt 1, 1-5
- Budd, S. L., Nicholls, D. G. (1996) Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 67, 2282-2291
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347
- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P., Yankner, B. A. (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 2092-2096
- Bustin, S. A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23-39.
- Buxbaum, J. D., Koo, E. H., Greengard, P. (1993) Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 9195-9198
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., 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
- Cabral, A. L., Lee, K. S., Martins, V. R. (2002) Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J. Biol. Chem.* 277, 5675-5682
- Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Muller, U., Prochiantz, A. (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173-2181
- Cao, X., Sudhof, T. C. (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24601-24611
- Cappai, R., Mok, S. S., Galatis, D., Tucker, D. F., Henry, A., Beyreuther, K., Small, D. H., Masters, C. L. (1999) Recombinant human amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) expressed in the yeast *Pichia pastoris* can stimulate neurite outgrowth. *FEBS Lett.* 442, 95-98

Literaturverzeichnis

- Carlson, G. A., Ebeling, C., Yang, S. L., Telling, G., Torchia, M., Groth, D., Westaway, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. (1994) Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 5690-5694
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., Chesebro, B. (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J.Virol.* 63, 175-181
- Chen, M., Yankner, B. A. (1991) An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci.Lett.* 125, 223-226
- Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P., utilio-Gambetti, L. (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J.Biol.Chem.* 270, 19173-19180
- Chen, Y., Liu, W., McPhie, D. L., Hassinger, L., Neve, R. L. (2003) APP-BP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain. *J.Cell Biol.* 163, 27-33
- Chen, Y. R., Tan, T. H. (1998) Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 17, 173-178
- Chen, Y. Z. (2004) APP induces neuronal apoptosis through APP-BP1-mediated downregulation of beta-catenin. *Apoptosis.* 9, 415-422
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., Bush, A. I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30, 665-676
- Chiang, M. Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H. M., Gage, F. H., Stevens, C. F., Evans, R. M. (1998) An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21, 1353-1361
- Chow, N., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Neve, R. L. (1996) APP-BP1, a novel protein that binds to the carboxyl-terminal region of the amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.* 271, 11339-11346
- Citron, M. (2000) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol.Med.Today* 6, 392-397
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., Fadda, F. (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475-482
- Cohen, F. E., Prusiner, S. B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 793-819
- Collin, R. W., van, S. D., Leunissen, J. A., Martens, G. J. (2004) Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian *Xenopus laevis*. *Eur.J.Biochem.* 271, 1906-1912
- Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu.Rev.Neurosci.* 24, 519-550
- Connor, M. J., Sidell, N. (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol.Chem.Neuropathol.* 30, 239-252
- Corcoran, J. P., So, P. L., Maden, M. (2004) Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur.J.Neurosci.* 20, 896-902
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890
- Coulson, E. J., Barrett, G. L., Storey, E., Bartlett, P. F., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (1997) Down-regulation of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease by antisense oligonucleotides reduces neuronal adhesion to specific substrata. *Brain Res.* 770, 72-80.

- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* 36, 175-184.
- Crain, B. J., Hu, W., Sze, C. I., Slunt, H. H., Koo, E. H., Price, D. L., Thinakaran, G., Sisodia, S. S. (1996) Expression and distribution of amyloid precursor protein-like protein-2 in Alzheimer's disease and in normal brain. *Am. J. Pathol.* 149, 1087-1095
- Dagert, M., Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6, 23-28
- de Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., Kopan, R. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522
- de Strooper, B., Annaert, W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1857-1870
- Dho, S. E., French, M. B., Woods, S. A., McGlade, C. J. (1999) Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J. Biol. Chem.* 274, 33097-33104
- Doedens, J. R., Black, R. A. (2000) Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 14598-14607
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., Haass, C. (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J. Biol. Chem.* 277, 13389-13393
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., Beyreuther, K. (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 279, 18146-18156
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113-123
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuieret, P. (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125-129
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., Postina, R. (2003) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur. J. Biochem.* 270, 2386-2393
- Ernst, M., Schmid, C., Froesch, E. R. (1989) Phenol red mimics biological actions of estradiol: enhancement of osteoblast proliferation in vitro and of type I collagen gene expression in bone and uterus of rats in vivo. *J. Steroid Biochem.* 33, 907-914
- Estus, S., Tucker, H. M., van, R. C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M., Rydel, R. E. (1997) Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17, 7736-7745
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R. M., Pallet, V., Jaffard, R., Higuieret, P. (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci.* 21, 6423-6429
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., Bishop, J. M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* 5, 3610-3616
- Feng, Z., Porter, A. G. (1999) NF-kappaB/Rel proteins are required for neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 274, 30341-30344

Literaturverzeichnis

- Ferreira, A., Caceres, A., Kosik, K. S. (1993) Intraneuronal compartments of the amyloid precursor protein. *J.Neurosci.* 13, 3112-3123
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Puig, B., Ribera, R., Rey, M.J., & Ribalta, T. (2001) Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl)* 101, 49-56
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., Russo, T. (1995) The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.* 270, 30853-30856
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., Gessler, M. (2004) The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* 18, 901-911
- Fridmacher, V., Kaltschmidt, B., Goudeau, B., Ndiaye, D., Rossi, F. M., Pfeiffer, J., Kaltschmidt, C., Israel, A., Memet, S. (2003) Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J.Neurosci.* 23, 9403-9408
- Fujioka, S., Schmidt, C., Scwab, G. M., Li, Z., Pelicano, H., Peng, B., Yao, A., Niu, J., Zhang, W., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Huang, P., Chiao, P. J. (2004) Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kappaB. *J.Biol.Chem.* 279, 27549-27559
- Galary, R. E., Cassabonne, M. E., Giese, C., Gilbert, J. H., Lapierre, F., Lopez, H., Schaefer, M. E., Stack, R., Sullivan, M., Summers, B., . (1994) Low molecular weight inhibitors in corneal ulceration. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 732, 315-323
- Gale, E., Prince, V., Lumsden, A., Clarke, J., Holder, N., Maden, M. (1996) Late effects of retinoic acid on neural crest and aspects of rhombomere. *Development* 122, 783-793
- Galvan, V., Chen, S., Lu, D., Logvinova, A., Goldsmith, P., Koo, E. H., Bredesen, D. E. (2002) Caspase cleavage of members of the amyloid precursor family of proteins. *J.Neurochem.* 82, 283-294
- Garton, K. J., Gough, P. J., Philalay, J., Wille, P. T., Blobel, C. P., Whitehead, R. H., Dempsey, P. J., Raines, E. W. (2003) Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J.Biol.Chem.* 278, 37459-37464
- Ge, Y. W., Ghosh, C., Song, W., Maloney, B., Lahiri, D. K. (2004) Mechanism of promoter activity of the beta-amyloid precursor protein gene in different cell lines: identification of a specific 30 bp fragment in the proximal promoter region. *J.Neurochem.* 90, 1432-1444
- Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M. S., Clarke, E. E., Zheng, H., van der Ploeg, L. H., Ruffolo, S. C., Thornberry, N. A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R. J., Roy, S., Nicholson, D. W. (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97, 395-406
- Geschwind, D. H. (2003) Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg? *Neuron* 40, 457-460
- 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, 885-890
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., . (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706
- Goodman, Y., Mattson, M. P. (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp.Neurol.* 128, 1-12
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* 36, 59-74

