

Untersuchungen zum Ectodomain Shedding  
des  
Receptor for Advanced Glycation Endproducts

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor  
der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Verena Vanessa Metz**  
geb. in Mainz

Mainz, 2011



Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 27.06.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Protein Ectodomain Shedding.....	1
1.2	Receptor for Advanced Glycation Endproducts.....	3
1.2.1	Struktur und Expressionsmuster von RAGE .....	3
1.2.2	Die Beteiligung von RAGE an der Alzheimer-Demenz .....	5
1.2.3	Weitere Liganden von RAGE und ihre pathophysiologische Funktion .....	7
1.2.3.1	Advanced Glycation Endproducts .....	7
1.2.3.2	High-Mobility-Group-Protein B1 .....	8
1.2.3.3	S100-Proteine.....	8
1.2.3.4	Makrophagen-1 Glykoprotein .....	9
1.2.4	sRAGE und seine therapeutische Bedeutung .....	9
1.3	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	10
1.3.1	Die VPAC-/PAC-Rezeptoren .....	11
1.3.1.1	Das Hormon Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide .....	11
1.3.1.2	Die PAC1- und VPAC1/VPAC2-Rezeptoren.....	14
1.3.1.3	Signaltransduktion der VPAC-/PAC-Rezeptoren.....	16
1.3.1.4	Physiologische Funktionen der VPAC/PAC-Rezeptoren .....	18
1.3.2	Oxytocin- und Vasopressin-Rezeptoren .....	19
1.4	Ziel der Arbeit .....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1	Material.....	23
2.1.1	Chemikalien .....	23
2.1.2	Gebrauchsmaterial .....	26
2.1.3	Laborgeräte.....	27
2.1.4	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	29
2.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze .....	32
2.1.6	Inhibitoren, Aktivatoren und Hormone .....	32

2.1.7	Antikörper .....	34
2.1.8	Enzyme und Kit-Systeme .....	36
2.1.9	Plasmide .....	37
2.1.10	Oligonukleotide .....	39
2.1.11	Zelllinien .....	41
2.1.12	Bakterienstämme .....	43
2.1.13	Molekulargewichtsmarker .....	43
2.1.13.1	SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard .....	43
2.1.13.2	DNA-Standard .....	44
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>45</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	45
2.2.1.1	Restriktion von DNA .....	45
2.2.1.2	Reinigung von DNA .....	45
2.2.1.3	Agarosegele .....	45
2.2.1.4	Gelextraktion aus einem präparativen Agarosegel .....	46
2.2.1.5	DNA-Mengenbestimmung .....	46
2.2.1.6	Herstellen eines Oligonukleotidadapters .....	46
2.2.1.7	Ligation .....	46
2.2.1.8	Plasmid-Präparationen .....	47
2.2.1.8.1	Plasmid-Mini-Präparation (Schnellmethode) .....	47
2.2.1.8.2	Plasmid-Präparation über Silika-Säulen .....	47
2.2.1.8.3	Plasmid-Midi-Präparation .....	48
2.2.2	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen .....	48
2.2.2.1	Kultivierung der Bakterienstämme .....	48
2.2.2.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	48
2.2.2.3	Anlegen von Dauerkulturen .....	49
2.2.2.4	Expression von Proteinen .....	49
2.2.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	50
2.2.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	50
2.2.3.2	Poly-L-Lysin-Beschichtung .....	50
2.2.3.3	Transfektion mit Lipofectamin .....	51
2.2.3.4	Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie .....	51
2.2.3.5	Isolierung eines Einzelklons .....	51
2.2.3.6	Kryokonservierung von Zellen .....	51
2.2.3.7	Behandlung von Zellen mit Hormonen, Aktivatoren und Inhibitoren .....	52
2.2.3.8	Knock down von Proteinen .....	53

2.2.3.9	Zytotoxizitäts-Test .....	53
2.2.3.10	GloSensor cAMP-Test .....	54
2.2.3.11	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration .....	56
2.2.4	Aufbereitung der Proben und Nachweis der Proteine .....	57
2.2.4.1	Ernten der Zellkulturüberstände .....	57
2.2.4.2	TCA-Fällung der Proteine des Zellkulturüberstandes .....	57
2.2.4.3	Ernten von Zellen .....	57
2.2.4.4	Herstellung von Zelllysaten .....	58
2.2.4.5	Membranpräparation.....	58
2.2.4.6	Biotinylierung von Oberflächenproteinen.....	58
2.2.4.7	Solubilisierung von RAGE und RAGE-Mutanten .....	59
2.2.4.8	Reinigung von His-markiertem RAGE über Ni-NTA-Säulen .....	60
2.2.4.9	Reinigung von Proteinen aus Mauslungen-Präparationen .....	60
2.2.4.10	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	61
2.2.4.10.1	Proteinfällung nach Wessel und Flügge (Chloroform-Methanol-Fällung) .....	61
2.2.4.10.2	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford .....	61
2.2.4.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	62
2.2.4.12	Färbung von Proteinen mit Coomassie .....	63
2.2.4.13	Silberfärbung .....	63
2.2.4.14	Western Blot .....	63
2.2.4.15	Inkubation des Western Blots mit Erst- und Zweit-Antikörper .....	64
2.2.4.16	Entwicklung des Western Blots .....	64
2.2.4.17	Nachweis von Fluoreszenz nach SDS-PAGE.....	64
2.2.4.18	Entfernung der Antikörper von der Membran .....	65
2.2.5	Reinigung eines Antikörpers und Kopplung mit farbstoffmarkiertem, Seitenketten- Maleinimid-funktionalisiertem Polymer .....	65
2.2.5.1	Ammoniumsulfat-Fällung .....	65
2.2.5.2	Reinigung über Maltose-bindendes Protein .....	65
2.2.5.3	Ellman-Test.....	66
2.2.5.4	Kopplung eines Antikörpers mit farbstoffmarkiertem, Seitenketten-Maleinimid- funktionalisiertem Polymer .....	67
2.2.6	Mikroskopie .....	68
2.2.6.1	Mikroskopie lebender Zellen.....	68
2.2.6.2	Mikroskopie fixierter Zellen .....	68
2.2.7	Bioinformatik .....	69
2.2.7.1	Ablichtung der Agarosegele .....	69
2.2.7.2	Entwicklung der Western Blots und Quantifizierung .....	69

2.2.7.3	Auswertung der Daten .....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung des Receptor for Advanced Glycation Endproducts .....</b>	<b>71</b>
3.1.1	Die proteolytische Spaltung von RAGE erfolgt an der Zelloberfläche .....	71
3.1.2	Nachweis der RAGE-spaltenden Proteasen.....	72
3.1.3	Auswirkungen von Mutationen nahe der Transmembranregion von RAGE auf die Proteolyse .....	74
3.1.4	Nähere Charakterisierung der Dimerisierungsregion von RAGE .....	77
3.1.5	Synthese eines fluoreszierenden RAGE-Antikörpers.....	78
3.1.5.1	Expression eines Maltose-bindenden Proteins mit RAGE-Epitop .....	78
3.1.5.2	Reinigung eines RAGE-Antikörpers .....	79
3.1.5.3	Kopplung des Antikörpers mit Tetramethylrhodamin-markiertem Polymer .....	82
<b>3.2</b>	<b>Stimulierung der Proteolyse von RAGE über GPCRs und Erforschung der daran beteiligten Signalwege .....</b>	<b>85</b>
3.2.1	Stimulierung der Proteolyse von RAGE über den PAC1-Rezeptor.....	85
3.2.1.1	Überprüfung des Peptids PACAP-27 auf Zytotoxizität .....	85
3.2.1.2	Das Shedding von RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PACAP-27 und PMA .....	87
3.2.1.3	Signaltransduktionswege des PAC1-Rezeptors.....	89
3.2.1.3.1	Proteinkinase A .....	90
3.2.1.3.2	Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zugabe von PACAP.. .....	93
3.2.1.3.3	Proteinkinase C .....	94
3.2.1.3.4	IP <sub>3</sub> -Rezeptor .....	96
3.2.1.3.5	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II .....	96
3.2.1.3.6	MAP-Kinase-Weg .....	97
3.2.1.3.7	Inhibierung von Signalwegen nach 30-minütiger Stimulierung mit PACAP-27 ....	98
3.2.2	Stimulierung der Proteolyse von RAGE über den Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptor .	100
3.2.2.1	Nachweis des Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptors im Western Blot .....	100
3.2.2.2	Stimulierung der RAGE-Proteolyse über den Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptor .... .....	101
3.2.2.3	Bestimmung der Kinetik der RAGE-Proteolyse .....	103
3.2.2.4	Nachweis der Beteiligung einer Metalloproteinase .....	105
3.2.2.5	Signaltransduktionswege des OTR- und V <sub>2</sub> -Rezeptors.....	106
3.2.2.5.1	Proteinkinase A .....	106

3.2.2.5.2	Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zugabe von OT bzw. AVP .....	108
3.2.2.5.3	Proteinkinase C.....	109
3.2.2.5.4	IP <sub>3</sub> -Rezeptor.....	110
3.2.2.5.5	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II.....	111
3.2.2.5.6	MAP-Kinase-Weg.....	111
3.2.3	Stimulierung der RAGE-Proteolyse in vivo.....	113
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur Proteolyse von Meprin β.....</b>	<b>114</b>
3.3.1	Stimulierung der Proteolyse von Meprin β mit PMA und einem Ca <sup>2+</sup> -Ionophor .....	115
3.3.2	Nachweis der Beteiligung von Metalloproteinasen.....	116
3.3.3	Identifizierung der Meprin β-spaltenden Protease .....	117
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>119</b>
<b>4.1</b>	<b>Receptor for Advanced Glycation Endproducts.....</b>	<b>119</b>
4.1.1	Spaltung durch MMP-9 und ADAM-10 an der Zelloberfläche .....	119
4.1.2	RAGE-Spaltungsstelle und Dimerisierungsregion .....	121
4.1.3	Synthese eines fluoreszierenden RAGE-Antikörpers .....	123
<b>4.2</b>	<b>Stimulierung der Proteolyse von RAGE über GPCRs .....</b>	<b>125</b>
4.2.1	Stimulierung der RAGE-Proteolyse über den PAC1-Rezeptor .....	125
4.2.1.1	Bildung von sRAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PACAP und PMA.....	125
4.2.1.2	Signaltransduktionswege des PAC1-Rezeptors und deren Einfluss auf die Proteolyse von RAGE .....	126
4.2.2	Stimulierung der RAGE-Proteolyse über den Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptor .....	129
4.2.2.1	Die Stimulierung der RAGE-Proteolyse ist auch über Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptoren möglich .....	129
4.2.2.2	Bildung von sRAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit AVP und OT .....	130
4.2.2.3	Signaltransduktionswege des Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptors und deren Einfluss auf die Proteolyse von RAGE.....	130
4.2.3	Stimulierung der RAGE-Proteolyse in vivo.....	132
4.2.4	Therapeutische Bedeutung der GPCR-vermittelten RAGE-Proteolyse .....	133
<b>4.3</b>	<b>Stimulierung der Proteolyse von Meprin β.....</b>	<b>137</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Summary.....</b>	<b>139</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>139</b>
<b>5.2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>140</b>

<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>141</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>163</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	163
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	166
7.3	Tabellenverzeichnis.....	168
7.4	Lebenslauf.....	169
<b>8</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>171</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Protein Ectodomain Shedding

Protein *Ectodomain Shedding* beschreibt die proteolytische Spaltung von Typ I- und Typ II-Transmembranproteinen nahe der Zelloberfläche, woraufhin der extrazelluläre Bereich (*Ectodomain*) des Proteins freigesetzt wird. Anschließend erfolgt häufig eine weitere Spaltung, die innerhalb der Zellmembran stattfindet. Dieser Schritt wird als *Regulated Intramembrane Proteolysis* (RIP) bezeichnet und durch sogenannte  $\gamma$ -Sekretasen bei Typ I-Transmembranproteinen bzw. durch *Signal Peptide Peptidase Like Proteins* (SPPLs) bei Membranproteinen vom Typ II ausgeführt (Reiss und Saftig, 2009). Eine Vielzahl von Proteinen wird durch das *Shedding* von der Zelloberfläche entfernt, z.B.: Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren (Hayashida *et al.*, 2010). Die meisten dieser Moleküle unterliegen immer einem geringen, basalen *Shedding*-Prozess, allerdings kann dieser durch verschiedene Aktivatoren stark erhöht werden, u.a. durch Wachstumsfaktoren (Mortier *et al.*, 2004), Calcium-Ionophore (Reiss *et al.*, 2005), Phorbolster (Arribas *et al.*, 1996), zellulären Stress (Fitzgerald *et al.*, 2000) sowie durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Prenzel *et al.*, 1999). Die an der Stimulierung der Proteolyse beteiligten Signalwege werden hauptsächlich über die Proteinkinase C und den *Mitogen Activated Protein Kinase*-Weg (MAPK-Weg) vermittelt (Huovila *et al.*, 2005).

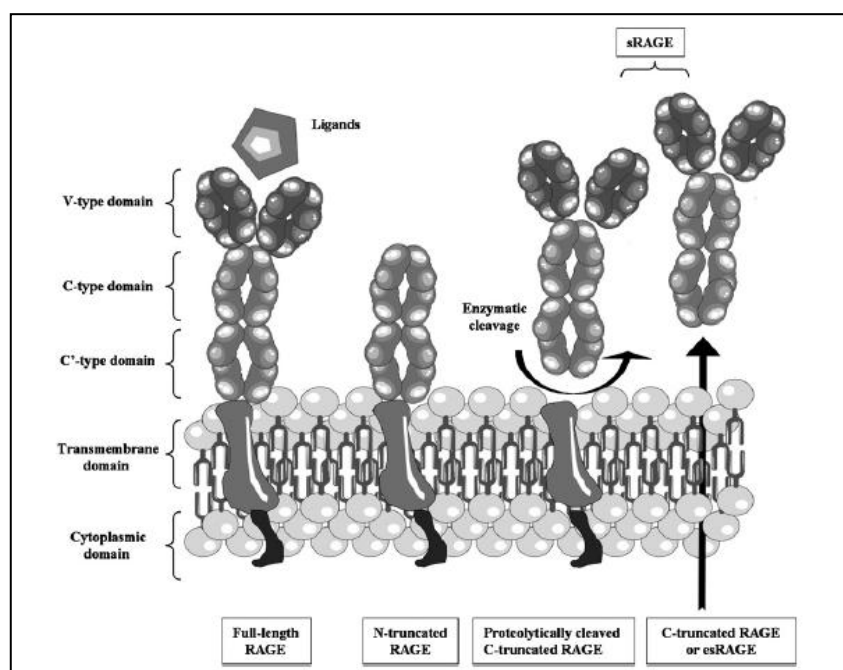
Für das *Shedding* sind zinkabhängige Metalloproteinasen, die zur Familie der Metzincine gehören, verantwortlich (Arribas und Borroto, 2002). Zum einen Matrix-metalloproteinasen (MMPs) und zum anderen die Mitglieder der „*A Disintegrin and Metalloproteases*“-Familie (ADAMs), die den größten Anteil haben. MMPs sind in der extrazellulären Matrix lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung, weiterhin bei der Freisetzung von Wachstumsfaktoren, der Reparatur und der Umgestaltung von Geweben, indem sie Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Interaktionen trennen (Nagase *et al.*, 2006). Zu den wichtigsten Vertretern der ADAMs gehören ADAM-10

und ADAM-17. Sie sind an einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt, u.a. an der Entstehung verschiedener Organe und des zentralen Nervensystems (ZNS). Auch bei Entzündungsreaktionen und der Entwicklung von Krebserkrankungen spielen sie wichtige Rollen (Reiss und Saftig, 2009). ADAM-17 kann durch die Bindung des entsprechenden Agonisten an einen GPCR (z.B. Angiotensin Typ 1-Rezeptor oder Lysophosphatid-Säure (LPA)-Rezeptor) über Aktivierung von Proteinkinase C,  $\text{Ca}^{2+}$  und *reactive oxygen species* (ROS) stimuliert werden. Dies führt zum *Shedding* eines epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), der daraufhin an den EGF-Rezeptor bindet und das Wachstum sowie die Wanderung von Zellen auslöst (Ohtsu *et al.*, 2006). An der Proteolyse des Amyloiden Vorläuferproteins (APP) ist vor allem ADAM-10 beteiligt und wird daher auch als  $\alpha$ -Sekretase bezeichnet. Durch die Spaltung entsteht neurotrophes und neuroprotektives APP $\alpha$  sowie durch anschließende  $\gamma$ -Sekretasenspaltung ein APP *intracellular domain* (AICD)-Fragment (Lammich *et al.*, 1999); dieses kann in den Zellkern gelangen und dort verschiedene Gene aktivieren (Kimberly *et al.*, 2001). APP kann auch durch eine  $\beta$ -Sekretase gespalten werden, was die Bildung des Amyloiden  $\beta$ -Peptids (A $\beta$ ) initiiert. Dieses lagert sich im Gehirn zu Amyloid-Plaques zusammen und ist für die Entstehung der Alzheimer-Demenz (AD) mitverantwortlich (Evin und Weidemann, 2002). Die Überexpression von ADAM-10 in einem Alzheimer-Mausmodell verhindert die Bildung der Plaques und verringert die neurologischen Defizite der Mäuse (Postina *et al.*, 2004). In einer Studie wurde nachgewiesen, dass in Gehirnen von AD-Patienten eine geringere Menge an ADAM-10 mRNA als in den Gehirnen gesunder Menschen vorlag (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Eine Aktivierung der Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase wäre also eine mögliche Therapie der AD, diese könnte zum Beispiel über die Aktivierung des PAC1-Rezeptors erfolgen (Kojro *et al.*, 2006).

## 1.2 Receptor for Advanced Glycation Endproducts

### 1.2.1 Struktur und Expressionsmuster von RAGE

Der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) wurde zum ersten Mal 1992 aus der Lunge eines Rindes isoliert (Schmidt *et al.*, 1992) und kloniert (Neeper *et al.*, 1992). Das für RAGE codierende Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 6 innerhalb des *Major Histocompatibility* (MHC) III-Komplexes und besteht aus elf Exons sowie zehn Introns (Sugaya *et al.*, 1994; Vissing *et al.*, 1994).



**Bild 1.1:** Darstellung der verschiedenen Spleißvarianten von RAGE und der durch Proteolyse entstandenen sRAGE-Form

Die unterschiedlichen RAGE-Isoformen sind: *full-length* RAGE, *C-truncated* RAGE (auch esRAGE genannt, ohne Transmembrandomäne und cytoplasmatische Domäne) sowie *N-truncated* RAGE (ohne V-Domäne). Durch proteolytische Spaltung entsteht sRAGE (aus Basta, 2008).

*Full-length* RAGE gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie der Zelloberflächenproteine und ist aus drei verschiedenen Regionen aufgebaut: die N-terminale, extrazelluläre Region besteht aus einem Signalpeptid (As: 1-22), drei Ig-ähnlichen Domänen, der variablen (V-) Domäne (As: 23-116) mit zwei N-Glykosylierungsstellen und zwei konstanten (C-) Domänen (As: 124-221 und As: 227-317). Danach folgen eine Transmembrandomäne (As: 343-363) sowie ein kurzer cytoplasmatischer C-Terminus (As: 364-404),

der wichtig für die Signalweiterleitung ist (Srikanth *et al.*, 2009). Die V-Domäne ist hauptsächlich für die Bindung der unterschiedlichen Liganden verantwortlich, dadurch wird die Weiterleitung des Signals in die Zelle ausgelöst.

Es existieren über 20 verschiedene Spleißvarianten von RAGE, wobei nur wenige auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten. Der Grund dafür ist, dass die verschiedenen mRNAs dem *nonsense-mediated decay* (NMD) unterliegen (Hudson *et al.*, 2008). NMD ist ein Kontrollmechanismus, der vorzeitige Stopp-Codons in der mRNA erkennt, diese abbaut und somit die Expression von verkürzten Proteinen verhindert. Die wichtigsten Spleißvarianten (siehe Bild 1.1) sind außer *full-length* RAGE, die *N-truncated* sowie die *C-truncated* Form, außerdem kann durch proteolytische Spaltung von *full-length* RAGE eine lösliche RAGE-Version (sekretiertes RAGE, sRAGE) entstehen (Zhang *et al.*, 2008). *N-truncated* RAGE zeichnet sich durch die fehlende V-Domäne aus, dies bedeutet, dass es keinen Liganden binden kann und somit auch keine Signaltransduktion in die Zelle möglich ist. Auch *C-truncated* RAGE kann kein Signal weiterleiten, da hier die Transmembrandomäne und der C-Terminus fehlen (Yonekura *et al.*, 2003).

Die Expression von RAGE ist während der Embryonalentwicklung in den Keimblättern von Mäusen konstitutiv hoch und verantwortlich für das Wachstum von Neuriten sowie für die Migration von Zellen. Nach der Geburt kann RAGE in den Granularzellschichten und in Purkinje-Zellen des sich entwickelnden Kleinhirns nachgewiesen werden (Chou *et al.*, 2004). Mäuse, in denen das Gen für RAGE deaktiviert worden ist, besitzen einen normalen Phänotyp und sind fruchtbar (Bierhaus *et al.*, 2004). Es muss also andere Proteine geben, die den Verlust des Rezeptors kompensieren können. Nach Abschluss der Entwicklungsphase wird die Expression von RAGE unter physiologischen Bedingungen erniedrigt und findet noch statt in: Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Makrophagen, Perizyten, Neuronen, Hepatozyten und Herzmuskelzellen (Brett *et al.*, 1993). Nur in der Lunge kann weiterhin eine hohe Menge an RAGE nachgewiesen werden. Der Rezeptor scheint dort eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Lunge zu haben, indem er die Adhäsion der alveolären Epithelzellen an die Basalmembran reguliert (Buckley und Ehrhardt, 2010). Die einzelnen Spleißvarianten werden in den Geweben in unterschiedlichen Verhält-

nissen exprimiert. *Full-length* RAGE ist die am häufigsten vorkommende Form in der menschlichen Lunge und den glatten Muskelzellen der Aorta, der Expressionsanteil von *C-truncated* RAGE entspricht im Vergleich dazu in der Lunge 1/11 und in den glatten Muskelzellen 1/7 (Hudson *et al.*, 2008); im Hippocampus hingegen ist diese Spleißform vorherrschend (Ding und Keller, 2005).

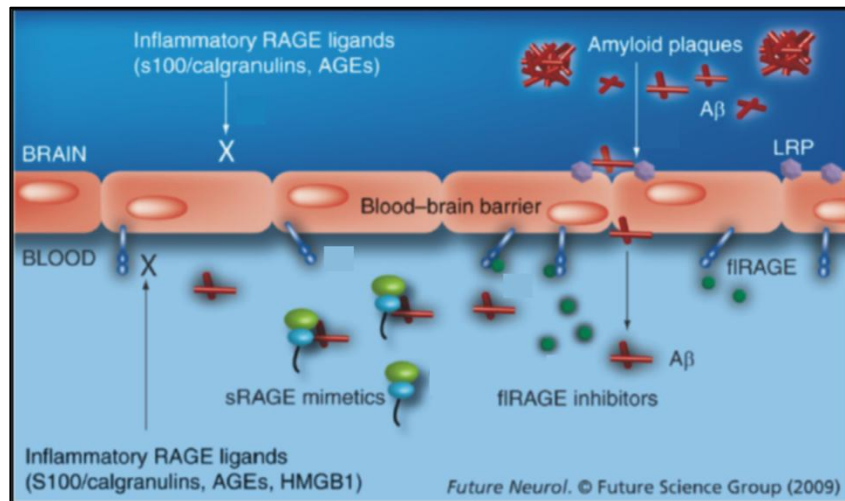
Nur unter pathologischen Bedingungen (z.B. Entzündungen, Diabetes, AD) wird eine vermehrte Bildung von RAGE nachgewiesen, diese geht zurück auf die gesteigerte Konzentration von RAGE regulierenden pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren (SP-1, AP-2, NF-IL6, NF-κB). Auch die erhöhte Menge vorhandener RAGE-Liganden induziert die Bildung von RAGE (Bierhaus *et al.*, 2005; Bierhaus und Nawroth, 2009).

### **1.2.2 Die Beteiligung von RAGE an der Alzheimer-Demenz**

Das Amyloid β-Peptid ist einer von vielen bekannten Liganden des *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*. Es wird gebildet, indem das Transmembranprotein APP durch eine β- und eine γ-Sekretase gespalten wird, dabei kann ein 40 oder 42 Aminosäuren großes Aβ-Peptid entstehen (Evin und Weidemann, 2002). Die Produktion von Aβ findet in fast allen Zellen des peripheren Gewebes und des zentralen Nervensystems statt. Aβ ist somit in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (CSF), der Gehirn-Interstitialflüssigkeit (ISF) und im Plasma zu finden (Deane *et al.*, 2004).

Die physiologischen Konzentrationen entsprechen im Gehirn 0,3 nM und im Plasma 0,05 nM. Bei Alzheimer-Patienten findet man dagegen einen starken Anstieg sowohl im Gehirn (12 nM) als auch im Plasma (2 nM). Obwohl die Konzentrationen in ISF und CSF sechsmal so hoch sind wie im Plasma, sind die absoluten Mengen an Aβ im Plasma, auf Grund des großen Plasmavolumens, um das Zehnfache größer (Cirrito *et al.*, 2003). Die Konzentration des Aβ-Peptids im Gehirn wird durch verschiedene Prozesse reguliert: 1) die Menge an produziertem Aβ im Gehirn und in peripheren Geweben; 2) die Menge an Aβ, die über LRP1 (*Lipoprotein Receptor Related Protein 1*) aus dem Gehirn ins Blut transportiert wird; 3) den Abbau von Aβ durch verschiedene Proteasen, 4) den Einstrom von Aβ ins Gehirn mit Hilfe von RAGE (Deane und Zlokovic, 2007). Die erhöhten Mengen von Aβ bei Alzheimer-Patienten führen zur Bildung von Aβ-Oligomeren

und Amyloid-Plaques, die neurotoxische Wirkungen haben bzw. zerebrovaskuläre Verletzungen auslösen. RAGE ist für den Einstrom pathophysiologischer Mengen des Peptids über die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich (siehe Bild 1.2) und löst außerdem eine Reihe von Signalketten aus (Yan *et al.*, 1996; Deane *et al.*, 2003).



**Bild 1.2: Mechanismus des A $\beta$ -Transportes über die Blut-Hirn-Schranke**

Die Konzentration von A $\beta$  im Gehirn wird durch den Transport über RAGE (für Einstrom verantwortlich) und LRP (für die Abgabe verantwortlich) bestimmt. Bei einer Alzheimer-Erkrankung führen erhöhte A $\beta$ -Konzentrationen zur Bildung von A $\beta$ -Oligomeren und Plaques, die eine neurotoxische Wirkung haben (aus Lue *et al.*, 2009).

Die Bindung eines Liganden an RAGE führt zu einer gesteigerten Expression von NF- $\kappa$ B, wodurch Apoptose- und Entzündungsprozesse ausgelöst werden. Des Weiteren werden vermehrt Zytokine (TNF- $\alpha$  und Interleukin-6) gebildet ebenso wie Endothelin-1, was Neuroinflammation und verringerten Blutfluss im Gehirn zur Folge hat, zudem wird auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies stimuliert (Stern *et al.*, 2002).

Untersuchungen der Gehirne verstorbener Alzheimer-Patienten zeigen im Vergleich zu Gehirnen von Gesunden einen starken Anstieg der Konzentration von RAGE in Neuronen und Mikroglia-Zellen des Hippocampus und frontalen Kortex. Darüber hinaus korreliert die vorhandene Menge an RAGE positiv mit dem Fortschreiten der Krankheit (Lue *et al.*, 2001). In Studien mit Mäusen, die zur Bildung von Amyloid-Plaques neigen, konnte nachgewiesen werden, dass die Infusion von A $\beta$  in das Blut zu einem durch RAGE vermittelten Transport in das Gehirn führt. Durch die Gabe eines Antikörpers

gegen RAGE konnte der Transport blockiert werden (Deane *et al.*, 2003). In derselben Studie führte die sechsmonatige Gabe von rekombinantem sRAGE zu einer signifikanten Reduktion der Plaque-Bildung. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass im Blut zirkulierendes A $\beta$  in hohem Maße zur Bildung von Plaques im Gehirn beiträgt (Lue *et al.*, 2009). In einem weiteren Versuch führte die Überexpression von APP und RAGE in Mäusen zu einer erhöhten Ablagerung von A $\beta$  im Gehirn sowie zu einer erhöhten Neuropathologie im Vergleich zu nur APP überexprimierenden Tieren (Arancio *et al.*, 2004). Origlia und Kollegen entdeckten, dass lösliche oligomere A $\beta$ (42)-Peptide die Langzeit-Potenzierung (LTP) bei Mäusen im entorhinalen Kortex inhibieren und dass dies durch RAGE vermittelt wird. Die Blockierung der LTP kam bei Mäusen, die RAGE ohne C-Terminus exprimieren bzw. bei RAGE *knock out* Mäusen, nicht vor (Origlia *et al.*, 2008).

### **1.2.3 Weitere Liganden von RAGE und ihre pathophysiologische Funktion**

#### **1.2.3.1 Advanced Glycation Endproducts**

Die *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) entstehen durch nicht-enzymatische Glykation und Oxidation von Proteinen, wobei dies hauptsächlich an den Arginin- und Lysin-Gruppen stattfindet. Vorläufer und verantwortlich für die Bildung der AGEs sind vor allem die Dicarbonylverbindungen Methylglyoxal und 3-Desoxyglucoson (Thornalley *et al.*, 1999). Die Glykation von Proteinen beinhaltet eine Reihe von Reaktionen, die zusammengefasst als Maillard-Reaktion beschrieben werden, und die über die Bildung von Schiff'schen Basen- und Amadori-Zwischenprodukten abläuft. Durch Oxidation und Dehydratation entstehen letztendlich eine Reihe von fluoreszierenden und gelb-braunen Produkten mit Stickstoff und Sauerstoff enthaltenden Heterozyklen (Srikanth *et al.*, 2009). Die Bildung der AGEs ist irreversibel und bei Diabetes, Entzündungsprozessen, Niereninsuffizienz sowie während des Alterungsprozesses stark erhöht (Ramasamy *et al.*, 2010). Außerdem liegt bei unzureichender Sauerstoffversorgung des Gewebes eine erhöhte Produktion von AGEs in Makrophagen und Endothelzellen vor (Xu *et al.*, 2010). Die Interaktion der AGEs mit RAGE führt zur Aktivierung

von NF- $\kappa$ B und zur Stimulierung pro-inflammatorischer Signalwege, wodurch über längere Zeit die Entstehung von Arteriosklerose begünstigt wird (Sparvero *et al.*, 2009). Außerdem wird die Bildung von reduziertem Glutathion verhindert und die vorhandene Menge an Ascorbinsäure erniedrigt, woraus ein erhöhter intrazellulärer oxidativer Stress folgt (Bierhaus *et al.*, 1997; Lander *et al.*, 1997). Xie und Kollegen fanden heraus, dass RAGE nur als Oligomer AGEs gut binden kann und dass die Oligomerisierung somit wichtig für die Signalweiterleitung ist (Xie *et al.*, 2008).

### 1.2.3.2 High-Mobility-Group-Protein B1

Das *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1, Amphoterin) ist ein weiterer Ligand von RAGE. Es ist ein sehr basisches Protein, das in fast allen Arten von Zellen exprimiert wird, an die DNA bindet und bei Veränderungen des Chromatins eine wichtige Rolle spielt (Hock *et al.*, 2007). Allerdings liegt HMGB1 nicht nur im Zellkern vor, sondern auch extrazellulär sowie im Zytosol und unterstützt dort die Autophagozytose und wirkt als Zytokin. Die Expression von HMGB1 und RAGE ist in vielen Tumorarten hochreguliert und die Bindung des Proteins führt zum Wachstum der Krebszellen und zur Metastasierung (Logsdon *et al.*, 2007). Dies zeigt auch eine Studie mit Mäusen, bei dieser konnte die Blockierung der Wechselwirkung von HMGB1 mit RAGE das Tumorstadium unterdrücken (Taguchi *et al.*, 2000). Die Signalweiterleitung ausgehend vom Rezeptor nach Stimulierung mit Amphoterin, führt über ERK1, ERK2, Jun-Kinase (JNK), p38 und Rho-GTPasen zur Expression von NF- $\kappa$ B, Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1), zur Produktion von Zytokinen (TNF $\alpha$ , Interleukine) und zur Stimulierung von Makrophagen (Sparvero *et al.*, 2009). Außerdem spielt HMGB1 eine wichtige physiologische Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems, da es hier nach Bindung an RAGE das Wachstum von Neuriten steuert (Hori *et al.*, 1995).

### 1.2.3.3 S100-Proteine

Es existieren über 20 verschiedene S100-Proteine, die sich alle durch zwei Calciumbindende EF-Handmotive auszeichnen, und die meist als Homo- oder Heterodimere in der Zelle vorliegen (Donato, 2001). Sie werden in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, z.B.: in Neutrophilen, Makrophagen, Lymphozyten, dendritischen Zellen (Clynes *et al.*,

2007). Außerdem findet in einer Reihe von Tumorzellen eine erhöhte Expression statt. Die S100-Proteine werden mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht, u.a. der rheumatoiden Arthritis, systemischen Autoimmunerkrankungen und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Wird die Interaktion von RAGE mit S100-Proteinen inhibiert, führt dies bei Mäusen zu einer reduzierten Darmentzündung sowie einer Verzögerung der Entwicklung von Arthritis (Hofmann *et al.*, 1999). Ein wichtiger Vertreter der S100-Familie ist S100B, das in Astrozyten und Melanozyten des Kortex exprimiert wird. Erhöhte Konzentrationen werden bei Patienten mit Down Syndrom, bei der Alzheimer-Erkrankung, bei einem Gehirntrauma oder einer Ischämie gefunden (Leclerc *et al.*, 2007). S100B besitzt als Tetramer die höchste Affinität für dimeres RAGE und aktiviert den  $PI_3$ -Kinase/AKT-Signalweg, NF- $\kappa$ B sowie die Bildung von ROS (Ostendorp *et al.*, 2007). In niedrigen Konzentrationen schützt das Protein vor Excitotoxizität, bei hohen Konzentrationen dagegen löst S100B die Apoptose von Neuronen aus und aktiviert Mikroglia-Zellen und Astrozyten (Huttunen *et al.*, 2000).

#### 1.2.3.4 Makrophagen-1 Glykoprotein

RAGE ist auch in der Lage, mit Oberflächenrezeptoren benachbarter Zellen Bindungen einzugehen. Ein Beispiel hierfür ist ein Beta-2-Integrin, das Makrophagen-1 Glykoprotein (MAC-1, CD11b/CD18), das von Leukozyten exprimiert wird (Chavakis *et al.*, 2003). RAGE agiert dabei als Adhäsionsrezeptor für Leukozyten und sorgt für deren Rekrutierung in entzündetes Gewebe, außerdem wird die Bildung von Adhäsionsmolekülen und pro-inflammatorischen Faktoren aktiviert (Riehl *et al.*, 2009). Dies zeigt, dass RAGE auch in Zusammenhang mit der angeborenen Immunantwort zu bringen ist.

#### 1.2.4 sRAGE und seine therapeutische Bedeutung

Die zentrale Rolle von RAGE bei einer Vielzahl von Krankheiten macht den Rezeptor zu einem möglichen therapeutischen Ziel und hat zur Folge, dass sich bereits ein RAGE-Antagonist (PF04494700) in der klinischen Testphase (Zhang *et al.*, 2009; Sabbagh *et al.*, 2010) sowie ein sRAGE Fusionsprotein in der Entwicklungsphase befinden (Lue *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist ein weiterer Ansatz die Stimulierung der Proteolyse von RAGE. Dies hat mehrere Vorteile, zum einen wird dadurch die Gesamtmenge an *full-*

*length* RAGE an der Zelloberfläche erniedrigt, was dazu führt, dass z.B. eine geringere Weiterleitung pro-inflammatorischer Signale und ein geringerer Transport von A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke stattfinden. Des Weiteren bindet das entstandene sRAGE die vorhandenen Liganden und wird dann über die Milz und Leber aus dem Blut entfernt, was u.a. zu einer geringeren Ablagerung von A $\beta$  im Gehirn führt (Renard *et al.*, 1997). Dass sRAGE eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Krankheiten spielen kann, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt. Die Gabe des löslichen Proteins reduzierte signifikant die Entstehung von Arteriosklerose bei Mäusen mit Diabetes sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Zytokinen und von Thromboplastin (Park *et al.*, 1998; Wendt *et al.*, 2006). Außerdem konnte die Verabreichung von sRAGE nach einem Infarkt den Herzmuskel von Mäusen vor einem Schaden durch Ischämie schützen (Aleshin *et al.*, 2008). Auch bei starken Entzündungsreaktionen kann die Behandlung positive Auswirkungen haben, z.B. konnte die Überlebensrate von Mäusen mit massivem Leberschaden oder hämorrhagischem Schock signifikant erhöht werden (Cataldegirmen *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2006). Für die Behandlung der Alzheimer-Demenz stellt die Erhöhung der sRAGE Konzentration ebenfalls eine vielversprechende Therapie dar. Dies ist auf Grund der Tatsache der Fall, dass bei AD-Patienten eine geringere Konzentration an zirkulierendem sRAGE im Vergleich zu gesunden Personen vorliegt (Emanuele *et al.*, 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Injektion von sRAGE die vorhandene Menge an A $\beta$ , Amyloid-Plaques und an dem *beta-site APP cleaving enzyme 1* (BACE1) in einem AD-Mausmodell signifikant reduzieren kann (Cho *et al.*, 2009).

### 1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind charakteristischerweise aus sieben Transmembranhelices aufgebaut und eines der wichtigsten Ziele für die Entwicklung neuer Medikamente. Das menschliche Genom codiert für über 950 verschiedene GPCRs, was einem Anteil am Gesamtgenom von 5 % entspricht (Takeda *et al.*, 2002). Die Liganden können biogene Amine, Lipid-Derivate, Peptide oder große Glykoproteine sein. Durch die Ligandenbindung findet eine Konformationsänderung des Rezeptors

statt, dies führt zur Weiterleitung des Signals in die Zelle und zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, indem GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Die G-Proteine können das Signal an eine Reihe von Effektormolekülen weitergeben, zum Beispiel an die Adenylatzyklase, Phospholipase C<sub>β</sub>, K<sup>+</sup>-Kanäle, PI<sub>3</sub>-Kinase und Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Im Folgenden werden die VPAC-/PAC-Rezeptoren und der Oxytocin- sowie Vasopressin-Rezeptor, die alle zur Familie der GPCRs gehören, näher charakterisiert.

### 1.3.1 Die VPAC-/PAC-Rezeptoren

#### 1.3.1.1 Das Hormon Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

Arimura und Kollegen forschten 1989 nach Adenylatzyklase aktivierenden Peptiden im Hypothalamus von Schafen und testeten diese Peptide an Hypophysen-Zellen von Ratten. Dabei entdeckten sie unter anderem ein Peptid mit der Eigenschaft, die Adenylatzyklase stark zu aktivieren; dieses umfasste 38 Aminosäuren und besaß am C-Terminus eine α-Amidierung (Miyata *et al.*, 1989). Auf Grund seiner Eigenschaften wurde es *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP-38) genannt. Weniger als ein Jahr später wurde ein Peptid gefunden, das aus den 27 Aminosäuren des N-Terminus von PACAP-38 besteht und dieselben Charakteristika aufweist (Miyata *et al.*, 1990), dieses Peptid wird dementsprechend als PACAP-27 bezeichnet. Die beiden PACAP-Varianten werden aus einer gemeinsamen Präpro-PACAP-Form gebildet (Hosoya *et al.*, 1992), die aus 176 Aminosäuren besteht. Dieser Vorläufer wird durch Pro-Hormonkonvertasen gespalten und noch weiter modifiziert, um PACAP-38 bzw. PACAP-27 sowie ein weiteres Peptid (*PACAP-related peptide*) herzustellen. Nach Aufklärung der Primärstruktur (Chartrel *et al.*, 1991) zeigte sich, dass PACAP-38 nach 27 Aminosäuren eine interne Spalt- und Amidierungsstelle besitzt und über diese PACAP-27 gebildet wird.

Das für PACAP codierende Gen besteht aus fünf Exons und befindet sich beim Menschen auf Chromosom 18 in der Region P11 (Hosoya *et al.*, 1992). Die PACAP-Promotor-Region besteht aus zwei *cAMP-response-like elements* (CRE), einem *PMA-response element* (TRE) und besitzt Homologien zur Konsensussequenz der Bindungsstelle des Hypophysen-spezifischen Wachstumsfaktors 1 (GHF-1). Die Expression von

PACAP erfolgt konstitutiv und kann durch cAMP, PMA sowie PACAP gesteigert werden (Suzuki *et al.*, 1994).