- Greenwald, I. (1998) LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12, 1751-1762
- Grilli, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M., Spano, P. (1995) Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J.Biol.Chem.* 270, 26774-26777
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., Ihara, Y. (2001) Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J.Biol.Chem.* 276, 35235-35238
- Guenette, S. Y., Chen, J., Ferland, A., Haass, C., Capell, A., Tanzi, R. E. (1999) hFE65L influences amyloid precursor protein maturation and secretion. *J.Neurochem.* 73, 985-993
- Guo, Q., Robinson, N., Mattson, M. P. (1998) Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. *J.Biol.Chem.* 273, 12341-12351
- 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., . (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325
- Hardy, J., Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356
- Hartmann, D., de, S. B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena, I. A., von, F. 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, 2615-2624
- Hattori, M., Osterfield, M., Flanagan, J. G. (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360-1365
- Hayashi, Y., Kashiwagi, K., Ohta, J., Nakajima, M., Kawashima, T., Yoshikawa, K. (1994) Alzheimer amyloid protein precursor enhances proliferation of neural stem cells from fetal rat brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 205, 936-943
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von, K. H., Von, K. C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfner, 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, 7951-7963
- Hegde, R. S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Lingappa, V. R. (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402, 822-826
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., Muller, U. (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23, 4106-4115
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., Thaller, C. (1992) 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406
- Ho, C. S., Marinescu, V., Steinhilb, M. L., Gaut, J. R., Turner, R. S., Stuenkel, E. L. (2002) Synergistic effects of Munc18a and X11 proteins on amyloid precursor protein metabolism. *J.Biol.Chem.* 277, 27021-27028
- Holmes, D. S., Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* 114, 193-197
- Honjo, T. (1996) The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J kappa/Su(H) transcription factor. *Genes Cells* 1, 1-9
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R., Candy, J. M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 207, 621-629
- Huang, T. S., Lee, S. C., Lin, J. K. (1991) Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 5292-5296

Literaturverzeichnis

- Huang, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C. X. (2005) NF-kappaB precursor, p105, and NF-kappaB inhibitor, IkkappaBgamma, are both elevated in Alzheimer disease brain. *Neurosci.Lett.* 373, 115-118
- 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, 1186-1195
- Hung, A. Y., Selkoe, D. J. (1994) Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 534-542
- 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, 419-427.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraborty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de, G.E., Wauters, E., van, B.J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van, S.J., Mann, D., Lynch, T., & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.
- Irvin, D. K., Dhaka, A., Hicks, C., Weinmaster, G., Kornblum, H. I. (2003) Extrinsic and intrinsic factors governing cell fate in cortical progenitor cultures. *Dev.Neurosci.* 25, 162-172
- Isaacs, A., Baker, M., Wavrant-De, V. F., Hutton, M. (1998) Determination of the gene structure of human GFAP and absence of coding region mutations associated with frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. *Genomics* 51, 152-154
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., Lansbury, P. T., Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., Israel, A. (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358
- Jimenez-Huete, A., Lievens, P. M., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B., Prelli, F. (1998) Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am.J.Pathol.* 153, 1561-1572
- Jimenez-Jimenez, F. J., Molina, J. A., de, B. F., Orti-Pareja, M., Ito-Leon, J., Tallon-Barranco, A., Gasalla, T., Porta, J., Arenas, J. (1999) Serum levels of beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A in patients with Alzheimer's disease. *Eur.J.Neurol.* 6, 495-497
- Joseph, R., Han, E. (1992) Amyloid beta-protein fragment 25-35 causes activation of cytoplasmic calcium in neurons. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 184, 1441-1447
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P. A., Kaltschmidt, C. (1997) Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 2642-2647
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hofmann, T. G., Hehner, S. P., Droge, W., Schmitz, M. L. (2000) The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur.J.Biochem.* 267, 3828-3835
- Kaltschmidt, B., Heinrich, M., Kaltschmidt, C. (2002) Stimulus-dependent activation of NF-kappaB specifies apoptosis or neuroprotection in cerebellar granule cells. *Neuromolecular Med.* 2, 299-309

- Kar, S., Issa, A. M., Seto, D., Auld, D. S., Collier, B., Quirion, R. (1998) Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J.Neurochem.* 70, 2179-2187
- Kawasumi, M., Matsuda, S., Matsuoka, M., Nishimoto, I. (2004) Cytoplasmic tail adaptors of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor. *Mol.Neurobiol.* 30, 185-200
- Kiaris, H., Politi, K., Grimm, L. M., Szabolcs, M., Fisher, P., Efstratiadis, A., rtavanis-Tsakonas, S. (2004) Modulation of notch signaling elicits signature tumors and inhibits hras1-induced oncogenesis in the mouse mammary epithelium. *Am.J.Pathol.* 165, 695-705
- Kibbey, M.C., Jucker, M., Weeks, B.S., Neve, R.L., Van Nostrand, W.E., & Kleinman, H.K. (1993) beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10150-10153.
- Kim, T. W., Wu, K., Xu, J. L., McAuliffe, G., Tanzi, R. E., Wasco, W., Black, I. B. (1995) Selective localization of amyloid precursor-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 32, 36-44
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., Ito, H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-532
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., Fahrenholz, F. (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 5815-5820
- Konig, G., Monning, U., Czech, C., Prior, R., Banati, R., Schreiter-Gasser, U., Bauer, J., Masters, C.L., & Beyreuther, K. (1992) Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 10804-10809
- Kosik, K. S., Joachim, C. L., Selkoe, D. J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 4044-4048
- Kostyszyn, B., Cowburn, R. F., Seiger, A., Kjaeldgaard, A., Sundstrom, E. (2001) Expression of presenilin-1 and Notch-1 receptor in human embryonic CNS. *Neuroscience* 103, 885-898
- Lahiri, D. K., Nall, C. (1995) Promoter activity of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 32, 233-240
- 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.U.S.A* 96, 3922-3927
- Le Gall, S. M., Auger, R., Dreux, C., Mauduit, P. (2003) Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J.Biol.Chem.* 278, 45255-45268
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C., Hammond, J. (1999) Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J.Biol.Chem.* 274, 23426-23436
- LeBlanc, A. C., Koutroumanis, M., Goodyer, C. G. (1998) Protein kinase C activation increases release of secreted amyloid precursor protein without decreasing A β production in human primary neuron cultures. *J.Neurosci.* 18, 2907-2913
- Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P., Selkoe, D. J. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087-1093
- Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A., . (1992) A new pathway for vitamin A. Understanding the pleiotropic effects of retinoids. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 669, 70-85
- Lewis, J. (1998) Notch signalling. A short cut to the nucleus. *Nature* 393, 304-305

Literaturverzeichnis

- Li, Q., Sudhof, T. C. (2004) Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J.Biol.Chem.* 279, 10542-10550
- Li, X. F., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Yu, F. S. (1999) Amyloid precursor-like protein 2 promotes cell migration toward fibronectin and collagen IV. *J.Biol.Chem.* 274, 27249-27256
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., Young, M. W. (1993) Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7, 1949-1965
- Lorent, K., Overbergh, L., Moechars, D., de, S. B., van, L. F., Van den, B. H. (1995) Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* 65, 1009-1025
- Lovat, P. E., Pearson, A. D., Malcolm, A., Redfern, C. P. (1993) Retinoic acid receptor expression during the in vitro differentiation of human neuroblastoma. *Neurosci.Lett.* 162, 109-113
- Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X., Salvesen, G. S., Koo, E. H., Bredesen, D. E. (2000) A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat.Med.* 6, 397-404
- Lukiw, W. J. (2004) Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. *Neurochem.Res.* 29, 1287-1297
- Lum, L., Blobel, C. P. (1997) Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev.Biol.* 191, 131-145
- Lyckman, A. W., Confaloni, A. M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Moya, K. L. (1998) Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J.Biol.Chem.* 273, 11100-11106
- Maden, M., Holder, N. (1991) The involvement of retinoic acid in the development of the vertebrate central nervous system. *Development Suppl* 2, 87-94
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., Zile, M. (1996) Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr.Biol.* 6, 417-426
- Mallucci, G. R., Ratte, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G., Collinge, J. (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 21, 202-210
- Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y., Lehmann, S. (2004) Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol.Cell* 96, 125-132
- Mark, R. J., Hensley, K., Butterfield, D. A., Mattson, M. P. (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J.Neurosci.* 15, 6239-6249
- Martin-Morris, L. E., White, K. (1990) The Drosophila transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* 110, 185-195
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M., rtavanis-Tsakonas, S. (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121, 2633-2644
- Mattson, M.P., Barger, S.W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V.L., & Rydel, R.E. (1993) beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16, 409-414.

- McNamara, M. J., Ruff, C. T., Wasco, W., Tanzi, R. E., Thinakaran, G., Hyman, B. T. (1998) Immunohistochemical and in situ analysis of amyloid precursor-like protein-1 and amyloid precursor-like protein-2 expression in Alzheimer disease and aged control brains. *Brain Res.* 804, 45-51
- Mecocci, P., Polidori, M. C., Cherubini, A., Ingegneri, T., Mattioli, P., Catani, M., Rinaldi, P., Cecchetti, R., Stahl, W., Senin, U., Beal, M. F. (2002) Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch.Neurol.* 59, 794-798
- Melino, G., Draoui, M., Bernardini, S., Bellincampi, L., Reichert, U., Cohen, P. (1996) Regulation by retinoic acid of insulin-degrading enzyme and of a related endoprotease in human neuroblastoma cell lines. *Cell Growth Differ.* 7, 787-796
- Merdes, G., Soba, P., Loewer, A., Bilic, M. V., Beyreuther, K., Paro, R. (2004) Interference of human and Drosophila APP and APP-like proteins with PNS development in Drosophila. *EMBO J.* 23, 4082-4095
- Misner, D. L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A. M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L. M., Stevens, C. F., Evans, R. M. (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 11714-11719
- Muller, U., Cristina, N., Li, Z. W., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A., Weissman, C. (1996) Mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein (beta APP) gene show impaired behavior and high incidence of agenesis of the corpus callosum. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 777, 65-73
- Muller, W. E., Scheffer, U., Perovic, S., Forrest, J., Schroder, H. C. (1997) Interaction of prion protein mRNA with CBP35 and other cellular proteins Possible implications for prion replication and age-dependent changes. *Arch.Gerontol.Geriatr.* 25, 41-58
- Multhaup, G. (1994) Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* 76, 304-311
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., Kopan, R. (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol.Cell* 5, 197-206
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103
- Narindrasorasak, S., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Poorman, R. A., Greenberg, B., & Kisilevsky, R. (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 266, 12878-12883.
- Natarajan, K., Singh, S., Burke, T. R., Jr., Grunberger, D., Aggarwal, B. B. (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 9090-9095
- Nathans, D. & Smith, H. O. (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 273-293.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362, 75-79
- Nitsch, R. M. (1996) From acetylcholine to amyloid: neurotransmitters and the pathology of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5, 477-482
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljianian, M., Lau, L. F., Duff, K. (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38, 555-565
- Nukina, N., Ihara, Y. (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J.Biochem.(Tokyo)* 99, 1541-1544

Literaturverzeichnis

- Ohsawa, I., Takamura, C., Kohsaka, S. (2001) Fibulin-1 binds the amino-terminal head of beta-amyloid precursor protein and modulates its physiological function. *J.Neurochem.* 76, 1411-1420
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. (2004) Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp.Neurol.* 189, 380-392
- Paliga, K., Peraus, G., Kreger, S., Durrwang, U., Hesse, L., Multhaupt, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., Weidemann, A. (1997) Human amyloid precursor-like protein 1--cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid. *Eur.J.Biochem.* 250, 354-363
- Palmer, Prediger Assessing RNA Quality. *Ambion Tech Notes* 11(1)
- Pan, D., Rubin, G. M. (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90, 271-280
- Pangalos, M. N., Shioi, J., Robakis, N. K. (1995) Expression of the chondroitin sulfate proteoglycans of amyloid precursor (appican) and amyloid precursor-like protein 2. *J.Neurochem.* 65, 762-769
- Parchi, P., Giese, A., Capellari, S., Brown, P., Schulz-Schaeffer, W., Windl, O., Zerr, I., Budka, H., Kopp, N., Piccardo, P., Poser, S., Rojiani, A., Streichenberger, N., Julien, J., Vital, C., Ghetti, B., Gambetti, P., Kretzschmar, H. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann.Neurol.* 46, 224-233
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., Hooper, N. M. (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38, 9728-9734
- Pastorino, L., Ikin, A. F., Lamprianou, S., Vacaresse, N., Revelli, J. P., Platt, K., Paganetti, P., Mathews, P. M., Harroch, S., Buxbaum, J. D. (2004) BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol.Cell Neurosci.* 25, 642-649
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de La, M. S., Dikkes, P., Tsai, L. H. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622
- Pellegrini, L., Passer, B. J., Tabaton, M., Ganjei, J. K., D'Adamio, L. (1999) Alternative, non-secretase processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8. *J.Biol.Chem.* 274, 21011-21016
- Poduslo, J. F., Curran, G. L., Haggard, J. J., Biere, A. L., Selkoe, D. J. (1997) Permeability and residual plasma volume of human, Dutch variant, and rat amyloid beta-protein 1-40 at the blood-brain barrier. *Neurobiol.Dis.* 4, 27-34
- Poduslo, J. F., Curran, G. L., Sanyal, B., Selkoe, D. J. (1999) Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier. *Neurobiol.Dis.* 6, 190-199
- 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, L. F., Fahrenholz, F. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J.Clin.Invest* 113, 1456-1464
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., rtavanis-Tsakonas, S. (1999) Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91-94
- Rachidi, W., Mange, A., Senator, A., Guiraud, P., Riondel, J., Benboubetra, M., Favier, A., Lehmann, S. (2003) Prion infection impairs copper binding of cultured cells. *J.Biol.Chem.* 278, 14595-14598
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P., rtavanis-Tsakonas, S. (1991) Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-699
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de, S. B., Hartmann, D., Saftig, P. (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24, 742-752

- Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I., Dingwall, C. (2001) Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr.Biol.* 11, 1288-1293
- 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
- Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M. H., Berechid, B. E., Lopez, P. A., Meucci, O., McGlade, J. C., Rakic, P., D'Adamio, L. (2002) The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 7102-7107
- Rooke, J. E., Xu, T. (1998) Positive and negative signals between interacting cells for establishing neural fate. *Bioessays* 20, 209-214
- Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., Giguere, V. (1991) Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5, 1333-1344
- Ruiz-Leon, Y. & Pascual, A. (2003) Induction of tyrosine kinase receptor b by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience* 120, 1019-1026.
- Sabo, S. L., Lanier, L. M., Ikin, A. F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., Buxbaum, J. D. (1999) Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J.Biol.Chem.* 274, 7952-7957
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., Greengard, P. (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J.Cell Biol.* 153, 1403-1414
- Saille, C., Marin, P., Martinou, J. C., Nicole, A., London, J., Ceballos-Picot, I. (1999) Transgenic murine cortical neurons expressing human Bcl-2 exhibit increased resistance to amyloid beta-peptide neurotoxicity. *Neuroscience* 92, 1455-1463
- Sanchez-Irizarry, C., Carpenter, A. C., Weng, A. P., Pear, W. S., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2004) Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol. Cell Biol.* 24, 9265-9273.
- Sandbrink, R., Banati, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., Konig, G. (1993) Expression of L-APP mRNA in brain cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 695, 183-189
- Sandbrink, R., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1994) APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiol.Dis.* 1, 13-24
- Sandbrink, R., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1994) Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J.Biol.Chem.* 269, 14227-14234
- Sandbrink, R., Monning, U., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1997) Expression of the APP gene family in brain cells, brain development and aging. *Gerontology* 43, 119-131
- Scheinfeld, M. H., Roncarati, R., Vito, P., Lopez, P. A., Abdallah, M., D'Adamio, L. (2002) Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP). *J.Biol.Chem.* 277, 3767-3775
- Schellenberg, G. D., Bird, T. D., Wijsman, E. M., Orr, H. T., Anderson, L., Nemens, E., White, J. A., Bonnycastle, L., Weber, J. L., Alonso, M. E., . (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668-671
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., Kopan, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386

Literaturverzeichnis

- Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T., Cole, G. (1989) The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3, 689-694
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1991) Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* 563, 184-194
- Sekido, H., Suzuki, T., Jomori, T., Takeuchi, M., Yabe-Nishimura, C., Yagihashi, S. (2004) Reduced cell replication and induction of apoptosis by advanced glycation end products in rat Schwann cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 320, 241-248
- Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23-A31
- Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-766
- Selkoe, D.J. (2002) Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J. Clin. Invest* 110, 1375-1381.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J., . (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361, 260-263
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., . (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A., Raz, A. (2004) Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 64, 6363-6367
- Shivers, B. D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K., Seeburg, P. H. (1988) Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J.* 7, 1365-1370
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B., . (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129
- Simons, M., Keller, P., de, S. B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., Simons, K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6460-6464
- Singh, S., Aggarwal, B. B. (1995) Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J.Biol.Chem.* 270, 24995-25000
- Sinha, S., Lieberburg, I. (1999) Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 11049-11053
- Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W., Lee, V. M. (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J.Biol.Chem.* 275, 2568-2575
- Slack, B. E., Ma, L. K., Seah, C. C. (2001) Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem.J.* 357, 787-794
- Slunt, H. H., Thinakaran, G., Von, K. C., Lo, A. C., Tanzi, R. E., Sisodia, S. S. (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J.Biol.Chem.* 269, 2637-2644
- Smith-Swintosky, V.L., Pettigrew, L.C., Craddock, S.D., Culwell, A.R., Rydel, R.E., & Mattson, M.P. (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J. Neurochem.* 63, 781-784.
- Spillantini, M. G., Goedert, M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 21, 428-433

- Stone, A. L., Kroeger, M., & Sang, Q. X. (1999) Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J. Protein Chem.* 18, 447-465.
- Storey, E., Beyreuther, K., Masters, C. L. (1996) Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* 735, 217-231
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., Roses, A. D. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 1977-1981
- Struhl, G., Greenwald, I. (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525
- Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C., Greengard, P. (1994) Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 1114-1122
- 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, 4643-4649
- Sweeney, C., Morrow, D., Birney, Y. A., Coyle, S., Hennessy, C., Scheller, A., Cummins, P. M., Walls, D., Redmond, E. M., Cahill, P. A. (2004) Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J.* 18, 1421-1423
- Takahashi, J., Palmer, T. D., Gage, F. H. (1999) Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J.Neurobiol.* 38, 65-81
- Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T., . (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 2065-2069
- Takuma, H., Tomiyama, T., Kuida, K., Mori, H. (2004) Amyloid beta peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 63, 255-261
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., Honjo, T. (1995) Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr.Biol.* 5, 1416-1423
- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F., Neve, R. L. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530
- Terry, R. D., Hansen, L. A., DeTeresa, R., Davies, P., Tobias, H., Katzman, R. (1987) Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 46, 262-268
- Tesco, G., Koh, Y. H., Tanzi, R. E. (2003) Caspase activation increases beta-amyloid generation independently of caspase cleavage of the beta-amyloid precursor protein (APP). *J.Biol.Chem.* 278, 46074-46080
- Thinakaran, G., Sisodia, S. S. (1994) Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) is modified by the addition of chondroitin sulfate glycosaminoglycan at a single site. *J.Biol.Chem.* 269, 22099-22104
- Thinakaran, G., Slunt, H. H., Sisodia, S. S. (1995) Novel regulation of chondroitin sulfate glycosaminoglycan modification of amyloid precursor protein and its homologue, APLP2. *J.Biol.Chem.* 270, 16522-16525
- Tokuda, T., Fukushima, T., Ikeda, S., Sekijima, Y., Shoji, S., Yanagisawa, N., Tamaoka, A. (1997) Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann.Neurol.* 41, 271-273
- Tomita, S., Ozaki, T., Taru, H., Oguchi, S., Takeda, S., Yagi, Y., Sakiyama, S., Kirino, Y., Suzuki, T. (1999) Interaction of a neuron-specific protein containing PDZ domains with Alzheimer's amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.* 274, 2243-2254

Literaturverzeichnis

- Tremblay, P., Meiner, Z., Galou, M., Heinrich, C., Petromilli, C., Lisse, T., Cayetano, J., Torchia, M., Mobley, W., Bujard, H., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. (1998) Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 12580-12585
- Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., Herz, J. (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.* 273, 33556-33560
- Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Friedman, W. J., Frappier, T. F., Brown, K., Shelanski, M. L. (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J.Neurosci.* 20, 1386-1392
- Tun, H., Marlow, L., Pinnix, I., Kinsey, R., Sambamurti, K. (2002) Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J.Mol.Neurosci.* 19, 31-35
- Valeva, A., Walev, I., Weis, S., Boukhallouk, F., Wassenaar, T. M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S., Zitzer, A. (2004) A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J.Biol.Chem.* 279, 25143-25148
- Varnum-Finney, B., Wu, L., Yu, M., Brashem-Stein, C., Staats, S., Flowers, D., Griffin, J. D., Bernstein, I. D. (2000) Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling. *J.Cell Sci.* 113 Pt 23, 4313-4318
- 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, 735-741
- Venezia, V., Russo, C., Repetto, E., Salis, S., Dolcini, V., Genova, F., Nizzari, M., Mueller, U., Schettini, G. (2004) Apoptotic cell death influences the signaling activity of the amyloid precursor protein through ShcA and Grb2 adaptor proteins in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J.Neurochem.* 90, 1359-1370
- Verdi, J. M., Bashirullah, A., Goldhawk, D. E., Kubu, C. J., Jamali, M., Meakin, S. O., Lipshitz, H. D. (1999) Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 10472-10476
- Vincent, B., Paitel, E., Frobert, Y., Lehmann, S., Grassi, J., Checler, F. (2000) Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J.Biol.Chem.* 275, 35612-35616
- Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., de, S. B., Grassi, J., Lopez-Perez, E., Checler, F. (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J.Biol.Chem.* 276, 37743-37746
- Voigt, A., Zintl, F. (2003) Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med.Pediatr.Oncol.* 40, 205-213
- von Koch, C. S., Lahiri, D. K., Mammen, A. L., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Sisodia, S. (1995) The mouse APLP2 gene. Chromosomal localization and promoter characterization. *J.Biol.Chem.* 270, 25475-25480
- von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L., Sisodia, S. S. (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol.Aging* 18, 661-669
- Wagner, E., Luo, T., Drager, U. C. (2002) Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb.Cortex* 12, 1244-1253
- Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., Wasco, W., Selkoe, D. J. (2003) gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* 42, 6664-6673
- Walsh, D.M. & Selkoe, D.J. (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181-193.