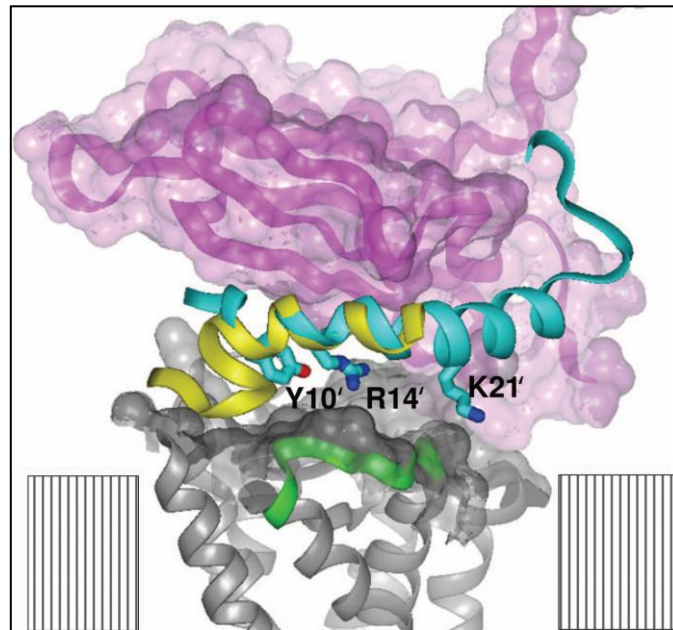
PACAP-27 besitzt eine Aminosäuren-Übereinstimmung von 68 % gegenüber dem *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP) und gehört damit zur *Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)-Glucagon-Growth Hormone Releasing Factor (GRF)-Secretin-Superfamilie* (Campbell und Scanes, 1992). Diese Familie umfasst insgesamt neun Hormone, die alle eine ähnliche Aminosäuresequenz besitzen (zum Beispiel His oder Tyr am N-Terminus), fast überall im Körper verteilt sind (vor allem im Gehirn und Darm) und pleiotrope Effekte ausüben (Sherwood *et al.*, 2000; Dogrukol-Ak *et al.*, 2004).

Die Aminosäuresequenz von PACAP hat sich über die letzten 700 Millionen Jahre nur in einer Position geändert (McRory und Sherwood, 1997) und ist hoch konserviert. Identische Sequenzen findet man im Menschen (Kimura *et al.*, 1990), im Schaf (Miyata *et al.*, 1989), in der Ratte (Ogi *et al.*, 1990) und in der Maus (Okazaki *et al.*, 1995); im Vergleich zu Huhn (McRory *et al.*, 1997) und Frosch (Chartrel *et al.*, 1991) ist nur eine Aminosäure abweichend.

PACAP wird sowohl im zentralen Nervensystem als auch in peripheren Organen exprimiert. Im ZNS findet man die höchste PACAP-Konzentration im Hypothalamus, wobei PACAP-38 mit über 90 % den größten Anteil der gesamten PACAP-Menge ausmacht (Arimura *et al.*, 1991; Ghatei *et al.*, 1993). Des Weiteren liegt das Peptid unter anderem im Suprachiasmatischen Nucleus (SCN), der Amygdala, dem Hippocampus, der Medulla Oblongata, dem zerebralen Kortex und dem Hypophysenhinterlappen vor (Ghatei *et al.*, 1993; Masuo *et al.*, 1993). Die Konzentration von PACAP im Pfortaderblut der Hypophyse bei Ratten ist zweimal so hoch verglichen zu Blut in der Peripherie; dies deutet daraufhin, dass das Peptid vom Hypothalamus zur Hypophyse transportiert wird (Dow *et al.*, 1994).

Auch in den peripheren Geweben ist die Menge an PACAP-38 die meist vorkommende Form. Allerdings ist das Mengenverhältnis PACAP-38 zu PACAP-27 von Organ zu Organ verschieden (Arimura *et al.*, 1991) und vermutlich vom Vorkommen unterschiedlicher Pro-Hormonkonvertasen abhängig. Die höchsten PACAP-Konzentrationen kommen in

der Nebenniere, im Gastrointestinaltrakt und den Lymphgefäßen vor (Arimura *et al.*, 1991). Shuto und Kollegen untersuchten die Menge der PACAP mRNA im Gehirn während der Ontogenese von Mäusen und wiesen diese ab Tag 9.5 im Embryo nach, sowie einer darauffolgenden Steigerung der mRNA-Menge und einem Maximum bei der Geburt (Shuto *et al.*, 1996; Waschek *et al.*, 1998).



**Bild 1.3: Modell zur Bindung von PACAP an den PAC1-Rezeptor**

Die N-terminale extrazelluläre Domäne des PAC1-Rezeptors ist in Lila dargestellt, die Transmembrandomänen des Rezeptors sind in Grau abgebildet. PACAP ist in Blau gezeigt und in Grün ist der extrazelluläre Loop zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 des Rezeptors dargestellt. Dieser bindet an die Aminosäuren Y10', R14' und K21' von PACAP (aus Sun *et al.*, 2007).

Der hydrophobe N-Terminus von PACAP besteht aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und ist für die Aktivität als Agonist essentiell, da um den N-Terminus verkürzte Peptide, wie zum Beispiel PACAP-(6-27) und PACAP-(9-27), als kompetitive Antagonisten fungieren (Robberecht *et al.*, 1992).

Der C-Terminus dagegen hat eine  $\alpha$ -helikale Struktur und ist wichtig für die Bindung an den Rezeptor (Inooka *et al.*, 2001). Diese erfolgt, indem der C-Terminus von PACAP an den N-Terminus der extrazellulären Domäne des GPCRs bindet; dadurch liegt das Peptid auf der extrazellulären Region der Transmembrandomäne auf. Dabei nehmen die Aminosäuren Y10', R14' und K21' des Peptids ihre richtige Orientierung ein (Sun *et al.*, 2007) und binden an den ersten extrazellulären Loop des Rezeptors (siehe Bild 1.3).

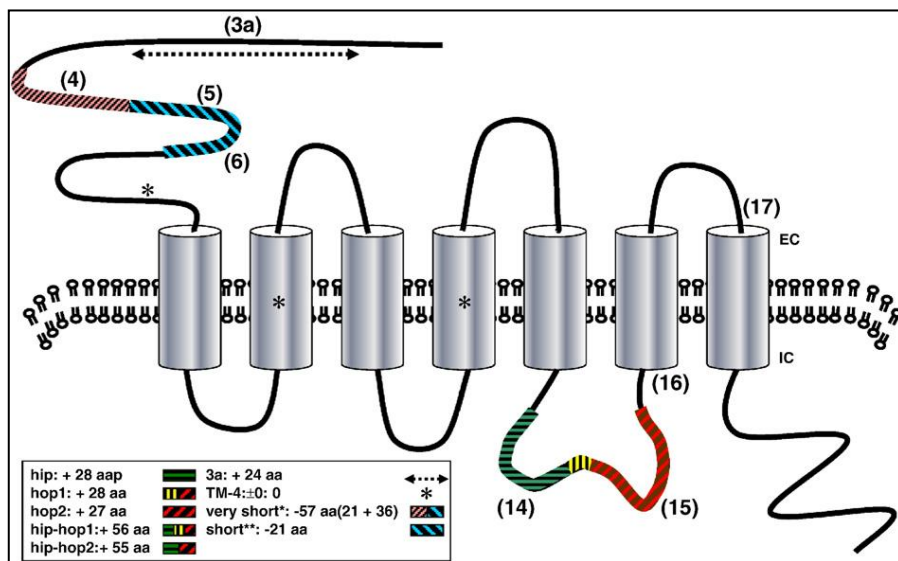
Die Bindung des Peptids führt zu einer Konformationsänderung des GPCRs, die intrazellulären Loops können daraufhin unterschiedliche Signalwege aktivieren.

### 1.3.1.2 Die PAC1- und VPAC1/VPAC2-Rezeptoren

Die Rezeptoren von PACAP gehören zur Gruppe B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese relativ kleine Gruppe mit 55 Mitgliedern wird auch als Secretin-Rezeptorfamilie bezeichnet und umfasst Peptidhormon- und Neuropeptid-Rezeptoren (Vaudry *et al.*, 2009). Die Gruppe ist noch einmal in Subfamilien unterteilt, wobei PACAP zur Subfamilie 1 gehört (Harmar, 2001). Diese zeichnen sich durch einen langen N-Terminus (ca. 120 - 140 Aminosäuren) aus, der durch sechs hoch konservierte Disulfidbrücken-bildende Cysteinreste eine globuläre Struktur einnimmt. Diese N-terminale Domäne ist wichtig für die erste Bindung des Liganden an den Rezeptor (Cao *et al.*, 1995). Bisher konnten drei verschiedene Rezeptoren für PACAP identifiziert werden (Lutz *et al.*, 1993; Pisegna und Wank, 1993; Sreedharan *et al.*, 1993) von denen zusätzlich verschiedene Spleißvarianten existieren. Die drei Hauptvarianten werden als PAC1-, VPAC1- und VPAC2-Rezeptor bezeichnet (Harmar *et al.*, 1998) und besitzen eine Typ 1-Bindungsstelle (PAC1-R) bzw. eine Typ 2-Bindungsstelle (VPAC1- und VPAC 2-R). Eine Typ 2-Bindungsstelle bedeutet, dass die beiden Rezeptoren eine ähnliche Affinität gegenüber PACAP und VIP aufweisen ( $K_d \approx 1$  nM); der PAC1-Rezeptor dagegen besitzt eine sehr viel höhere Affinität für PACAP ( $K_d \approx 0,5$  nM) als für VIP ( $K_d > 500$  nM) (Gottschall *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1990). Studien mit radioaktiv-markiertem PACAP zeigen, dass die Expression der verschiedenen Rezeptoren nicht zelltyp-spezifisch ist, sondern dass in den meisten Geweben unterschiedliche Anteile der Rezeptoren vorliegen (Robberecht *et al.*, 1991).

Der PAC1-Rezeptor liegt in mehreren Varianten vor, die durch alternatives *Splicing* entstehen. Fünf verschiedene Formen können durch Modifikationen im dritten intrazellulären Loop gebildet werden (siehe Bild 1.4). Diese sind durch die Abwesenheit (kurze Variante) oder Anwesenheit einer oder zweier Kassetten von 28 Aminosäuren (hip oder hop1-Variante) oder 27 Aminosäuren (hop2-Variante) gekennzeichnet (Spengler *et al.*, 1993; Journot *et al.*, 1994). Das Vorhandensein der hip-Kassette unter-

stützt die Stimulation der Adenylatzyklase und verhindert die Aktivierung der Phospholipase C.



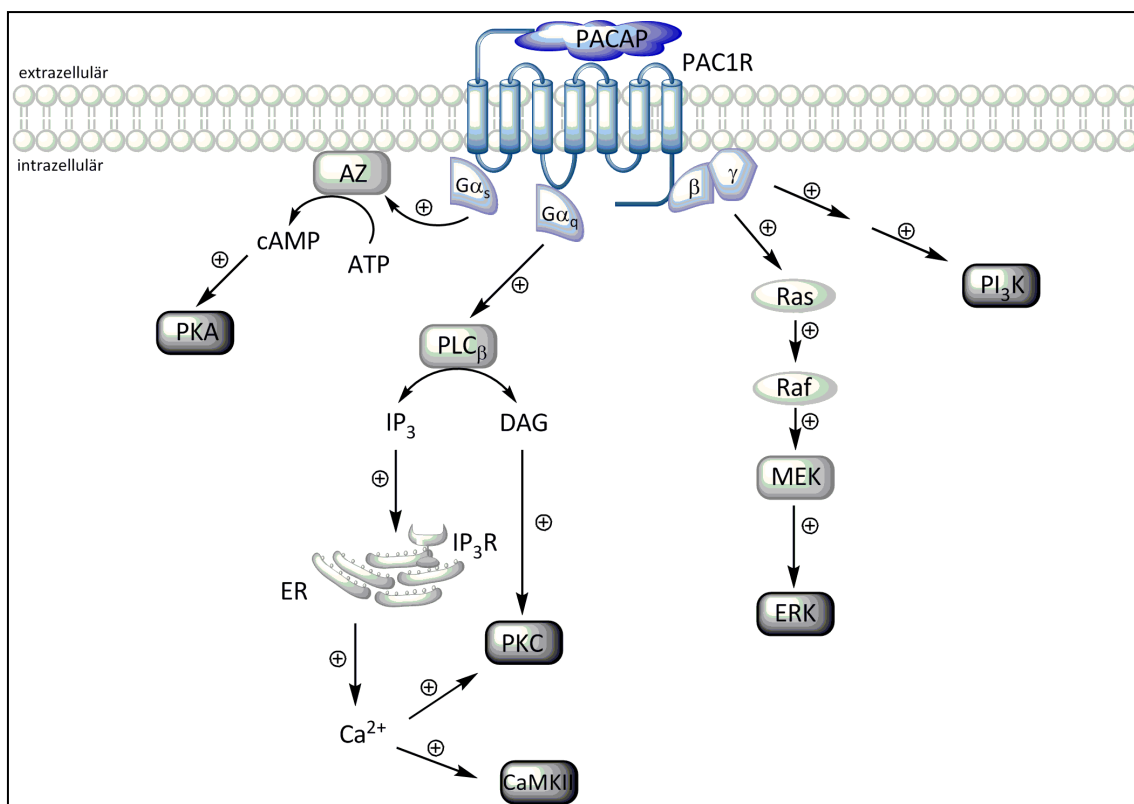
**Bild 1.4: Schematische Darstellung der PAC1-Rezeptor Varianten**

Der PAC1-Rezeptor existiert in unterschiedlichen Varianten, die durch alternatives *Splicing* entstehen. Farblich dargestellt sind die Bereiche, in denen Aminosäuren dazukommen (+) oder entfernt werden (-) im Vergleich zum PAC1-null-Rezeptor (aus Dickson und Finlayson, 2009).

Eine hohe Expression des PAC1-Rezeptors findet in vielen Regionen des Gehirns statt, unter anderem im zerebralen Kortex, im Septum, in der Amygdala, im Hippocampus und Hypothalamus (Martin *et al.*, 1987; Gottschall *et al.*, 1990; Cauvin *et al.*, 1991; Masuo *et al.*, 1992). Zudem wurde eine niedrigere Expressionsrate in Lunge und Leber gefunden (Hosoya *et al.*, 1993) sowie in der Hypophyse, Nebenniere, der Gebärmutter und dem Lymphgewebe (Shivers *et al.*, 1991; Reubi, 2000; Vaudry *et al.*, 2000a). Die VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren werden im Gegensatz zum PAC1-Rezeptor hauptsächlich in der Peripherie exprimiert, zum Beispiel in der Lunge, den Nieren und Gonaden sowie der Leber (Ishihara *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1993; Usdin *et al.*, 1994). Die Rezeptoren für PACAP und VIP werden auch in einer großen Anzahl in Krebszellen exprimiert. Der PAC1-Rezeptor kommt vor allem in neuronalen und endokrinen Tumoren vor, zum Beispiel bei Gliomen, Neuroblastomen und Prostata-Tumoren (Vertongen *et al.*, 1996; Reubi *et al.*, 2000; Lieu *et al.*, 2006; Mammi *et al.*, 2006).

### 1.3.1.3 Signaltransduktion der VPAC-/PAC-Rezeptoren

Die VPAC/PAC-Rezeptoren sind Mitglieder der Gruppe B der GPCRs und aktivieren charakteristischerweise über die  $G\alpha_s$ -Untereinheit die Adenylatzyklase (AZ), was zu einem Anstieg von cAMP führt und der nachfolgenden Aktivierung der Proteinkinase A, der GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase-3) und der Transkriptionsfaktoren CREB und NF- $\kappa$ B (Gonzalez und Montminy, 1989; Shirakawa und Mizel, 1989; Fang *et al.*, 2000). Außerdem können VPAC/PAC-Rezeptoren noch eine Vielzahl anderer Signalwege induzieren (siehe Bild 1.5).



**Bild 1.5: PAC1-Rezeptor Signalwege**

Nach Bindung eines Agonisten kann der PAC1-Rezeptor die Proteinkinase A, Proteinkinase C, CaM-Kinase II, den MAP-Kinase-Weg und die  $PI_3$ -Kinase aktivieren.

Dies geschieht zum Beispiel über die  $G\alpha_q$ -Untereinheit und führt zunächst zur Aktivierung der Phospholipase  $C_\beta$  und daraufhin der Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ). Dieser *second messenger* bindet an Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum und sorgt dadurch für den Ausstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen ins Zytosol (Chatterjee *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2006b; Tompkins *et al.*, 2006). Diese

Ionen und das gebildete DAG aktivieren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige PKCs, welche unter anderem einen stimulierenden Effekt auf den MAP-Kinase-Weg ausüben, dies geschieht entweder indirekt über Raf oder direkt über ERK1/2 (Lopez-Illasaca, 1998; Moroo *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2001). Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration sorgt auch dafür, dass sich die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) autophosphoryliert, somit aktiv ist und einen positiven Effekt auf den MAP-Kinase-Weg ausübt (Falktoft *et al.*, 2009). Ferner aktivieren die VPAC-Rezeptoren über das kleine G-Protein ARF (Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor) und der PAC1-Rezeptor ARF-unabhängig die Phospholipase D (McCulloch *et al.*, 2000) sowie Rho-GTPasen (Henle *et al.*, 2006) und Src (Macdonald *et al.*, 2005).

Durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit der GPCRs kann ebenfalls der MAP-Kinase-Weg über Ras und Raf induziert werden (van Biesen *et al.*, 1995; Osipenko *et al.*, 2000) oder eine Stimulierung der  $\text{PI}_3$ -Kinase erfolgen (Bhave und Hoffman, 2004).

Allerdings werden nicht immer alle Signalwege angeschaltet. Für die VPAC-Rezeptoren ist zum Beispiel beobachtet worden, dass manchmal nur eine cAMP-Antwort induziert wird, aber keine Änderung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vorliegt (McCulloch *et al.*, 2000; McCulloch *et al.*, 2001). Überdies ist die benötigte Konzentration von VIP bzw. PACAP, um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu erhalten, in einigen Zelllinien um eine oder zwei Zehnerpotenzen größer im Vergleich zur benötigten Menge für ein cAMP-Signal (Sreedharan *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1996; Langer *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2001; Dickson *et al.*, 2006a). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in der jeweiligen Zelllinie in unterschiedlicher Menge vorliegenden G-Proteine und *second messenger* darüber entscheiden, welche Signalwege angeschaltet werden (Laburthe und Couvineau, 2002; Langer *et al.*, 2002). Ansonsten spielen die *receptor activity-modifying proteins* (RAMPs) hierbei wahrscheinlich eine entscheidende Rolle. Diese Transmembranproteine sind bekannt dafür, dass sie die Pharmakologie und Signaltransduktionswege von GPCRs der Familie B beeinflussen (Hay *et al.*, 2006). Für den VPAC1-Rezeptor wurde gezeigt, dass dieser stark mit RAMPs interagiert und die durch VIP induzierte Inositolphosphat-Hydrolyse steigert, ohne einen Effekt auf die cAMP-Antwort auszuüben (Christopoulos *et al.*, 2003; Sexton *et al.*, 2006).

#### 1.3.1.4 Physiologische Funktionen der VPAC/PAC-Rezeptoren

Für PACAP konnte bisher gezeigt werden, dass es als Hormon, Neurohormon, Neurotransmitter und trophischer Faktor in verschiedenen Geweben des Körpers wirkt.

Die Injektion von PACAP in den Hypothalamus von Ratten bewirkt zum Beispiel die Phosphorylierung von CREB und Stimulierung der Fos-Expression, was wiederum zu einem Anstieg der Corticosteron-Konzentration im Plasma und gesteigertem Stressverhalten führt (Agarwal *et al.*, 2005; Norrholm *et al.*, 2005). Des Weiteren veranlasst eine Injektion von PACAP in den Hypothalamus die Unterdrückung der Sekretion des luteinisierenden Hormons (LH) und des Eisprungs (Anderson *et al.*, 1996). Dies sind Hinweise auf eine Wirkungsweise als Neuromodulator, der die Sekretion von hypophysetropen Neurohormonen regelt. PACAP scheint auch eine Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts zu spielen, da in Studien festgestellt wurde, dass im Hungerzustand eine stark erhöhte Menge des Peptids gebildet wird (Kiss *et al.*, 2007). Bei Ratten wurde zudem beobachtet, dass die Menge der vorhandenen PAC1-mRNA im SCN und im Nucleus supraopticus im Verlauf eines Tages stark variiert, wobei ein Höhepunkt um die Mittagszeit und um Mitternacht erreicht wird (Cagampang *et al.*, 1998). Dies deutet daraufhin, dass PACAP wichtig ist für die Aufrechterhaltung des 24 Stunden-Biorhythmus.

PACAP ist aber vor allem für seine neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaften bekannt. Diese werden über den cAMP/PKA-Weg und die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges eingeleitet (Villalba *et al.*, 1997; Obara *et al.*, 2007). Danach erfolgt die Stimulierung der *c-fos* Genexpression und diese ist für die Bildung des Proteins *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) verantwortlich (Vaudry *et al.*, 1998; Botia *et al.*, 2007). Nachgeschaltet wird dadurch die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 verhindert. Außerdem kann das Absterben hippocampaler Neuronen, das durch Ischämie ausgelöst wurde, durch die Gabe von PACAP verhindert werden. Dies geschieht durch die Inhibierung der c-Jun N-terminalen Kinase 1 (JNK) und von p38-Signalwegen (Dohi *et al.*, 2002). PACAP kann daher als wirkungsvolles Medikament bei Apoplexie und neurodegenerativen Krankheiten gesehen werden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die vorbeugende Behandlung mit PACAP-38 die Auswirkungen eines Schlaganfalls reduziert (Reglodi *et al.*, 2002), indem es die Neuronen vor

Apoptose schützt (Chen *et al.*, 2006) und die Aktivierung von Mikroglia-Zellen verhindert (Yang *et al.*, 2006).

PACAP ist ebenfalls von therapeutischem Interesse, wenn es um die Behandlung von Diabetes geht, denn die Verabreichung führt zu einem signifikanten Anstieg des Insulingehalts im Plasma beim Menschen (Filipsson *et al.*, 1997). Überdies übt PACAP einen anti-apoptotischen Effekt auf Insulinom-Zellen von Ratten aus, was darauf hindeutet, dass die während des Alterns geringer werdende PACAP-Menge zur Entstehung des Typ 2-Diabetes beiträgt (Onoue *et al.*, 2008).

Ebenfalls interessant sind die vasorelaxierenden Wirkungen von PACAP (Ascutto *et al.*, 1996), die eine Möglichkeit bieten, das Peptid zur Behandlung von Bluthochdruck einzusetzen. Die Effekte sind auf den Anstieg der cAMP-Konzentration in arteriellen glatten Muskelzellen zurückzuführen, da cAMP eine inhibitorische Auswirkung auf die Zellkontraktion der glatten Muskulatur hat (Farah, 1983; Yao *et al.*, 1996).

Weiterhin hat PACAP eine Reihe von Effekten auf Immunzellen. Zum Beispiel wird bei PACAP-*knock out* Mäusen eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beobachtet sowie eine geringere Menge an anti-inflammatorischen Zytokinen (Tan *et al.*, 2009). PACAP verhindert unter anderem die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und erhöht die Produktion von Interleukin-10 (Delgado *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1999).

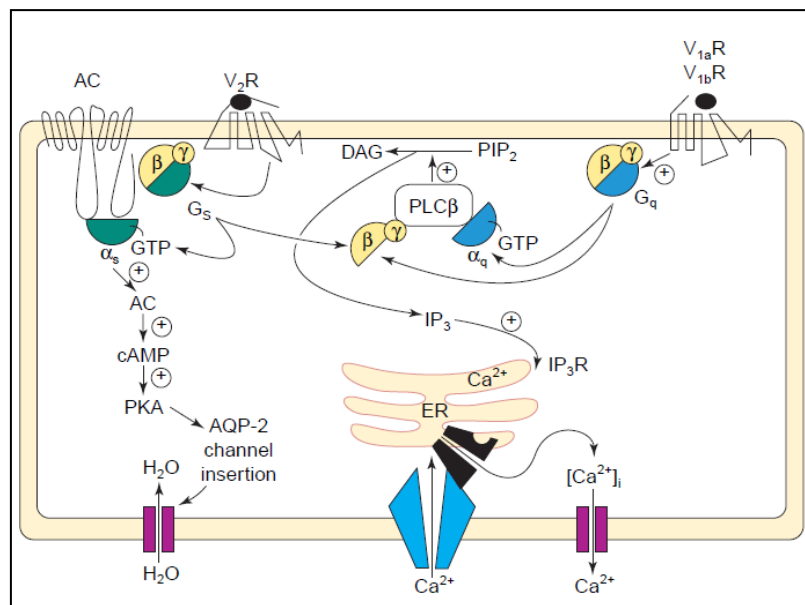
### 1.3.2 Oxytocin- und Vasopressin-Rezeptoren

Die Hormone Oxytocin (OT) und Arginin-Vasopressin (AVP) werden im Hypothalamus von magnozellulären Neuronen gebildet und in der Hypophyse zwischengespeichert (Ho *et al.*, 1995). Die beiden Peptide bestehen aus jeweils neun Aminosäuren und unterscheiden sich nur in Position 3 und 8. Sowohl Vasopressin als auch Oxytocin bilden zwischen der ersten und sechsten Aminosäure eine Disulfidbrücke aus, sodass die Peptide aus einem zyklischen Teil und einem drei Aminosäuren großen C-terminalen Rest, der eine  $\alpha$ -Amidierung trägt, aufgebaut sind (Gimpl und Fahrenholz, 2001).

Die dazugehörigen GPCRs können in vier Subtypen eingeteilt werden, den  $V_{1a}$ -Rezeptor (hauptsächlich in Leber und glatten Muskelzellen der Blutgefäße exprimiert), den  $V_{1b}$ -

Rezeptor (wird in der Adenohypophyse exprimiert), der  $V_2$ -Rezeptor (Expression in den Nieren) und den Oxytocin-Rezeptor (wird hauptsächlich im Uterus und den Milchdrüsen exprimiert) (Barberis *et al.*, 1998).

AVP spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts, indem es für die Einlagerung des Wasserkanals Aquaporin-2 in die luminal Oberfläche des Sammelrohrs in der Niere und somit eine erhöhte Reabsorption von Wasser sorgt (Deen *et al.*, 1994). Diese physiologische Funktion wird über den  $V_2$ -Rezeptor vermittelt (siehe Bild 1.6), der über die  $G\alpha_s$ -Untereinheit eine Stimulierung der Adenylatzyklase und einen Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt (Dousa *et al.*, 1972).



**Bild 1.6: Signaltransduktionswege der Vasopressin-Rezeptoren**

Die  $V_{1a}$ - und  $V_{1b}$ -Rezeptoren sind mit  $G\alpha_q$  gekoppelt und aktivieren die Phospholipase  $C_\beta$ . Der  $V_2$ -Rezeptor ist  $G\alpha_s$  gekoppelt und aktiviert die Adenylatzyklase, was letztendlich zur Einlagerung des Wasserkanals Aquaporin-2 führt (aus Birnbaumer, 2000).

Die  $V_{1a}$ - und  $V_{1b}$ -Rezeptoren sind  $G\alpha_q$  gekoppelt (siehe Bild 1.6) und aktivieren dementsprechend die Phospholipase  $C_\beta$ , was letztendlich zu einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt. Die über den  $V_{1a}$ -Rezeptor vermittelten Effekte spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks, indem sie den Baroreflex und die zirkulierende Blutmenge modulieren (Koshimizu *et al.*, 2006). Über die  $V_{1b}$ -Rezeptoren

wird die Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aktiviert (Antoni *et al.*, 1984) und die Sekretion von Katecholaminen (Guillon *et al.*, 1998).

Der Oxytocin-Rezeptor ist mit  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_i$  gekoppelt und stimuliert zusammen mit  $G\beta\gamma$  die Phospholipase  $C_\beta$  (Blanks *et al.*, 2007). Dies führt zu einer Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration und Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), was schließlich zur Kontraktion des Uterus führt (Word *et al.*, 1993). Oxytocin wird daher klinisch verwendet, um die Wehen einzuleiten, bzw. Antagonisten werden genutzt, um das verfrühte Einsetzen von Wehen zu unterbinden (Manning *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1998). Überdies hat Oxytocin einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System, indem es zu einem reduzierten Herzschlag und einer Verminderung des Blutdrucks führt (Petersson *et al.*, 1996; Favaretto *et al.*, 1997). Dies ist unter anderem auf die Ausschüttung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) in den Muskelzellen des Herzens zurückzuführen (Gutkowska *et al.*, 1997).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Der Multiligandenrezeptor RAGE ist an der Entstehung verschiedener Krankheiten beteiligt, wie z.B. der Alzheimer-Demenz, Diabetes, Arteriosklerose und Krebs. Durch Stimulierung von *Shedding*-Prozessen kann der Rezeptor von der Zelloberfläche entfernt werden (Zhang *et al.*, 2008). Dadurch wird u.a. der Transport von A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke sowie die Aktivierung von Signalkaskaden, die Apoptose und Entzündungsreaktionen auslösen, unterbunden (Yan *et al.*, 1996; Deane *et al.*, 2003). Des Weiteren wird die Menge an sRAGE gesteigert, was dazu führt, dass Liganden abgefangen und aus dem Körper entfernt werden. Eine gesteigerte Proteolyse von RAGE kann durch nicht-physiologische Stimulatoren, wie z.B. PMA, erreicht werden. Ein Ziel war es daher zunächst, die dafür verantwortlichen RAGE-spaltenden Proteasen zu identifizieren (Zhang *et al.*, 2008).

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf Untersuchungen zur Induktion des RAGE-*Shedding* durch die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In meiner Diplomarbeit mit dem Thema: „Induktion der regulierten Proteolyse des *Receptor*

for Advanced Glycation Endproducts durch ligandeninduzierte Aktivierung des PAC1-Rezeptors“ konnte bereits gezeigt werden, dass ein erhöhtes *Shedding* von überexprimiertem RAGE in HEK-Zellen auch über den GPCR PAC1 möglich ist. Da dieser Rezeptor eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert, wurde in der Diplomarbeit begonnen zu prüfen, welche davon zur Aktivierung der Protease führen. Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten die begonnenen Untersuchungen fortgeführt und vertieft sowie die Beteiligung weiterer Signalmoleküle erforscht werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die Proteolyse von RAGE auch über andere GPCRs aktiviert werden kann. Dazu wurden der Vasopressin-Rezeptor ( $V_2R$ ) sowie der Oxytocin-Rezeptor (OTR) verwendet, da diese im Vergleich zum PAC1-Rezeptor entweder nur  $G\alpha_s$  ( $V_2R$ ) oder nur  $G\alpha_{q/i}$  (OTR) gekoppelt sind. In beiden Fällen sollten die beteiligten Signalwege identifiziert werden, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Aktivierung der regulierten Proteolyse herauszuarbeiten. Ferner sollte überprüft werden, ob PACAP-38 die Entstehung von sRAGE *in vivo* positiv beeinflussen kann.

Ein weiterer Aspekt war zu überprüfen, welche Bereiche von RAGE wichtig für die Proteolyse sowie die Dimerisierung des Proteins sind. Dazu wurden verschiedene Mutanten von RAGE kloniert, in HEK-Zellen exprimiert und entsprechend untersucht.

Da RAGE als Transporter für A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke bekannt ist, liegt es nahe, diese Eigenschaft zu nutzen, um z.B. Arzneistoffe über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren oder Anti-Tumor-Medikamente gezielt in Krebszellen einzubringen. Diese Möglichkeit soll mit anti-RAGE Antikörper tragenden Nanopartikeln überprüft werden. Dazu sollten Vorarbeiten geleistet werden, indem zunächst ein anti-RAGE Antikörper gereinigt und dann eine Kopplung mit einem fluoreszierenden Polymer durchgeführt wurde.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Protein Meprin  $\beta$ , das Eigenschaften als  $\beta$ -Sekretase aufweist (Jefferson *et al.*, submitted). Hierbei sollte geklärt werden, ob die Sekretion von Meprin  $\beta$ , das in HEK-Zellen überexprimiert wurde, stimuliert werden kann und welche Protease für das *Shedding* verantwortlich ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: verwendete Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
2-Iminothiolan (2-IT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Acros, Geel (Belgien)
Acrylamid	Biorad, München
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Amylose-Resin	NEB, St. Leon-Rot
Atosiban	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz (Roti-Quant)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Blau	Roth, Karlsruhe
Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran	Pharmacia, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	VbF B, Offenbach am Main
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
GloSensor cAMP Reagenz	Promega, Mannheim
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
I-Block	AppliedBiosystems, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Lipofectamin2000	Invitrogen, Paisley (UK)
Luminol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Mowiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NeutrAvidin Biotin-bindendes Protein	Pierce, Rockford (USA)
Nu-PAGE-Auftragspuffer (4x)	Invitrogen, Paisley (UK)
OPC-31260	Sanofi-Recherche, Montpellier (F)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
p-Cumarsäure	Roth, Karlsruhe
Pepton	Merck, Darmstadt
PonceauS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein A-Sepharose	GE Healthcare, München
Saccharose	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Rockford (USA)
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford (USA)

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem, Darmstadt
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.2 Gebrauchsmaterial

Tabelle 2.2: verwendete Gebrauchsmaterialien

<b>Gebrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
1,5 ml Ultrazentrifugen-Reaktionsgefäße	Beckman Coulter, Krefeld
6-, 48-, 96-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg
Acryl-Küvetten	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Dialysemembran Spectra/Por® 3	Roth, Karlsruhe
Einfrier-Röhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filter (Whatman-)	Biometra, Göttingen
gestopfte Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Hybond ECL-Nitrocellulose Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Microcon-Röhrchen (YM-100)	Millipore, Billerica (USA)

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Mikrospritze	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Säulen	Qiagen, Hilden
Objektträger	Heiland, Gallin
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturschalen (ø 3 cm, 6 cm, 10 cm)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht

### 2.1.3 Laborgeräte

Tabelle 2.3: verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Analysenwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bakterienschüttler Multitron	Infors, Bettingen (Schweiz)
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Bakterien (B5060)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Zellkultur (CB150)	Binder, Tuttlingen
Doppelstrahlphotometer Hitachi U-2000	Colora-Meßtechnik GmbH, Lorch
ELISA-Reader Powerwave XS	Biotek, Bad Friedrichshall
Fluoreszenzkamera Stella 8300	Raytest, Straubenhardt
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Jena
Fluoreszenzspektrometer Quantamaster	Photon Technology, Birmingham (USA)
Gelapparatur (für Agarosegele)	Eigenbau
Gelapparatur (für große Gele)	Hoefer, Holliston (USA)

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller</b>
Gelapparatur (für Minigele)	Biometra, Göttingen
Glaspotter (Homogenisator)	GLW, Würzburg
Heizblock Bioblock Scientific	Fisher, Illkirch Cedex (F)
Kippschüttler (Duomax 2030)	Heidolph, Kelheim
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman Coulter, Krefeld
Luminometer FluoStar Optima	BMG Labtechnologies, Bedford (USA)
Mikroskop CK2	Olympus, Heidelberg
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Mini-Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
pH-Meter	Schott, Mainz
Pipetboy Acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton, WI (USA)
PowerSupply EPS 500/400 PowerSupply 2197 PowerPack P25	Pharmacia, Uppsala (Schweden) LKB, Bromma (Schweden) Biometra, Göttingen
Schwingmühle	Qiagen, Hilden
Sterilbank HeraSafe (für Zellkultur)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Sterilwerkbank GWL (für Bakterienkultur)	Biochrom KG, Berlin
Tankblotapparatur	Eigenbau
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina 46	Hettich, Tuttlingen
Überkopfschüttler	CMV

Laborgerät	Hersteller
Ultraschallbad Sonorex RK100	Bandelin, Berlin
Ultraschallgerät (Branson Sonifier)	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Ultrazentrifuge L7-65 (Rotor Ti45)	Beckman Coulter, Krefeld
VersaDoc Imaging System Model 3000	BioRad, München
Vortexer VF2	Janke+Kunkel, Staufen
Waage PM2000	Mettler, Gießen
Wasserbad 5B	Julabo, Seelbach
Zählkammer	Roth, Karlsruhe

### 2.1.4 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 2.4: verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Puffer, Lösungen und Medien	Zusammensetzung
2x SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	125 mM Tris (pH 6,8) 6 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 0,02 % Bromphenolblau 200 mM DTT
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure 30 % Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie G250 10 % Essigsäure 30 % Methanol
ECL-Substrat (eigene Herstellung)	50 µl Luminol (200 mM in DMSO) 50 µl p-Cumarsäure (40 mM in DMSO) 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (37 %ig) 10 ml Tris-Puffer (pH 8,5)
Farbloser Auftragspuffer (für DNA-Agarose-Gele)	50 % (v/v) Glycerin 0,2 % (v/v) SDS 0,05 % Xylencyanol 10 mM EDTA
Hypotonischer Lysispuffer	10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4) 10 mM EDTA

<b>Puffer, Lösungen und Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
I-Block/Tween-20	1x PBS 0,2 % I-Block 0,05 % Tween-20
Komplettmedium (für HEK-Zellen)	DMEM, High Glucose 10 % (v/v) FCS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM Glutamin 1 % Penicillin 1 % Streptomycin
Laufpuffer SDS-PAGE	0,1 % SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin
LB (Lysogeny Broth) -Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % Bactoagar
LB (Lysogeny Broth) -Medium	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl in H <sub>2</sub> O autoklavieren (121°C, 20 min)
Lysispuffer (ERK-Nachweis)	50 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C) 150 mM NaCl 1% Triton X-100 1 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> + 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail complete (auf 50 ml)
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer (Bakterienaufschluss)	46,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl Protease-Inhibitor 1:1000
Sammelgel (5%ig) für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 1,25 ml Sammelgelpuffer 0,1 ml 10% SDS 6,8 ml H <sub>2</sub> O 5 µl TEMED 100 µl APS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris (pH 6,8)

Puffer, Lösungen und Medien	Zusammensetzung
Sekretionsmedium	DMEM, High Glucose 2 mM Glutamin
Solubilisierungspuffer	150 mM NaCl 50 mM HEPES 0,1 % Triton X-100 je 8 ml 1 Tablette Complete mini-Protease Inhibitor, EDTA-free
STET-Puffer	8 % Saccharose (w/v) 5 % Triton X-100 (w/v) 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
Stripping-Lösung	0,2 M Glycin pH 2,2 1 % Tween-20 0,1 % SDS
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA x 2 H <sub>2</sub> O → pH auf 8,4 einstellen
Tankblotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
Transfektionsmedium	Opti-MEM 7 % Nu-Serum 2 mM Glutamin
Trenngel (10%ig) für Polyacrylamid-Gelelektrophorese	3,34 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 1,25 ml Trenngelpuffer 0,1 ml 10% SDS 5,26 ml H <sub>2</sub> O 5 µl TEMED 50 µl APS
Trenngelpuffer	3 M Tris (pH 8,9)
Tris-Buffered Saline (TBS)	20 mM Tris 138 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 7.5
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin 0,54 mM EDTA in 1x PBS

### 2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 2.5: verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
Blasticidin	Invitrogen, Paisley (UK)
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose	PAA, Pasching (A)
Fötale Kälberserum (FCS) -Gold	PAA, Pasching (A)
Geneticin (G418)	PAA, Pasching (A)
Hygromycin B	PAA, Pasching (A)
L-Glutamin	PAA, Pasching (A)
MEM nicht essentielle Aminosäuren	Promocell, Heidelberg
MEM Vitamine	Promocell, Heidelberg
Natriumpyruvat	PAA, Pasching (A)
Opti-MEM	Invitrogen, Paisley (UK)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching (A)
Poly-L-Lysin	Roth, Karlsruhe
RPMI1640	PAA, Pasching (A)
Serum Plus Serum Supplement (Nu-Serum)	JRH Biosciences, Lenexa (USA)
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching (A)

### 2.1.6 Inhibitoren, Aktivatoren und Hormone

Tabelle 2.6: verwendete Inhibitoren und Aktivatoren

Inhibitoren/Aktivatoren	Hersteller
(2-Aminoethoxy)diphenylborat (2-APB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Inhibitoren/Aktivatoren	Hersteller
8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (8-Bromo-cAMP)	Merck, Darmstadt
A23187	Merck, Darmstadt
CK59	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
GI254023X	GlaxoSmithKline, München
GM6001	Merck, Darmstadt
Gö6976	Merck, Darmstadt
Gö6983	Merck, Darmstadt
H89	Merck, Darmstadt
KT5720	Merck, Darmstadt
LY294002	Merck, Darmstadt
PD98059	Merck, Darmstadt
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Axxora, Lausen (CH)
Protease Inhibitor Cocktail complete Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim

Tabelle 2.7: verwendete Hormone

Hormon	Hersteller
<b>Arginin-Vasopressin (AVP)</b> Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub> MW: 1084,2 Da	Bachem, Heidelberg
<b>Oxytocin (OT)</b> Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> MW: 1007,2 Da	Bachem, Heidelberg

Hormon	Hersteller
<b>PACAP(1-27)</b> (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide-27) His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH <sub>2</sub> MW: 3147,6 Da	University of Gdańsk (PL), Faculty of Chemistry (Z. Grzonka)
<b>PACAP(1-38)</b> (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide-38) His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH <sub>2</sub> MW: 4534,3 Da	University of Gdańsk (PL), Faculty of Chemistry (Z. Grzonka)

### 2.1.7 Antikörper

Tabelle 2.8: verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Eigenschaften, Verdünnung	Hersteller
anti-ADAM-10	Ab19026, von Kaninchen, polyklonal, 1:1000 in I-Block, Epitop: C-Terminus	Millipore, Billerica (USA)
anti-ADAM-17	Ab19027, von Kaninchen, polyklonal, 1:1000 in I-Block, Epitop: C-Terminus	Millipore, Billerica (USA)
anti-Aktin	A2066, polyklonal, von Kaninchen, 1:1000 in I-Block, Epitop: C-Terminus	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-GFP	monoklonal, von Maus, 1:1000 in I-Block	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-HA	16B12, monoklonal, 1:6000 in I-Block	Hiss-Diagnostics
anti-Meprin $\beta$	polyklonal, von Kaninchen, 1:1000 in I-Block	C. Becker-Pauly, Institut für Biologie, Universität Mainz

<b>Primärantikörper</b>	<b>Eigenschaften, Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	polyklonal, von Kaninchen, 1:1000 in 5 %BSA/TBS, Epitop: Thr202/Tyr204	Cell Signaling, Schwalbach
anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	polyklonal, von Kaninchen, 1:1000 in 5 %BSA/TBS, Epitop: Thr202/Tyr204	Cell Signaling, Schwalbach
anti-RAGE	Ab 3260, polyklonal, Serum von Kaninchen, Blutung vom 22.11.2006, 1:200 in I-Block, Epitop: As 316-331	Eurogentec, Seraing (Belgien)
anti-RAGE	MAB5328, monoklonal, von Maus, 1:2000 in I-Block, Epitop: As 102-116	Chemicon International Inc., Temecula (USA)
anti-RAGE	Ab 3259, polyklonal, Serum von Kaninchen, Blutung vom 22.11.2006, 1:10 in PBS/5 % FCS für Mikroskopie, Epitop: As 316-331	Eurogentec, Seraing (Belgien)
anti-RAGE (Maus)	Ab 1179, monoklonal, von Ratte 1:300 in I-Block, Epitop: N-Terminus	R&D Systems, Minneapolis (USA)
anti-Rho	monoklonal, von Maus, 1:1000 in I-Block	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 2.9: verwendete Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Eigenschaften, Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 568 gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Fluoreszenzfarbstoff, für Mikroskopie, 1:250 in PBS/5 % FCS	Invitrogen, Paisley (UK)
Cy3 gekoppelter anti-Maus IgG	Fluoreszenzfarbstoff, für Mikroskopie, 1:500 in PBS/5 % FCS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Peroxidase, 1:3000 in PBS/0,05 % Tween	Pierce, Rockford (USA)

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Eigenschaften, Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Peroxidase, für ERK-Nachweis, 1:2000 in TBS/0,05 % Tween	Cell Signaling, Schwalbach
Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG	Peroxidase, 1:3000 in PBS/0,05 % Tween	Pierce, Rockford (USA)
Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Ratte IgG	Peroxidase, 1:1000 in PBS/0,05 % Tween	Merck, Darmstadt

## 2.1.8 Enzyme und Kit-Systeme

Tabelle 2.10: verwendete Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>benötigter Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-Phosphatase	für Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
DNA-Polymerase	für Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	/	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restriktionsenzyme	wie von Hersteller angegeben	NEB, Frankfurt am Main; Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA	/	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4-DNA-Ligase	für Ligase	NEB, Frankfurt am Main

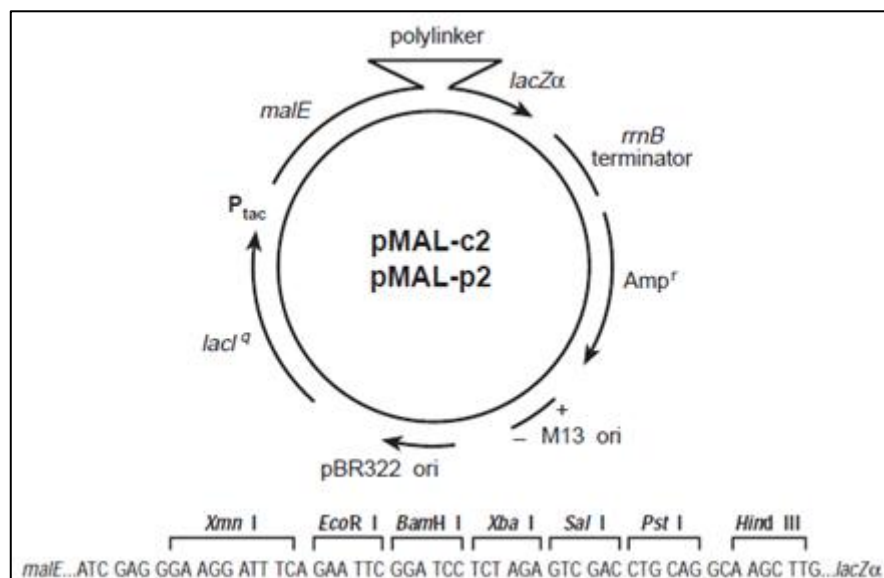
Tabelle 2.11: verwendete Kit-Systeme

<b>Kit-System</b>	<b>Hersteller</b>
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® ExtractII	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey & Nagel, Düren

## 2.1.9 Plasmide

### pMAL-c2

Der pMAL-c2 Vektor (siehe Bild 2.1) von NEB enthält die Sequenz des Maltose-bindenden Proteins mit einer Deletion der *malE*-Signalsequenz, sodass die Expression eines Fusionsproteins in das Cytoplasma erfolgt. In der multiplen Klonierungsstelle befinden sich die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII*, die zum Einfügen der RAGE-Epitop-Sequenz genutzt wurden. Des Weiteren enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen und ein *lacZ*-Gen, das eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt.