- Walsh, D.M., Townsend, M., Podlisny, M.B., Shankar, G.M., Fadeeva, J.V., Agnaf, O.E., Hartley, D.M., & Selkoe, D.J. (2005) Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* 25, 2455-2462.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Dominguez, B., Lee, K. F., Gan, W. B., Zheng, H. (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci.* 25, 1219-1225
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., Tanzi, R. E. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat.Genet.* 5, 95-100
- Wasco, W., Peppercorn, J., Tanzi, R. E. (1993) Search for the genes responsible for familial Alzheimer's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 695, 203-208
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., Tanzi, R. E. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat.Genet.* 5, 95-100
- Watabe, M., Hishikawa, K., Takayanagi, A., Shimizu, N., Nakaki, T. (2004) Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF κ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J.Biol.Chem.* 279, 6017-6026
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126
- Welshons, W. V., Wolf, M. F., Murphy, C. S., Jordan, V. C. (1988) Estrogenic activity of phenol red. *Mol.Cell Endocrinol.* 57, 169-178
- Weng, A. P., Aster, J. C. (2004) Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 14, 48-54
- Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T. A., Higashiyama, S., Manova, K., Ludwig, T., Blobel, C. P. (2002) Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol.Cell Biol.* 22, 1537-1544
- Westaway, D., Carlson, G. A. (2002) Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem.Sci.* 27, 301-307
- White, A. R., Collins, S. J., Maher, F., Jobling, M. F., Stewart, L. R., Thyer, J. M., Beyreuther, K., Masters, C. L., Cappai, R. (1999) Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am.J.Pathol.* 155, 1723-1730
- White, A. R., Maher, F., Brazier, M. W., Jobling, M. F., Thyer, J., Stewart, L. R., Thompson, A., Gibson, R., Masters, C. L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Barrow, C. J., Collins, S. J., Cappai, R. (2003) Diverse fibrillar peptides directly bind the Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 resulting in cellular accumulation. *Brain Res.* 966, 231-244
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., Binder, L. I. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (τ). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 4040-4043
- Worley, J. R., Baugh, M. D., Hughes, D. A., Edwards, D. R., Hogan, A., Sampson, M. J., Gavrilovic, J. (2003) Metalloproteinase expression in PMA-stimulated THP-1 cells. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR gamma) agonists and 9-cis-retinoic acid. *J.Biol.Chem.* 278, 51340-51346
- Xie, Z., Romano, D. M., Tanzi, R. E. RNAi-mediated silencing of X11a and X11b attenuate A β levels via differential effects on APP processing (2005) *J.Biol.Chem* (paper in press)
- Xu, K. P., Zoukhri, D., Zieske, J. D., Dartt, D. A., Sergheraert, C., Loing, E., Yu, F. S. (2001) A role for MAP kinase in regulating ectodomain shedding of APLP2 in corneal epithelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281, C603-C614

Literaturverzeichnis

- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Hirai, S., Shoji, M., Harigaya, Y. (1989) Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am.J.Pathol.* 135, 593-597
- Yuan, J., Yankner, B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809
- Zaman, Z., Roche, S., Fielden, P., Frost, P. G., Niriella, D. C., Cayley, A. C. (1992) Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 21, 91-94
- Zambrano, N., Buxbaum, J. D., Minopoli, G., Fiore, F., de, C. P., De, R. S., Faraonio, R., Sabo, S., Cheetham, J., Sudol, M., Russo, T. (1997) Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins. *J.Biol.Chem.* 272, 6399-6405
- Zetterstrom, R. H., Simon, A., Giacobini, M. M., Eriksson, U., Olson, L. (1994) Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62, 899-918
- Zetterstrom, R. H., Lindqvist, E., Mata de, U. A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., Olson, L. (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur.J.Neurosci.* 11, 407-416
- 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., . (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531
- Zheng, P., Eastman, J., Vande, P. S., Pimplikar, S. W. (1998) PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 14745-14750
- Zhong, W., Jiang, M. M., Weinmaster, G., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1997) Differential expression of mammalian Numb, Numbl like and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development* 124, 1887-1897

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

AD	<i>Alzheimers disease</i> (Alzheimersche Krankheit)
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i> (Disintegrin-Metalloproteinase)
AICD	intrazelluläre Domäne von APP
APLP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
APLP2s	lösliches Spaltprodukt des APLP2
APP	<i>amyloid precursor-like protein</i> (Amyloid-Vorläufer-ähnliches Protein)
APPs α	α -Sekretase-Spaltprodukt des APP
APPs β	β -Sekretase-Spaltprodukt des APP
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA (entsteht durch reverse Transkription von RNA)
CMV	Cytomegalie Virus
CS-GAG	Chondroitin-Glukosaminoglykan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N entspricht Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced fluorescence protein</i> aus <i>Aequora victoria</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiäre Formen der Alzheimerschen Krankheit
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GPI	Glycosylphosphatidyl-Inositol
HA	Hämagglutinin-Epitop des Influenza-Virus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Mol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NIC	Intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors
NLNG	Ligandenunabhängige Deletionsmutante von Notch-1
OD	optische Dichte (Absorption)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SV40	SimianVirus Typ 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
U	<i>unit</i> (Einheit zur Kennzeichnung der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

7.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.2.1 Tabellen

1. verwendete Geräte	S. 30
2. verwendete Chemikalien	S. 31
3. verwendete Primärantikörper	S. 34
4. verwendete Sekundärantikörper	S. 35
5. Oligonukleotide für die RealTime RT-PCR	S. 43
6. Oligonukleotide für die Klonierung	S. 44
7. Molekulargewichte der C-terminalen APLP2-Spaltfragmente	S. 89
8. Übersicht über die eingesetzten Apoptose-auslösenden Substanzen	S. 116

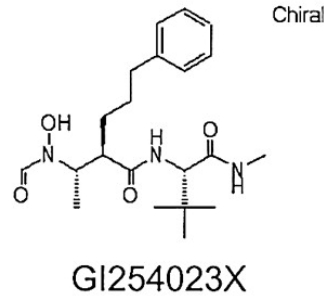
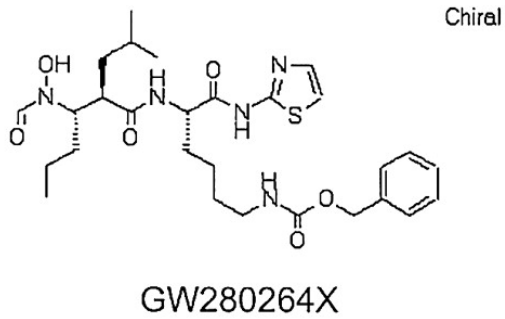
7.2.2 Abbildungen

1. Neuropathologische Veränderungen im Gehirn	S. 2
2. Bildung von neurofibrillären Bündeln aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen	S. 3
3. Proteolytische Prozessierung des APP	S. 5
4. Amyloid-Kaskaden-Hypothese zur Pathogenese der AD	S. 9
5. Sequenzvergleich der humanen Proteine der APP-Superfamilie	S. 12
6. Phylogenetische Analyse der APP/ APLP-Proteinfamilie	S. 13
7. Domänenstruktur der Proteine der APP-Superfamilie	S. 14
8. CS-GAG-Modifikation von APP und APLP2	S. 15
9. Bindungspartner des APP/APLP-C-Terminus	S. 20
10. Zelluläre Wege der A β -vermittelten Neurotoxizität	S. 21
11. Struktur des zellulären Prionenproteins	S. 23
12. Proteolyse des Notch-Rezeptors	S. 25
13. Oligonukleotid-Adapter für die Klonierung pIRESHyg-APLP2-763	S. 40
14. Auftrennung der durch TriFast gewonnene RNA	S. 52
15. Elutionsprofil der HPLC zum Nachweis der proteolytischen Spaltung des APP-18-Peptids	S. 58
16. Nachweis apoptotischer Zellkerne durch DAPI-Färbung	S. 66
17. Entstehung der Biolumineszenz im Caspase3/7-Test	S. 67
18. Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch exogene Apoptose-Induktoren	S. 68
19. beispielhafte Darstellung eines PCR-Verlaufs bei der RealTime-RT-PCR	S. 76
20. beispielhafte Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse zweier RealTime-RT-PCR-Probe	S. 77
21. Beispiel einer Analyse von RealTime-RT-PCR-Proben auf einem 1%igen Agarose-Gel	S. 77
22. Standardkurve der Ct-Werte einer Verdünnungsreihe von zellulärer mRNA	S. 78
23. Luciferase-katalysierte biolumineszente Reaktionen	S. 80
24. Inhibitorischer Einfluss von CAPE auf die Luciferase-Aktivität	S. 82
25. Elutionsprofile zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des APLP2-Peptids durch rekombinantes ADAM10	S. 83
26. Einfluss von PMA auf die Sekretion von APLP2 in HEK 293-, SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen	S. 85
27. Einfluss der Hydroxamsäure-Inhibitoren BB3103 und Ro-31-9790 auf die Sekretion von überexprimiertem APLP2-763 in HEK 293-Zellen	S. 86
28. Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT auf die membranständigen Proteinspezies von APLP2 in HEK 293- und SKNMC-Zellen	S. 88
29. Protease-Spaltstellen in APLP2 und APP	S. 89
30. Lage des Epitops des Primärantikörpers D2II und der potentiellen α - und β -ähnlichen Spaltstellen in murinem und humanem APLP2	S. 90
31. Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II auf APLP2s in HEK 293-Zellen	S. 91
32. Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II auf APPs β und APLP2s in U373hwtAPP-Zellen	S. 92
33. Einfluss des β -Sekretase-Inhibitors II auf die membranständigen Proteinspezies von APP und APLP2 in U373hwtAPP-Zellen	S. 93
34. Einfluss des MMP- und ADAM-Inhibitors GM6001 auf die konstitutive und stimulierte Sekretion von APPs α und APLP2s in HEK 293- und SKNMC-Zellen	S. 94
35. Einfluss des MMP- und ADAM-Inhibitors GM6001 auf die C-terminalen Spaltfragmente von APLP2 in SKNMC-Zellen	S. 95
36. Einfluss der ADAM-Inhibitoren GW280264X und GI254023X auf die Sekretion von APPs α und APLP2s in HEK 293-Zellen	S. 96
37. Einfluss des ADAM10-Inhibitors GI254023X auf die Sekretion von APPs α und APLP2s und die Entstehung C-terminaler Fragmente des APLP2 in SKNMC-Zellen	S. 97
38. Nachweis der überexprimierten Proteasen ADAM10, TACE und ADAM10DN in stabilen HEK 293-Einzelzellklonen	S. 99
39. Einfluss der überexprimierten Proteasen ADAM10, TACE und ADAM10DN auf die Sekretion von APLP2s in stabilen Einzelzellklonen	S. 100