**Bild 2.1: Schematische Darstellung des pMAL-c2 Vektors**

Der pMAL-c2 Vektor enthält die Sequenz für das Maltose-bindende Protein sowie eine Ampicillin-Resistenz und Schnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* (von NEB).

### pMAL-c2-RAGE-Epi

Der Vektor enthält die cDNA für ein Fusionsprotein, das aus dem Maltose-bindenden Protein und einem Epitop von RAGE besteht (Aminosäuresequenz: VSISIIEPGEEGPTAG), gegen das der zu reinigende Antikörper gerichtet ist.

**pcDNA6-RAGE**

Der Expressionsvektor (hergestellt von Ling Zhang) mit einem CMV-Promotor enthält die humane cDNA von RAGE. Zur Selektion transformierter, eukaryotischer Zellen wird Blasticidin verwendet.

**pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 1**

Der Vektor (hergestellt von Lutz Nuhn) enthält die cDNA einer RAGE-Mutante, in dieser wurden neun Aminosäuren oberhalb der Transmembrandomäne durch Aminosäuren von esRAGE substituiert. Außerdem ist RAGE am N-Terminus mit C-Myc und am C-Terminus mit V5- und His-Epitopen markiert.

**pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 2**

Der Vektor (hergestellt von Lutz Nuhn) enthält die Sequenz einer RAGE-Mutante, in dieser wurden 17 Aminosäuren oberhalb der Transmembrandomäne substituiert. Hierbei wurden geladene Aminosäuren, Prolin (Helixbrecher) und kleine Aminosäuren gegen große ungeladene ausgetauscht. Außerdem ist RAGE am N-Terminus mit C-Myc und am C-Terminus mit V5- und His-Epitopen markiert.

**pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 3**

Der Vektor (hergestellt von Lutz Nuhn) enthält die cDNA einer RAGE-Mutante, in der die Glycine des GxxxG-Motivs in der Transmembrandomäne durch Alanine ersetzt worden sind. Außerdem ist RAGE am N-Terminus mit C-Myc und am C-Terminus mit V5- und His-Epitopen markiert.

**pcDNA6-RAGE-HA**

Der Vektor (hergestellt von Alexander Kirschner) enthält die cDNA für humanes RAGE mit einem HA-Epitop am C-Terminus.

**pcDNA6-mycRAGE-V5-His**

Der Vektor (hergestellt von Alexander Kirschner) enthält die cDNA für humanes RAGE mit einer C-Myc-Markierung am N-Terminus sowie V5- und His-Markierung am C-Terminus.

**pcDNA6-RAGE $\Delta$ RLEW-HA**

Das Plasmid (hergestellt von Annette Roth) enthält die cDNA für eine RAGE-Mutante, in der die Aminosäuren RLEW in der V-Domäne gegen ASAA ausgetauscht wurden. Außerdem ist das Protein am C-Terminus mit HA markiert.

**pcDNA6- $\Delta$ VRAGE-HA**

Das Plasmid (hergestellt von Annette Roth) enthält die cDNA für eine RAGE-Mutante ohne V-Domäne sowie eine HA-Markierung am C-Terminus.

**2.1.10 Oligonukleotide**

Die beiden Oligonukleotide RAGE-Epi-for und RAGE-Epi-rev dienen zur Herstellung eines Adapters, der in das Plasmid pMAL-c2 (siehe Kapitel 2.1.9) zwischen die Schnittstellen EcoRI und HindIII eingebaut wurde.

**RAGE-Epi-for**

5'-ATTCGTGAGCATTAGCATTATTGAACCGGGCGAAGAAGGCCCGACCGCCGGC  
GTGAGCATTAGCATT ATTGAACCGGGCGAAGAAGGCCCGACCGCCGGCTA-3'

**RAGE-Epi-rev**

5'-AGCTTAGCCGGCGGTTCGGGCCTTCTTCGCCCGGTTCAATAATGCTAATGCTCA  
CGCCGGCGGTTCGGGCCTTCTTCGCCCGGTTCAATAATGCTAATGCTCACG-3'

**RNAi stealth Oligonukleotid-Duplexe der Firma Invitrogen:****RNAi ADAM-10**

5'-UACACCAGUCAUCUGGUAAUUUCCUC-3'

3'-AUGUGGUCAGUAGACCAUAAAGGAG-5'

5'-AACAGUAGUCAUCAUGAUUCUGCUC-3'

3'-UUGUCAUCAGUAGUACUAAGACGAG-5'

5'-AGAAUUAACACUCUCAGCAACACCA-3'

3'-UCUAAUUGUGAGAGUCGUUGUGGU-5'

**RNAi ADAM-17**

5'-GGAAGCUGACCUGGUUACAACUCAU-3'

3'-CCUUCGACUGGACCAUGUUGAGUA-5'

5'-CCAGGGAGGGAAAUAUGUCAUGUAU-3'

3'-GGUCCCUCCCUUUAUACAGUACAUA-5'

5'-GAGGAAAGGAAAGCCCUGUACAGUA-3'

3'-CUCCUUCCUUUCGGGACAUGUCAU-5'

**RNAi MMP-2**

5'-AGUAGAUCAGUAUUCAUUCCUGC-3'

3'-UCAUCUAGGUCAUAAGUAAGGGACG-5'

5'-AGAAGUUGUAGUUGGCCACAUCUGG-3'

3'-UCUUCAACAUAACCGGUGUAGACC-5'

5'-ACUCCUUGCCAUUGAACAAGAAGGG-3'

3'-UGAGGAACGGUAACUUGUUCUCCCC-5'

**RNAi MMP-9**

5'-AAGAUGUUCACGUUGCAGGCAUCGU-3'

3'-UUCUACAAGUGCAACGUCCGUAGCA-5'

5'-AAUACAGCUGGUUCCCAAUCUCCGC-3'

3'-UUAUGUCGACCAAGGGUUAGAGGCG-5'

5'-AUGAAUGGAAACUGGCAGGGUUUCC-3'

3'-UACUUACCUUUGACCGUCCCAAAGG-5'

### 2.1.11 Zelllinien

#### HEK 293

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC 1573-CRL (Graham *et al.*, 1977). HEK 293 sind humane embryonale Nierenzellen, die durch den humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurden. Die Zellen wurden in phenolrotem DMEM mit hohem Glucosegehalt und 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert und in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10 subkultiviert.

#### FlpIn<sup>TM</sup> 293-PAC1/RAGE

Diese Zelllinie exprimiert den Ratten-PACAP-Rezeptor (Subtyp PAC1<sub>null</sub>), dieser besitzt N-terminal eine C-Myc-Markierung und C-terminal eine Rho-Markierung. Außerdem exprimieren die Zellen humanes RAGE-Protein ohne Markierungen (pcDNA6-RAGE). Der codierende Bereich für den PACAP-Rezeptor wurde über das FlpIn-System in die Zelle eingebracht, der codierende Bereich für RAGE durch eine Standard-Transfektion. Während der Doktorarbeit wurde mit einem Einzelklon gearbeitet.

#### FlpIn<sup>TM</sup> 293-RAGE

Diese Zelllinie exprimiert humanes RAGE-Protein ohne Markierungen (pcDNA6-RAGE). Während der Doktorarbeit wurde mit einem Einzelklon gearbeitet.

#### HEK 293-OTR-GFP/RAGE

Diese Zelllinie exprimiert stabil den humanen Oxytocin-Rezeptor mit einer C-terminalen GFP-Markierung und einer N-terminalen C-Myc- und FLAG-Markierung sowie humanes RAGE-Protein ohne Markierung (pcDNA6-RAGE). Während der Doktorarbeit wurde mit einem Einzelklon gearbeitet.

**HEK 293-bV<sub>2</sub>-HA/RAGE**

Diese Zelllinie exprimiert stabil den C-terminal HA-markierten Rinder V<sub>2</sub>-Vasopressin-Rezeptor sowie humanes RAGE-Protein ohne Markierung. Während der Doktorarbeit wurde mit einem Einzelklon gearbeitet.

**HEK 293-pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 1**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 1.

**HEK 293-pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 2**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 2.

**HEK 293-pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 3**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6-mycRAGE-V5-His Mutante 3.

**HEK 293-pcDNA6-RAGE-HA**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6-RAGE-HA.

**HEK 293-pcDNA6-mycRAGE-V5-His**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6-mycRAGE-V5-His.

**HEK 293-pcDNA6-RAGE $\Delta$ RLEW-HA**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6-RAGE $\Delta$ RLEW-HA.

**HEK 293-pcDNA6- $\Delta$ VRAGE-HA**

Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6- $\Delta$ VRAGE-HA.

**HEK 293-Meprin  $\beta$** 

Diese Zelllinie exprimiert stabil humanes Meprin  $\beta$  sowie unabhängig davon lösliches EGFP.

## 2.1.12 Bakterienstämme

### *E.coli* XL1 Blue

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1 Blue weist folgenden Genotyp auf: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]. Die Bakterien wurden mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode kompetent gemacht (Dagert und Ehrlich, 1979), bei -80°C aufbewahrt und dienten zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA.

### *E.coli* DH5α

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5α, weist folgenden Genotyp auf: *φ80δlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR, D(lacZYA-argFV169), F<sup>-</sup>, λ<sup>-</sup>* und wurde bei Clontech (Heidelberg) gekauft. Der Stamm diente ebenfalls zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA.

### *E.coli* SCS110

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* SCS110 weist folgenden Genotyp auf: *rpsL* (Strr) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ (lacproAB)* [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*] und ist von Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Er ist defizient für die Dam- und Dcm-Methylasen und diente zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA, deren Restriktion durch Methylierungen erschwert war.

### *E.coli* HMS174

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* HMS weist folgenden Genotyp auf: *F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (DE3) (Rif R)*. Dieser Bakterienstamm, wurde zur Expression von Proteinen verwendet.

## 2.1.13 Molekulargewichtsmarker

### 2.1.13.1 SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard

Der SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen (Paisley, UK) wurde bei allen SDS-PAGE Gelen verwendet (siehe Bild 2.2). Es wurden immer 2 µl aufgetragen. Zu beachten ist, dass die farbigen Banden des Standards in unterschiedlichen Puffersys-

temen verschiedene Größen darstellen. Während dieser Arbeit wurde immer das Tris-Glycine-Puffersystem verwendet.

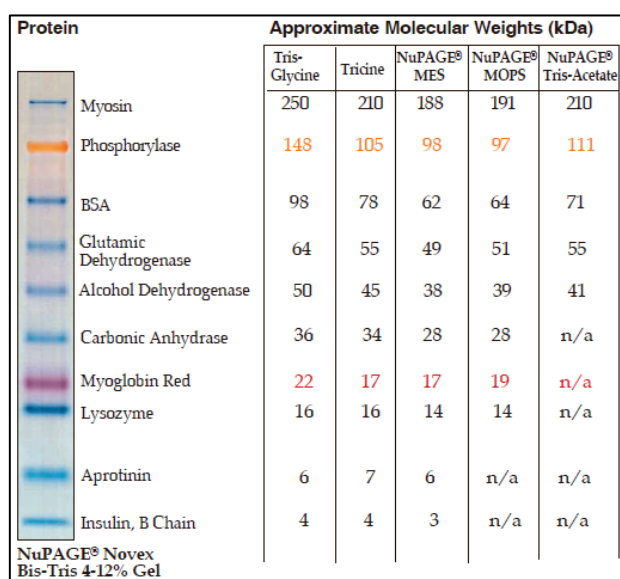


Bild 2.2: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard

### 2.1.13.2 DNA-Standard

Als Standard bei Agarose-Gelen wurde der GeneRuler 1 kb DNA-Ladder (siehe Bild 2.3) von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Es wurden immer 3 µl Standard aufgetragen.

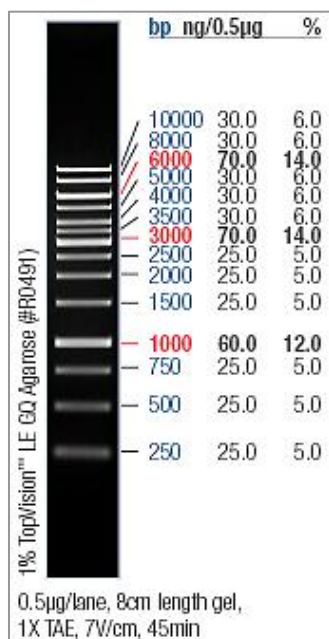


Bild 2.3: DNA-Größenstandard

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion der Plasmide erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firmen Fermentas und NEB. Die Restriktionsansätze, deren DNA später zur Ligation weiterverwendet wurde, hatten ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$ , es wurden zwischen 5  $\mu\text{g}$  und 10  $\mu\text{g}$  DNA, 10  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Puffers und 3  $\mu\text{l}$  Enzym (10 U/ $\mu\text{l}$ ) eingesetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Bei Test-Restriktionen zur Überprüfung der Plasmide auf Mutationen wurden 400 ng DNA, 1,5  $\mu\text{l}$  Puffer und 0,5  $\mu\text{l}$  Enzym eingesetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 15  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Die Ansätze wurden für 2 Stunden in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt.

#### 2.2.1.2 Reinigung von DNA

Die Reinigung der DNA von Restriktionsansätzen erfolgte mit dem Nucleo-Spin<sup>®</sup> ExtractII-Kit von Macherey & Nagel (Düren) nach Anleitung des Herstellers.

#### 2.2.1.3 Agarosegele

Mit Hilfe eines Agarosegels konnten die in einer Probe vorhandenen DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Das Agarosegel wurde dazu an eine elektrische Spannungsquelle (ca. 100 V) angeschlossen und die negativ geladene DNA wanderte, je nach Größe unterschiedlich schnell, zur Anode (Pluspol).

Es wurden 1 %ige Agarosegele mit 0,01 % Ethidiumbromid verwendet, die Herstellung erfolgte, indem 1 g Agarose pro 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst wurden. Nach dem Abkühlen wurden 5  $\mu\text{l}$  einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) zugesetzt und die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen, die Taschen wurden durch Einsetzen eines Kammes geformt.

Präparative Gele wurden 1,5 %ig und ohne Ethidiumbromid hergestellt.



Ligationsansatz eine Transformation von *E.coli* (siehe Kapitel 2.2.2.2) durchgeführt werden.

### **2.2.1.8 Plasmid-Präparationen**

#### **2.2.1.8.1 Plasmid-Mini-Präparation (Schnellmethode)**

Die Methode der Plasmid-Minipräparation wurde angewandt, um nach der erfolgreichen Transformation von Bakterien die Plasmid-DNA mehrerer Klone zu isolieren und auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Dazu wurde eine stecknadelkopfgroße Menge an Bakterien, die über Nacht im Brutschrank auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum gewachsen waren, mit einer Impföse abgenommen und in 350 µl STET-Puffer vollständig mit Hilfe eines Vortexers suspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 25 µl Lysozymlösung (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O), kurzes Mischen, einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und anschließendem Erhitzen für 50 s bei 100°C im Wasserbad. Dann wurde für 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, danach hatte sich ein weißes Pellet gebildet, das mit einem sterilen Zahnstocher entfernt wurde. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 38 µl Kaliumacetat (3 M, pH 4,8) sowie 400 µl Isopropanol in das Reaktionsgefäß zur DNA-Lösung gegeben, daraufhin wurde gemischt und 15 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte der Überstand abgegossen werden und das DNA enthaltende Pellet wurde mit 400 µl Ethanol (75 %ig) gewaschen, wozu ein weiteres Mal bei 14000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert wurde. Der Waschalkohol wurde danach abgenommen und das Pellet ungefähr 15 min unter der Sterilbank getrocknet. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde die DNA in 60 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.1.8.2 Plasmid-Präparation über Silika-Säulen**

Die Isolierung von Plasmid-DNA für Klonierungen und Transfektionen erfolgte über Silika-Säulen mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kits von Macherey-Nagel (Vorgehensweise nach Anleitung des Herstellers). Die Elution der DNA erfolgte in 50 µl Puffer AE (aus NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kit).

### 2.2.1.8.3 Plasmid-Midi-Präparation

Zur quantitativen Gewinnung von DNA wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C im Schüttler in 200 ml LB-Selektionsmedium herangezogen. Dann wurden die Bakterien bei 4°C in der Kühlzentrifuge J2-21 von Beckman bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und die Isolierung der DNA erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi-Kit von Macherey & Nagel, Düren nach Anleitung des Herstellers. Nachdem das DNA-Pellet unter der Sterilbank getrocknet war, wurde es in 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

## 2.2.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

### 2.2.2.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme wurden in LB-Medium kultiviert, nach der Durchführung einer Transformation mit dem jeweiligen Plasmid wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Um Einzelklone zu bekommen, wurden die Bakterien auf einer Agar-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen und am nächsten Tag vereinzelt. Die Bildung von Kondenswasser konnte verhindert werden, indem die Agar-Platten vor Benutzung im Brutschrank getrocknet wurden. Nach dem Ausstreichen wurden die Platten mit dem Deckel nach unten bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

### 2.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Einbringung von DNA in die Bakterienzellen wurden zunächst 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Dann wurden 10 µl des Ligationsansatzes (siehe Kapitel 2.2.1.7) zugegeben und das Ganze vorsichtig gemischt. Nach weiteren 20 min auf dem Eis wurde der Ansatz für 90 s in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt, um einen Hitzeschock durchzuführen. Zur Abkühlung wurde 3 min auf Eis inkubiert, bevor 800 µl LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese bei 37°C für eine Stunde auf dem Bakterien-schüttler inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand soweit abgenommen, dass sich noch ungefähr 200 µl im Gefäß befanden. Davon wurden jeweils 100 µl auf eine Agar-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Um Einzelklone zu isolieren, wurden am nächsten Morgen zwölf Klone mit Hilfe einer Impföse gepickt, auf neue Agar-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen und wieder über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am darauffolgenden Morgen wurde aus den Klonen die Plasmid-DNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.8.1) und durch Restriktionsanalyse (siehe Kapitel 2.2.1.1) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

### 2.2.2.3 Anlegen von Dauerkulturen

Um Dauerkulturen anzulegen, wurden die Bakterien eines Einzelklones von einer Platte abgenommen und in 1,5 ml LB-Medium mit Antibiotikum gemischt und für mehrere Stunden auf einem Bakterienschüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Glycerin vermischt und über Nacht bei -20°C eingefroren. Am nächsten Morgen wurden sie in einen -80°C Gefrierschrank überführt.

### 2.2.2.4 Expression von Proteinen

Zur Expression von Proteinen wurden 20 ml Flüssigmedium, das Ampicillin und Chloramphenicol (jeweils 20 µg/µl) sowie 11 mM Glucose (zur Inhibierung der Expression von Amylase) enthielt, mit Bakterien (HMS174 + pMAL-c2-RAGE-Epi) aus Dauerkulturen angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 15 ml der entsprechenden Kultur zu 200 ml LB-Medium (plus Antibiotika und 11 mM Glucose) in einen Schikanekolben gegeben und solange bei 37°C geschüttelt bis eine optische Dichte (OD) von 0,4-0,6 erreicht war. Dies dauerte im Durchschnitt ein bis zwei Stunden. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl 1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und eine weitere Inkubationszeit von vier Stunden. Danach wurden die Bakterien bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 ml Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.4) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 3x 3 min mit Ultraschall behandelt und dann wurden Zelltrümmer und *Inclusion Bodies* bei 13000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und eine Stunde bei 4°C und 40000 rpm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Im Pellet befand sich danach die Membranfraktion und im Überstand die lösliche Fraktion. Da es für die weitere

Verwendung des Proteins wichtig war zu überprüfen, ob es sich in der löslichen Fraktion befindet, wurden die *Inclusion Bodies* in 2 ml und die Membranfraktion in 3 ml Phosphatpuffer aufgenommen. Jeweils 5 µl der drei Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend zum Nachweis der Proteine mit Coomassie (siehe Kapitel 2.2.4.12) angefärbt.

## 2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

### 2.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen wuchsen in 10 cm Zellkulturschalen heran und wurden in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Die Zellen wurden etwa alle zwei bis drei Tage unter einer Sterilbank auf eine neue Zellkulturschale umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellkulturschale mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung sowie 3 ml PBS darauf gegeben. Damit sich die Zellen leichter von der Platte ablösen ließen, wurde diese nun für ungefähr 5 min in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die gelösten Zellen suspendiert, in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml Kompletmedium überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Kompletmedium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Zelllinie im Verhältnis 1:2 bis 1:10 auf einer 10 cm Zellkulturschale, in der bereits 9 ml Kompletmedium vorgelegt worden waren, ausgesät.

### 2.2.3.2 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Vor Durchführung von Versuchen oder der Transfektion der Zellen wurden die verwendeten 6-Loch-Platten, 6 cm oder 10 cm Zellkulturschalen oder Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet, um ein Ablösen der Zellen zu verhindern. Dazu wurde auf die Zellkulturschalen so viel Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) gegeben, dass der Boden bedeckt war. Nach einer 15-minütigen Einwirkungszeit wurde das Poly-L-Lysin wieder abgenommen und nach zweimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O konnten die Zellkulturschalen bis zum Aussäen der Zellen bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 2.2.3.3 Transfektion mit Lipofectamin

Für eine Transfektion wurden Zellen auf einer 6 cm Kulturschale (beschichtet mit Polylysin) ausgesät, sodass sie am nächsten Tag zu 90-95 % konfluent waren. Etwa 10 µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurden in 500 µl Opti-MEM gelöst und 18 µl Lipofectamin in weiteren 400 µl Opti-MEM. Beides wurde gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Opti-MEM gewaschen und 2 ml Opti-MEM (mit 7 % Nu-Serum und 2 mM Glutamin) sowie das DNA/Lipofectamin-Gemisch darauf gegeben. Nach vierstündiger Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C wurden 4 ml Komplettmedium dazugegeben und die Kulturschale über Nacht im Brutschrank stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale umgesetzt.

### 2.2.3.4 Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie

Zwei Tage nach der Transfektion der Zellen wurden in das Komplettmedium die entsprechenden Antibiotika (pro 10 ml: 30 µl Blasticidin (10 mg/ml); 40 µl G418 (250 mg/ml)) zugesetzt, um die nicht transfizierten Zellen von den Zellen, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, zu trennen. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte etwa über einen Zeitraum von zwei Wochen, um eine stabil transfizierte Zelllinie herzustellen. Danach konnten Versuche mit den Zellen durchgeführt werden.

### 2.2.3.5 Isolierung eines Einzelklons

Um von stabil transfizierten Zellen einen Einzelklon zu erhalten, wurden die Zellen in einer Dichte von einer Zelle pro Vertiefung auf einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Selektionsmedium kultiviert und dann in 48-Loch-Platten überführt. Dies wurde fortgeführt bis zur Kultivierung der Zellen auf 10 cm Schalen. Danach erfolgte die Analyse der Expression mittels SDS-PAGE und Western Blot.

### 2.2.3.6 Kryokonservierung von Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte, indem das Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale in 1,5 ml Komplettmedium mit 10 % DMSO suspendiert und in ein 2 ml-Cryo-Röhrchen überführt wurde. Anschließend wurde dieses in eine mit Eis gefüllte verschließbare

Styroporkiste gestellt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht eingefroren, am nächsten Tag kamen die Zellen für 24 Stunden in einen  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem  $\text{N}_2$ .

### 2.2.3.7 Behandlung von Zellen mit Hormonen, Aktivatoren und Inhibitoren

Zur Durchführung von Versuchen wurden die Zellen einen Tag zuvor auf polylysin-beschichteten 6-Loch-Platten ausgesät. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium ohne Zusätze gewaschen und danach das Sekretionsmedium mit 2 mM Glutamin und den jeweiligen Hormonen, Inhibitoren und Stimulatoren dazugegeben. Meist erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit dem benötigten Inhibitor (siehe Tabelle 2.12) und danach die Zugabe des Hormons (300 nM).

Tabelle 2.12: verwendete Inhibitoren und eingesetzte Konzentrationen

Art des Inhibitors	Name des Inhibitors	Konzentration der Stammlösung	Finale Konzentration
<b>ADAM10</b>	GI254023X	25 mM	25 $\mu\text{M}$ /100 nM
<b>CaMKII</b>	CK59	10 mM	20 $\mu\text{M}$
<b>IP<sub>3</sub>-Rezeptor</b>	2-APB	75 mM	75 $\mu\text{M}$
<b>MEK1-Kinase</b>	PD98059	20 mM	50 $\mu\text{M}$
<b>Metalloproteinasen</b>	GM6001	5 mM	20 $\mu\text{M}$
<b>PI3-Kinase</b>	LY294002	10 mM	50 $\mu\text{M}$
<b>Proteinkinase A</b>	H89	20 mM	5 $\mu\text{M}$
<b>Proteinkinase A</b>	KT5720	2 mM	1 $\mu\text{M}$
<b>Proteinkinase C</b>	Gö6976	2 mM	1 $\mu\text{M}$
<b>Proteinkinase C</b>	Gö6983	2 mM	1 $\mu\text{M}$

Zur Aufnahme der Kinetik der Stimulierung des Proteolyse-Prozesses von RAGE (siehe Kapitel 3.2.2.3) wurden die OTR/RAGE- bzw.  $\text{bV}_2$ /RAGE-Zellen unterschiedlich lange mit dem jeweiligen Hormon (finale Konzentration: 300 nM) inkubiert. Nach folgenden

Zeiten wurden die Zellkulturüberstände geerntet: 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360 min. Um sicherzustellen, dass die Zunahme von sRAGE nicht auf eine vermehrte Biosynthese des Proteins zurückzuführen ist, wurden die Zellen vor Zugabe des Hormons 2,5 Stunden mit Cycloheximid (45 µg/ml) vorinkubiert und auch während des Versuches mit Cycloheximid behandelt.

Zur Stimulierung der Adenylatzyklase (siehe Kapitel 3.2.1.3.1) wurden RAGE exprimierende Zellen zwei oder vier Stunden mit 50 µM Forskolin (Stammlösung: 20 mM in DMSO) oder 500 µM 8-Bromo-cAMP (Stammlösung 100 mM in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit DMSO bzw. H<sub>2</sub>O behandelt.

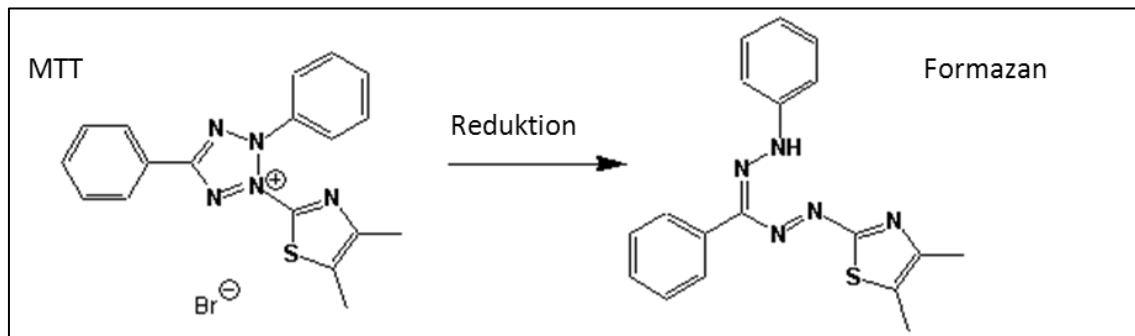
### 2.2.3.8 Knock down von Proteinen

Zum *knock down* von ADAM-10, ADAM-17, MMP-2 und MMP-9 wurden *stealth siRNA Oligonukleotide* von Invitrogen verwendet. Die Transfektion wurde mit Lipofectamin 2000 und nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen; Paisley, UK) durchgeführt. Die Stimulierung mit PMA erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Der erfolgreiche *knock down* von MMP-2 und MMP-9 wurde durch einen Gelatinase-Test nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen 18 Stunden mit PMA (1 µM) oder DMSO in FCS-freiem DMEM/Glutamin behandelt. Vom Überstand wurden 30 µl mit 10 µl Nu-PAGE-Puffer (Invitrogen) gemischt und die Proteine per SDS-PAGE (+ 0,1 % Gelatine) unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 2,5 % Triton X-100 für eine Stunde inkubiert und danach für 16 Stunden im Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Letztendlich erfolgte das Anfärben der Proteine mit Coomassie Blau, dabei entstehen nicht-angefärbte Bereiche durch die Spaltung der Gelatine auf Grund der Gelatinase-Aktivität von MMP-2 und MMP-9.

### 2.2.3.9 Zytotoxizitäts-Test

Zur Messung der Zellviabilität wurde der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Test benutzt. Dieser basiert auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums und unter Verwendung der Pyridin-Nukleotide NADH und NADPH zu blau-violetter, was-

serunlöslichem Formazan (siehe Bild 2.5) und ist somit ein Maß der Glykolyserate der Zelle (Berridge *et al.*, 1996).



**Bild 2.5: Reduktion von MTT zu Formazan – Das Prinzip des MTT-Tests**

Der gelbe Farbstoff MTT wird durch Reduktion zu wasserunlöslichem, blau-violetter Formazan.

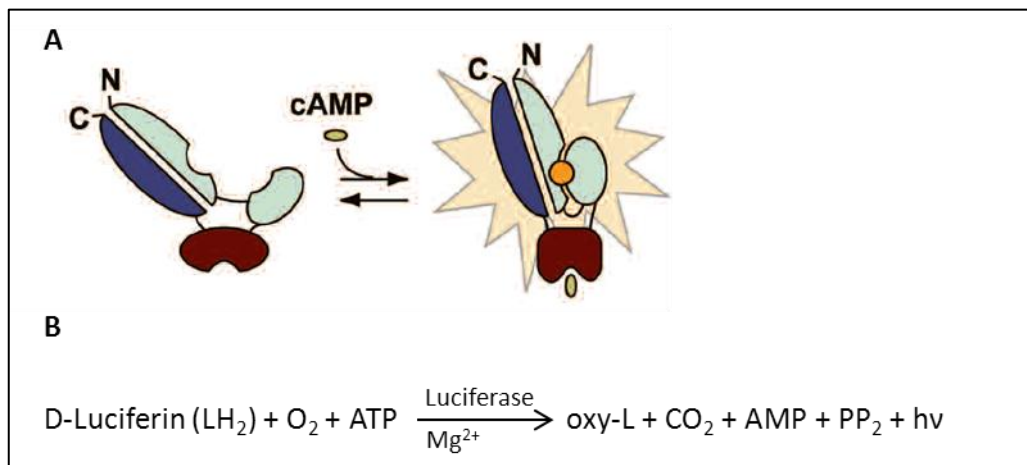
Zur Durchführung des Tests wurden die Zellen auf 48-Loch-Platten mit einer Zelldichte von 50000 Zellen/Vertiefung ausgesät und am nächsten Tag einmal mit FCS-freiem Medium ohne Phenolrot gewaschen. Dann wurden pro Vertiefung 200 µl FCS-freies Medium mit PACAP-27 (300 nM) zugegeben und die jeweilige Zeit (15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 360 min) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, danach wurde das Medium abgesaugt und 200 µl neues Medium + 20 µl MTT (5 mg/ml in PBS) zugegeben und eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 220 µl Solubilisationsreagenz (10 % Triton X-100, 0.1 N HCl in Isopropanol), wurde die Platte über Nacht stehen gelassen und am nächsten Morgen spektrophotometrisch mit dem ELISA-Reader vermessen. Dabei wurde die Absorption bei 565 nm (Absorptionsmaximum Formazan) und bei 690 nm (Referenzwellenlänge für Zelltrümmer/präzipitierte Proteine, welche durch Isopropanol-Zugabe entstanden sein können). Die Viabilität ergab sich aus dem gemessenen Wert bei 565 nm minus dem Wert bei 690 nm.

### 2.2.3.10 GloSensor cAMP-Test

Der GloSensor cAMP-Test von Promega diente zur Überprüfung, ob nach Behandlung von OTR-Zellen mit Oxytocin eine Stimulierung der Adenylatzyklase erfolgt. Dazu mussten die Zellen zuerst mit dem pGloSensor-20F cAMP-Plasmid transfiziert werden, dieses codiert für eine gentechnisch veränderte *Firefly Luciferase* mit einer cAMP-

bindenden Domäne. Die Bindung von cAMP führt zu einer Konformationsänderung und einer gesteigerten Lumineszenz (siehe Bild 2.6 A). Diese entsteht durch die Oxidation von D-Luciferin unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch und führt zur Bildung des Oxyluciferins und der Abgabe eines Photons (siehe Bild 2.6 B).

Zur Durchführung des GloSensor cAMP-Tests mit den OTR/RAGE-Zellen wurden diese auf einer weißen 96-Loch-Platte mit Glasboden ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag sollten die Zellen zu 90 % konfluent sein und wurden zweimal mit Transfektionsmedium (DMEM, 2 mM Glutamin) gewaschen. Danach wurden pro Vertiefung 100 µl DNA/Lipofectamin-Gemisch (100 ng pGloSensor-20F cAMP-Plasmid + 50 µl Transfektionsmedium und 1 µl Lipofectamin + 49 µl Transfektionsmedium vorher mischen und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren) zugegeben und 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C stehen gelassen.



**Bild 2.6: Prinzip des GloSensor cAMP-Tests**

Luciferin wird unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch oxidiert, dabei entsteht Oxyluciferin und ein Photon wird abgegeben.

Daraufhin wurde das Medium abgenommen und durch jeweils 100 µl CCS-FCS-Medium (DMEM, 2 mM Glutamin, 10 % CCS-FCS) ersetzt und die Zellen über Nacht im Brutschrank aufbewahrt. Am dritten Tag wurde das Medium abgenommen und durch 90 µl Equilibrierungsmedium (88 % CO<sub>2</sub>-unabhängiges Medium (besteht aus DMEM, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES), 10 % CCS-FCS und 2 % GloSensor cAMP Reagenz in 10 mM HEPES) pro Vertiefung ersetzt. Die Zellen wurden zwei Stunden darin im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Testsubstanzen in 10 µl CO<sub>2</sub>-unabhängigem

Medium zugegeben (Positivkontrolle: 10  $\mu\text{M}$  Forskolin, Negativkontrollen: 0,1 % DMSO und 0,1 %  $\text{H}_2\text{O}$ , Testsubstanz: 300 nM Oxytocin). Die Lumineszenz (Luminometer FluoStar Optima) wurde vor Zugabe der Substanzen und in sehr kurzen Abständen nach der Zugabe gemessen, nach 30 min nur noch alle 10 min und nach einer Stunde nur alle 30 min.

### 2.2.3.11 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration können mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM bestimmt werden, welcher ein Derivat des nicht-fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA darstellt (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von  $\lambda = 380 \text{ nm}$  zu  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Das Emissionsmaximum beider Formen liegt bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$ . Da bei einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  die Fluoreszenz bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  stark zunimmt und bei  $\lambda = 380 \text{ nm}$  abnimmt, kann ein Fluoreszenzverhältnis (340 nm/380 nm) gebildet werden. Fura-2/AM ist auf Grund seiner fünf Acetoxymethylester lipophil und kann leicht durch die Membran diffundieren. Innerhalb der Zelle werden die Ester durch Esterasen abgespalten, so dass der Farbstoff in der Zelle verbleibt.

Alle Experimente mit Fura-2/AM müssen in einem abgedunkelten Raum ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt werden. Das Medium einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale wurde abgenommen und zu den Zellen 5 ml Fura-2/AM (1,5  $\mu\text{M}$ ) in DMEM-Komplettmedium gegeben. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde das Medium abgenommen und durch 10 ml frisches Komplettmedium ersetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe von vorgewärmtem PBS/0,5 mM EDTA von der Kulturschale gelöst und anschließend für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen des Zellpellets mit Calciumpuffer (10 mM HEPES (pH 7,4), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Glucose) wurden die Zellen in 5 ml Calciumpuffer resuspendiert. In einer 3 ml Küvette wurden 2,5 ml vorgewärmter Calciumpuffer mit 0,5 ml Zellsuspension luftblasenfrei vermengt und die Messung gestartet. Diese wurde in einem computergesteuerten Fluoreszenzspektrometer (Photon Technology Int., Birmingham NJ (USA)) mit thermostatisierbarem Küvettenhalter und Magnetrührereinrichtung durchgeführt. Nach jeweils 100 s wurde der entsprechende Agonist in der

finalen Konzentration von 300 nM zugesetzt und das Signal bis zum Abklingen vermessen.

Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Computerprogramm „Felix“ des Geräteherstellers.

## **2.2.4 Aufbereitung der Proben und Nachweis der Proteine**

### **2.2.4.1 Ernten der Zellkulturüberstände**

Das Ernten der Zellkulturüberstände erfolgte nach der jeweiligen Inkubationszeit, die meistens zwei oder vier Stunden betrug. Dazu wurde das Sekretionsmedium, dessen Volumen immer 1,5 ml bei 6-Loch-Platten entsprach, abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde der Inhalt bei Raumtemperatur für 10 min und bei 2000 rpm zentrifugiert, um mögliche vorhandene Zellen abzutrennen. 1,2 ml des Überstandes wurden daraufhin abgenommen und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

### **2.2.4.2 TCA-Fällung der Proteine des Zellkulturüberstandes**

Zu den geernteten Sekretionsmedien (siehe Kapitel 2.2.4.1) wurden 140 µl TCA (Trichloressigsäure, 100 %ig) gegeben und mehrmals invertiert. Dann wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das im Reaktionsgefäß verbliebene Pellet gewaschen. Dazu wurde auf das Pellet 800 µl eiskaltes Aceton gegeben und nochmals bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Trocknen der Pellets wurden diese jeweils in 30 µl zweifachem Lämmli-Puffer mit 10 % DTT aufgenommen und bei 95°C für 10 min, unter mehrmaligem Mischen, denaturiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

### **2.2.4.3 Ernten von Zellen**

Nach Abnahme der Zellkulturüberstände erfolgte bei einigen Versuchen das Ernten der Zellen. Dazu wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen, danach wurde 200 µl PBS oder Lysispuffer (bei 6-Loch-Platten) oder 1 ml PBS oder Lysispuffer (bei 10 cm Zellkulturschalen) zugegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein

1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur und 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit dem Zellpellet konnte unterschiedlich weitergearbeitet werden (siehe Kapitel 2.2.4.4, 2.2.4.5). Bei manchen Versuchen wurden die Zelllysate nach dem PBS-Waschschritt direkt in Lämmli/DTT aufgenommen.

#### **2.2.4.4 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde das gewonnene Zellpellet (siehe Kapitel 2.2.4.3) in zweifachem Lämmli-Puffer mit 100 mM DTT gelöst. Die Menge des verwendeten Puffers hing von der Größe der erhaltenen Pellets ab, es wurden zwischen 100 µl und 400 µl Puffer eingesetzt. Die Proben wurden daraufhin bei 95°C für 10 min inkubiert und mehrmals gemischt.

#### **2.2.4.5 Membranpräparation**

Für eine Membranpräparation wurden die Zellen auf einer 6-Loch-Platte nach Versuchsdurchführung einmal mit PBS gewaschen und 500 µl hypotonischer Lysispuffer (siehe Tabelle 2.4, pro 10 ml + 1 Tablette Complete Mini von Roche) zugegeben. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, mit 500 µl hypotonischem Lysispuffer nachgespült und die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In diese Suspension wurde der Stab eines Ultraschallgeräts getaucht und es wurden 10 Impulse gegeben. Dann wurden die Zellen 30 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Letztendlich wurden 50 µl zweifach Lämmli/DTT zugegeben und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Proben konnten dann auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden (siehe Kapitel 2.2.4.11).

#### **2.2.4.6 Biotinylierung von Oberflächenproteinen**

Zellen, die auf 6-Loch-Platten ausgesät waren, wurden am nächsten Tag zweimal mit PBS gewaschen und dann 1,5 ml PBS pro Loch vorgelegt. Danach erfolgte die Zugabe von 15 µl 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung in H<sub>2</sub>O. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 30 min mit dem Biotin inkubiert, daraufhin wurde die Lösung abgenommen und 2 ml TBS (pH 7,4) für 2 min auf die Zellen gegeben um überschüssiges Biotin mit

Aminogruppen des Tris-Puffers abreagieren zu lassen. Nach Zugabe von 1,5 ml Sekretionsmedium (mit DMSO oder 1  $\mu$ M PMA sowie 2 mM Glutamin und 10  $\mu$ g/ml BSA) wurden die Zellen bis zu vier Stunden inkubiert. Danach wurde das Sekretionsmedium abgenommen, bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend 1,2 ml entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden mit 500  $\mu$ l 5 % SDS-Lösung geerntet und ebenfalls eingefroren. Nach dem Auftauen wurden am nächsten Tag 12  $\mu$ l einer 10 % SDS-Lösung zu den Überständen gegeben, von den Lysaten wurden 70  $\mu$ l entnommen und mit 3430  $\mu$ l PBS gemischt, um die SDS-Konzentration auf 0,1 % abzusenken. Dann erfolgte die Zugabe von 40  $\mu$ l NeutrAvidin Biotin-bindender Agarose zu den Überständen und Lysaten. Die Proben wurden 1,5 Stunden bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert, danach wurden die Agarosekügelchen bei 5200 rpm und Raumtemperatur für 7 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Agarosekügelchen zweimal mit 0,8 ml PBS/0,1 % SDS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Agarose in 40  $\mu$ l zweifachem Lämmli mit 100 mM DTT aufgenommen und bei 95°C für 10 min erhitzt.

#### **2.2.4.7 Solubilisierung von RAGE und RAGE-Mutanten**

Um den überexprimierten und mit einem Hexahistidin-Epitop markierten Zellmembranrezeptor RAGE bzw. RAGE-Mutanten aus der Membran zu lösen, wurden Zellen, die auf einer 10 cm Zellkulturschale zu 90-95 % konfluent waren, mit 5 ml PBS gewaschen und dann in 4 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Danach wurden die Zellen bei 1000 rpm 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 400  $\mu$ l PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurden die Zellen bei -20°C für eine bis zwei Stunden eingefroren. Danach wurden die Zellen in 400  $\mu$ l Solubilisierungspuffer (siehe Tabelle 2.4) suspendiert und für drei Stunden bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Um die Membranen und sonstigen Zellbestandteile abzutrennen, erfolgte ein einstündiger Zentrifugationsschritt bei 34000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge. Der Überstand (Solubilisat) wurde dann über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.4.8).

#### 2.2.4.8 Reinigung von His-markiertem RAGE über Ni-NTA-Säulen

Das, wie in Kapitel 2.2.4.7 beschrieben, gereinigte Solubilisat wurde dann auf eine Ni-NTA-Säule von Qiagen gegeben. Diese war zuvor mit 600 µl Bindungspuffer (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4) bei 1600 rpm 2 min zentrifugiert und damit äquilibriert worden. Das Solubilisat wurde 4 min bei 1600 rpm zentrifugiert und danach erneut auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Dann wurde die Membran zweimal mit 600 µl Bindungspuffer gewaschen (Zentrifugation für 2 min bei 1600 rpm) und mit 100 µl Elutionspuffer (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4) wurde das His-markierte RAGE von der Säule gelöst. Dafür erfolgte ebenfalls ein zweiminütiger Waschschrift bei 1600 rpm und der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Die 100 µl Elution wurden mit 100 µl zweifachem Lämmli/100 mM DTT gemischt und bei 95°C für 10 min erhitzt. Davon wurden 60 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen.

#### 2.2.4.9 Reinigung von Proteinen aus Mauslungen-Präparationen

Es wurden die Lungen männlicher, sechs Monate alter APP[717I] Mäuse verwendet. Die Mäuse waren zuvor für drei Monate (5 Tage pro Woche) intranasal mit jeweils 10 µl PACAP-38 (1 µg/µl in 0,5 % Chitosanglutamat und 0,5 % NaCl, pH 4,0) behandelt worden. Dieselbe Lösung, aber ohne PACAP-38, erhielt eine Gruppe von Kontrolltieren. Die Behandlung der Mäuse sowie die Entnahme der Lungen wurden von Dr. Dorothea Rat durchgeführt.

Zur Trennung der löslichen Proteine und der Membranproteine in den Mauslungenproben wurden die Lungen zuerst unter flüssigem Stickstoff in zwei Hälften geteilt, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safe-Lock) überführt und dann das vierfache Volumen des eingesetzten Organgewichts an eiskaltem Homogenisierungspuffer (1,4 M NaCl/20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 1 Proteinaseinhibitor-Tablette Complete Mini pro 10 ml) dazu gegeben. Daraufhin wurden sie in einer Schwingmühle homogenisiert (30 Hz, 2x 2 min) und die erhaltene Suspension in 1,5 ml Ultrazentrifugen-Reaktionsgefäße überführt und bei 34000 rpm und 4°C für zwei Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und ein Aliquot (20 µl) für eine Proteinbestimmung abgenommen. Ein weiteres Aliquot (50 µl) wurde mit 150 µl

zweifachem Nu-PAGE Puffer mit 10 % DTT versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Pellets wurden wieder in der Schwingmühle (30 Hz, 2x 2 min) mit dem vierfachen Volumen an Homogenisierungspuffer suspendiert und anschließend bei 14000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und verworfen; das erhaltene Pellet wurde im zweifachen Volumen an TBS (mit Proteinaseinhibitor-Tablette Complete Mini, 1 Tablette pro 10 ml) mit Hilfe der Schwingmühle erneut suspendiert. Die so erhaltene Suspension beinhaltete die Membranproteine, von dieser wurden Aliquots (20 µl) entnommen und in 180 µl zweifachem Nu-PAGE Puffer mit 100 mM DTT gelöst und bei 95°C inkubiert. Zur Proteinbestimmung wurde ein 10 µl Aliquot entnommen.

#### **2.2.4.10 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die Proteinkonzentration einer Probe festzustellen, wurde eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Zuvor mussten aber die Proteine der Probe, falls sie bereits in Lämmli-Puffer oder Nu-PAGE-Puffer gelöst waren, mit Hilfe einer Chloroform-Methanol-Fällung isoliert werden.

##### **2.2.4.10.1 Proteinfällung nach Wessel und Flüge (Chloroform-Methanol-Fällung)**

Zu einer 50 µl wässrigen Proteinlösung wurden 400 µl Methanol gegeben und gemischt, dann erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform und weiteres Mischen. Als Nächstes wurden 300 µl H<sub>2</sub>O zugegeben, wieder gemischt und für 2 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend hatten sich zwei flüssige Phasen gebildet. Nach vorsichtiger Abnahme der oberen Phase wurden 400 µl Methanol zur verbliebenen Phase gegeben, gemischt und für weitere 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und danach in 50 µl Ameisensäure (100 %ig) aufgenommen.

##### **2.2.4.10.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford**

Für eine Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford musste zunächst eine Standardreihe erstellt werden. Dazu wurden verschiedene Volumen einer BSA-Lösung (0,5 mg/ml) eingesetzt (siehe Tabelle 2.13) und mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt; es fand

eine Zweifach-Bestimmung statt. Dann wurden zu den Proben der BSA-Verdünnungsreihe 50 µl Ameisensäure (100 %ig) gegeben, gemischt und für mindestens 10 min inkubiert.

Tabelle 2.13: Bradford-Standardreihe

BSA (0,5 mg/ml)	H <sub>2</sub> O	Konzentration
0 µl	50 µl	0 µg/ml
4 µl	46 µl	2 µg/ml
8 µl	42 µl	4 µg/ml
12 µl	38 µl	6 µg/ml
16 µl	34 µl	8 µg/ml
20 µl	30 µl	10 µg/ml

Von den zu vermessenden Proben wurde eine Verdünnung in 50 %iger Ameisensäure hergestellt, so dass deren Konzentrationen in der Eichgerade lagen, die Proben wurden dreifach bestimmt. 100 µl der Proben der Eichreihe bzw. der zu vermessenden Proben wurden mit 1 ml Roti-Quant (1:5 verdünnt mit H<sub>2</sub>O) versetzt, gemischt und für 20 min inkubiert. Anschließend wurden alle Proben bei 595 nm am Doppelstrahlphotometer (Hitachi U-2000) vermessen.

#### 2.2.4.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die in den Zellkulturüberständen, Zelllysaten, Membranfraktionen oder Mauslungen-Proben enthaltenen Proteine wurden mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Die Proben wurden zuvor in zweifachem Lämmli-Puffer mit 100 mM DTT oder einfachem Nu-PAGE-Puffer mit 100 mM DTT gelöst. Das DTT dient zur Reduktion der Disulfidbrücken, das im Probenpuffer enthaltene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine und sorgt dafür, dass diese eine „stäbchenförmige“ Struktur annehmen. Außerdem bindet SDS an die Proteine und überträgt seine hohe negative Ladung auf diese. Zur Auftrennung der Proben wurden meist 5 %ige Sammelgele und 10 %ige Trenngele (siehe Tabelle 2.4) mit 10 oder 15 Probentaschen verwendet. Das Einlaufen der Proben ins Sammelgel erfolgte bei 10 mA; hatten die Proben das Trenngel erreicht,

wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht, bis das Bromphenolblau des Lämmli-Puffers aus dem Gel austrat. Danach wurden die Proteine per Tankblot-Verfahren (siehe Kapitel 2.2.4.14) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen oder mit Coomassie gefärbt (siehe Kapitel 2.2.4.12).

#### **2.2.4.12 Färbung von Proteinen mit Coomassie**

Zur Färbung von Proteinen nach einer SDS-PAGE wurden diese für zwei Stunden in einer Glasschale mit Coomassie-Färbelösung (siehe Tabelle 2.4) auf einem Kipp-Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Entfärbung des Gels mit Coomassie-Entfärbelösung (siehe Tabelle 2.4) für weitere zwei bis drei Stunden. Zur Dokumentation wurde das Gel eingescannt.

#### **2.2.4.13 Silberfärbung**

Nach einer SDS-PAGE wurden sehr geringe Proteinmengen durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel zunächst für 5 min in Fixierlösung gegeben (60 ml Aceton (50 %), 1,5 ml TCA (50 %), 25 µl Formaldehyd (37 %)) und dann 3x 5 s, 1x 5 min und nochmals 3x 5 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Daraufhin erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit 50 % Aceton und eine Behandlung mit Natriumthiosulfatlösung (10 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O in 60 ml H<sub>2</sub>O) für eine Minute. Daraufhin wurde 3x 5 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen und das Gel in Färbelösung (160 mg AgNO<sub>3</sub> und 600 µl Formaldehyd (37 %) in 60 ml H<sub>2</sub>O) 8 min inkubiert. Dann wurde kurz gewaschen und Entwicklungslösung (1,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25 µl Formaldehyd (37 %) und 2,5 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O) für 10-20 s zugegeben. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Gel mit 1 %iger Essigsäure für 30 s inkubiert und dann mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

#### **2.2.4.14 Western Blot**

Nach Auftrennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel mit einer Nitrocellulose-Membran in einen Puffertank (Eigenbau) gesetzt und die Apparatur mit Tankblot-Puffer gefüllt (siehe Tabelle 2.4). Dann wurde für 2 Stunden ein elektrisches Feld (100 V, ca. 250 mA) angelegt, um die Protei-

ne zu übertragen. Die Apparatur wurde währenddessen in ein Eiswasserbad gestellt, um eine Überhitzung zu vermeiden.

#### **2.2.4.15 Inkubation des Western Blots mit Erst- und Zweit-Antikörper**

Nachdem die Membran eine Stunde in I-Block-Lösung oder BSA-Lösung (siehe Tabelle 2.4) auf einem Kipp-Schüttler gelegen hatte, um noch freie Proteinbindungsbereiche der Membran abzusättigen, wurde der Erst-Antikörper (siehe Tabelle 2.8) zugegeben. Die Membran wurde für eine weitere halbe Stunde auf dem Schüttler belassen und dann über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit der Erst-Antikörper-Lösung für wieder etwa eine halbe Stunde auf den Schüttler gestellt, daraufhin wurde die Lösung abgenommen und die Membran fünfmal (zweimal kurz, zweimal 5 min, einmal 10 min) mit PBS oder TBS + 0,05 % Tween gewaschen. Danach wurde der Zweit-Antikörper, ebenfalls in PBS oder TBS + 0,05 % Tween für eine Stunde zugegeben. Dann erfolgten weitere Waschschriffe (zweimal kurz, zweimal 5 min, einmal 10 min) mit PBS oder TBS + 0,05 % Tween und letztendlich die Detektion des nachzuweisenden Proteins (siehe Kapitel 2.2.7.2).

#### **2.2.4.16 Entwicklung des Western Blots**

Zum Nachweis der interessierenden Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran 5 min mit dem ECL-Reagenz von Pierce (Rockford, USA) inkubiert. An dem Zweit-Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt (horseradish peroxidase=HRP), diese katalysiert die Oxidation von Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (beides ist im ECL-Reagenz enthalten), wodurch die nachzuweisenden Proteine im Western Blot sichtbar gemacht werden. Die Detektion erfolgte mit dem VersaDoc Imaging System Model 3000 von BioRad (München).

#### **2.2.4.17 Nachweis von Fluoreszenz nach SDS-PAGE**

Zum Nachweis der Fluoreszenz des mit Farbstoff markierten Antikörpers wurde die Kamera Stella 8300 (Raytest, Straubenhardt) verwendet. Die Entwicklung des Gels erfolgte unter Verwendung des YFP-Filters.

#### **2.2.4.18 Entfernung der Antikörper von der Membran**

Zur nochmaligen Entwicklung eines Blots, zum Beispiel zum Nachweis von Aktin, wurde die Membran mit einer sogenannten Stripping-Lösung (siehe Tabelle 2.4) behandelt. Zuvor wurde die Membran mehrmals mit PBS + 0,05 % Tween gewaschen und dann 20 min mit der Stripping-Lösung auf einem Schüttler inkubiert, um die Antikörper von der Membran zu lösen. Daraufhin wurde der Blot fünfmal (zweimal kurz, zweimal 5 min, einmal 10 min) mit PBS + 0,05 % Tween gewaschen und eine Stunde in eine I-Block-Lösung gelegt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.15 beschrieben.

### **2.2.5 Reinigung eines Antikörpers und Kopplung mit farbstoffmarkiertem, Seitenketten-Maleinimid-funktionalisiertem Polymer**

Zur Reinigung des anti-RAGE Antikörpers wurden zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte angewandt:

#### **2.2.5.1 Ammoniumsulfat-Fällung**

Die Reinigung mit Hilfe von Ammoniumsulfat erfolgte, indem 5 ml Antikörper-Serum mit 5 ml PBS gemischt wurden und innerhalb von 15 min 10 ml eiskalte 100 %ige  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung zugegeben wurde. Nach einer Stunde Rühren in einem Eisbad wurden die ausgefällten Proteine bei 4°C und 13200 rpm für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und über Microcon-Röhrchen (YM-100, Millipore, nach Anleitung des Herstellers) das Ammoniumsulfat entfernt. Der Antikörper wurde letztendlich in 600 µl PBS + 0,1 %  $\text{NaN}_3$  gelöst.

#### **2.2.5.2 Reinigung über Maltose-bindendes Protein**

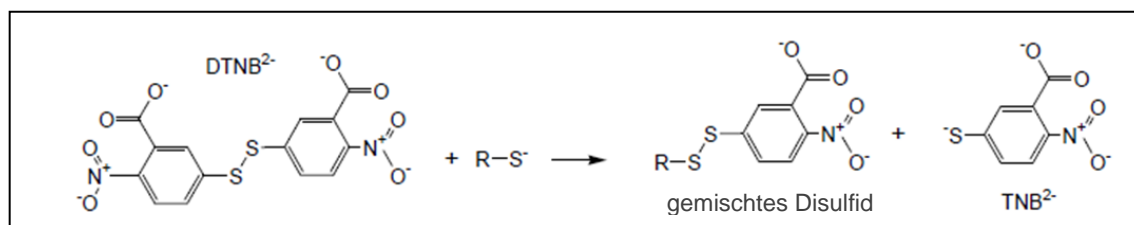
Das Maltose-bindende Protein mit Epitop für den RAGE Antikörper (MBP-RAGE-Epi) wurde, wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben, exprimiert und ein Großteil konnte in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.5.1). Daraufhin wurde die lösliche Fraktion mit dem zu reinigenden Antikörper, der zuvor durch Ammoniumsulfat-Fällung (siehe Kapitel 2.2.5.1) vorgereinigt worden war, über Nacht in einem Überkopfschüttler im Kühlschrank inkubiert. Zur weiteren Reinigung wurde Amylose-Matrix

in einer Säule von Biorad mit Phosphatpuffer (fünffaches Säulenvolumen) äquilibriert und die Lösung mit MBP-RAGE-Epi und Antikörper darauf gegeben. Nach einer fünfminütigen Einwirkungszeit wurde die Säule mit Phosphatpuffer (vierfaches Säulenvolumen) gewaschen und mit Phosphatpuffer pH 2,0 eluiert. Das Eluat wurde in Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 9,0) aufgenommen.

Die Amylose-Matrix konnte mehrmals verwendet werden, zur Regeneration der Matrix wurde diese mit Wasser (dreifaches Säulenvolumen), 0,1 % SDS (dreifaches Säulenvolumen), nochmal mit Wasser (einfaches Säulenvolumen) und Phosphatpuffer (dreifaches Säulenvolumen) gereinigt und in 20 % Ethanol im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.2.5.3 Ellman-Test

Zur Bestimmung der Anzahl der freien Thiolgruppen des Antikörpers wurde der Ellman-Test durchgeführt. Dabei reagiert DTNB (5,5'-Dithiobis (2, 2'-nitrobenzoesäure)) mit freien Thiolgruppen zu einem gemischten Disulfid und TNB (2-Nitro-5-thiobenzoessäure) (siehe Bild 2.7). Das entstehende TNB besitzt einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten ( $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 412 nm) im sichtbaren Bereich und die Anzahl der SH-Gruppen kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden.



**Bild 2.7: Das Prinzip des Ellman-Tests**

DTNB reagiert mit freien SH-Gruppen zu einem gemischten Disulfid und TNB.

Zur Durchführung des Tests wurden für jede zu bestimmende Probe 50  $\mu\text{l}$  Ellmans Reagenz-Lösung (4 mg DTNB pro 1 ml Reaktionspuffer (0,1 M Natriumphosphat, pH 8,0 mit 1 mM EDTA)) und 2,5 ml Reaktionspuffer vorgelegt. Dann wurden 250  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe hinzugegeben, die Proben gemischt und 15 min inkubiert. Für den Nullwert wurden 50  $\mu\text{l}$  Ellmans Reagenz-Lösung mit 2,75 ml Reaktionspuffer gemischt und ebenfalls 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge der unbekannt Proben musste so gewählt werden, dass die Konzentration der SH-Gruppen weni-

ger als 1 mM entsprach. Nach der Inkubationszeit wurde die Absorption der Proben an einem Photometer bei der Wellenlänge von 412 nm gemessen. Die Anzahl der Thiolgruppen wurde mit folgenden Formeln berechnet:

$$c = \frac{A}{bE}$$

$c$  = Konzentration in mol/l  
 $A$  = gemessene Absorption  
 $b$  = Dicke Küvette (1 cm)  
 $E$  = Extinktionskoeffizient (14,150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

Da das Gesamtvolumen der Probe 2,80 ml beträgt, entspricht die Anzahl der Thiolgruppen in der gesamten Probe:

$$\frac{2,80 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times c = \text{Anzahl Thiolgruppen in ges. Probe}$$

Die Konzentration an Thiolgruppen in der ursprünglichen Probe beträgt dann:

$$\frac{\text{Anzahl Thiolgruppen in ges. Probe}}{0,25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ml} = \text{Konzentration Thiolgruppen in Probe}$$

#### 2.2.5.4 Kopplung eines Antikörpers mit farbstoffmarkiertem, Seitenketten-Maleinimid-funktionalisiertem Polymer

150 µg des entsprechenden Antikörpers wurde in 125 µl PBS mit 1 mM EDTA (pH 7,7) gelöst und mit 5 µg 2-Iminothiolan (2-IT) versetzt (35 äq. 2-IT bezogen auf Antikörper) und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 24 Stunden bei 4°C gegen PBS mit 1 mM EDTA dialysiert. Die resultierende Lösung wurde mit 7,5 µg Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP, 25 äq. bezogen auf den Antikörper) versetzt, um eine Oxidation der SH-Gruppen zu verhindern, und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde wieder 24 Stunden bei 4°C gegen PBS mit 1 mM EDTA dialysiert. Daraufhin wurde der Ellmans-Test durchgeführt um sicherzustellen, dass SH-Gruppen gebildet worden waren. Danach wurden 1 mg des mit Tetramethylrhodamin-markierten, Maleinimid-funktionalisierten Polymers (synthetisiert von Kristof Tappertzhofen), das auf dem Copolymer Poly-N-2-Hydroxy-propylmethacrylamid-co-

Poly-N-4-(Maleinimidomethyl)cyclohexan-carbonsäureaminoethoxyethoxyethylmethacrylamid basiert (Abkürzung: p(HPMA)-co-p(Maleinimido~methacrylat)), in 10 µl DMSO aufgenommen und zu dem modifizierten Antikörper gegeben (30 äq. Polymerketten bezogen auf den Antikörper) und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Polymer wurde mit einem Amicon-Filter (Ausschlussgrenze 100 kDa) abgetrennt. Die Kopplung wurde in Kooperation mit Kristof Tappertzhofen (AK Zentel) durchgeführt.

## 2.2.6 Mikroskopie

### 2.2.6.1 Mikroskopie lebender Zellen

Zum Mikroskopieren von lebenden Zellen wurden diese auf polylysin-beschichtete 18 mm Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag einmal mit PBS gewaschen, um das Medium und den enthaltenen Farbstoff Phenolrot, der bei der Mikroskopie stört, zu entfernen. Das Deckgläschen wurde in eine spezielle Mikroskopiekammer überführt und mit PBS bedeckt. Die Kammer wurde auf dem Mikroskoptisch in einen Adapter eingesetzt und die Zellen konnten am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100, Metascan) betrachtet und mit einer MicroMax CCD-Kamera fotografiert werden. Die Steuerung des Mikroskops und die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software MetaView Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA (USA)).

### 2.2.6.2 Mikroskopie fixierter Zellen

Die Zellen wurden einen Tag vorher auf polylysin-beschichteten 18 mm Deckgläschen ausgesät und dann nach Absaugen des Mediums zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml (bei 3 cm Zellkulturschalen) 3,7 %iges Paraformaldehyd in PBS darauf gegeben und 10 min inkubiert, dann abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. In eine Petrischale wurde ein Stück nasses Filterpapier gelegt und darauf Parafilm. Auf diesen wurden 40 µl des Antikörpers (AK5328 oder AK3259: 1:500 in PBS mit 5 % FCS) gegeben und das Deckglas mit den Zellen darauf gelegt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen auf dem Deckglas zweimal mit PBS gewa-

schen und dann mit dem Zweitantikörper an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war (siehe Tabelle 2.9), genauso verfahren. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit wurde wieder zweimal mit PBS gewaschen und das Deckglas mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen Mowiol (15  $\mu$ l), der sich auf einem Objektträger befand, gegeben. Nach dem Trocknen über Nacht, konnten die Präparate am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100, Metascan) betrachtet und mit einer MicroMax CCD-Kamera fotografiert werden. Die Steuerung des Mikroskops und die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software MetaView Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA (USA)).

## **2.2.7 Bioinformatik**

### **2.2.7.1 Ablichtung der Agarosegele**

Die Ablichtung Ethidiumbromid-haltiger Agarosegele fand unter UV-Licht mit Hilfe einer CCD-Kamera von Raytest (Straubenhardt) statt. Die Bearbeitung des Bildes wurde mit dem Programm DianaV1.6 ebenfalls von Raytest (Straubenhardt) durchgeführt.

### **2.2.7.2 Entwicklung der Western Blots und Quantifizierung**

Die Signale der Western Blots, die mit Hilfe des ECL-Systems entwickelt wurden, konnten mit dem Programm „QuantityOne“ und dem VersaDoc Imaging System Model 3000 von Biorad (München) sichtbar gemacht werden.

Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm „Aida 4.25“ von Raytest (Straubenhardt).

### **2.2.7.3 Auswertung der Daten**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software (San Diego, USA) sowie dem Programm Microsoft Office Excel 2007 von Microsoft (Redmond, USA). Zur Berechnung der Signifikanz wurde bei zwei Wertereihen der Student'sche T-Test für unabhängige Stichproben verwendet und beim Vergleich mehrerer Wertereihen der One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test.

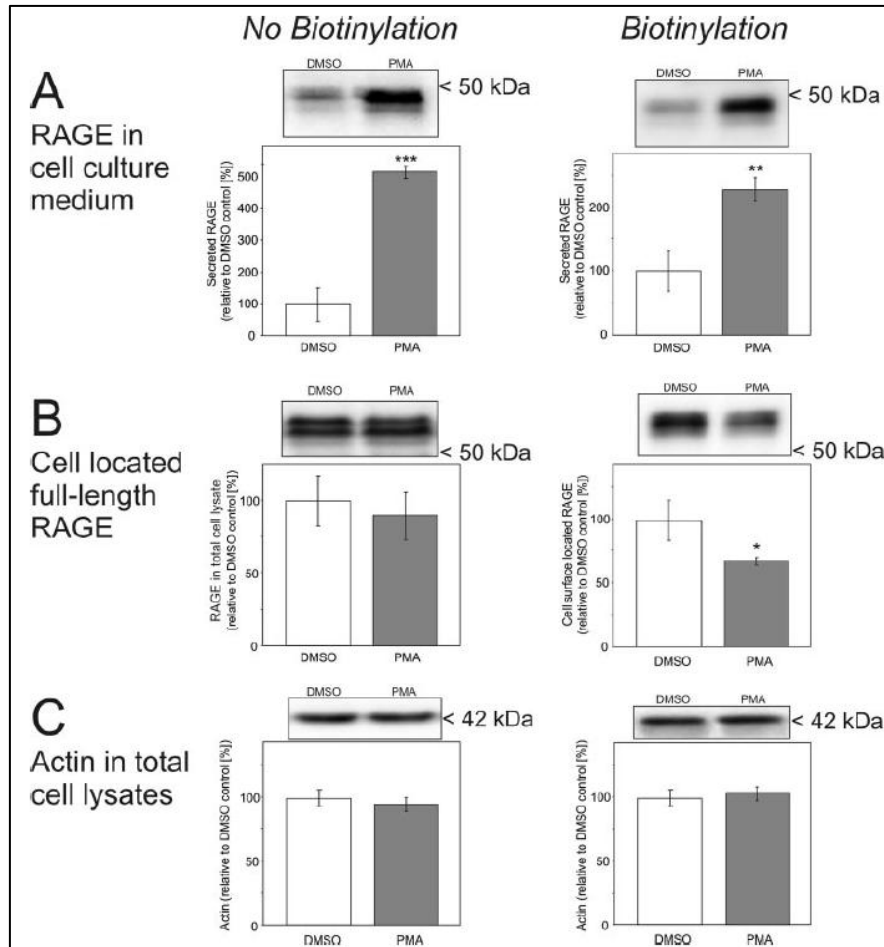


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung des Receptor for Advanced Glycation Endproducts

#### 3.1.1 Die proteolytische Spaltung von RAGE erfolgt an der Zelloberfläche

In der Arbeitsgruppe von Dr. habil. Postina konnte bereits vor Beginn meiner Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Proteolyse von RAGE mit dem Proteinkinase C-Aktivatoren PMA stimuliert werden kann. Auf Grund dieser Ergebnisse wäre eine Abnahme der *full-length* RAGE Menge in den Zellysaten zu erwarten gewesen, dies konnte aber nicht nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, ob die Konzentration von *full-length* RAGE an der Zelloberfläche abnimmt, wurden alle Oberflächenproteine der RAGE-überexprimierenden Zellen vor Versuchsbeginn mit Biotin markiert. Nach zweistündiger Inkubation mit PMA (1  $\mu$ M) wurden die biotinylierten Proteine mit Hilfe von Biotin-bindender Agarose isoliert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde der Versuch auch an Zellen ohne vorherige Biotinylierung durchgeführt. In Bild 3.1 sind die Ergebnisse zu sehen. Im Überstand ist nach Stimulierung mit PMA eine große Menge von sRAGE zu erkennen, diese ist bei Zellen ohne Biotinbehandlung fünfmal größer als die Menge bei der entsprechenden DMSO-Kontrolle. Sind die Oberflächenproteine dagegen biotinyliert gewesen, ist der Unterschied nur etwa 2,5-mal so groß. In den Lysaten ist dahingegen nur bei den biotinylierten Proben ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Abnahme von *full-length* RAGE nach Behandlung mit PMA entsprach ungefähr 33 %. Als Ladekontrollen wurde Aktin in den Lysaten detektiert.



**Bild 3.1: Untersuchungen zur Stimulierung der RAGE-Proteolyse durch PMA**

Links: RAGE-exprimierende Zellen wurden zwei Stunden mit PMA bzw. als Kontrolle mit DMSO behandelt. Rechts: Bei RAGE-exprimierenden Zellen wurden die Proteine an der Zelloberfläche mit Biotin markiert und danach erfolgte die Stimulierung mit PMA (1  $\mu$ M) bzw. DMSO für zwei Stunden. Nach Ernten der Überstände und der Lysate wurden diese mit NeutrAvidin Biotin-bindender Agarose behandelt und die Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von *full-length* RAGE bzw. sRAGE erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 5328, Aktin wurde mit dem polyklonalen Antikörper A2066 nachgewiesen (aus Zhang *et al.*, 2008). Die Auswertung der Daten wurde durchgeführt, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 4; ns = P > 0,05; \* = P > 0,01; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001).

### 3.1.2 Nachweis der RAGE-spaltenden Proteasen

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die PMA-induzierte Stimulierung der RAGE-Proteolyse mit dem Breitspektrum-Matrixmetalloproteinase-Inhibitor GM6001 unterbunden werden kann. Um die RAGE-spaltende Protease näher zu charakterisieren, wurde ein *knock down* der Gene für die Proteasen ADAM-10,



ADAM-10 und ADAM-17 wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen und in Bild 3.2 B wird gezeigt, dass beide Proteasen bei dem durchgeführten *knock down* nur noch schwach exprimiert wurden. Der Aktin-Nachweis erfolgte, um zu zeigen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren.

### 3.1.3 Auswirkungen von Mutationen nahe der Transmembranregion von RAGE auf die Proteolyse

Die näheren Untersuchungen einer Vielzahl von *Shedding*-Substraten ergaben keine übereinstimmenden Sequenzen im Bereich der Spaltstelle. Vielmehr weisen die Sequenzen der Substrate darauf hin, dass der Abstand der Schnittstelle von der Plasmamembran sowie deren Sekundärstruktur eine wichtige Rolle beim *Ectodomain Shedding* spielen (Hayashida *et al.*, 2010). Um zu überprüfen, ob diese Merkmale auch die Proteolyse von RAGE beeinflussen, wurden verschiedene Mutationen in der Nähe der RAGE-Spaltstelle eingeführt. Ein Überblick der verschiedenen Mutanten ist in Bild 3.3 dargestellt. Bei Mutante 1 wurden neun Aminosäuren, die sich C-terminal von der Spaltstelle befinden, gegen die entsprechende Sequenz von esRAGE ausgetauscht. Diese Änderungen wurden eingeführt, weil esRAGE das identische Motiv der Spaltstelle von *full-length* RAGE besitzt, aber dort keine Spaltung erfolgt.

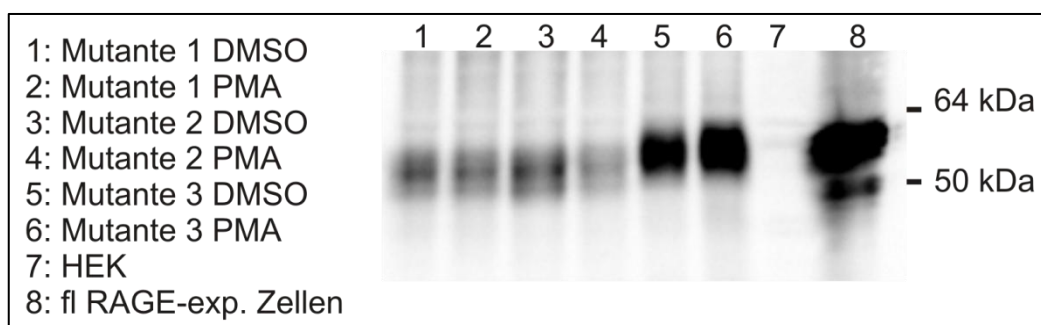
Sequenz:	
<i>full-length</i> RAGE:	....VSISIIEPGEEGPTAGSVGGSGGLGT <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LALALGILGGLGTAALLI.....</span>
esRAGE:	....VSISIIEPGEEGPTAGEGFDKVREAEDSPQHM-COOH
Mutante 1:	....VSISIIEPGEEGPTAGEGFDKVREA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LALALGILGGLGTAALLI.....</span>
Mutante 2:	....VSISIIQIAQQAITAAQAFDKVREA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LALALGILGGLGTAALLI.....</span>
Mutante 3:	....VSISIIEPGEEGPTAGSVGGSGGLGT <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LALALAILAALATAALLI.....</span>

**Bild 3.3: Veränderungen in den Sequenzen der drei RAGE-Mutanten im Vergleich zu fl RAGE und esRAGE**

Blau: Sequenzbereich der Spaltstelle, Rot: Sequenz von esRAGE, Lila: zusätzliche Aminosäuren, Grün: Dimerisierungsmotiv, Orange: Veränderungen im möglichen Dimerisierungsmotiv, Kästchen: Transmembranregion.

Bei Mutante 2 wurden die gleichen neun Aminosäuren wie bei Mutante 1 ausgetauscht. Zusätzlich wurden alle in der Spaltstelle und nach der Spaltstelle befindlichen geladenen Aminosäuren (Glutamat) gegen ungeladene (Glutamin) und alle Helixbrecher (Prolin) sowie kleine Aminosäuren (Glycin) gegen große, ungeladene Aminosäuren (Isoleucin, Alanin) ausgewechselt. Dadurch sollte die Anlagerung einer Protease verhindert bzw. erschwert werden. Ein bekanntes Motiv in Transmembranhelices dimerisierender Proteine ist GxxxG (Mingarro *et al.*, 1996; McClain *et al.*, 2003). Dieses kommt auch in der  $\alpha$ -helicalen Transmembrandomäne von RAGE in der Nähe der Spaltstelle vor. Das Motiv könnte eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit membrangebundenen Proteasen (z.B. ADAM-10) oder bei der Dimersierung von RAGE spielen. Die Bildung von Dimeren könnte Voraussetzung für einen *Shedding*-Prozess sein. Daher wurden bei Mutante 3 alle Glycine im Dimerisierungsmotiv gegen Alanine ausgetauscht.

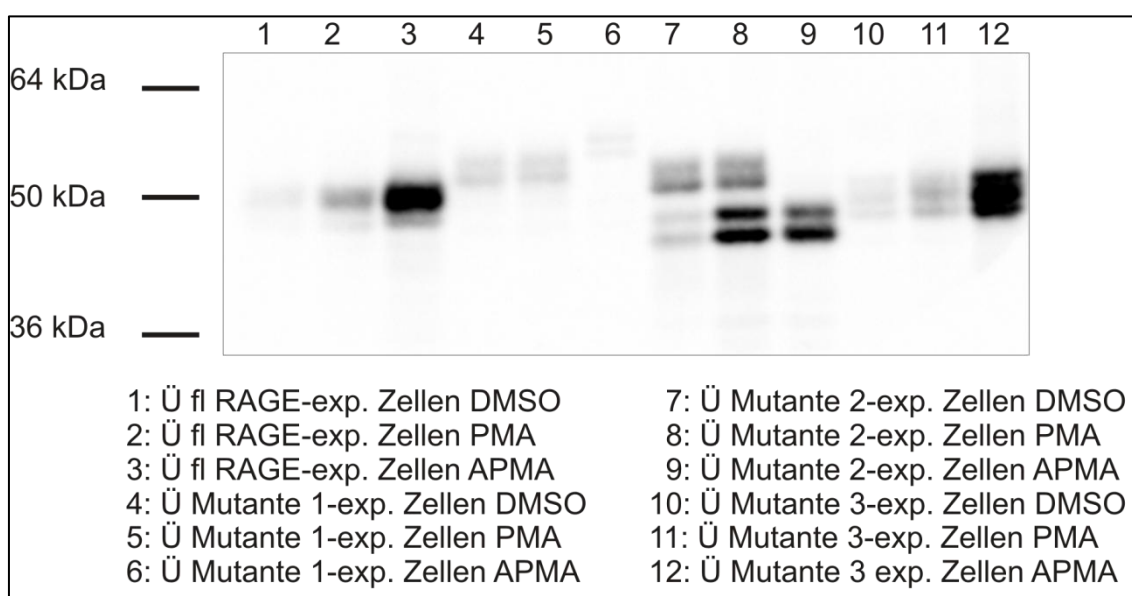
Zum Nachweis der Mutanten nach Behandlung mit DMSO oder PMA (1  $\mu$ M) in HEK-Zellen wurde RAGE mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers in den Zelllysaten nachgewiesen. In Bild 3.4 ist zu erkennen, dass alle RAGE-Varianten exprimiert werden und dass Mutante 1 und 2 ein etwas geringeres Molekulargewicht im Vergleich zu Mutante 3 und *full length* RAGE aufweisen. Außerdem ist nur bei Mutante 2 eine signifikante Veränderung der RAGE-Menge nach Stimulierung mit PMA zu sehen.