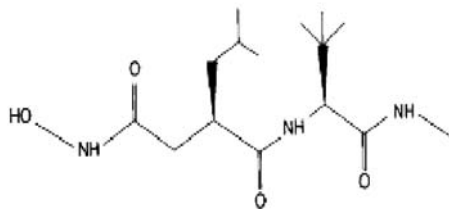
40. Expression von APLP2 in ADAM10-, ADAM10DN- und TACE-überexprimierenden stabilen Einzelzellklonen	S. 100
41. Nachweis der Spezifität der Antikörper CT12 und D2II für APLP2 in Gehirn-Proben von Mäusen	S. 101
42. Nachweis der Transgenität am Beispiel der Tiere der B-Linie	S. 102
43. Nachweis des Einflusses von überexprimiertem ADAM10 (moderate Expression) auf die APLP2-Prozessierung in transgenen Mäusen	S. 103
44. Nachweis des Einflusses von stark überexprimiertem ADAM10 auf die APLP2-Prozessierung in transgenen Mäusen	S. 104
45. Nachweis der Transgenität der Tiere der I-Linie	S. 105
46. Nachweis des Einflusses von überexprimiertem dominant negativem ADAM10 auf die APLP2-Prozessierung in transgenen Mäusen	S. 105
47. RA-induzierte Differenzierung der Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y	S. 107
48. APP- und APLP2-mRNA in SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen nach RA-Differenzierung	S. 108
49. mRNA von ADAM10 und BACE in den Neuroblastoma-Zelllinien SKNMC und SH-SY5Y nach RA-Differenzierung	S. 109
50. Einfluss der Differenzierung mit RA auf die Expression von APLP2 in SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen	S. 110
51. Einfluss der Differenzierung mit RA auf die Expression von ADAM10 in SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen	S. 110
52. Einfluss der Differenzierung mit RA auf die Expression von TACE in SKNMC- und SH-SY5Y-Zellen	S. 111
53. Einfluss der Differenzierung mit RA auf die Sekretion von APP α und APLP2s	S. 113
54. Einfluss von gleichzeitiger Applikation des Metalloproteinase-Inhibitors Ro-31-9790 und RA auf die Morphologie von SH-SY5Y-Zellen	S. 115
55. Abschnürung apoptotischer Vesikel in SKNMC-Zellen nach Camptothecin-Behandlung	S. 117
56. Expression von ADAM10 unter dem Einfluss apoptose-induzierender Substanzen in Neuroblastoma-Zellen	S. 118
57. Expression von APLP2 unter dem Einfluss apoptose-induzierender Substanzen in Neuroblastoma-Zellen	S. 119
58. Sekretion von APLP2s und APP α unter dem Einfluss von Camptothecin in SKNMC-Zellen	S. 120
59. mRNA von ADAM10, APLP2 und BACE in apoptotischen SH-SY5Y-Zellen	S. 121
60. Einfluss der Apoptose-Induktoren Camptothecin, CAPE und Doxorubicin auf die NF κ B-Aktivität in Neuroblastoma-Zellen	S. 123
61. Einfluss einer verminderten MMP- bzw. ADAM10/ 17-Aktivität in Neuroblastoma-Zellen auf die Induktion der Apoptose	S. 124
62. Vergleich der Proteinsequenzen des humanen und des murinen Notch-1-Peptids	S. 126
63. Elutionsprofile zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des murinen Notch-1-Peptids durch rekombinantes ADAM10	S. 126
64. Elutionsprofile zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des murinen Notch-1-Peptids durch rekombinantes TACE	S. 127
65. Quantifizierung der Proteolyse der Notch-1-Peptide	S. 128
66. Notch-1-Konstrukte und proteolytische Prozessierungen	S. 129
67. Aktivierung des RBPJ κ_6 -Luciferase-Reporters in NIH3T3-Zellen durch transient überexprimierte Notch-1-Konstrukte und Nachweis der endogenen Proteasen ADAM10 und TACE	S. 130
68. Einfluss des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT auf verkürzte Notch-1-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Zellen	S. 131
69. Einfluss des Phorbolesters PMA und der Hydroxamsäureinhibitoren Ro-31-9790 und GI-254023X auf verkürzte Notch-1-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Zellen	S. 132
70. Einfluss transient überexprimierter Proteasen auf verkürzte Notch-1-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Zellen	S. 133
71. Einfluss des Phorbolesters PMA und der Hydroxamsäureinhibitoren Ro-31-9790 und GI254023X auf die Spaltprodukte des transient überexprimierten Notch-1-LNG in NIH3T3-Zellen	S. 134
72. Quantifizierung der Hes-5-mRNA in RNA-Isolaten aus Maus-Gehirnen der Linie B (10 Wochen)	S. 136
73. Quantifizierung der Hes-5-mRNA in RNA-Isolaten aus Maus-Gehirnen der Linie B (15 Tage)	S. 137
74. Quantifizierung der Hes-5-mRNA in RNA-Isolaten aus Maus-Gehirnen der Linie I (15 Tage)	S. 137
75. Elutionsprofile zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des PrP-Peptids durch 500 ng rekombinantes ADAM10 bzw. TACE	S. 138
76. Elutionsprofile zum Nachweis einer potentiellen proteolytischen Spaltung des PrP-Peptids durch 500 ng rekombinantes TACE	S. 140
77. Nachweis des endogenen PrP in Maushirn-Homogenaten	S. 141
78. Einfluss von überexprimiertem ADAM10 auf die PrP-Expression	S. 141
79. Nachweis des endogenen PrP in Maushirn-Homogenaten der Linie I	S. 142
80. Nachweis des endogenen PrP und seines C-terminalen Spaltfragments in Maushirn-Homogenaten der Linie D nach Deglykosylierung	S. 143
81. Quantifizierung der PrP-mRNA in transgenen Mäusen	S. 144
82. Mögliche Wechselwirkungen von ADAM10 mit dem Prionenprotein	S. 147
83. Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen Notch-1-Peptids	S. 149
84. Sequenz des verwendeten APLP2-Peptids mit Spaltstellen	S. 152
85. Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im APP- und APLP2-Promotor	S. 158
86. Mögliche Mechanismen der Retinsäure-induzierten Regulation	S. 160

7.3 Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren

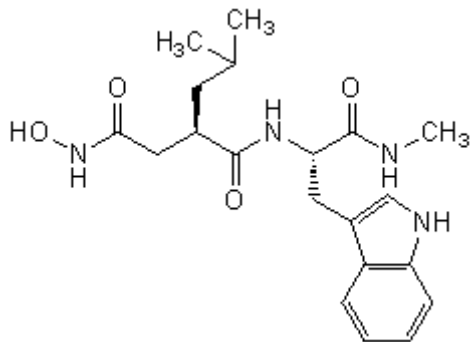
GW280264X und GI254023X (Hundhausen et al., 2003)



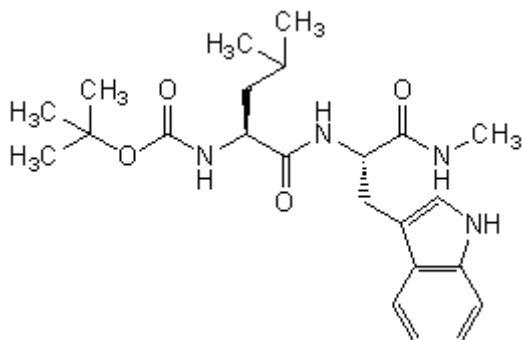
DAPT, B. Schmitt, Darmstadt



GM6001, Calbiochem, San Diego, CA (USA)

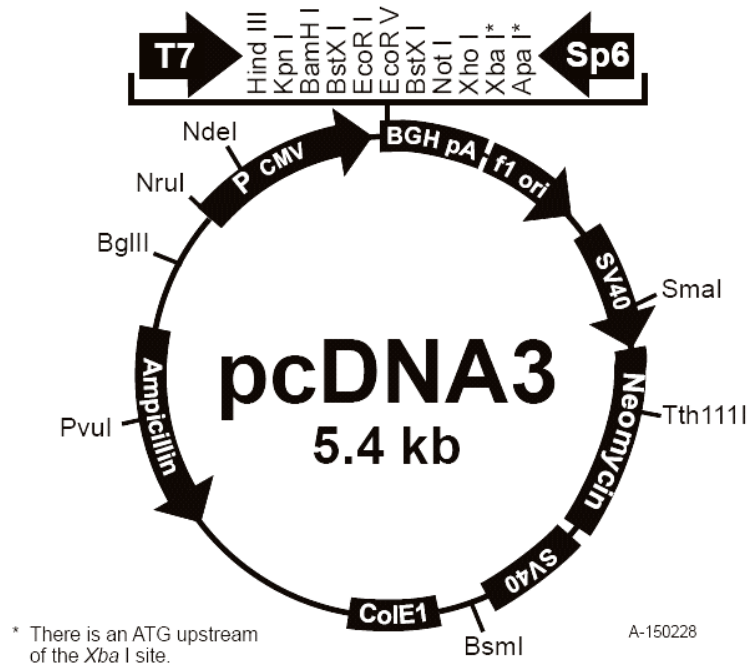


GM6001NK, Calbiochem, San Diego, CA (USA)



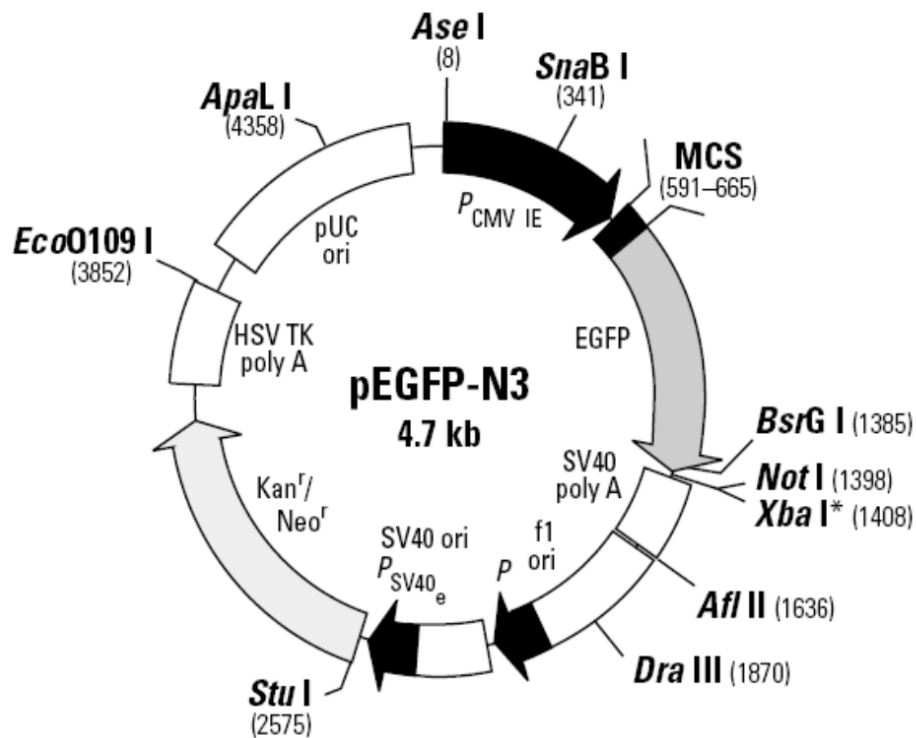
7.4 Plasmid-Karten kommerziell erhältlicher Vektoren

pcDNA3, Invitrogen, Leek (Niederlande)

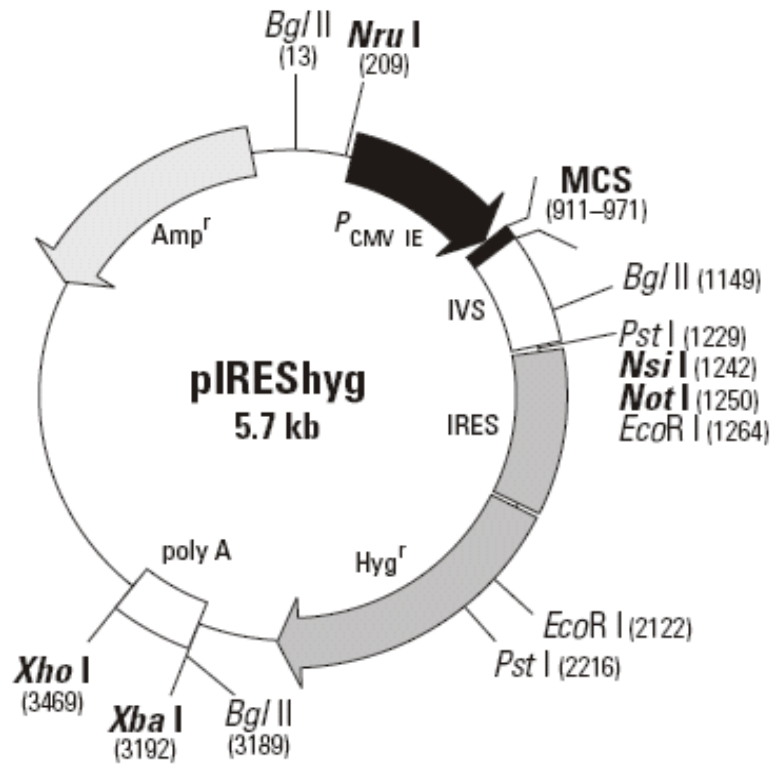


N3, BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA)

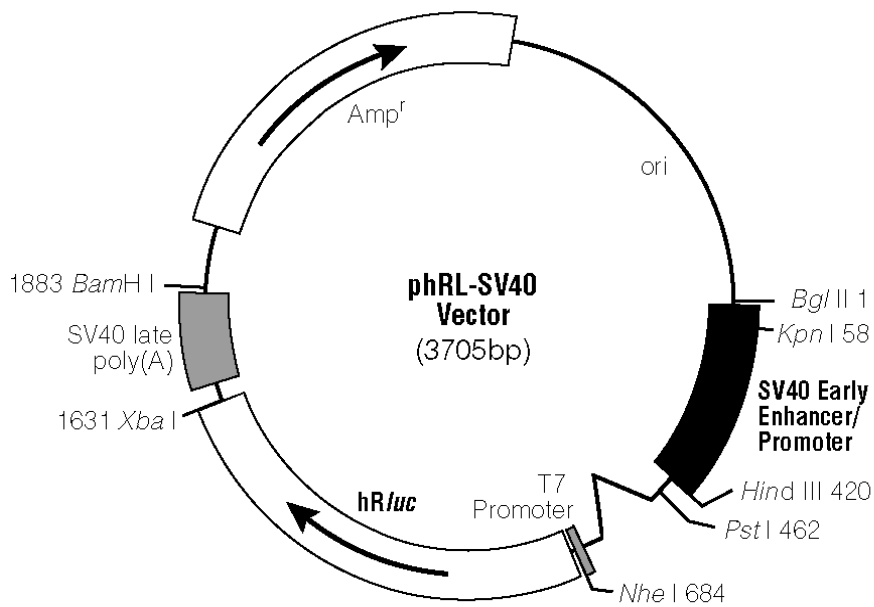
pEGFP-



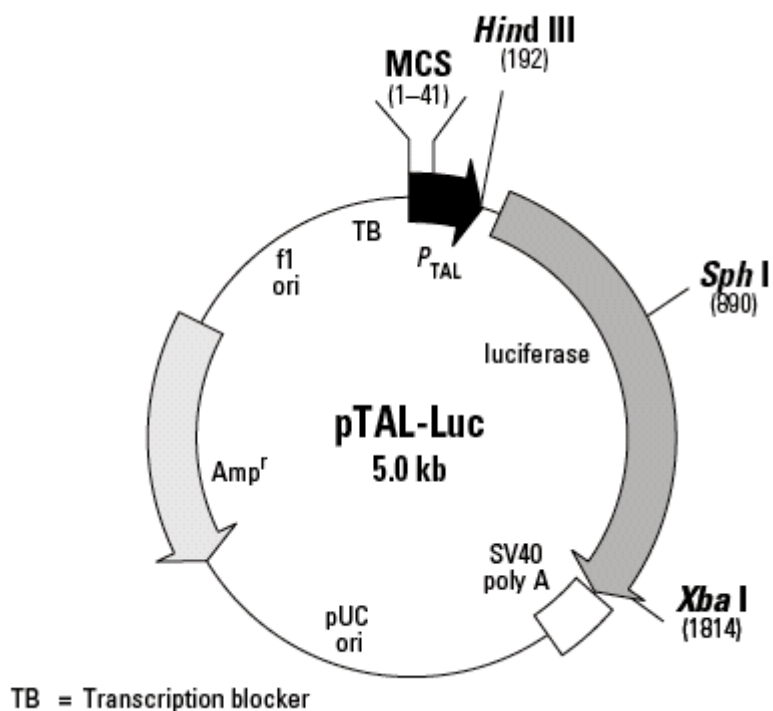
pIREShyg, BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA)



phRL-SV40, Promega, Madison, WI (USA)



pTAL-Luc, BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA)



pNF κ B-TA-Luc, BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, CA (USA)