**Bild 3.4: Zelllysate der RAGE-Mutanten nach Behandlung mit DMSO und PMA**

Nach vierstündiger Inkubation mit DMSO bzw. PMA (1  $\mu$ M) wurden Lysate der Zellen, die mutierte Formen von RAGE exprimieren, auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrollen dienten ein HEK-Zelllysate und RAGE-exprimierende Zellen. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte der Nachweis von RAGE mit dem Antikörper 5328.

Überdies wurde sekretiertes RAGE in den Zellkulturüberständen nach Behandlung mit DMSO, PMA (1  $\mu$ M) oder APMA (140  $\mu$ M) nachgewiesen. Das organische Quecksilber enthaltende APMA ermöglicht es Matrixmetalloproteinasen, sich selbst zu aktivieren (Stricklin *et al.*, 1983). Als Kontrolle wurden RAGE-überexprimierende Zellen, die keine Mutationen aufweisen, auf die gleiche Weise behandelt (Spur 1-3). Nach zweistündiger Inkubation der RAGE-Mutante 1-überexprimierenden Zellen mit PMA konnte ein Spaltprodukt mit einem höheren Molekulargewicht als sRAGE nachgewiesen werden (Spur 4-5), dessen Bildung nicht stimulierbar war. Die detektierten Doppelbanden sind auf die glykosylierte und unglykosylierte Form von RAGE zurückzuführen. Die Behandlung mit APMA führte zur Bildung eines noch größeren Fragments (Spur 6).



**Bild 3.5: Stimulierung der Proteolyse von drei verschiedenen RAGE-Mutanten mit PMA und APMA**

HEK-Zellen, die mutierte RAGE-Varianten exprimieren, wurden 15 Minuten mit APMA (140  $\mu$ M) oder zwei Stunden mit DMSO bzw. PMA (1  $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle dienen Zellen, die *full-length* RAGE ohne Mutation exprimieren. Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE und der Nachweis von sekretiertem RAGE mit dem Antikörper 5328.

In Überständen der RAGE-Mutante 2-exprimierenden Zellen wurden zwei *Shedding*-Produkte nachgewiesen, wobei das eine in etwa die gleiche Größe wie das Spaltprodukt der ersten Mutante aufwies und das zweite ein Molekulargewicht deutlich unterhalb von 50 kDa zeigte (Spur 7-8). Beide Spaltprodukte entstanden nach DMSO- und PMA-Behandlung, allerdings war nur die Bildung des kleineren stimulierbar. Nach

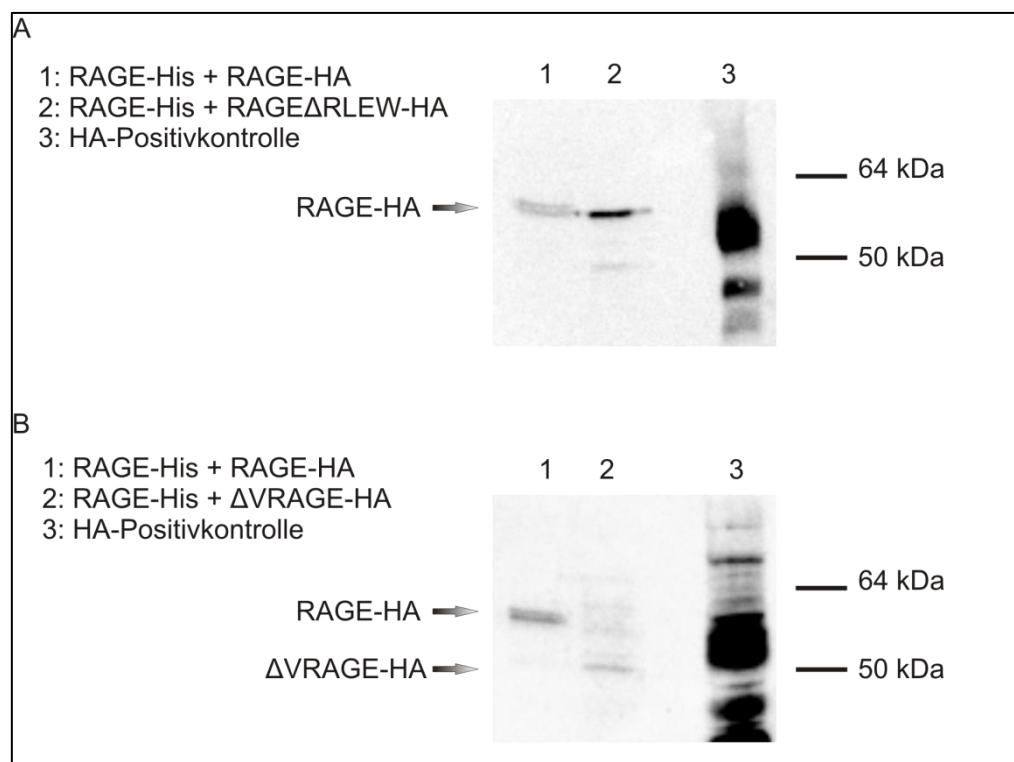
APMA-Behandlung konnte ebenfalls nur das kleinere Produkt nachgewiesen werden (Spur 9).

Die Stimulierung der RAGE-Mutante 3-überexprimierenden Zellen führte zu den gleichen Ergebnissen wie bei den Kontrollen, die keine Mutationen aufwiesen (Spur 10-12). Die gebildeten Produkte hatten die gleiche Größe und waren im gleichen Maße stimulierbar im Vergleich zu HEK-Zellen, die *full-length* RAGE exprimieren.

### 3.1.4 Nähere Charakterisierung der Dimerisierungsregion von RAGE

Zur näheren Bestimmung des Bereiches, in welchem RAGE dimerisiert, wurden in der V-Domäne die vier Aminosäuren RLEW (As: 48-51) gegen ASAA ausgetauscht. Die Aminosäuren RLEW wurden verändert, da diese ein beschriebenes Dimerisierungsmotiv bilden (Kostrewa *et al.*, 2001). Außerdem wurde der C-Terminus bei dieser Mutante mit einem HA-Epitop versehen.

Zur Untersuchung, ob dieses Motiv wichtig für die Dimerisierung ist, wurden HEK-Zellen mit RAGE-His und RAGE $\Delta$ RLEW-HA Expressionsvektoren transfiziert. Außerdem wurde als Positivkontrolle eine Transfektion von HEK-Zellen mit RAGE-His und RAGE-HA ohne Mutationen durchgeführt. Nach Solubilisierung des Rezeptors und Ultrazentrifugation wurde das gewonnene Solubilisat über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Die mit His markierten Proteine binden dabei an das Nickel. Nach mehreren Waschschritten und Elution mit Imidazol wurden die Proteine im Eluat mittels SDS-PAGE getrennt. Nur bei der Bildung von Dimeren oder Oligomeren kann anschließend im Western Blot RAGE mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop nachgewiesen werden. Wie in Bild 3.6 A zu sehen, konnte das Protein bei der erwarteten Größe von 58 kDa nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die V-Domäne überhaupt eine Rolle bei der Dimerisierung spielt, wurden Zellen mit RAGE-His und RAGE ohne V-Domäne mit HA-Epitop am C-Terminus ( $\Delta$ RAGE-HA) untersucht. Allerdings konnte nach Reinigung über eine Ni-NTA-Säule ebenfalls RAGE mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers detektiert werden (siehe Bild 3.6 B). Auch die kleinere Größe unterhalb von 50 kDa entspricht den Erwartungen, da bei dieser Mutante die V-Domäne fehlt.



**Bild 3.6: Nachweis der HA-markierten RAGE-Varianten nach Reinigung über Ni-NTA-Säulen**

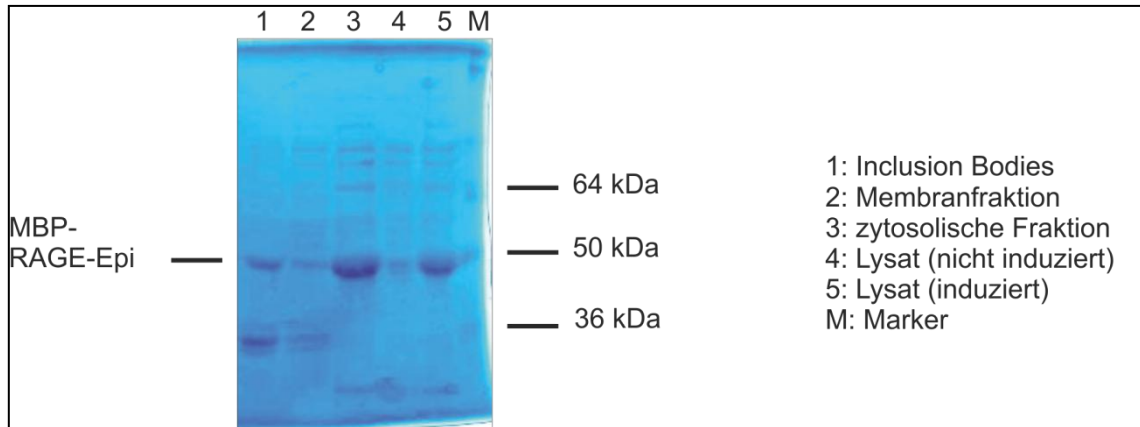
Nach Solubilisierung der Membranproteine in Zellen, die RAGE-His und RAGE-HA oder RAGE-His und RAGE $\Delta$ RLEW-HA bzw. RAGE-His und  $\Delta$ RAGE-HA coexprimieren, wurden diese eine Stunde bei 34000 rpm zentrifugiert. Dann wurde das Solubilisat über eine Ni-NTA-Säule gereinigt und die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop der RAGE-Varianten.

### 3.1.5 Synthese eines fluoreszierenden RAGE-Antikörpers

RAGE transportiert A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn. Daher soll überprüft werden, ob es möglich ist Substanzen gezielt mit Hilfe des Rezeptors in Zellen einzubringen. Dazu wurden Vorbereitungen getroffen, indem ein anti-RAGE Antikörper gereinigt, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und im Western Blot getestet wurde.

#### 3.1.5.1 Expression eines Maltose-bindenden Proteins mit RAGE-Epitop

Zur Reinigung des anti-RAGE Antikörpers wurde zunächst ein Fusionsprotein (MBP-RAGE-Epi) aus einem Maltose-bindenden Protein und dem Epitop, das der Antikörper 3259 erkennt, in *E.coli* HMS exprimiert. Um die Lokalisation des Proteins zu überprüfen, wurde die Bakterienkultur nach Ultraschallaufschluss in drei Fraktionen (*Inclusion Bodies*, Membranfraktion, zytosolische Fraktion) getrennt.



**Bild 3.7: Überprüfung der Expression von MBP-RAGE-Epi**

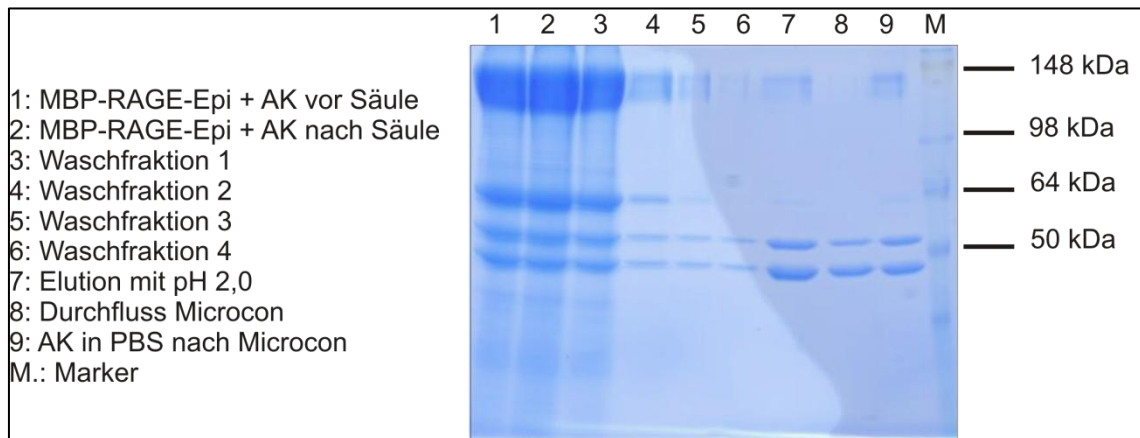
Nach vierstündiger Inkubationszeit der HMS-Zellen mit IPTG wurden diese mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen und anschließend zunächst 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet enthielt die *Inclusion Bodies*, der Überstand wurde abgenommen und für eine Stunde bei 40000 rpm in der UZ zentrifugiert, um die Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion abzutrennen. Anschließend wurden die Proben in Lämmli/DTT auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach Auftrennung der Proteine mit Coomassie angefärbt.

Der Nachweis des Proteins, das eine Größe von 45 kDa hat, erfolgte in einem Coomassie-Gel (siehe Bild 3.7). Der größte Anteil von RAGE-MBP-Epi lag, wie erwartet, in der zytosolischen Fraktion (Spur 3) vor, am wenigsten in der Membranfraktion (Spur 2) und eine geringe Menge in den *Inclusion Bodies*. Zum Nachweis, dass die Induktion erfolgreich war, wurde das Bakterienlysat vor und nach der Zugabe von IPTG aufgetragen. Nach der Behandlung (Spur 5) ist eine deutliche Erhöhung der gebildeten MBP-RAGE-Epi Menge im Vergleich zum unbehandelten Lysat (Spur 4) zu sehen.

### 3.1.5.2 Reinigung eines RAGE-Antikörpers

Die Reinigung des Antikörpers erfolgte über eine Amylose-Säule. Dazu wurde MBP-RAGE-Epi mit dem Antikörper, der bereits durch eine Ammoniumsulfatfällung vorge-reinigt worden war, über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Amylose-Matrix mit dem Antikörper, der an MBP-RAGE-Epi gebunden hatte, beladen und das Maltose-bindende Protein blieb an der Säule haften. Nach einigen Waschschritten (siehe Bild 3.8, Spur 3-6) erfolgte die Elution des Antikörpers (Spur 7). Wie im Coomassie-Gel zu sehen, ist durch die Elution mit dem sauren Puffer (pH 2,0) nicht nur der Antikörper, sondern auch das MBP-RAGE-Epi Fusionsprotein von der Säule gelöst worden. Daher wurde ein weiterer Schritt durchgeführt und die Proteine mit Hilfe ei-

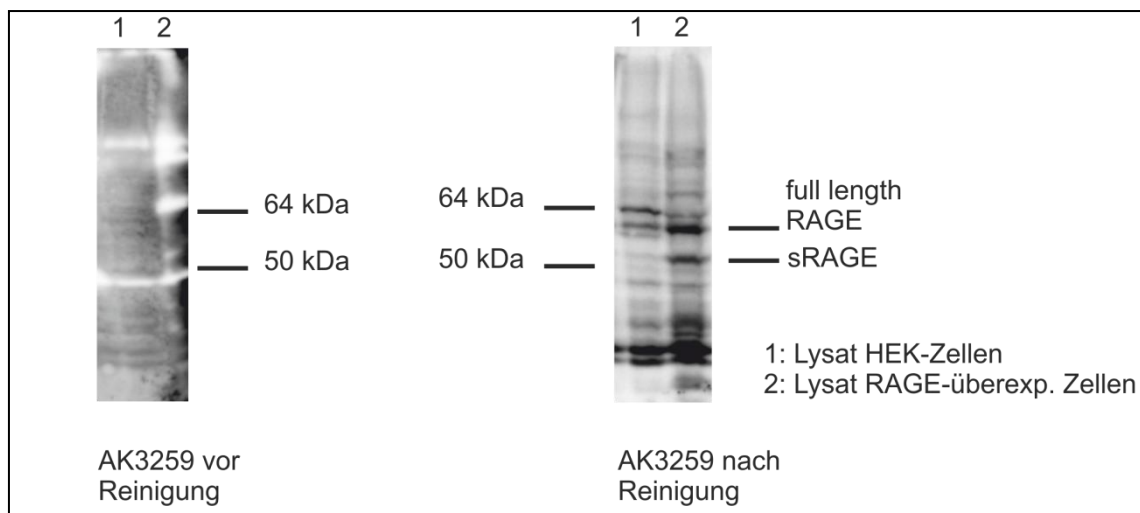
ner Microcon-Filtrationseinheit mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa getrennt (Spur 7-9). Allerdings war die Trennung nicht vollständig möglich.



**Bild 3.8: Überprüfung der Reinigung von AK3259 über eine Amylose-Säule**

Die Proteine der einzelnen Fraktionen der Reinigung des AK3259 über eine Amylose-Säule wurden per SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt und mit Coomassie angefärbt.

Zur Überprüfung, ob die Reinigung des Antikörpers erfolgreich war, wurde dieser vor und nach der Reinigung an einem Western Blot mit Lysaten von RAGE-überexprimierenden HEK-Zellen und HEK-Zellen als Negativkontrolle getestet. In Bild 3.9 ist das Ergebnis zu sehen.

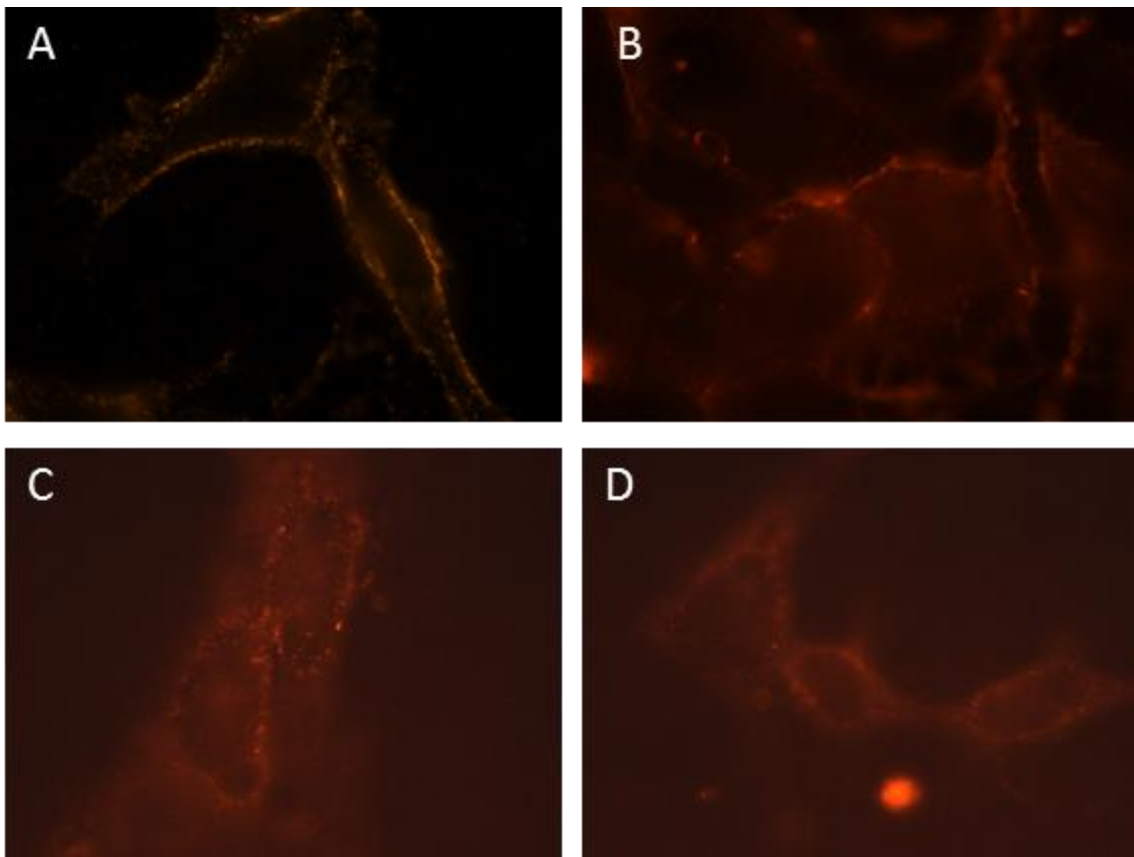


**Bild 3.9: Western Blots mit AK3259 vor und nach Reinigung über eine Amylose-Säule**

Die Proteine der Lysate von RAGE-überexprimierenden Zellen und HEK-Zellen wurden mittels SDS-PAGE getrennt und der Western Blot mit dem AK3259 vor und nach der Reinigung behandelt.

Nach der Reinigung des AK3259 ist *full-length* RAGE sowie sRAGE deutlich zu sehen (rechts, Spur 2). Dahingegen war vor der Reinigung, außer einigen unspezifischen Signalen, bei der entsprechenden Größe nichts zu sehen (links, Spur 2). Als Negativkontrollen wurden HEK-Zellen aufgetragen (links/rechts, Spur 2), allerdings sind auch nach der Reinigung des Antikörpers noch unspezifische Signale zu sehen.

Zum Nachweis, dass der gereinigte Antikörper AK3259 auch weiterhin natives RAGE erkennt, wurden mit RAGE-überexprimierenden Zellen und dem Antikörper vor und nach der Reinigung Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen durchgeführt.



**Bild 3.10: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von RAGE-exprimierenden Zellen vor und nach Reinigung des AK3259**

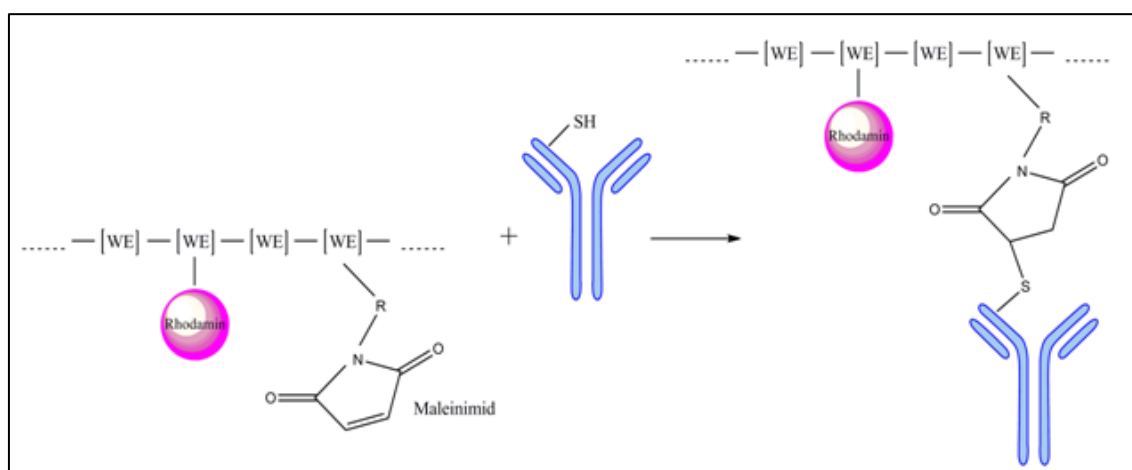
RAGE-überexprimierende Zellen, die auf 18 mm Deckgläschen ausgesät worden waren, wurden 15 Minuten in Paraformaldehyd gelegt und danach eine Stunde mit dem jeweiligen Erstantikörper [A: AK5328 (1:500), B: ungereinigter AK3259 (1:50) und C/D: gereinigter AK3259 (1:10)] behandelt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit Zweitantikörper [A: Cy3 (1:500), B/C/D: Alexa Fluor 568 (1:250)] inkubiert und dann in Mowiol gebettet.

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem kommerziell erhältlichen AK5328 von Chemicon behandelt. In Bild 3.10 A ist eine Aufnahme der Positivkontrolle zu sehen,

wobei der Antikörper sehr spezifisch in der Zellmembran vorhandenes RAGE erkennt. Die Behandlung der Zellen mit dem ungereinigten Antikörper führte dahingegen zu einer teilweisen Färbung der Zellmembran sowie zu unspezifischen Anreicherungen des mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zweitantikörpers (siehe Bild 3.10 B). In Bild 3.10 C und D ist eine Verbesserung der Qualität des Antikörpers zu beobachten. Dieser erkennt besser als vorher natives RAGE an der Zelloberfläche und die unspezifisch angefärbten Bereiche konnten reduziert werden.

### 3.1.5.3 Kopplung des Antikörpers mit Tetramethylrhodamin-markiertem Polymer

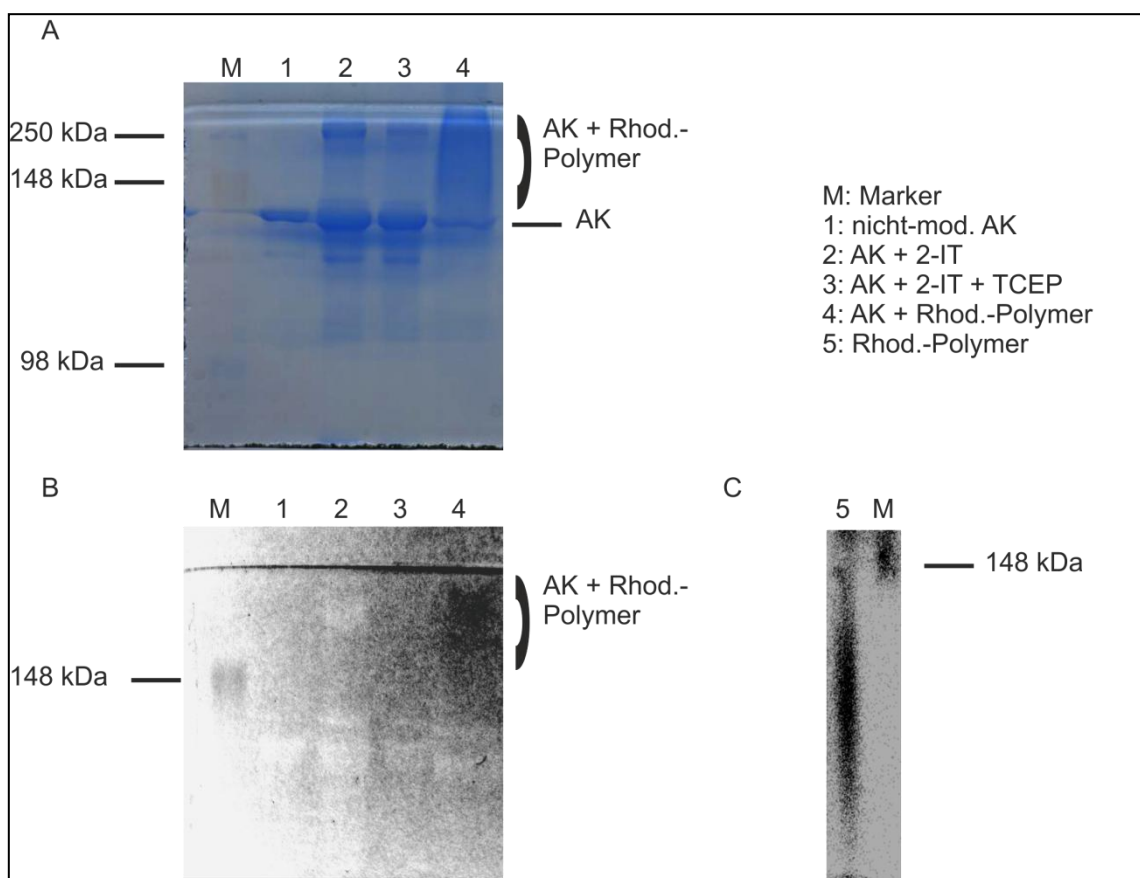
Zur Kopplung des Antikörpers mit Rhodamin-markiertem, Maleinimid-funktionalisiertem Polymer musste dieser zunächst modifiziert werden. Dazu wurde der Antikörper mit 2-Iminothiolan (2-IT, Trauts-Reagenz) behandelt. 2-IT ist ein Thioimidat und reagiert mit primären Aminen, wobei durch Ringöffnung ein Thiol gebildet wird. Die anschließende Inkubation mit dem Reduktionsmittel TCEP erfolgte, um zu verhindern, dass die Antikörper unter Bildung von Disulfidbrücken miteinander reagieren. Nach Modifikation des Antikörpers wurde das mit dem Farbstoff markierte Polymer, das auf p(HPMA)-co-p(Maleinimido~methacrylat) basiert und einen PDI von 1,35 besitzt, für 24 Stunden zugegeben und unter Rühren inkubiert.



**Bild 3.11: Schematische Darstellung der Kopplung des modifizierten Antikörpers mit Rhodamin-markiertem, Maleinimid-funktionalisiertem Polymer**

Nach Behandlung des Antikörpers (blau) mit 2-IT und TCEP wurde dieser 24 Stunden mit dem Rhodamin-markierten, Maleinimid-funktionalisierten Polymer (WE= Wiederholungseinheit, Polymer besteht aus 120) bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert.

Dabei konnten eine oder mehrere Polymerketten an den Antikörper gebunden werden, wobei die Maleinimidgruppen mit den Thiolgruppen unter Bildung eines Thioethers reagieren (siehe Bild 3.11). Danach wurden die Zwischenprodukte der einzelnen Schritte mit Hilfe einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt und der Antikörper mit Coomassie bzw. Silberfärbung nachgewiesen; außerdem wurde die Fluoreszenz im Gel detektiert. Da von dem anti-RAGE Antikörper nur geringe Mengen zur Verfügung standen, wurden die Synthesebedingungen zunächst an einem anderen IgG-Antikörper getestet, der gegen dendritische Zellen gerichtet ist (DEC-205).

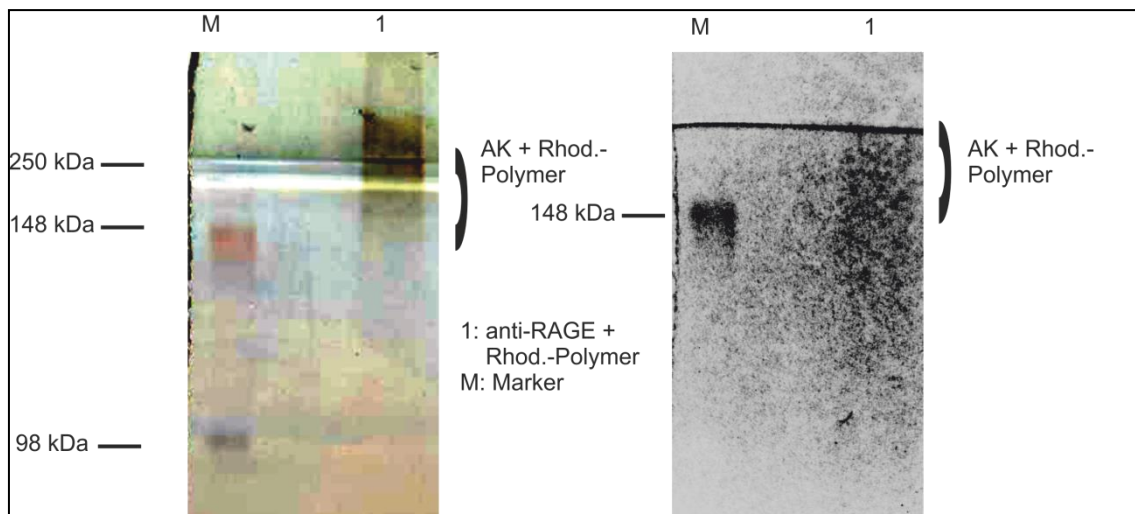


**Bild 3.12: Coomassie-Färbung der einzelnen Zwischenprodukte der Kopplung des Test-Antikörpers mit Polymer und Nachweis der Fluoreszenz im Gel**

**A:** Gleiche Mengen der einzelnen Zwischenprodukte der Kopplung des Tetramethylrhodamin-markierten, Maleinimid-funktionalisierten Polymers mit Antikörper (40 µg) wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt und mit Coomassie gefärbt. **B/C:** Die Fluoreszenz wurde mit einem YFP-Filter sichtbar gemacht.

In Bild 3.12 A sind die einzelnen Zwischenprodukte mit Coomassie angefärbt. Der nicht-modifizierte Antikörper läuft in Spur 1 bei ca. 140 kDa, nach Behandlung mit 2-IT

(Spur 2) ist weiterhin bei derselben Größe der Antikörper zu sehen, außerdem ist aber auch bei ca. 250 kDa Protein nachweisbar. Dies ist vermutlich dimerisierter Antikörper, der durch Disulfidbrückenbildung entstanden ist. Um die Bildung des Nebenprodukts zu verhindern, wurde das Reduktionsmittel TCEP zugesetzt und in Spur 3 ist zu sehen, dass dadurch die Dimerisierung zum Teil unterbunden werden konnte. Nach Kopplung mit dem Rhodamin-Polymer sind in Spur 4 oberhalb des Antikörpers sehr viele verschieden große Proteine zu sehen, sodass es wie „Schmier“ aussieht. Dieser geht bis zum Ende des Trenngels, also über die 250 kDa des Markers hinaus und deutet daraufhin, dass an die einzelnen Antikörper-Moleküle eine unterschiedliche Anzahl an Polymeren, die eine Größe von jeweils ca. 32 kDa besitzen, gebunden hat. Allerdings ist auch noch ungebundener Antikörper im Gel sichtbar, der nicht mit dem Polymer reagiert hat. Die Fluoreszenz des Farbstoffs Rhodamin konnte ebenfalls oberhalb von 148 kDa nachgewiesen werden (siehe Bild 3.12 B, Spur 4). In den Spuren 1-3 ist keine Fluoreszenz zu sehen, da in diesen Proben kein Rhodamin-markiertes Polymer enthalten ist. Die Durchführung einer SDS-PAGE nur mit Rhodamin-Polymer zeigte, dass die höchste Fluoreszenzintensität deutlich unterhalb von 148 kDa liegt (siehe Bild 3.12 C).



**Bild 3.13: Silberfärbung des gekoppelten anti-RAGE Antikörpers und Nachweis der Fluoreszenz im Gel**  
Links: Silberfärbung des anti-RAGE Antikörpers mit Rhodamin-Polymer gekoppelt. Rechts: Nachweis der Fluoreszenz des gekoppelten Antikörpers.

Nachdem die Synthese erfolgreich verlaufen war, wurde diese mit dem gereinigten anti-RAGE Antikörper wiederholt. Da die zur Verfügung stehende Menge sehr gering

war, wurde zum Nachweis der erfolgreichen Kopplung eine Silberfärbung durchgeführt. In Bild 3.13 ist zu sehen, dass auch hier wieder oberhalb von 148 kDa viele unterschiedlich stark gekoppelte Antikörper entstanden sind (Spur 1, links). Der Nachweis der Fluoreszenz im Gel erbrachte ebenfalls ein Signal um die 150 -250 kDa (Spur 1, rechts), was auf eine erfolgreiche Kopplung des Antikörpers hindeutet.

## **3.2 Stimulierung der Proteolyse von RAGE über GPCRs und Erforschung der daran beteiligten Signalwege**

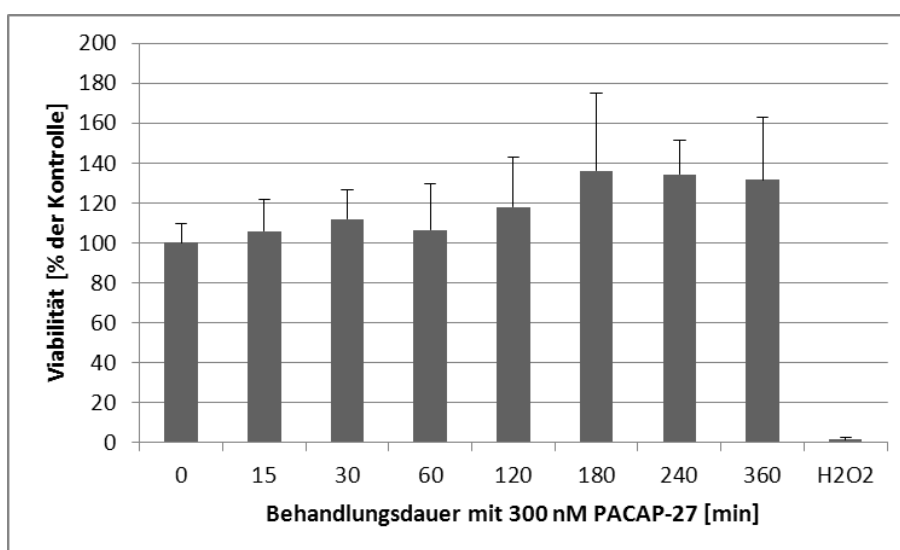
### **3.2.1 Stimulierung der Proteolyse von RAGE über den PAC1-Rezeptor**

Die Stimulierung der Proteolyse von RAGE kann, wie schon in meiner Diplomarbeit mit dem Titel: „Induktion der regulierten Proteolyse des Receptor for Advanced Glycation Endproducts durch ligandeninduzierte Aktivierung des PAC1-Rezeptors“ gezeigt wurde, über den PAC1-Rezeptor erfolgen. In dieser Arbeit wurde bereits der Einfluss unterschiedlicher Kinase-Inhibitoren auf die Stimulierung der RAGE-Proteolyse an PAC1/RAGE-überexprimierenden Zellen untersucht. Dabei konnten Beteiligungen der Proteinkinase C (Inhibierung mit Gö6983 und Gö6976, jeweils 1  $\mu$ M), der PI3-Kinase (Inhibierung mit LY294002, 50  $\mu$ M) und des MAP-Kinase-Weges (Inhibierung mit PD98059, 50  $\mu$ M) nachgewiesen werden. Außerdem wurde herausgefunden, dass Metalloproteinasen (Inhibierung mit GM6001, 20  $\mu$ M) für das *Shedding* verantwortlich sind. Um die Aktivierung der Proteolyse noch genauer zu untersuchen, wurden weitere Inhibitoren eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.1.3) und die bereits in der Diplomarbeit verwendeten nochmals an nicht mit dem Hormon PACAP-27 behandelten Zellen getestet.

#### **3.2.1.1 Überprüfung des Peptids PACAP-27 auf Zytotoxizität**

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Kinetik des *Sheddings* von RAGE aufgenommen. Das heißt nach 15, 30, 60, 120, 180, 240 und 360 Minuten Behandlung von PAC1/RAGE-überexprimierenden Zellen mit PACAP-27 (300 nM) wurde die Menge an sekretiertem RAGE im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Um sicherzustellen, dass die erhöhte Menge an RAGE nicht auf eine vermehrte Proteinbiosynthese zurückzuführen

ist, wurden die Zellen vorher 150 Minuten mit Cycloheximid inkubiert. Das Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese bei Eukaryoten inhibiert (Pestka, 1971), wurde auch während der Inkubation mit PACAP-27 auf den Zellen belassen. Die Auswertung der Western Blots zeigte, dass der Betrag an sekretiertem RAGE nach einer halben Stunde anstieg, nach einer Stunde etwas abfiel und nach drei Stunden Behandlung mit RAGE stark zunahm. Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass der späte Anstieg nach drei Stunden auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist, bei denen RAGE vermehrt einem *Shedding*-Prozess unterliegt. Um dies zu untersuchen, wurde ein MTT-Test durchgeführt, bei dem PAC1- und RAGE-überexprimierende Zellen zwischen 15 und 360 Minuten mit PACAP-27 (300 nM) behandelt und dann ihre Viabilität mit Hilfe des MTT-Reagenzes bestimmt wurde. Zur Kontrolle, ob der MTT-Test funktioniert hat, wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , 56 mM) für eine Stunde behandelt.  $H_2O_2$  ist ein sehr starkes Oxidationsmittel und wirkt apoptotisch auf Zellen.



**Bild 3.14:** Der Einfluss von PACAP-27 auf die Viabilität von PAC1- und RAGE-überexprimierenden Zellen

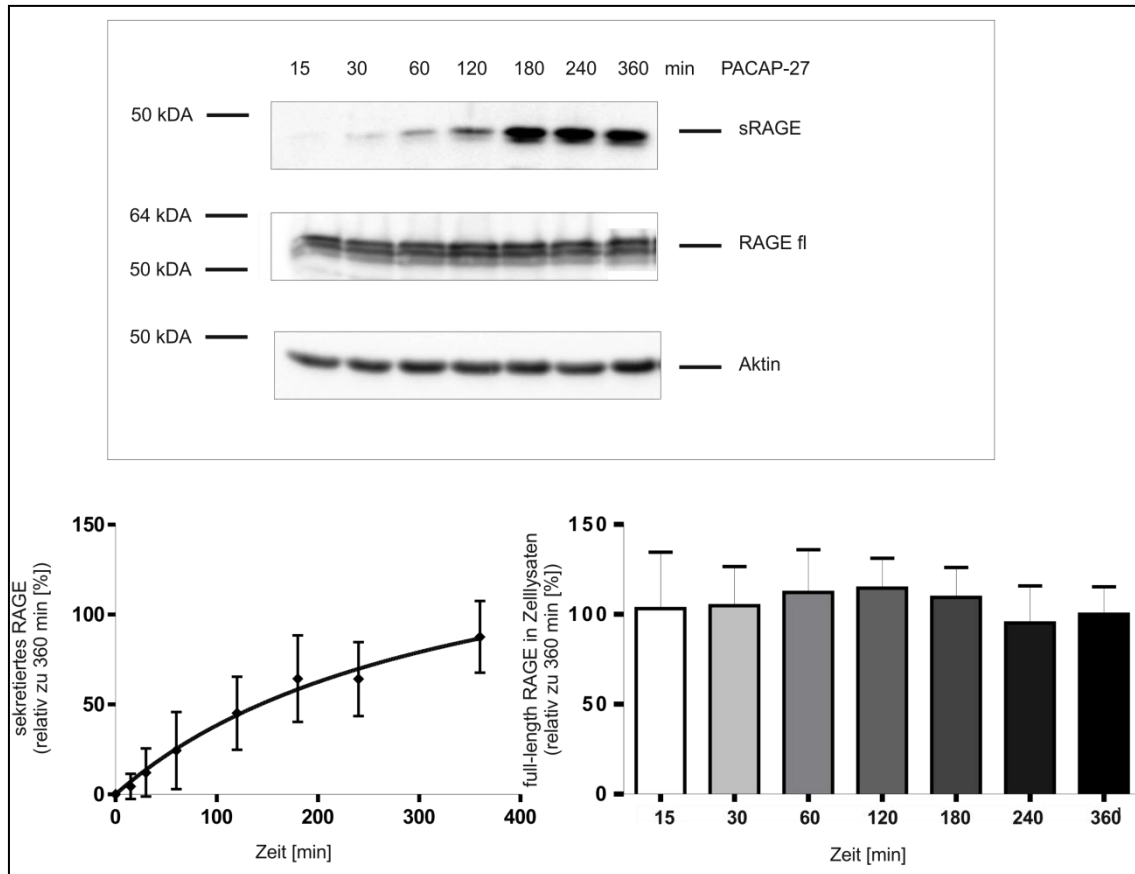
PAC1/RAGE-Zellen wurden auf 48-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag 15 - 360 min mit PACAP-27 (300 nM) inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das MTT-Reagenz für eine Stunde auf die Zellen gegeben und anschließend das Solubilisationsreagenz. Am nächsten Tag wurden die Proben am ELISA-Reader gemessen und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte, indem der Mittelwert der unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Danach wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 6).

Bild 3.14 zeigt, dass die Zellen nach 360 Minuten Inkubation mit dem Peptid dieselbe bzw. sogar eine höhere Lebensfähigkeit besitzen wie Zellen, die nicht mit PACAP-27

behandelt worden waren. Daher wurden die Versuche zur Zeitreihe während der Doktorarbeit wiederholt (siehe Kapitel 3.2.1.2), mit einigen Änderungen bei der praktischen Durchführung. Zum Beispiel wurde für jeden Zeitpunkt eine 6-Loch-Platte verwendet (vorher pro 6-Loch-Platte zwei Zeiten), damit es während der Inkubationszeit durch das Ernten zu keinen Temperaturschwankungen kommen konnte. Außerdem wurden die Überstände nach dem Ernten sofort eingefroren, damit keine Abbauprozesse von sRAGE stattfinden konnten.

### **3.2.1.2 Das Shedding von RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PACAP-27 und PMA**

Die Inkubation von PAC1/RAGE-überexprimierenden Zellen führte zu dem Ergebnis, dass die sekretierte Menge an RAGE innerhalb der ersten drei Stunden stetig zunahm und in den nächsten drei Stunden nur noch gering (siehe Bild 3.15). Die Menge an *full-length* RAGE blieb in den Lysaten gleich und eine erwartete Abnahme konnte nicht detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die starke Expression von RAGE in den Zellen sein, sodass trotz erhöhter Menge an sekretiertem RAGE kein erkennbarer Unterschied bei *full-length* RAGE zu sehen ist. Außerdem ist auch eine erhebliche Menge des überexprimierten RAGE intrazellulär (im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat) lokalisiert und unterliegt somit keinem *Shedding*-Prozess.



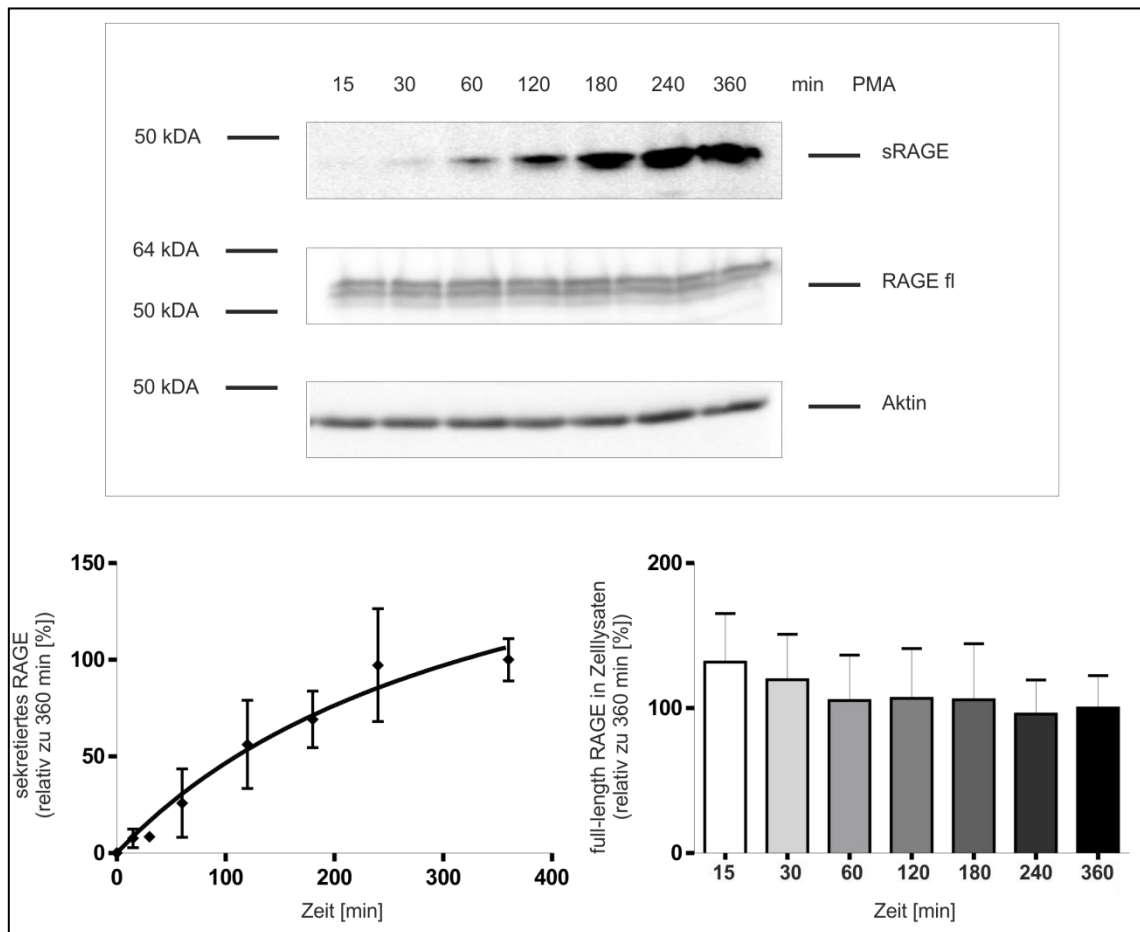
**Bild 3.15: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PACAP-27**

PAC1- und RAGE-überexprimierende Zellen wurden 2,5 Stunden mit Cycloheximid vorinkubiert und dann mit PACAP-27 (300 nM) für 15 min bis 360 min behandelt. Danach wurden die Überstände abgenommen und eine TCA-Fällung durchgeführt. Die Zellen wurden in zweifachem Lämmli-Puffer/100 mM DTT aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und sRAGE bzw. *full-length* RAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde der Mittelwert nach 360 min auf 100 % gesetzt und die anderen Werte in das prozentuale Verhältnis dazu. Danach wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 6).

Um vergleichen zu können, wie stark das durch PACAP-27 stimulierte *Shedding* ist, wurden PAC1/RAGE-überexprimierende Zellen mit dem Phorbolster PMA (1  $\mu$ M) behandelt. Dieser ist bekannt dafür, dass er ein Aktivator der Proteinkinase C ist und das *Shedding* unterschiedlicher Proteine aktivieren kann (Postina, 2008).

Die bis zu 360 min dauernde Behandlung mit PMA resultierte in einer vergleichbaren Kinetik, wie sie auch nach der PACAP-27 Behandlung zu beobachten war. Auch mit PMA nahm die Menge an sekretiertem RAGE in den ersten drei Stunden stark zu und

danach nur noch gering. In den Lysaten konnte eine geringe Abnahme von *full-length* RAGE beobachtet werden (siehe Bild 3.16).

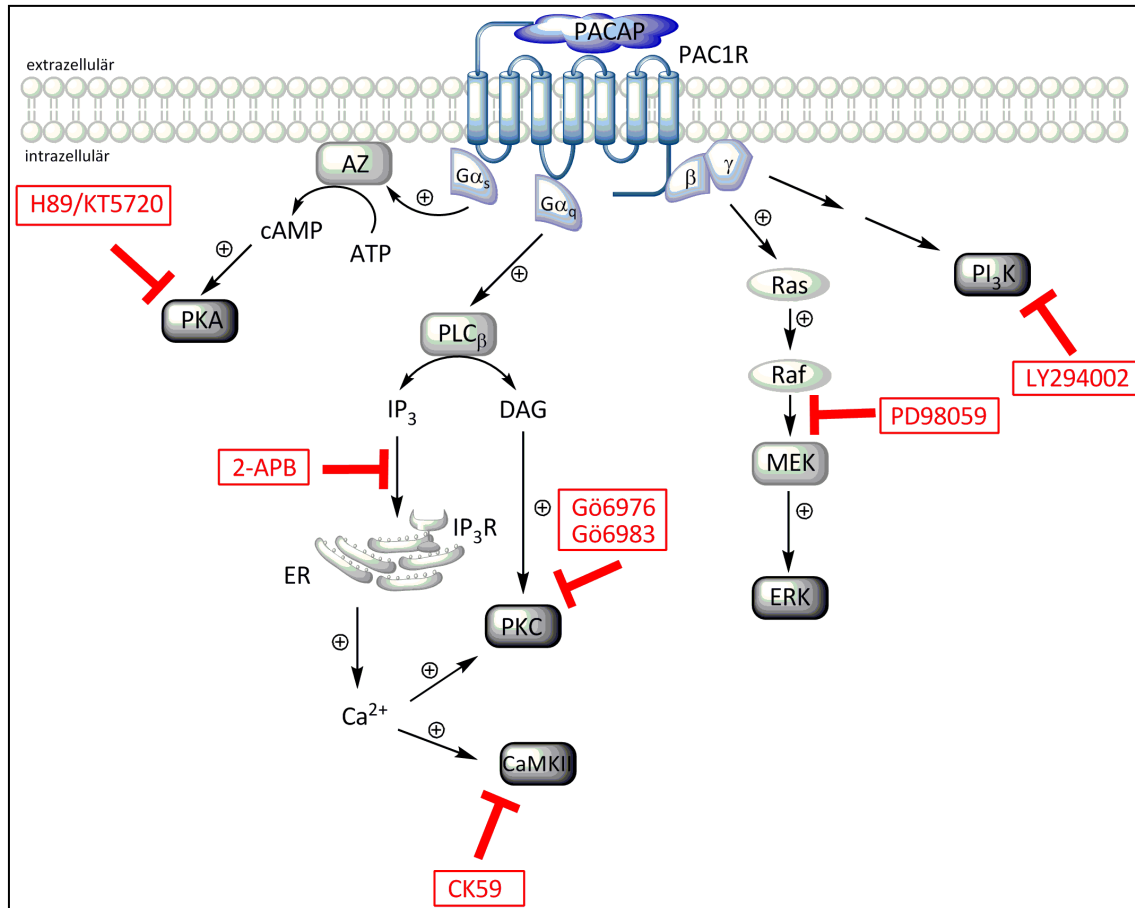


**Bild 3.16: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PMA**

PAC1- und RAGE-überexprimierende Zellen wurden 2,5 Stunden mit Cycloheximid vorinkubiert und dann mit PMA (1  $\mu$ M) für 15 min bis 360 min behandelt. Danach wurden die Überstände abgenommen und die Proteine gefällt. Die Zellen wurden in zweifachem Lämmli-Puffer/100 mM DTT aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und sRAGE bzw. *full-length* RAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde Aktin nachgewiesen. Zur Auswertung der Daten wurde der Mittelwert nach 360 min auf 100 % gesetzt und die anderen Werte in das prozentuale Verhältnis dazu. Danach wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 6).

### 3.2.1.3 Signaltransduktionswege des PAC1-Rezeptors

Der PAC1-Rezeptor schaltet eine ganze Reihe von Signalwegen an (siehe Kapitel 1.3.1.3). Um nachzuweisen, welcher Weg bei der Stimulierung der RAGE-Proteolyse wichtig ist, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Eine Übersicht der verwendeten Substanzen ist in Bild 3.17 zu sehen.



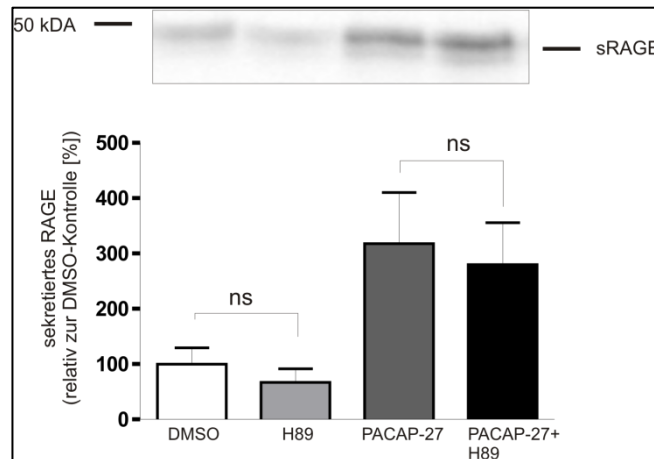
**Bild 3.17: PAC1-Rezeptor Signalwege und verwendete Inhibitoren**

Es wurden verschiedene Inhibitoren auf ihren Einfluss auf das *Shedding* von RAGE untersucht. H89 und KT5720 sind Inhibitoren der Proteinkinase A, GÖ6976/GÖ6983 verhindern die Aktivierung der Proteinkinase C, 2-ABP blockiert den IP<sub>3</sub>-Rezeptor, CK59 inhibiert die Aktivierung der CaM-Kinase II, die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges wird durch PD98059 verhindert und LY294002 blockiert die PI<sub>3</sub>-Kinase.

### 3.2.1.3.1 Proteinkinase A

Wie schon der Name des Hormons *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide* (PACAP) zeigt, ist der PAC1-Rezeptor bekannt dafür, nach PACAP-Bindung die Adenylatzyklase zu aktivieren (Vaudry *et al.*, 2009). Dies führt zur Bildung von cAMP, dieser *second messenger* wiederum aktiviert die Proteinkinase A. Um zu überprüfen, ob diese Kinase eine Rolle bei der Stimulierung der RAGE-Proteolyse spielt, wurden PAC1/RAGE-überexprimierende Zellen mit zwei verschiedenen Inhibitoren behandelt. Zum einen erfolgte die Behandlung mit dem PKA-Inhibitor H89 (1 µM), der jedoch auch andere Kinasen, zum Beispiel MSK1, S6K1 und Rock-II (Davies *et al.*, 2000), beeinflusst. Die zweite eingesetzte Substanz war KT5720 (1 µM), ein spezifischer Inhibitor der PKA. In

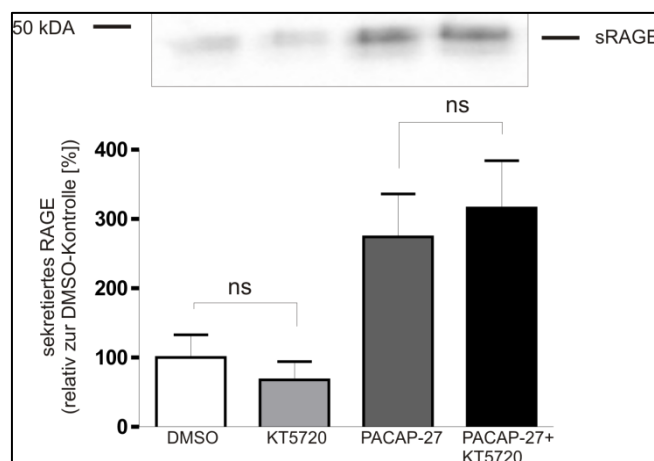
Bild 3.18 ist gezeigt, dass nach einstündiger Vorinkubation mit H89 oder DMSO als Kontrolle und zwei Stunden Stimulierung mit PACAP-27 (300 nM) sowohl in den Negativkontrollen als auch in den mit dem Inhibitor behandelten Proben kein signifikanter Unterschied an sekretiertem RAGE zu erkennen war.



**Bild 3.18: Inhibierung der Proteinkinase A mit H89 bei PAC1/RAGE-Zellen**

PAC1/RAGE-Zellen wurden 1 Stunde mit dem Inhibitor (1  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit PACAP-27 (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte nach TCA-Fällung der Proteine im Überstand und Durchführung einer SDS-PAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 9; ns = P > 0,05).

Auch mit dem spezifischen Inhibitor KT5720 konnte nach zwei Stunden Stimulierung mit PACAP-27 kein Einfluss auf die sekretierte Menge von sRAGE nachgewiesen werden (siehe Bild 3.19). Auch in den Proben, die nicht mit dem Hormon behandelt waren, wurde kein Unterschied detektiert.

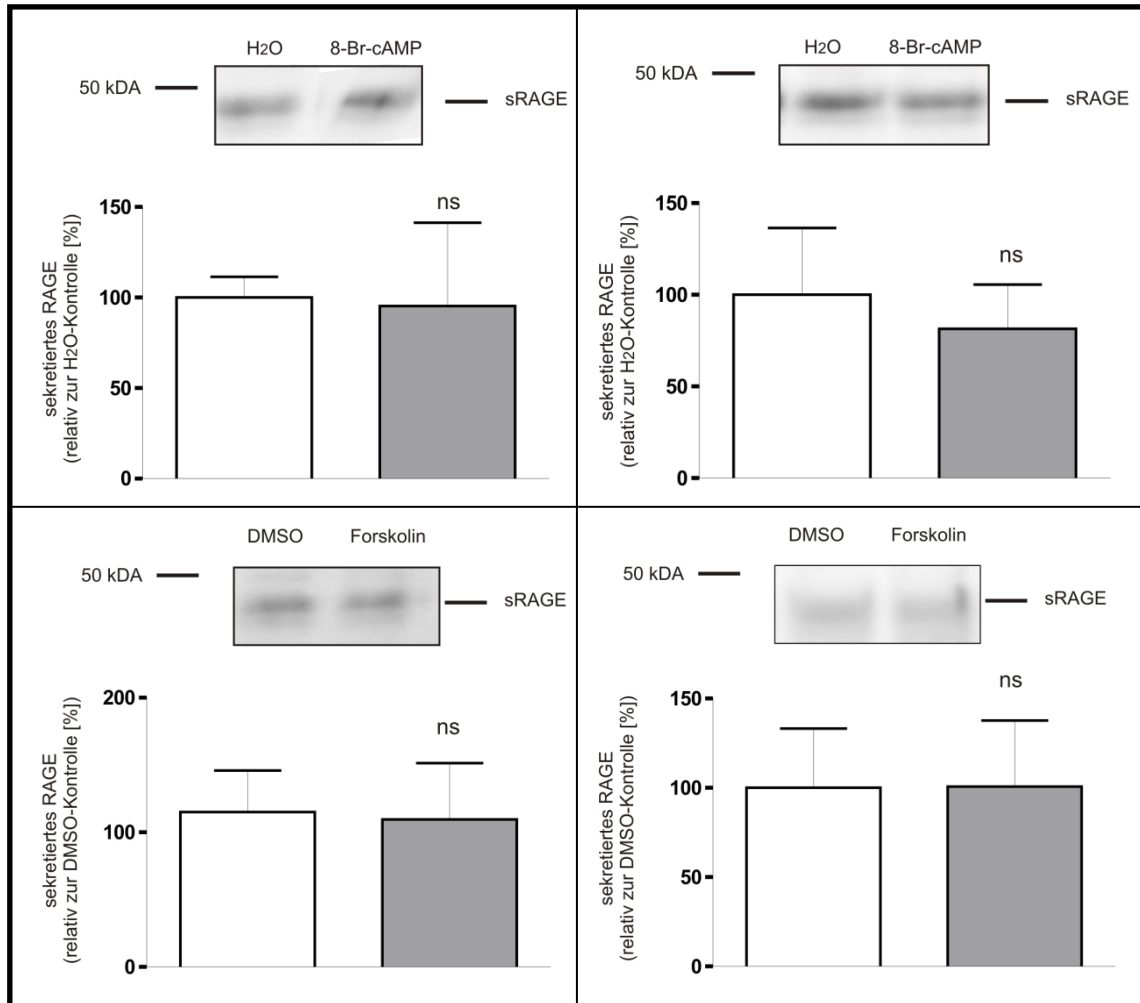


**Bild 3.19: Inhibierung der Proteinkinase A mit KT5720 bei PAC1/RAGE-Zellen**

PAC1/RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor (1  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit PACAP-27 (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Der Nachweis von sRAGE wurde nach Fällung der Proteine im Überstand im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper 5328 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt und die anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt wurden. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 9; ns = P > 0,05).

Um die mit den Inhibitoren erzielten Ergebnisse, die Proteinkinase A betreffend, zu belegen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dazu wurden RAGE-überexprimierende Zellen zwei bzw. vier Stunden mit Forskolin (50  $\mu$ M), einem Aktivator der Adenylatzyklase, bzw. dem zell-permeablen 8-Bromo-cAMP (1  $\mu$ M), einem Aktivator der Proteinkinase A, behandelt. 8-Bromo-cAMP besitzt eine höhere Stabilität gegenüber Phosphodiesterasen als cAMP und lagert sich an die Untereinheiten der Proteinkinase A an. Durch das darauffolgende Abdissoziieren der regulatorischen Untereinheiten erfolgt die Aktivierung der Proteinkinase A. Es konnte aber weder nach zwei noch nach vier Stunden Behandlung mit Forskolin bzw. 8-Bromo-cAMP eine Erhöhung des sekretierten RAGE-Gehalts nachgewiesen werden (siehe Bild 3.20). Der Nachweis, dass Forskolin aktiv war und den cAMP-Spiegel erhöht, wurde mit Hilfe des GloSensor cAMP-Tests durchgeführt (siehe Bild 3.35).

Die Ergebnisse mit den beiden Inhibitoren sowie den beiden Aktivatoren zeigen, dass die Stimulierung des RAGE-*Sheddings* unabhängig von der Proteinkinase A erfolgt.



**Bild 3.20: Stimulierung der Adenylatzyklase (mit Forskolin) und der Proteinkinase A (mit 8-Br-cAMP)**

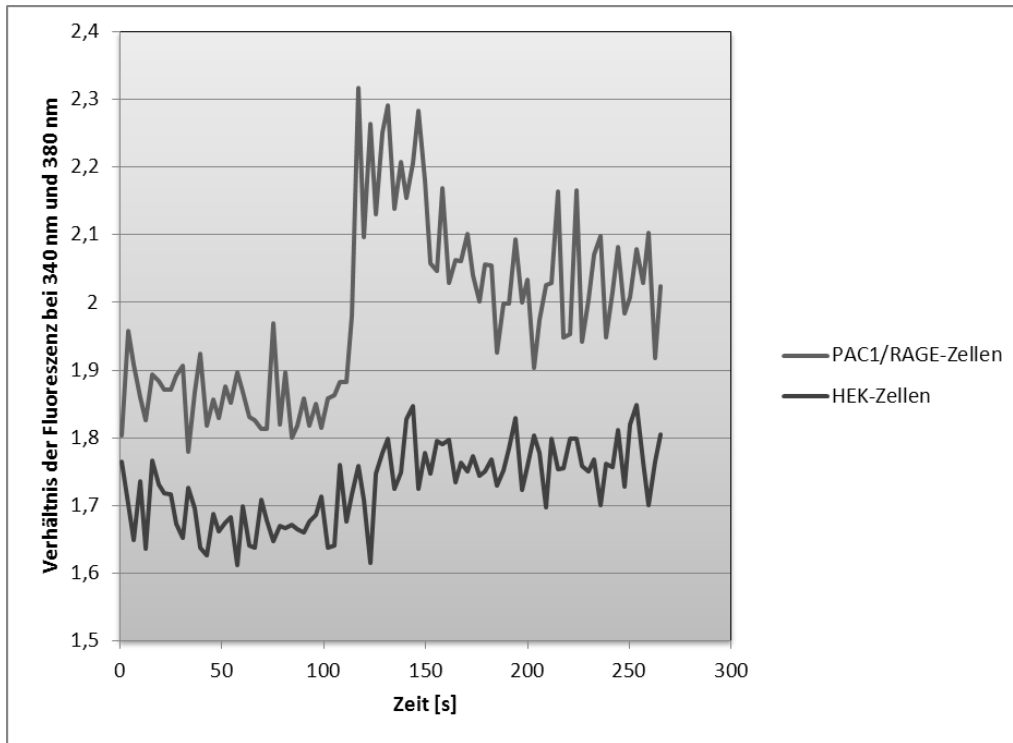
Links: zweistündige Inkubation und rechts: vierstündige Inkubation.

RAGE-überexprimierende Zellen wurden zwei bzw. vier Stunden mit den Aktivatoren 8-Br-cAMP (1  $\mu$ M)/Forskolin (50  $\mu$ M) bzw. H<sub>2</sub>O/DMSO inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper 3260. Die Auswertung der Daten wurde durchgeführt, indem der Mittelwert der Kontrolle (H<sub>2</sub>O/DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 4; ns = P > 0,05).

### 3.2.1.3.2 Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zugabe von PACAP

Die Bindung von PACAP an den PAC1-Rezeptor hat eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge (Zhou *et al.*, 2001). Zum Nachweis, dass dies auch beim vorliegenden Zellsystem der Fall ist, wurde die Änderung der Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration nach Zugabe des Hormons mit dem fluoreszierenden Indikator Fura-2/AM bestimmt.

Bild 3.21 zeigt, dass nach der Zugabe von PACAP die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den PAC1/RAGE-Zellen innerhalb von Sekunden stark ansteigt. In den HEK-Zellen ist dagegen keine schnelle, signifikante Veränderung festzustellen gewesen.



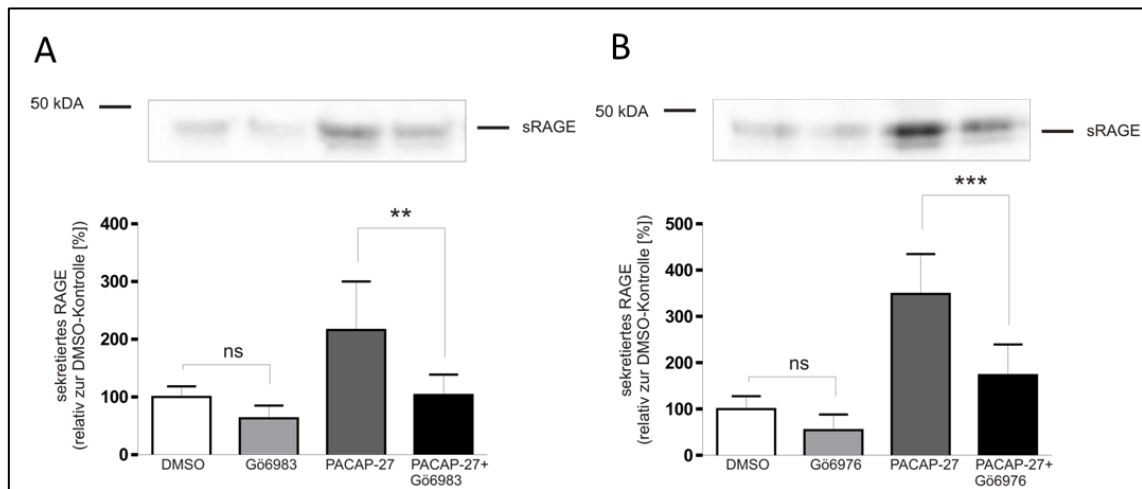
**Bild 3.21: Messung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in PAC1/RAGE-Zellen**

PAC1/RAGE-überexprimierende Zellen sowie HEK-Zellen als Negativkontrolle wurden eine halbe Stunde mit dem Farbstoff Fura-2/AM inkubiert. Nach dem Ernten wurden sie in Calciumpuffer (siehe Kapitel 2.2.3.11) resuspendiert und die Messung in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Die Zugabe von PACAP-38 (final 300 nM) erfolgte jeweils nach 100 s.

### 3.2.1.3.3 Proteinkinase C

Es ist weiterhin bekannt, dass der PAC1-Rezeptor die Phospholipase C stimuliert (Basille *et al.*, 1995), was zur Entstehung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) führt. DAG ist ein bekannter Aktivator der Proteinkinase C und die Bildung von  $\text{IP}_3$  führt zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Diese wirken ebenfalls aktivierend auf die PKCs. Außerdem werden *Shedding*-Prozesse oft durch Aktivierung von PKCs induziert (Pandiella und Massague, 1991). Um die Beteiligung dieser Kinasen zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Substanzen verwendet, zum einen der Inhibitor Gö6983, der die PKC-Isozyme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  und  $\delta$  inhibiert (Gschwendt *et al.*, 1996). Zum anderen der Inhibitor Gö6976, der spezifisch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ -

Isozyme hemmt, aber keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen PKC  $\zeta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -Isozyme hat (Martiny-Baron *et al.*, 1993).



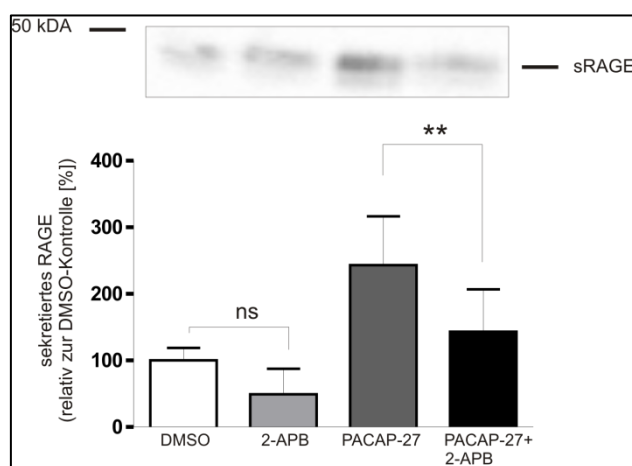
**Bild 3.22: Inhibierung der Proteinkinase C mit Gö6976 (A) und Gö6983 (B) bei PAC1/RAGE-Zellen**

PAC1/RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor (1  $\mu\text{M}$ ) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit PACAP-27 (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte nach TCA-Fällung der Proteine im Überstand und Auftrennung über SDS-PAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328. Die Auswertung der Daten wurde durchgeführt, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 9; ns = P > 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001).

Nach einstündiger Vorbehandlung mit Gö6983 (1  $\mu\text{M}$ ) und anschließender Stimulierung mit PACAP-27 (300 nM) konnte eine verringerte Menge an sRAGE im Überstand nachgewiesen werden. Diese war um 60 % niedriger im Vergleich zur PACAP-stimulierten Probe und damit auf demselben Niveau wie die sRAGE Menge in der DMSO-Kontrolle. Nur mit dem Inhibitor behandelte Proben hatten einen nicht signifikanten, aber leicht geringeren sRAGE-Gehalt verglichen mit der DMSO-Kontrolle (siehe Bild 3.22 A). Die Behandlung mit Gö6976 (1  $\mu\text{M}$ ) führte zu einem ähnlichen Ergebnis, hier betrug die Inhibierung nach Stimulierung mit PACAP-27 50 %. Die Überstände der nicht-stimulierten und nur mit Inhibitor behandelten Zellen wiesen, auch bei der Behandlung mit Gö6976, keinen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle auf (siehe Bild 3.22 B).

### 3.2.1.3.4 IP<sub>3</sub>-Rezeptor

Die Bindung von IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor führt, wie bereits erwähnt, zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, z.B. aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Die Verwendung des Inhibitors 2-APB (75 µM), der die Aktivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors verhindert, führte nach einstündiger Vorinkubation und zweistündiger Behandlung mit PACAP-27 (300 nM) bei PAC1/RAGE-überexprimierenden Zellen zu einer Verminderung der Proteolyse von RAGE um 40 % (siehe Bild 3.23). Zur Kontrolle wurden auch nicht-stimulierte Zellen mit 2-APB behandelt, hier konnte keine signifikante Abnahme von sRAGE im Überstand nachgewiesen werden.



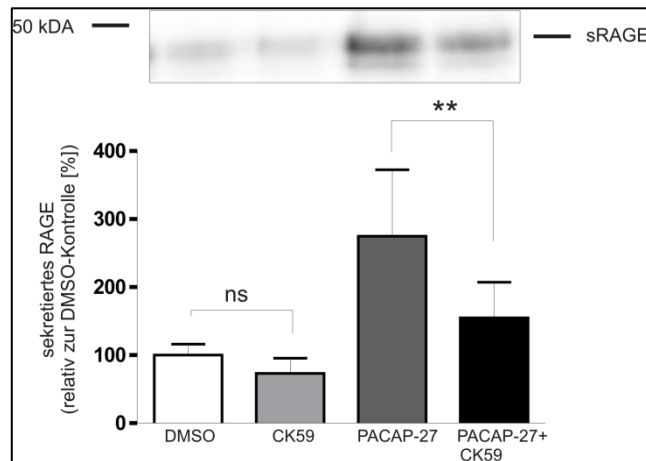
**Bild 3.23: Blockierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors mit 2-APB bei PAC1/RAGE-Zellen**

PAC1/RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor (75 µM) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit PACAP-27 (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Lösliches RAGE im Überstand wurde nach Fällung und SDS-PAGE mit dem monoklonalen AK 5328 nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt wurden. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 9; ns = P > 0,05; \*\* = P < 0,01).

### 3.2.1.3.5 Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Für den Nachweis der Beteiligung weiterer Signalwege wurde ein Inhibitor für die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) an PAC1/RAGE-überexprimierenden Zellen getestet. Eine von PACAP ausgelöste Stimulierung der CaMKII (Wong *et al.*, 2005) ist in der Literatur beschrieben. CK59 ist ein Olomoucine-Analog und diente als CaMKII-Inhibitor (IC<sub>50</sub> < 10 µM). Olomoucine ist ein Purin, das zur Inhibierung von Cyclin-abhängigen Kinasen benutzt wird. Nach einstündiger Vorinkubation

und zwei Stunden Behandlung mit PACAP-27 (300 nM) wurde im Zellkulturüberstand der mit CK59 (20  $\mu$ M) behandelten Proben 43 % weniger sekretiertes RAGE nachgewiesen als in den DMSO-Kontrollen (siehe Bild 3.24). Zur Kontrolle wurden auch nicht-stimulierte Zellen mit CK59 behandelt, hier konnte keine signifikante Abnahme von sRAGE im Überstand nachgewiesen werden.



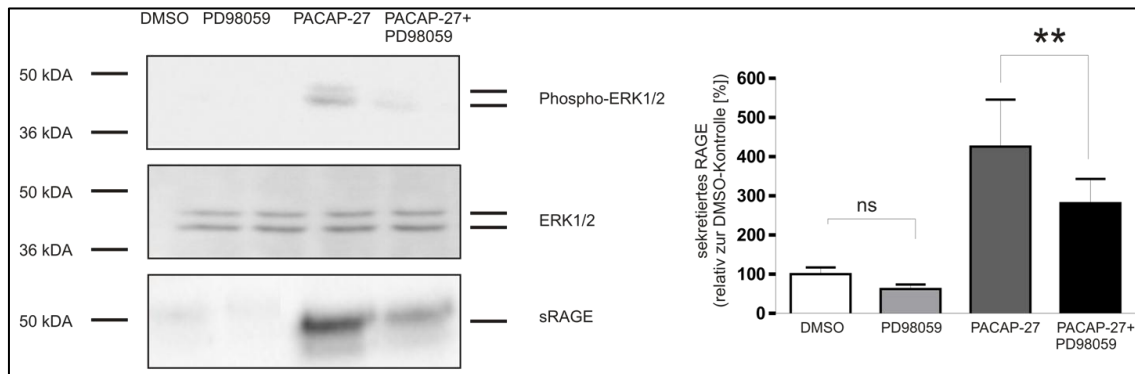
**Bild 3.24:** Inhibierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II mit CK59 bei PAC1/RAGE-Zellen

PAC1/RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor (20  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit PACAP-27 (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte nach Fällung der Proteine im Überstand mit TCA und Auftrennung über SDS-PAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 9; ns = P > 0,05; \*\* = P < 0,01).

### 3.2.1.3.6 MAP-Kinase-Weg

Der PAC1-Rezeptor induziert die Phosphorylierung von ERK1/2 (Villalba *et al.*, 1997; Moroo *et al.*, 1998), diese Aktivierung des MAP-Kinase-Weges ist wichtig, um die Caspase-3-Aktivität zu inhibieren (Vaudry *et al.*, 2000b; Falluel-Morel *et al.*, 2004) und trägt somit zum neuroprotektiven Effekt von PACAP bei. Bereits während der Diplomarbeit wurde gezeigt, dass nach Inhibierung der ERK1/2 MAP-Kinasen die Sekretion von sRAGE reduziert ist. Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 nach zweistündiger Inkubation mit PACAP-27 (300 nM) nachgewiesen. Die Behandlung mit dem Hormon führte zu einer Phosphorylierung von ERK1/2, aber zu keiner Veränderung der gesamten Expressionsrate von ERK1/2 (siehe Bild

3.25). Bei gleichzeitiger Inkubation mit dem MEK1-Inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) (Alessi *et al.*, 1995) konnte die Phosphorylierung vollständig unterbunden werden.



**Bild 3.25: Nachweis des ERK1/2-Phosphorylierungsstatus in PAC1/RAGE-Zellen nach Stimulierung mit PACAP**

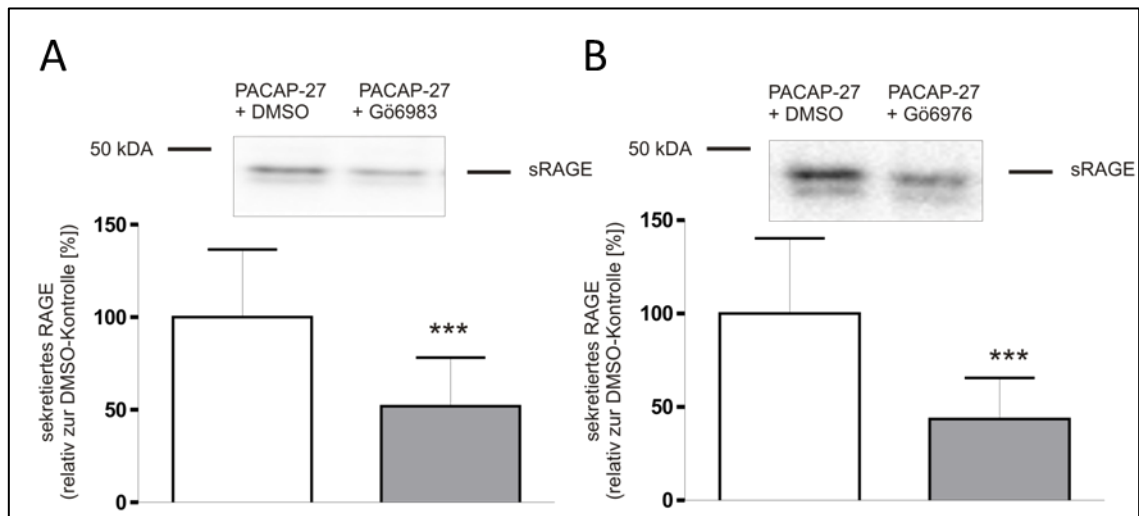
PAC1/RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit PD98059 (50  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit PACAP-27 (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Lösliches RAGE im Überstand wurde mit dem polyklonalen Antikörper 3260 nachgewiesen. Die Zellen wurden in Lämmli- und Lysispuffer (2x Lämmli/100 mM DTT + Lysispuffer, 1:1) geerntet und die Proteine ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von ERK1/2 und Phospho-ERK1/2 wurde mit polyklonalen Antikörpern von Cell Signaling durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; ns = P > 0,05; \*\* = P < 0,01).

Ebenfalls in Bild 3.25 sind die dazugehörigen sRAGE-Mengen zu sehen. Bei zeitgleicher Inkubation mit PACAP-27 und PD98059 ist eine um 34 % erniedrigte Menge an sekretiertem RAGE im Überstand im Vergleich zu Zellen, die nur mit PACAP behandelt worden waren, zu beobachten gewesen. Die Inkubation von PAC1/RAGE-Zellen mit dem Inhibitor ohne Hormonbehandlung hatte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied an sRAGE im Überstand zur Folge.

### 3.2.1.3.7 Inhibierung von Signalwegen nach 30-minütiger Stimulierung mit PACAP-27

In den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der sekretierten RAGE-Menge (siehe Kapitel 3.2.1.2) ist erkennbar, dass bereits nach 30-minütiger Inkubation mit PACAP-27 (300 nM) eine Aktivierung des *Sheddings* erfolgt. Dies ist nicht ungewöhnlich für *Shedding*-Prozesse. Im Zusammenhang mit PMA ist zum Beispiel bekannt, dass bereits nach

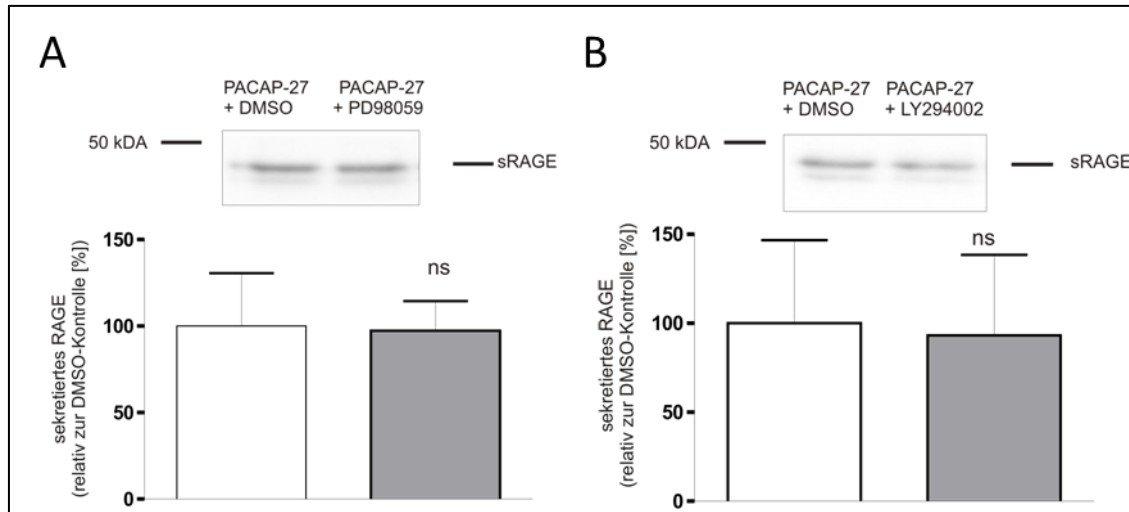
zehn Minuten ungefähr 2 % aller Zelloberflächenmoleküle einer Proteolyse unterzogen werden (Arribas und Borroto, 2002).



**Bild 3.26: Inhibierung der Proteinkinase C und 30-minütige Stimulierung mit PACAP-27**

PAC1- und RAGE-überexprimierende Zellen wurden eine Stunde mit Gö6983 (A, 1  $\mu$ M) oder Gö6976 (B, 1  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach 30 min mit PACAP-27 (300 nM) inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte nach TCA-Fällung der Proteine im Überstand im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper 3260. Die Auswertung der Daten wurde durchgeführt, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 12; \*\*\* = P < 0,001).

Daher wurden die Inhibitoren, mit denen auch nach zweistündiger Inkubationszeit mit PACAP-27 eine geringere sRAGE Menge im Überstand beobachtet worden war, verwendet, um zu untersuchen, ob bereits nach 30 Minuten Stimulierung mit PACAP-27 ein Effekt zu beobachten ist. Mit den beiden Inhibitoren der Proteinkinase C Gö6976 und Gö6983 (beide 1  $\mu$ M) konnte tatsächlich bereits nach 30 Minuten eine um ca. 50 % geringere Menge an sRAGE im Überstand nachgewiesen werden (siehe Bild 3.26 A und B). Dagegen hatten die Inhibitoren des MAP-Kinase-Weges (siehe Bild 3.27 A, 50  $\mu$ M) und der PI3-Kinase (50  $\mu$ M) keinen Einfluss auf die Bildung des sekretierten RAGE (siehe Bild 3.27 B).



**Bild 3.27: Inhibierung von MEK1 sowie der PI3-Kinase und 30-minütige Stimulierung mit PACAP-27**

PAC1- und RAGE-überexprimierende Zellen wurden eine Stunde mit PD98059 (A, 50  $\mu$ M) oder LY294002 (B, 50  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach 30 min mit PACAP-27 (300 nM) inkubiert. Der Nachweis von sRAGE wurde nach Fällung der Proteine im Überstand und nach einer SDS-PAGE mit dem polyklonalen Antikörper 3260 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 12; ns = P > 0,05).

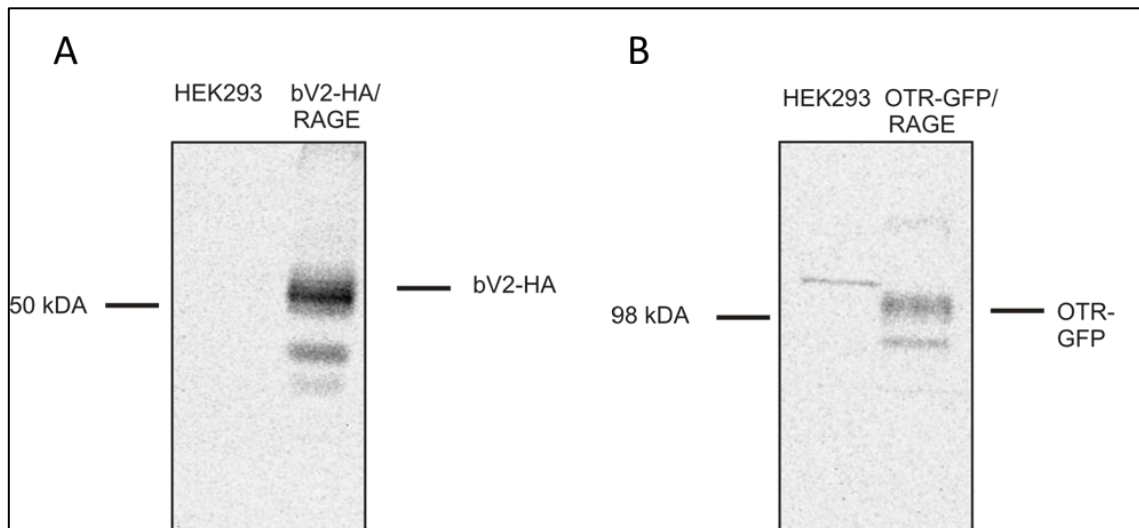
### 3.2.2 Stimulierung der Proteolyse von RAGE über den Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptor

Zur Überprüfung, ob die Proteolyse von RAGE auch über andere GPCRs stimuliert werden kann, wurde dies am Oxytocin- sowie Vasopressin ( $V_2$ )-Rezeptor getestet. Diese beiden Proteine wurden gewählt, weil sie im Gegensatz zum PAC1-Rezeptor nur jeweils einen bestimmten Bereich an Signalwegen anschalten. Der OT-Rezeptor ist  $G\alpha_q$  bzw.  $G\alpha_i$  gekoppelt und stimuliert die Phospholipase  $C_\beta$ . Der  $V_2$ -Rezeptor ist charakteristischerweise mit  $G\alpha_s$  gekoppelt, was zur Stimulierung der Adenylatzyklase führt (siehe Kapitel 1.3.2).

#### 3.2.2.1 Nachweis des Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptors im Western Blot

Die nachfolgenden Versuche in Kapitel 3.2.2 wurden an zwei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt, an einer HEK 293-Linie, die den Rinder-Vasopressin-Rezeptor vom Typ 2 (bV<sub>2</sub>) mit einer HA-Markierung am C-Terminus und den humanen *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* überexprimiert (siehe Bild 3.28 A). Die zweite Zelllinie war auch eine HEK 293-Linie, die den humanen Oxytocin-Rezeptor (OTR) mit einer C-

terminalen GFP-Markierung sowie den humanen *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* überexprimiert (siehe Bild 3.28 B). Um sicherzustellen, dass die Zellen den entsprechenden G-Protein gekoppelten Rezeptor exprimieren, wurden diese in einem Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden Zelllysate von HEK-Zellen und Zellen, die RAGE und den bV<sub>2</sub>- oder OT-Rezeptor überexprimieren, auf ein SDS-Gel aufgetragen.



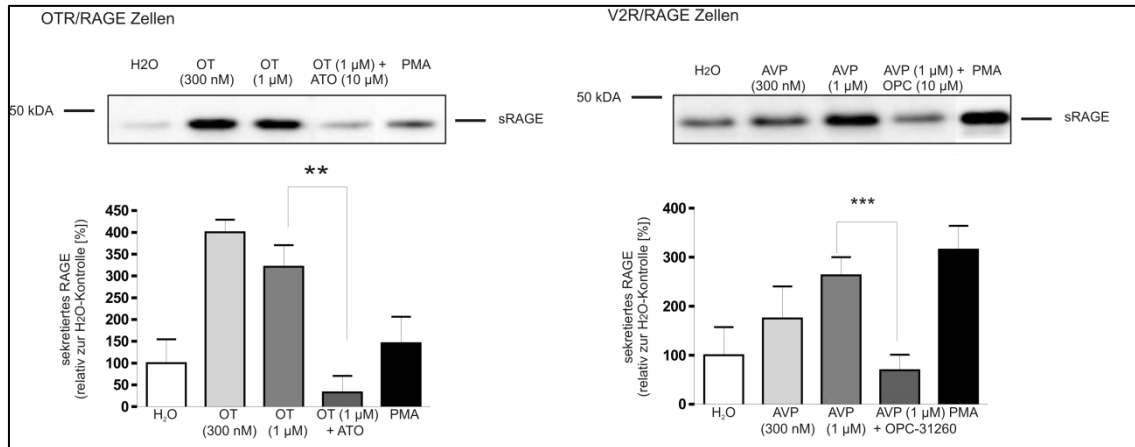
**Bild 3.28: Nachweis des bV<sub>2</sub>- und OT-Rezeptors im Western Blot**

Für die Nachweise der Rezeptoren wurden jeweils 40 µg Zelllysate aufgetragen. Die Proteine wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen die HA- bzw. GFP-Markierung nachgewiesen.

In Bild 3.28 ist zu sehen, dass der bV<sub>2</sub>-Rezeptor mit einem Antikörper, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist, bei der erwarteten Größe von 55 kDa nachgewiesen werden konnte. Der OT-Rezeptor wurde mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers bei einer Größe von 100 kDa sichtbar gemacht.

### 3.2.2.2 Stimulierung der RAGE-Proteolyse über den Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptor

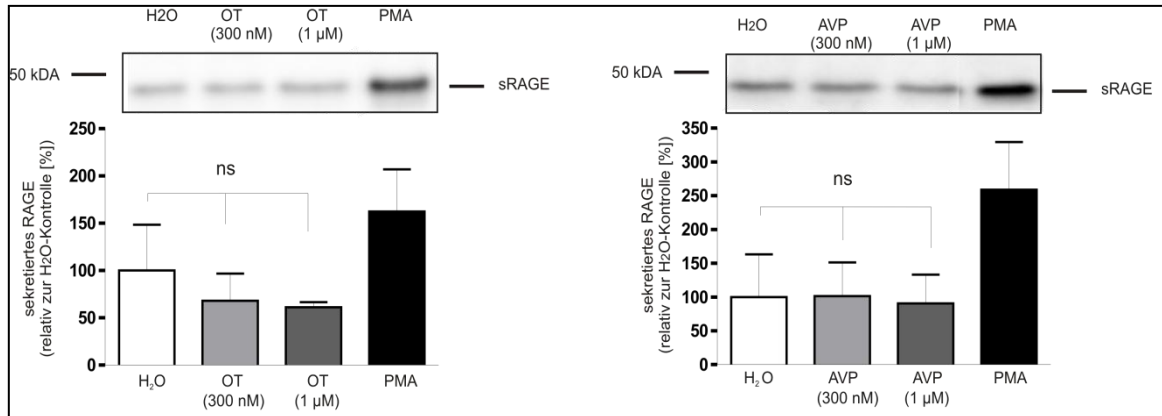
Zunächst stellte sich die Frage, ob eine Stimulierung der RAGE-Proteolyse über die beiden GPCRs möglich ist. Dazu wurden die bV<sub>2</sub>/RAGE- bzw. OTR/RAGE-exprimierenden Zellen vier Stunden mit 300 nM oder 1 µM Arginin-Vasopressin (AVP) bzw. Oxytocin (OT) bei 37°C inkubiert. In Bild 3.29 ist gezeigt, dass es nach Zugabe der Hormone zu einem deutlichen Anstieg des sekretierten RAGE kam. Die Menge des Proteins war zwei- bis viermal so groß im Vergleich zu den H<sub>2</sub>O-Kontrollen.



**Bild 3.29: Stimulierung der OT- und V<sub>2</sub>-Rezeptor Zellen**

OTR/RAGE- bzw. bV<sub>2</sub>/RAGE-Zellen wurden vier Stunden mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen (in Anwesenheit des Antagonists erfolgte eine 20-minütige Vorinkubation) bzw. als Kontrolle mit H<sub>2</sub>O inkubiert. Danach wurden die Proteine des Überstandes mit TCA gefällt und die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis von sRAGE erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper 3260. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (H<sub>2</sub>O) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001).

Um zu zeigen, dass tatsächlich die Signaltransduktion über die GPCRs für die erhöhte Proteolyse verantwortlich war, wurde zusätzlich zu dem Hormon (1 μM) noch ein Antagonist im zehnfachen Überschuss ins Sekretionsmedium gegeben. Für den bV<sub>2</sub>-Rezeptor wurde der Antagonist OPC-31260 verwendet (10 μM und 20-minütige Vorinkubation) und für den OT-Rezeptor der kompetitive Antagonist Atosiban (ebenfalls 10 μM und 20-minütige Vorinkubation). Wie in Bild 3.29 zu sehen, wurde dadurch die Stimulierung des *Sheddings* komplett unterbunden. Einen weiteren Beweis, dass die Stimulierung auf die GPCRs zurückzuführen ist, lieferte ein Experiment, in dem Zellen, die nur RAGE exprimieren, mit AVP oder OT behandelt wurden. Hier wurde kein Unterschied der sekretierten RAGE-Konzentration in den Zellkulturüberständen im Vergleich zu Zellen, die mit H<sub>2</sub>O behandelt worden waren, festgestellt (siehe Bild 3.30). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA (1 μM) inkubiert, hier ist eine deutliche Steigerung der RAGE-Menge zu sehen. PMA ist bekannt dafür, dass es die Proteinkinase C aktiviert (Blobe *et al.*, 1994) und dass es das *Shedding* von RAGE stimuliert (Zhang *et al.*, 2008).

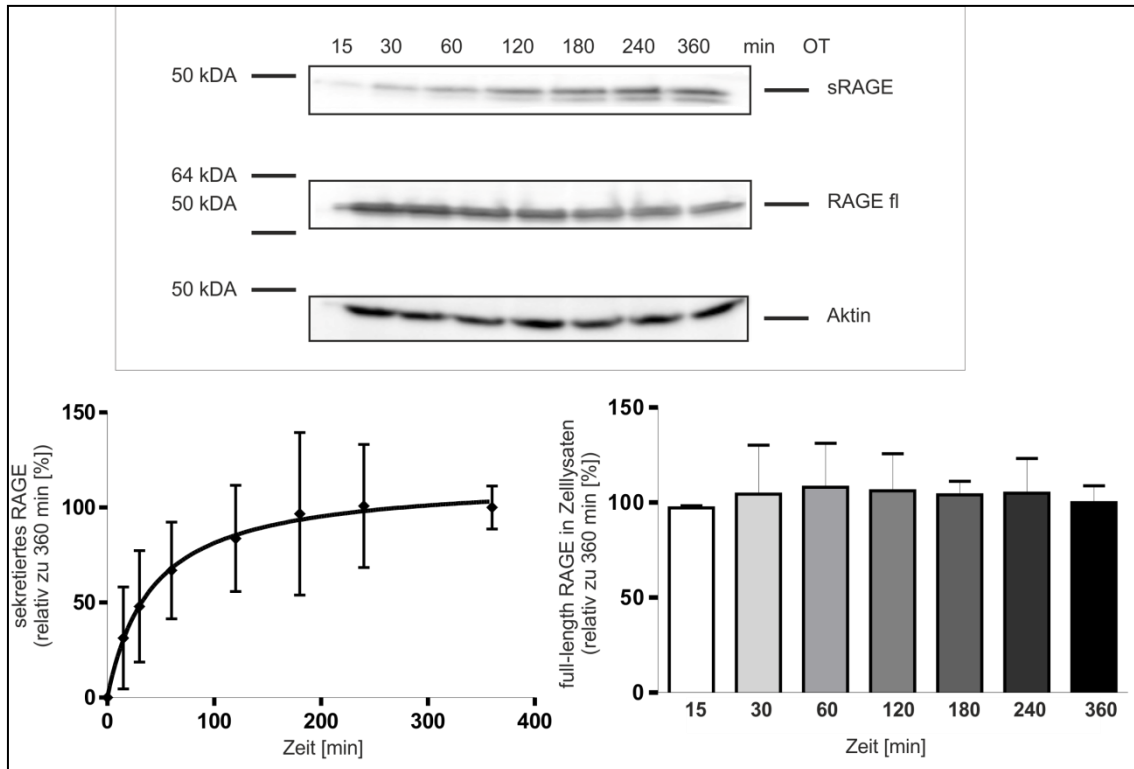


**Bild 3.30: Kontrolle mit RAGE-exprimierenden Zellen**

RAGE-überexprimierende Zellen wurden vier Stunden mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen an OT (links) und AVP (rechts) bzw. als Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O und als Positivkontrolle mit PMA (1 μM) inkubiert. Danach wurden die Proteine des Überstandes gefällt und mit dem polyklonalen Antikörper 3260 im Western Blot nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (H<sub>2</sub>O) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; ns = P > 0,05).

### 3.2.2.3 Bestimmung der Kinetik der RAGE-Proteolyse

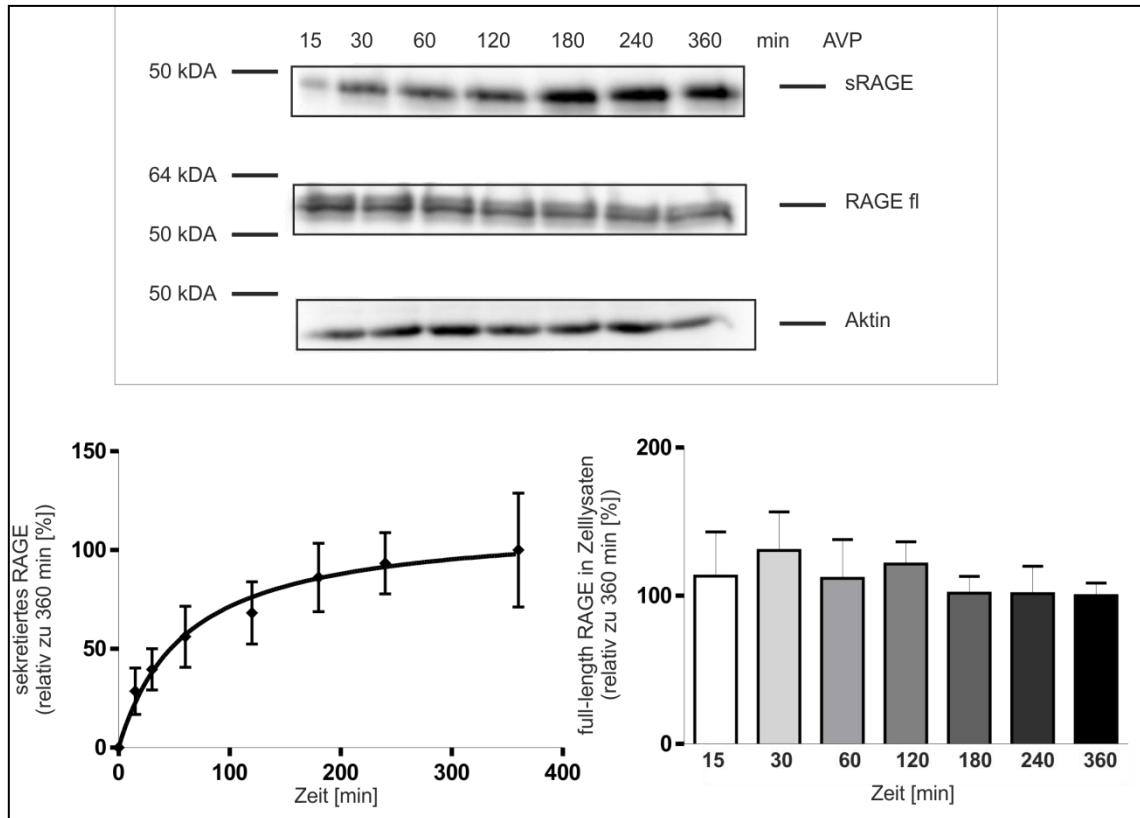
Zur Aufnahme der Kinetik der RAGE-Proteolyse mit den bV<sub>2</sub>/RAGE- bzw. OTR/RAGE-überexprimierenden Zellen wurden diese mit dem entsprechenden Hormon 15, 30, 60, 120, 180, 240 oder 360 Minuten behandelt. Zuvor waren die Zellen 2,5 Stunden mit Cycloheximid, einem Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese inhibiert, inkubiert worden. Cycloheximid wurde auch während der Behandlung mit AVP bzw. OT (beide 300 nM) auf den Zellen belassen.



**Bild 3.31: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Oxytocin**

OTR- und RAGE-überexprimierende Zellen wurden mit Oxytocin (300 nM) für 15 min bis 360 min behandelt. Danach wurden die Überstände abgenommen und eine TCA-Fällung durchgeführt. Die Zellen wurden in zweifachem Lämmli-Puffer/100 mM DTT aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und sRAGE bzw. *full-length* RAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von Aktin verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde der Mittelwert nach 360 min auf 100 % gesetzt und die anderen Werte in das prozentuale Verhältnis dazu. Danach wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 9).

Nach Fällung der Proteine aus dem Zellkulturüberstand wurden diese auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Auswertung des Western Blots zeigte einen starken Anstieg innerhalb der ersten beiden Stunden und einen geringen von 20 % innerhalb der nächsten vier Stunden bei beiden Zelllinien (siehe Bild 3.31 und Bild 3.32). Die Lysate der OT-Zellen und der  $bV_2$ -Zellen zeigten keine Abnahme in der Menge des *full-length* RAGE. Um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren, wurde in den Zelllysaten Aktin nachgewiesen.

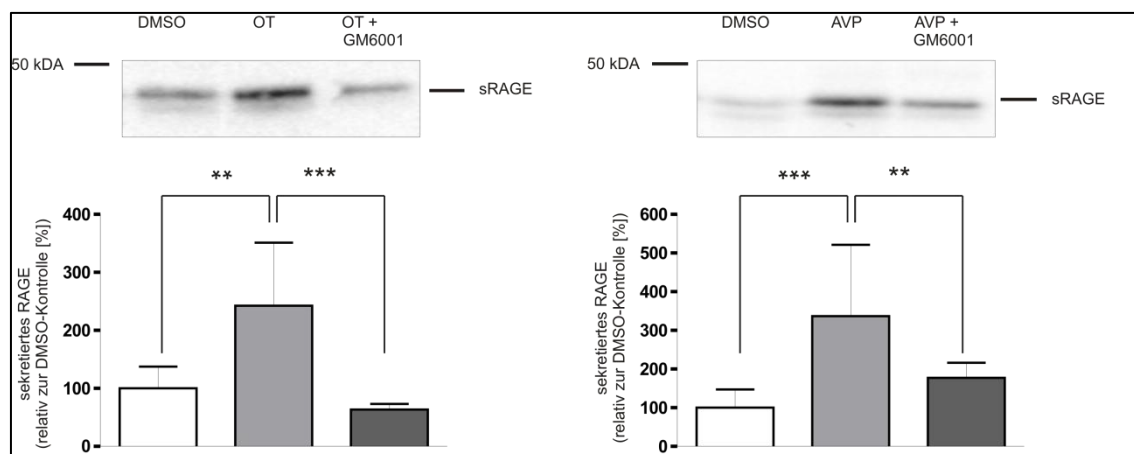


**Bild 3.32: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Arginin-Vasopressin**

bV<sub>2</sub>- und RAGE-überexprimierende Zellen wurden mit Arginin-Vasopressin (300 nM) für 15 min bis 360 min behandelt. Die Zellen wurden in zweifachem Lämmli-Puffer/100 mM DTT aufgenommen und die Proteine im Überstand gefällt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und sRAGE bzw. *full-length* RAGE mit dem monoklonalen Antikörper 5328 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von Aktin verwendet. Zur Auswertung der Daten wurde der Mittelwert nach 360 min auf 100 % gesetzt und die anderen Werte in das prozentuale Verhältnis dazu. Danach wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet (N = 9).

### 3.2.2.4 Nachweis der Beteiligung einer Metalloproteinase

Um zu überprüfen, ob die Bindung eines Agonisten an die Rezeptoren bV<sub>2</sub> und OT zur Aktivierung von Metalloproteinasen führt, wurden Experimente mit dem Breitspektrum-Matrixmetalloproteinase-Inhibitor GM6001, einem MMP- und ADAM-Inhibitor, durchgeführt. Nach einer einstündigen Vorinkubation mit GM6001 (20 µM) wurde AVP bzw. OT (beide 300 nM) für zwei Stunden zu den bV<sub>2</sub>/RAGE- bzw. OTR/RAGE-überexprimierenden Zellen gegeben. In Bild 3.33 ist zu sehen, dass die Behandlung mit GM6001 zu einer deutlichen Verringerung der Menge an sekretiertem RAGE im Vergleich zu den mit Hormon behandelten Proben führte.



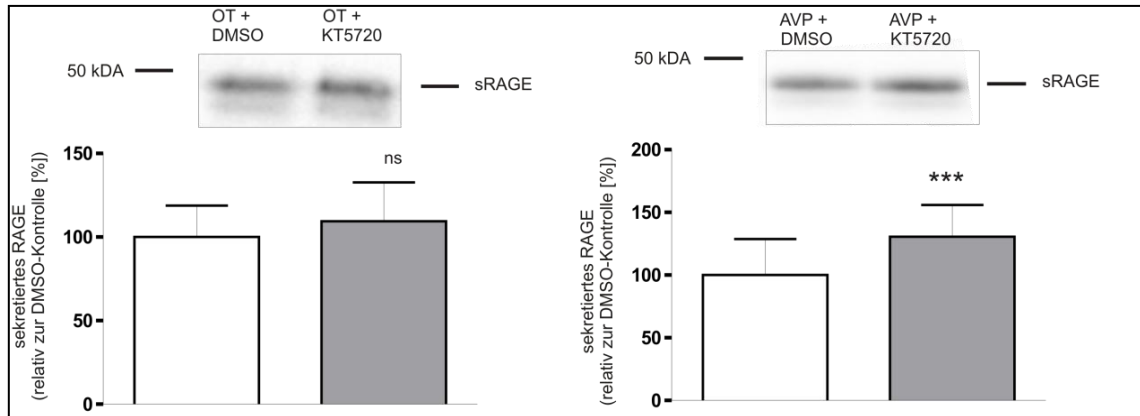
**Bild 3.33: Inhibierung von Metalloproteinasen mit GM6001**

OTR- bzw.  $bV_2$ - und RAGE-überexprimierende Zellen wurden eine Stunde mit GM6001 (20  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und dann zwei Stunden mit OT bzw. AVP (beide 300 nM) stimuliert. Die Auftrennung der gefällten Proteine des Überstandes erfolgte mittels SDS-PAGE und der Nachweis von sRAGE wurde mit dem polyklonalen Antikörper 3260 durchgeführt. Die Daten wurden ausgewertet, indem der Mittelwert der DMSO-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins prozentuale Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001).

### 3.2.2.5 Signaltransduktionswege des OTR- und $V_2$ -Rezeptors

#### 3.2.2.5.1 Proteinkinase A

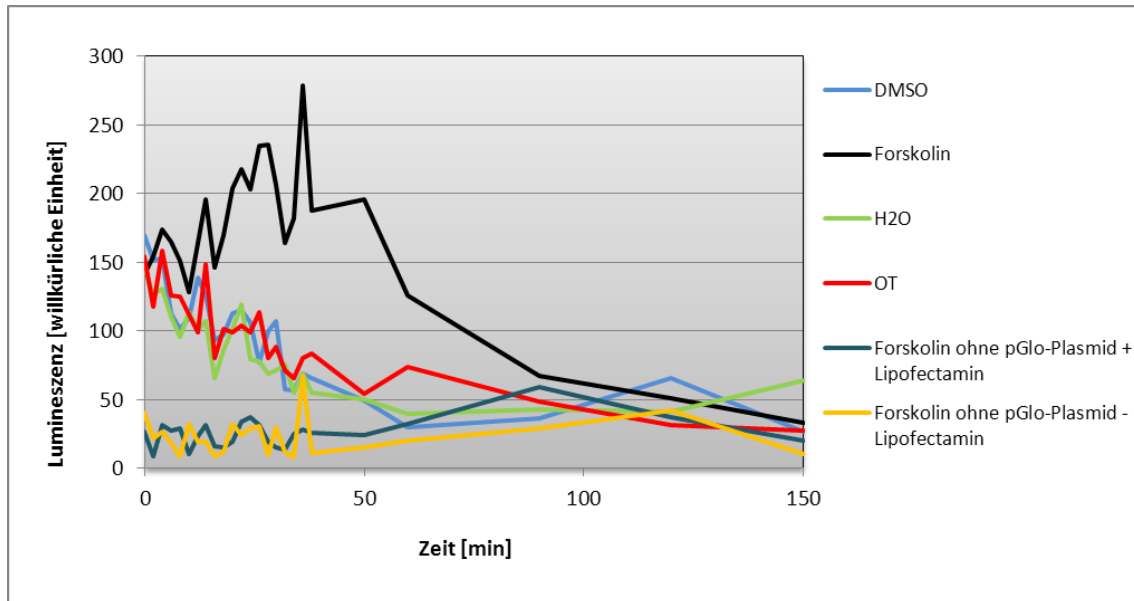
Um zu kontrollieren, ob die Proteinkinase A an der Stimulierung der Proteolyse über den Vasopressin- oder Oxytocin-Rezeptor beteiligt ist, wurde der spezifische PKA-Inhibitor KT5720 (1  $\mu$ M) verwendet. Nach einstündiger Vorinkubation und zweistündiger Inkubation mit AVP oder OT (300 nM) wurden die Proteine im Überstand ausgefällt. Die Entwicklung der Proben auf einem Western Blot ergab, dass der Inhibitor keinen Einfluss auf die durch den OT-Rezeptor vermittelte Stimulierung hat, aber beim Vasopressin-Rezeptor war eine geringe Steigerung der sRAGE Menge im Überstand um 30 % nachweisbar (siehe Bild 3.34).



**Bild 3.34: Inhibierung der Proteinkinase A mit KT5720**

OTR- bzw.  $bV_2$ -RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor KT5720 ( $1 \mu\text{M}$ ) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit Oxytocin oder Arginin-Vasopressin (beide  $300 \text{ nM}$ ) inkubiert. Der Nachweis von sRAGE wurde nach TCA-Fällung der Proteine im Überstand und Auftrennung über SDS-PAGE mit dem polyklonalen Antikörper 3260 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben ( $N = 18$ ;  $ns = P > 0,05$ ;  $*** = P < 0,001$ ).

Beim OT-Rezeptor ist zwar bisher keine Stimulierung der Adenylatzyklase sowie nachfolgend der Proteinkinase A in der Literatur beschrieben worden, aber um dies auch für das vorliegende Zellsystem sicherzustellen, wurde bei den OTR/RAGE-Zellen die Veränderung der cAMP-Konzentration nach Behandlung mit dem Hormon ( $300 \text{ nM}$ ) gemessen. Sollte der Rezeptor die Adenylatzyklase aktivieren, würde dies zu einem Anstieg der Menge an cAMP führen und schließlich zu einer gesteigerten Lumineszenz. Die Ergebnisse der Messung sind in Bild 3.35 abgebildet. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Forskolin ( $1 \mu\text{M}$ ), einem Aktivator der Adenylatzyklase, behandelt. Dies führte zu einer deutlichen Steigerung der Synthese von cAMP im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 30 bis 40 Minuten. Nach der Zugabe von OT war im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle dagegen keine Veränderung in der cAMP-Menge zu detektieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch die Überexpression des OT-Rezeptors nicht zu einer Kopplung mit der Adenylatzyklase bzw. Aktivierung der Proteinkinase A führt.

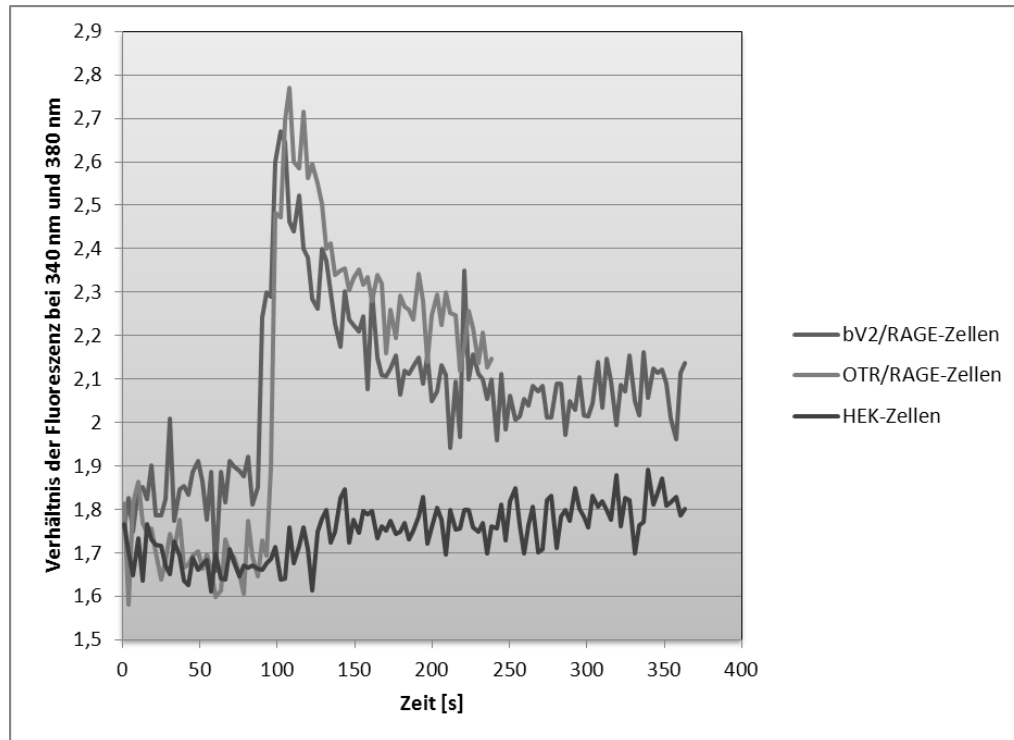


**Bild 3.35: Messung der Veränderung der cAMP-Konzentration bei OTR/RAGE-Zellen nach Stimulierung mit Oxytocin**

OTR/RAGE-Zellen wurden auf 96-Loch-Platten ausgesät und mit dem pGloSensor-20F cAMP-Plasmid transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit OT (300 nM), Forskolin (1  $\mu$ M) oder DMSO bzw. H<sub>2</sub>O. Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei 0 Minuten, die Lumineszenz wurde dann über 150 Minuten gemessen und die Mittelwerte in obiges Diagramm eingetragen (N = 3).

### 3.2.2.5.2 Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zugabe von OT bzw. AVP

Einer der Signalwege, der nach Bindung von OT an den Oxytocin-Rezeptor aktiviert wird, führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration (Jeng *et al.*, 1996). Daher wurde überprüft, ob eine Stimulierung dieses Signals auch nach Zugabe von OT zu OTR/RAGE-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden kann. Der V<sub>2</sub>-Rezeptor wurde ebenfalls untersucht, obwohl dieser charakteristischerweise nicht das Ca<sup>2+</sup>-Signal beeinflusst. Wie zu erwarten, ist nach Zugabe von OT (300 nM) bei den OTR/RAGE-Zellen ein starker Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration zu beobachten (siehe Bild 3.36). Überraschenderweise resultiert auch die AVP-Behandlung (300 nM) der bV<sub>2</sub>/RAGE-Zellen in einer schnellen Erhöhung dieses *second messengers* im Zytosol. Der Zusatz von AVP und OT zu den HEK-Zellen führte zu keiner Änderung der Signalstärke.

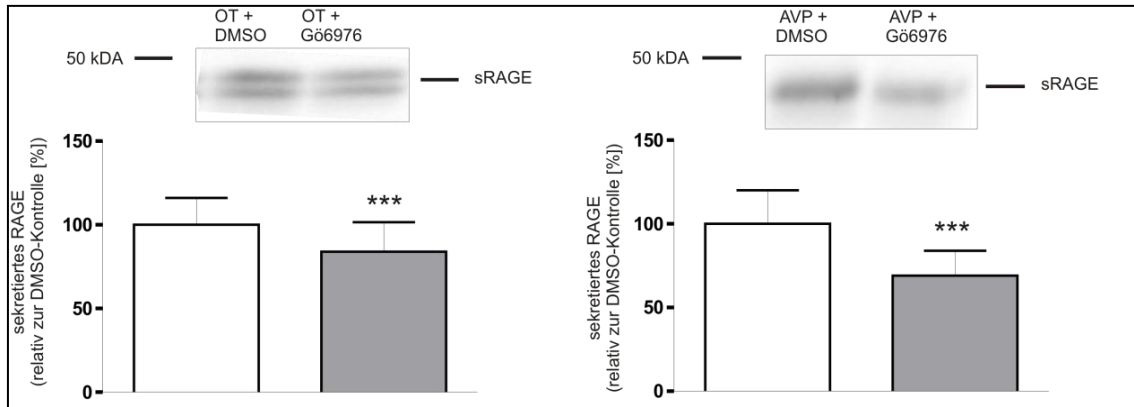


**Bild 3.36: Messung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in OTR- und bV<sub>2</sub>/RAGE-Zellen**

OTR/RAGE- oder bV<sub>2</sub>/RAGE-überexprimierende Zellen sowie HEK-Zellen als Negativkontrolle wurden eine halbe Stunde mit dem Farbstoff Fura-2/AM inkubiert. Nach dem Ernten wurden sie in Calciumpuffer (siehe Kapitel 2.2.3.11) resuspendiert und die Messung in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Die Zugabe von OT bzw. AVP (final 300 nM) erfolgte nach 100 s. Bei den HEK-Zellen wurde OT nach 200 s und AVP nach 300 s zugegeben.

### 3.2.2.5.3 Proteinkinase C

Die Behandlung der OTR/RAGE- bzw. bV<sub>2</sub>/RAGE-überexprimierenden Zellen mit dem spezifischen Inhibitor der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PKCs Gö6976 (1 μM, PKCα (IC<sub>50</sub>= 2,3 nM) und PKCβ (IC<sub>50</sub>= 6,2 nM)) führte sowohl bei den mit Oxytocin als auch mit Vasopressin (beide 300 nM) stimulierten Zellen zu einer verminderten Sekretion von sRAGE. Diese betrug 31 % bei Vasopressin-Rezeptor exprimierenden Zellen und 16 % bei den Oxytocin-Rezeptor exprimierenden Zellen im Vergleich zu den nur mit DMSO behandelten Kontrollen (siehe Bild 3.37). Dies lässt auf eine Beteiligung der Isozyme PKCα und PKCβ schließen.

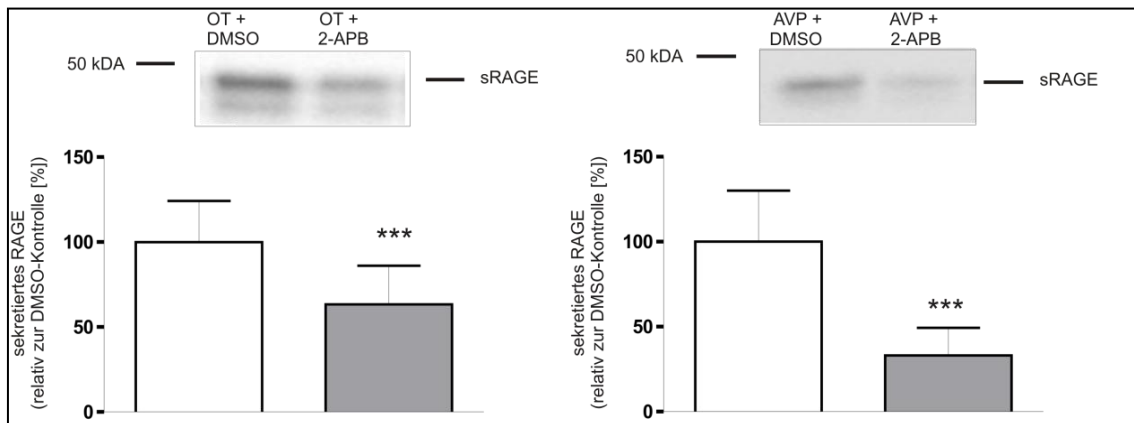


**Bild 3.37: Inhibierung der Proteinkinase C mit Gö6976**

OTR- bzw.  $bV_2$ -RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor Gö6976 (1  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit Oxytocin bzw. Arginin-Vasopressin (beide 300 nM) inkubiert. Der Nachweis von sRAGE im Western Blot wurde mit dem polyklonalen Antikörper 3260 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 18; \*\*\* = P < 0,001).

#### 3.2.2.5.4 $IP_3$ -Rezeptor

Die zeitgleiche Behandlung von OTR/RAGE- und  $bV_2$ /RAGE-Zellen mit 2-APB (75  $\mu$ M) sollte zeigen, ob die Proteolyse von einer intrazellulären Steigerung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration abhängig ist.



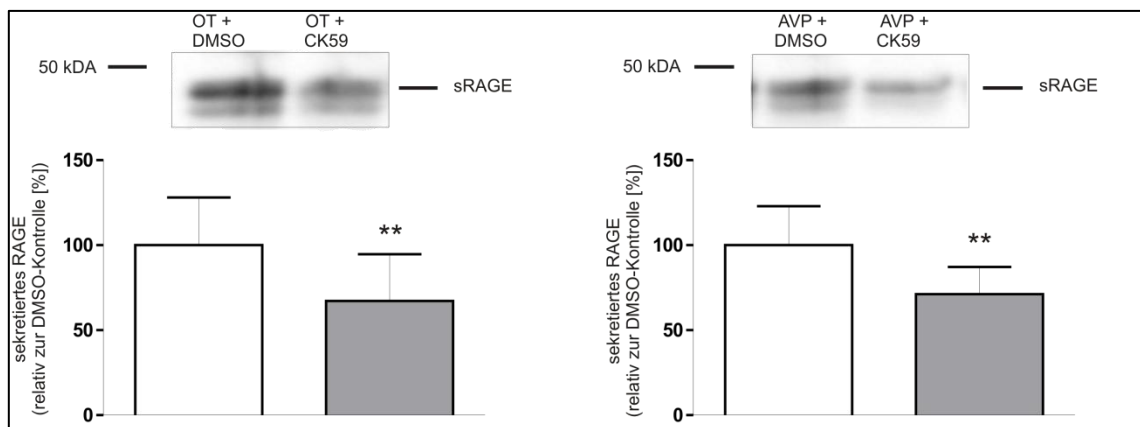
**Bild 3.38: Blockierung des  $IP_3$ -Rezeptors mit 2-APB**

OTR- bzw.  $bV_2$ -RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor 2-APB (75  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit Oxytocin bzw. Arginin-Vasopressin (beide 300 nM) inkubiert. Der Nachweis von sRAGE wurde nach TCA-Fällung der Proteine im Überstand und SDS-PAGE mit dem polyklonalen Antikörper 3260 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 18; \*\*\* = P < 0,001).

Bild 3.38 zeigt, dass dies der Fall war und zwar konnte bei den OTR/RAGE-Zellen eine 40 %ige Abnahme von sRAGE im Überstand beobachtet werden, bei den  $bV_2$ /RAGE-Zellen betrug diese sogar 70 %.

### 3.2.2.5.5 $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Da sowohl der Oxytocin- (Blanks *et al.*, 2007) als auch Vasopressin-Rezeptor (Balasubramanian *et al.*, 2008) eine Stimulierung von CaM-Kinasen auslösen können, wurde der Inhibitor CK59 (20  $\mu$ M) an beiden Zelllinien getestet.



**Bild 3.39:** Inhibierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II mit CK59

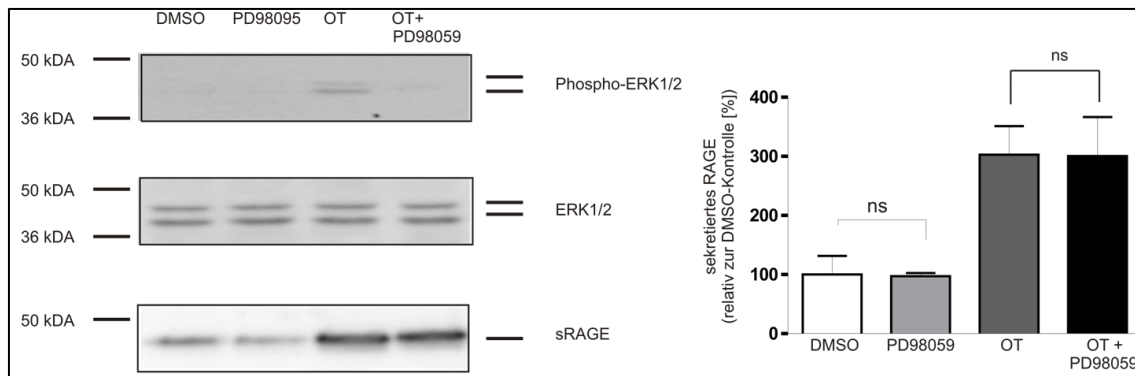
OTR- bzw.  $bV_2$ -RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor CK59 (20  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit Oxytocin bzw. Arginin-Vasopressin (beide 300 nM) inkubiert. Lösliches RAGE wurde nach Proteinfällung des Überstands und Auftrennung über SDS-PAGE mit dem polyklonalen Antikörper 3260 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 12; \*\* = P < 0,01).

Dies führte nach Stimulierung mit dem jeweiligen Hormon (beide 300 nM) zu einer Verringerung der RAGE-Sekretion von etwa 35 % im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen (siehe Bild 3.39).

### 3.2.2.5.6 MAP-Kinase-Weg

Die beiden GPCRs OTR und  $V_2R$  besitzen außerdem die Möglichkeit, den MAP-Kinase-Weg zu aktivieren (Ohmichi *et al.*, 1995; Charest *et al.*, 2007). Um die Effizienz des eingesetzten Inhibitors PD98059 zu überprüfen, wurde auch der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 detektiert. Der Nachweis von Phospho-ERK1/2 in den Lysaten der OTR/RAGE-Zellen ergab nach Behandlung mit OT (300 nM) eine um das Vierfache er-

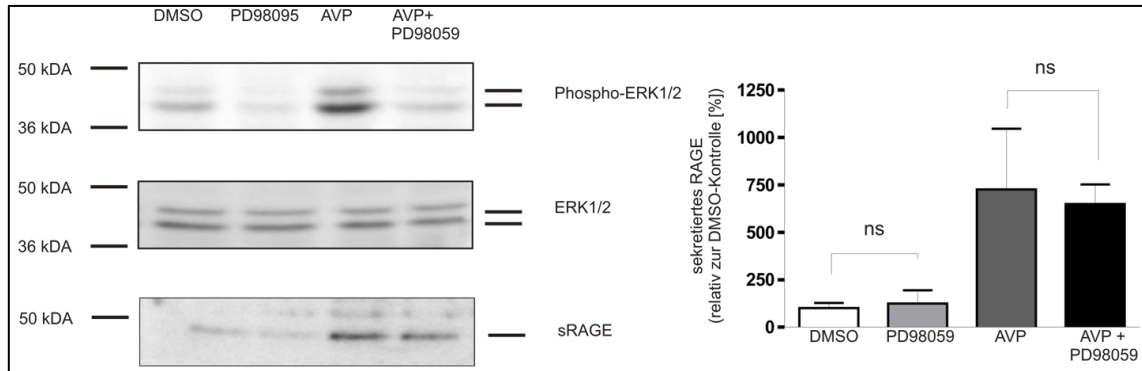
höhte Menge im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Inhibitor (50  $\mu\text{M}$ ) konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 fast komplett unterdrückt werden (siehe Bild 3.40). Dahingegen hatte PD98059 keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit des RAGE-*Sheddings*. Eine Beteiligung des MAP-Kinase-Weges an der vermehrten Proteolyse nach Aktivierung des OT-Rezeptors kann also ausgeschlossen werden.



**Bild 3.40: Inhibierung von ERK1/2 bei OTR/RAGE-Zellen und Nachweis des Phosphorylierungsstatus**

OTR/RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit Oxytocin (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper 3260. Die Zellen wurden in Lämmli- und Lysispuffer (2x Lämmli-Puffer/100 mM DTT + Lysispuffer, 1:1) geerntet und die Proteine ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von ERK1/2 und Phospho-ERK1/2 wurde mit polyklonalen Antikörpern von Cell Signaling durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; ns = P > 0,05).

Derselbe Versuch wurde auch mit  $\text{bV}_2$ /RAGE-überexprimierenden Zellen durchgeführt. Die Stimulierung mit AVP (300 nM) führte zu einer dreifachen Erhöhung der Phosphorylierung von ERK1/2 und konnte in Anwesenheit des Inhibitors (50  $\mu\text{M}$ ) komplett unterdrückt werden (siehe Bild 3.41). Allerdings hatte der Phosphorylierungsstatus bei dieser Zelllinie ebenfalls keinen Einfluss auf die gebildete Menge an sRAGE. Diese war sowohl in An- als auch in Abwesenheit von PD98059 nach Stimulierung mit dem Hormon um das Siebenfache erhöht. Also scheint auch der  $\text{V}_2$ -Rezeptor die RAGE-Proteolyse ohne die Beteiligung des MAP-Kinase-Weges zu aktivieren.

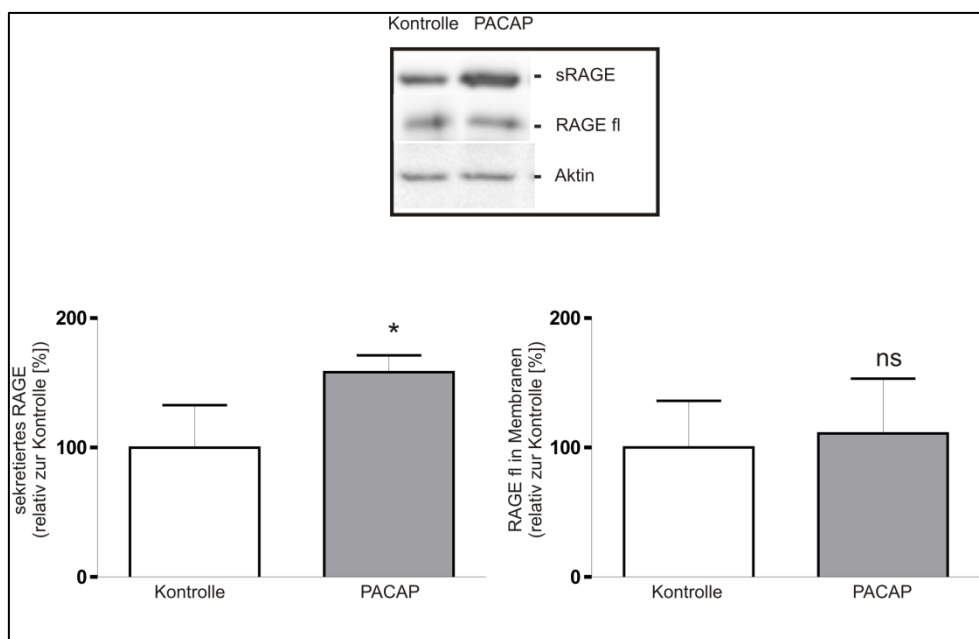


**Bild 3.41: Inhibierung von ERK1/2 bei  $bV_2$ /RAGE-Zellen und Nachweis des Phosphorylierungsstatus**

$bV_2$ /RAGE-Zellen wurden eine Stunde mit PD98095 (50  $\mu$ M) bzw. DMSO vorinkubiert und danach zwei Stunden entweder mit AVP (300 nM) oder als Kontrolle ohne Hormon inkubiert. Der Nachweis von sRAGE erfolgte nach TCA-Fällung der Proteine im Überstand und Auftrennung über SDS-PAGE mit dem polyklonalen Antikörper 3260. Die Zellen wurden in Lämmli- und Lysispuffer (2x Lämmli/100 mM DTT + Lysispuffer, 1:1) geerntet und die Proteine ebenfalls über SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis von ERK1/2 und Phospho-ERK1/2 wurde mit polyklonalen Antikörpern von Cell Signaling durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; ns = P > 0,05).

### 3.2.3 Stimulierung der RAGE-Proteolyse *in vivo*

Zur Überprüfung, ob die Proteolyse von RAGE auch *in vivo* stimuliert werden kann, wurden die Lungen von APP[V717I] Mäusen, die drei Monate mit PACAP-38 behandelt worden waren, auf sekretiertes RAGE und *full-length* RAGE untersucht. APP[V717I] Mäuse besitzen eine Mutation im APP-Gen, die bewirkt, dass die Bildung von A $\beta$  stark erhöht ist.



**Bild 3.42: Einfluss einer intranasalen PACAP-Behandlung auf die Proteolyse von RAGE in murinen Lungen**

APP[V717I] Mäuse wurden drei Monate mit PACAP-38 behandelt und danach wurden die Lungen der Mäuse entnommen. Von diesen wurden die löslichen Proteine von den Membranproteinen isoliert, die Proben in Nu-PAGE-Puffer/DTT aufgenommen und per SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper 1179 im Western Blot. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte dazu ins Verhältnis. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben ( $N = 6$ ,  $ns = P > 0,05$ ;  $* = P < 0,05$ ).

Nach dem Trennen der löslichen Proteine und der Membranproteine wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von RAGE im Western Blot ergab eine um 60 % größere Menge an sRAGE bei den Tieren, die mit PACAP-38 behandelt worden waren, verglichen zur Kontrollgruppe (siehe Bild 3.42 links). In den Membranen konnte kein Unterschied in der *full-length* RAGE-Konzentration detektiert werden (siehe Bild 3.42 rechts). Dies liegt vermutlich an der starken Expression des Proteins in der Lunge.

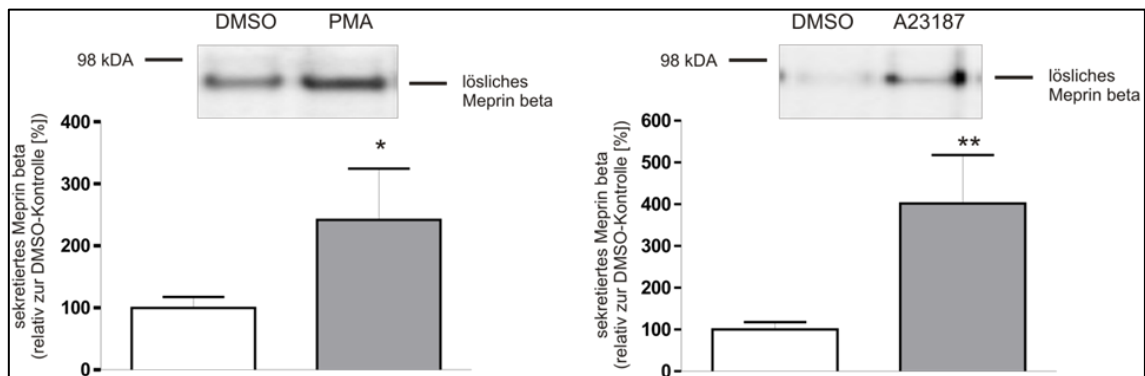
### 3.3 Untersuchungen zur Proteolyse von Meprin $\beta$

Meprin  $\beta$  ist ein multimeres Transmembranprotein, das zur Astacin-Familie der zink-abhängigen Metalloproteinasen gehört. Zu seinen Substraten zählen Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18, TGF- $\alpha$  und APP. Meprin  $\beta$  besitzt die Eigenschaften einer  $\beta$ -Sekretase

und könnte bei der Entstehung der AD eine Rolle spielen (Jefferson *et al.*, submitted). Weiterhin ist bekannt, dass Meprin  $\beta$  durch *Ectodomain Shedding* von der Zelloberfläche freigesetzt werden kann (Hahn *et al.*, 2003).

### 3.3.1 Stimulierung der Proteolyse von Meprin $\beta$ mit PMA und einem $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor

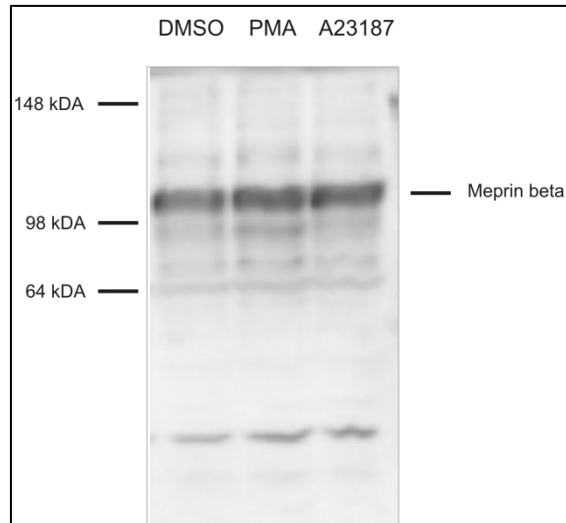
Zunächst sollte geklärt werden, ob die Proteolyse von überexprimiertem Meprin  $\beta$  in HEK-Zellen durch Behandlung mit PMA (1  $\mu\text{M}$ ) und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor (A23187, 1  $\mu\text{M}$ ) stimulierbar ist. Dazu wurden diese Zellen drei Stunden in Anwesenheit der Aktivatoren bei 37°C inkubiert. In Bild 3.43 sind die detektierten löslichen Meprin  $\beta$  Mengen in den Überständen gezeigt. Sowohl mit PMA als auch mit A23187 ist eine Stimulierbarkeit des *Sheddings* zu erkennen. Mit dem Phorbol ester sind die sekretierten Mengen des Proteins ungefähr 2,5-fach höher im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor um das Vierfache.



**Bild 3.43: Stimulierung von Meprin  $\beta$ -überexprimierenden Zellen mit PMA und A23187**

Meprin  $\beta$ -überexprimierende HEK-Zellen wurden drei Stunden mit PMA (1  $\mu\text{M}$ ) bzw. A23187 (1  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Danach erfolgten die Fällung der Proteine im Überstand mittels TCA und die Trennung über eine SDS-PAGE. Der Nachweis von löslichem Meprin  $\beta$  wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen Meprin  $\beta$  durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student'schen T-Test für unabhängige Stichproben (N = 4; \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01).

Die Lysate der behandelten Zellen wurden ebenfalls auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis von *full-length* Meprin  $\beta$  zeigte, dass keine Abnahme des Proteins nach Stimulierung mit den beiden Substanzen zu erkennen war (siehe Bild 3.44).

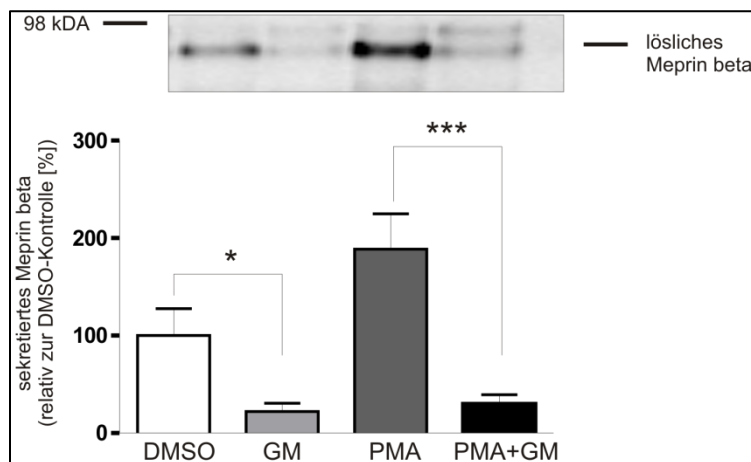


**Bild 3.44: Zelllysate von Meprin  $\beta$ -überexprimierenden Zellen nach Stimulierung mit PMA und A23187**

Nach Behandlung mit DMSO, PMA bzw. A23187 (siehe Bild 3.43) wurden die Proteine von Meprin  $\beta$ -Zelllysaten über eine SDS-PAGE aufgetrennt und Meprin  $\beta$  mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers im Western Blot nachgewiesen.

### 3.3.2 Nachweis der Beteiligung von Metalloproteinasen

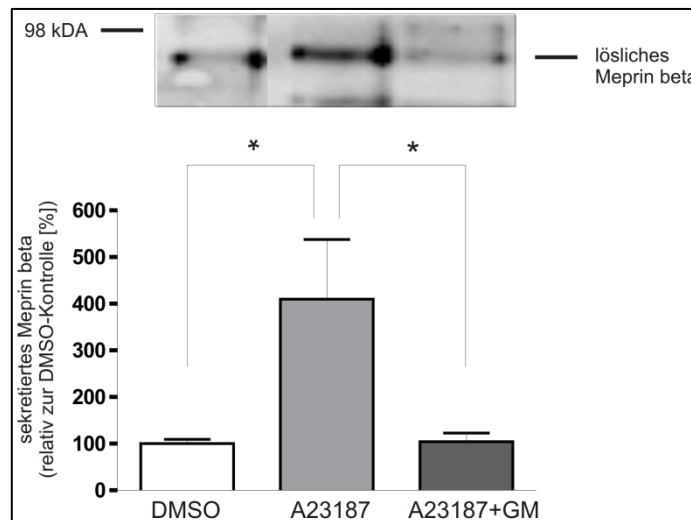
Um den Nachweis zu erbringen, dass die Proteolyse von Metalloproteinasen abhängig ist, wurden die Meprin  $\beta$ -überexprimierenden Zellen in An- und Abwesenheit von GM6001 (25  $\mu$ M) mit PMA (1  $\mu$ M) bzw. A23187 (1  $\mu$ M) stimuliert.



**Bild 3.45: Stimulierung mit PMA und zeitgleiche Inhibierung mit GM6001**

Meprin  $\beta$ -überexprimierende Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor GM6001 (25  $\mu$ M) vorinkubiert und danach drei Stunden mit PMA (1  $\mu$ M) behandelt. Die gefällten Proteine der Überstände wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit einem Antikörper gegen Meprin  $\beta$  wurde das sekretierte Protein im Western Blot nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; \* = P < 0,05; \*\*\* = P < 0,001).

Außerdem wurden, um zu überprüfen, ob auch am basalen *Shedding*-Prozess Metalloproteinasen beteiligt sind, nicht-stimulierte Zellen mit GM6001 behandelt. Die Ergebnisse sind in Bild 3.45 und Bild 3.46 gezeigt. Sowohl das durch PMA stimulierte als auch das basale *Shedding* sind durch die Zugabe von GM6001 inhibierbar. Die durch PMA induzierte Proteolyse kann komplett blockiert werden und liegt unter dem Niveau der DMSO-Kontrolle.



**Bild 3.46: Stimulierung mit A23187 und zeitgleiche Inhibierung mit GM6001**

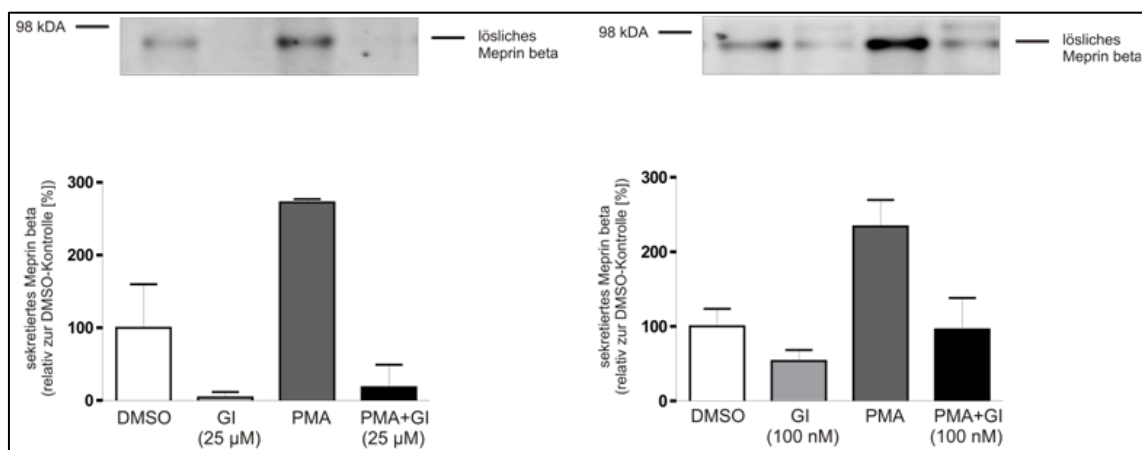
Meprin  $\beta$ -überexprimierende Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor GM6001 (25  $\mu$ M) vorinkubiert und danach drei Stunden mit A23187 (1  $\mu$ M) behandelt. Die gefällten Proteine der Überstände wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit einem Antikörper gegen Meprin  $\beta$  wurde das sekretierte Protein im Western Blot nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Bonferoni-Test (N = 3; \* = P < 0,05).

Auch die Steigerung der durch A23187 (1  $\mu$ M) gebildeten Mengen an löslichem Meprin  $\beta$  kann durch Verwendung dieses Breitspektrum-Matrixmetalloproteinase-Inhibitors (25  $\mu$ M) komplett unterbunden werden und die sekretierten Mengen entsprechen dann der DMSO-Kontrolle.

### 3.3.3 Identifizierung der Meprin $\beta$ -spaltenden Protease

Um die Meprin  $\beta$ -spaltende Protease genau zu identifizieren, wurden die Zellen mit dem Inhibitor GI254023X behandelt. Dies ist ein spezifischer Inhibitor für ADAM-10 (IC<sub>50</sub>= 5,3 nM), ADAM-17 (IC<sub>50</sub>= 541 nM) hingegen wird bedeutend schlechter ge-

hemmt. Beide Proteasen sind dafür bekannt, dass sie für eine Vielzahl von *Shedding*-Prozessen verantwortlich sind. Der Inhibitor wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: in einer hohen von 25  $\mu\text{M}$ , in der beide Proteasen inhibiert werden, sowie einer niedrigeren (100 nM), bei der nur ADAM-10 inhibiert wird (siehe Bild 3.47).



**Bild 3.47: Stimulierung mit PMA und zeitgleiche Inhibierung von ADAM-10 bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors GI254023X**

Meprin  $\beta$ -überexprimierende Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor GI254023X (links: 25  $\mu\text{M}$  und rechts: 100 nM) vorinkubiert und danach drei Stunden mit PMA (1  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die gefällten Proteine der Überstände wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit einem Antikörper gegen Meprin  $\beta$  wurde das sekretierte Protein im Western Blot nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Mittelwert der Kontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt (N = 3).

Die Stimulierung mit PMA (1  $\mu\text{M}$ ) bei gleichzeitiger Behandlung mit GI254023X (25  $\mu\text{M}$  und 100 nM) führte zu einer vollständigen Inhibierung der Proteolyse von Meprin  $\beta$ , wobei diese unter Einsatz von 25  $\mu\text{M}$  etwas stärker war. Auch das basale *Shedding* konnte unterdrückt werden. ADAM-10 scheint also einen großen Anteil an der Spaltung von Meprin  $\beta$  zu haben. Allerdings kann auch eine Beteiligung von ADAM-17 oder anderen zinkabhängigen Metalloproteinasen (z.B. MMP-9) nicht ausgeschlossen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Receptor for Advanced Glycation Endproducts

Eine erhöhte Expressionsrate von RAGE konnte bei einer Vielzahl von Erkrankungen festgestellt werden, dazu zählen Diabetes, Arteriosklerose, Alzheimer-Demenz und Krebs. Die Inhibition der Wechselwirkung von RAGE mit seinen Liganden führte in einer Reihe von Versuchen an Mausmodellen zu einer Verbesserung des Krankheitszustandes (Goova *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2010). Daher war es das primäre Ziel in dieser Arbeit herauszufinden, über welche Wege eine Stimulierung der regulierten Proteolyse (*Shedding*) von RAGE erfolgen kann, um dieses Wissen möglicherweise für therapeutische Zwecke einsetzen zu können.

#### 4.1.1 Spaltung durch MMP-9 und ADAM-10 an der Zelloberfläche

Die Behandlung RAGE-exprimierender HEK-Zellen mit PMA führte in vorangegangenen Versuchen zu einer gesteigerten Bildung von löslichem RAGE (sRAGE), aber keiner Abnahme von *full-length* RAGE in den Zelllysaten (Zhang *et al.*, 2008). Weil eine bedeutende Menge des Rezeptors nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch intrazellulär (im Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und in Vesikeln) vorliegt, stellte sich daher die Frage, ob die Spaltung des Proteins tatsächlich an der Zellmembran stattfindet. Nach Biotinylierung aller Zelloberflächenproteine der RAGE-exprimierenden Zellen und Behandlung mit PMA konnte eine gesteigerte Menge an biotinyliertem sRAGE im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Damit wurde bewiesen, dass die Proteolyse an der Zellmembran durchgeführt wird (siehe Bild 3.1 A, rechts). Allerdings war die gebildete Menge an sRAGE etwas geringer im Vergleich zum Versuch ohne vorherige Biotinylierung (siehe Bild 3.1 A, links). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Teil von RAGE auch intrazellulär gespalten wird. Es ist zwar bekannt, dass ein Großteil aller *Shedding*-Prozesse an der Zelloberfläche stattfindet, aber einige Proteasen (z.B. ADAM-10, ADAM-17) können auch intrazellulär spalten

(Seals und Courtneidge, 2003). Weitere Gründe können sein, dass die Biotinylierung von ADAM-10, das sich ebenfalls an der Zelloberfläche befindet, zu einer geringeren Aktivität dieser Protease führt oder dass biotinyliertes RAGE ein schlechteres Substrat als unbiotinyliertes RAGE ist. Eine Abnahme von *full-length* RAGE ist lediglich dann nachweisbar, wenn nur das biotinylierte RAGE an der Zelloberfläche nachgewiesen wird. Im Gesamt-Zelllysate hingegen war keine Veränderung detektierbar. Auch nach Stimulierung der Proteolyse von APP ist keine Abnahme der gesamten APP-Menge in den Zelllysaten nachweisbar (Racchi *et al.*, 1999), bei diesem Protein findet die Spaltung ebenfalls hauptsächlich an der Zelloberfläche statt (Parvathy *et al.*, 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, dass APP von ADAM-10 auch innerhalb des trans-Golgi-Netzwerks gespalten wird (Skovronsky *et al.*, 2000).

Auf Grund der Tatsache, dass die Proteolyse von RAGE durch den Breitspektrum-Matrixmetalloproteinase Inhibitor GM6001 verhindert werden kann (Zhang *et al.*, 2008), wurde zur Charakterisierung der RAGE-spaltenden Proteasen der Einfluss eines *knock down* von ADAM-10, ADAM-17, MMP-2 und MMP-9 auf die Bildung von sRAGE untersucht. Dies führte zu dem Ergebnis, dass sowohl ADAM-10 als auch MMP-9 als *Sheddases* für RAGE identifiziert wurden (siehe Bild 3.2). Dies wird durch die Arbeiten von anderen Forschungsgruppen, die ADAM-10 ebenfalls als Protease für RAGE identifiziert haben, bestätigt (Galichet *et al.*, 2008; Raucci *et al.*, 2008). Auch der Nachweis, dass in Fibroblasten von ADAM-10 *knock out*-Mäusen bedeutend weniger sRAGE gebildet wird, stützt dieses Ergebnis. Der *knock-out* von ADAM-9 und ADAM-17 hatte keinen Einfluss auf die Entstehung von sRAGE (Raucci *et al.*, 2008). Die Beobachtung, dass trotz des Fehlens von ADAM-10 immer noch eine geringe Menge an sRAGE gebildet wird, ist ein Hinweis darauf, dass mindestens eine weitere Protease an dem Prozess beteiligt ist. Und wie während dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist eine davon MMP-9.

Sowohl die Mitglieder der ADAMs als auch der MMPs sind für ihre Funktion als *Sheddases* bekannt. ADAM-10 und ADAM-17 gehören zu den bekanntesten Proteasen von Zelloberflächenproteinen und sind unter anderem für das *Shedding* von N-Cadherin (Reiss *et al.*, 2005), Notch (Pan und Rubin, 1997), APP (Lammich *et al.*, 1999),

Tumornekrosefaktoren (Peschon *et al.*, 1998) und VCAM-1 (Garton *et al.*, 2003) verantwortlich. MMP-9 ist als *Sheddase* für ICAM-1 (Fiore *et al.*, 2002), E-Cadherin (Symowicz *et al.*, 2007), APP (Talamagas *et al.*, 2007) und VEGF (Belotti *et al.*, 2003) nachgewiesen worden. Daher ist eine Beteiligung von ADAM-10 und MMP-9 an der Spaltung von RAGE naheliegend.

#### 4.1.2 RAGE-Spaltungsstelle und Dimerisierungsregion

In der Literatur ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass es meist keine spezifische Sequenz gibt, die von den Metalloproteasen erkannt wird. Sondern vielmehr scheint der Abstand der Spaltstelle zur Plasmamembran und die Sekundärstruktur in der Nähe dieser Stelle entscheidend zu sein, ob ein Protein dem *Ectodomain Shedding* unterliegt oder nicht (Hayashida *et al.*, 2010). Ähnliche Erkenntnisse lieferten auch die durchgeführten Versuche in der vorliegenden Arbeit. Bei der RAGE-Mutante 1 wurden neun Aminosäuren, die sich zwischen der Spaltstelle und der Transmembranregion befinden, ausgetauscht. Dabei wurden ungeladene gegen geladene Aminosäuren gewechselt, um eine Änderung der Sekundärstruktur herbeizuführen. Diese scheint auch stattgefunden zu haben. Hierfür spricht das veränderte Laufverhalten der mutierten RAGE-Formen 1 und 2 in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verglichen mit dem unveränderten *full-length* RAGE. Obwohl alle drei Proteine dieselbe Anzahl an Aminosäuren aufweisen, wandern die Mutanten 1 und 2 in der SDS-PAGE schneller. Solche Abweichungen sind auch für andere Proteine gezeigt worden, z.B. führte die Substitution einer einzigen Aminosäure in einem Histidin-Transport-Protein zu einem veränderten Laufverhalten im SDS-Gel (Noel *et al.*, 1979). Nach zweistündiger Inkubationszeit konnte eine lösliche Form der Mutante 1 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht war allerdings größer als die entsprechende sRAGE Form vom Wildtyp-RAGE und die Bildung dieser löslichen Variante war weder mit PMA noch mit APMA stimulierbar. Nach 15-minütiger Behandlung mit APMA konnte jedoch ein ebenfalls lösliches RAGE nachgewiesen werden, dessen Molekulargewicht allerdings nochmals höher war und ungefähr dieselbe Größe wie im Zelllysat hatte (siehe Bild 3.4 und Bild 3.5). Dies deutet daraufhin, dass die ursprüngliche Spaltstelle durch

die Änderung der darunterliegenden Sequenz nicht mehr erkannt wird und dass stattdessen an einer anderen Stelle, wahrscheinlich näher an der Plasmamembran, gespalten wird. Aber vermutlich von anderen Proteasen als normalerweise, da die Spaltung weder mit PMA noch mit APMA stimulierbar war. Auch bei APP, TGF- $\alpha$  sowie bei dem Neurotrophin-Rezeptor p75 sind die Sekundärstrukturen, die durch ca. 14 Aminosäuren an der Zelloberfläche ausgebildet werden, entscheidend für die Proteolyse durch Mitglieder der ADAM-Familie (Arribas *et al.*, 1997; Zampieri *et al.*, 2005).

Eine zusätzliche Änderung der Aminosäuresequenz bei der RAGE-Mutante 2, die auch die Spaltungsstelle betrifft (Austausch geladene gegen ungeladene AS), führte zur Entstehung von zwei verschiedenen löslichen Formen. Die Produktion der einen Form war wieder weder mit PMA noch mit APMA aktivierbar und entsprach etwa derselben Größe wie das gebildete Protein bei Mutante 1 nach Behandlung mit DMSO bzw. PMA. Da bei diesen beiden Mutanten die einzige gemeinsame Abweichung gegenüber dem Wildtyp-RAGE die neun Aminosäuren unterhalb der Spaltstelle sind, scheint diese Sequenz einen wichtigen Einfluss auf die Spaltung zu haben. Außerdem ist durch die geänderten Aminosäuren in der Sequenz, die normalerweise von ADAM-10 und MMP-9 gespalten wird, eine neue Spaltstelle N-terminal der alten entstanden. Dies wird dadurch deutlich, dass sowohl die mit PMA als auch mit APMA stimulierbaren Produkte ungefähr 5 kDa kleiner sind als sRAGE des Wildtyps. Das *Shedding* von Mutante 2 muss also auch von mindestens zwei verschiedenen Proteasen durchgeführt werden, da die eine stimulierbar ist und die andere nicht.

Bei RAGE-Mutante 3 wurden nur innerhalb der Transmembranregion die Glycine in dem Dimerisierungsmotiv GxxxG gegen Alanine ausgetauscht. Hierdurch sollte untersucht werden, ob z.B. eine mögliche Bindung von Proteasen an dieses Motiv verhindert wird. Das Protein besaß beim Nachweis im Zelllysat dieselbe Größe wie Wildtyp-RAGE und auch die Inkubation mit PMA und APMA führte zu derselben Proteingröße und Stimulierbarkeit wie bei sRAGE. Die Veränderung innerhalb der Transmembrandomäne kurz nach der Spaltungsstelle hat also keinen Einfluss auf das *Shedding*. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Proteolyse von APP. Auch hier wurde das

GxxxG-Motiv mutiert und es konnte kein veränderter Effekt durch ADAM-10 oder BACE-1 nachgewiesen werden (Munter *et al.*, 2007).

Zong und Kollegen postulieren, dass die V-Domäne von RAGE verantwortlich für die Dimerisierung des Proteins ist (Zong *et al.*, 2010). Um dies zu überprüfen und die mögliche Region innerhalb der V-Domäne zu bestimmen, wurde in HEK-Zellen RAGE-His und  $\Delta$ V RAGE-HA oder RAGE-His und RAGE $\Delta$ RLEW-His exprimiert. R(V/I/L)EW ist ein beschriebenes Dimerisierungsmotiv (Kostrewa *et al.*, 2001). Ob eine Dimerisierung von RAGE stattfand, wurde durch Reinigung über Ni-NTA-Säulen bestimmt. Erstaunlicherweise hatten beide Mutationen keinen Einfluss auf das Dimerisierungsverhalten. Das bedeutet, dass trotz Deletion der V-Domäne eine Wechselwirkung zwischen den RAGE-Monomeren stattfand. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den bereits publizierten Ergebnissen von Zong. Da aber  $\Delta$ V RAGE-HA im Western Blot nur nachgewiesen werden konnte, wenn zuvor eine Bindung an RAGE-His stattgefunden hatte, ist wahrscheinlich noch eine weitere Region an der Dimerisierung beteiligt. Sehr häufig finden solche Wechselwirkungen in der Transmembranregion von Proteinen statt. Meist sind die Regionen durch spezifische Motive gekennzeichnet, wie z.B. das GxxxG-Motiv, das auch in der Sequenz von RAGE vorliegt (Russ und Engelman, 2000).

### 4.1.3 Synthese eines fluoreszierenden RAGE-Antikörpers

Das pMAL Proteinfusions- und Reinigungssystem von NEB ist normalerweise zur Expression eines gewünschten Proteins gedacht, das zunächst mit einem Maltosebindenden Protein fusioniert ist. Anschließend wird das Fusionsprotein an eine Amylose-Matrix gebunden und danach die beiden Proteine mit dem Faktor Xa gespalten, sodass das gewünschte Protein in gereinigter Form von der Säule eluiert werden kann (Gebrauchsanweisung von NEB, pMAL Protein Fusion & Purification System). In dieser Arbeit wurde die Methode in der Weise umfunktioniert, dass das Epitop, das der anti-RAGE Antikörper erkennt, mit dem Maltose-bindenden Protein fusioniert wurde (RAGE-MBP-Epi). Zur Expression in *E.coli* HMS wurde der Vektor pMAL-c2 verwendet, da bei diesem eine Synthese des Proteins ins Cytoplasma erfolgt. Wie in Bild 3.7 zu sehen, wurde die größte Menge von RAGE-MBP-Epi auch wie erwartet in der

zytosolischen Fraktion nachgewiesen und eine geringere Menge in den *Inclusion Bodies*. Diese entstehen bei einer starken Synthese von Proteinen und bestehen aus unvollständig gefaltetem Protein. Die Expression ins Cytoplasma ist daher wichtig, da mit dem Fusionsprotein sofort weitergearbeitet werden konnte und keine Rückfaltung aus den *Inclusion Bodies* durchgeführt werden musste. Nachdem das Fusionsprotein über Nacht an den zu reinigenden Antikörper gebunden hatte, wurden die Proteine auf eine Amylose-Säule gegeben. Dies hatte zur Folge, dass RAGE-MBP-Epi und gebundener Antikörper mit der Säule wechselwirkten und alle anderen Proteine aus dem Serum nach mehreren Waschschritten entfernt werden konnten. Die Elution erfolgte bei pH 2,0, da sich bei diesem pH-Wert die nicht-kovalenten Bindungen zwischen Antigen und Antikörper lösen. In Bild 3.8 ist zu sehen, dass nach der Elution geringe Mengen an Antikörper nachgewiesen werden konnten und dass die meisten sonstigen Proteine entfernt worden sind. Nur zwei Proteine um die 50 kDa sind noch zu erkennen, wobei knapp über 50 kDa möglicherweise die schweren Ketten des Antikörpers zu sehen sind. Die leichten Ketten (ca. 25 kDa groß) sind zwar nach der Elution (Spur 7-9) nicht mehr zu sehen, allerdings sind in Spur 1-3 (MBP-RAGE-Epi + AK vor/nach Säule und Waschfraktion 1) Proteine in der entsprechenden Größe sichtbar. Dies zeigt, dass die leichten Ketten von der Säule gewaschen werden konnten, aber dies mit den schweren Ketten nicht gelungen ist. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die schweren Ketten immer noch zu einer Wechselwirkung mit dem RAGE-Epitop fähig waren. Das unterhalb von 50 kDa nachgewiesene Protein entspricht RAGE-MBP-Epi, das nach Erniedrigung des pH-Werts ebenfalls von der Säule eluiert worden war. Um die beiden Verunreinigungen zu entfernen, wurde eine Reinigung über eine Microcon-Säule (Ausschlussgrenze 100 kDa) durchgeführt. In demselben Bild ist zu sehen, dass dies nur teilweise gelungen ist. Möglicherweise war der Antikörper bzw. die schwere Kette trotz des niedrigen pH-Wertes noch an RAGE-MBP-Epi gebunden und konnte auf Grund des zu hohen Molekulargewichts nicht über die Säule entfernt werden. Allerdings hatten diese Verunreinigungen keinen merklichen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Antikörpers. Diese wurde anhand eines Western Blots und von Mikroskopie-Aufnahmen getestet. Bei beiden Methoden ist eine deutliche Verbesserung gegenüber dem ungereinigten

Antikörper zu erkennen (siehe Bild 3.9 und Bild 3.10). Daher wurde er zur Kopplung mit einem Tetramethylrhodamin-markierten, Seitenketten-Maleinimid-funktionalisierten Polymer verwendet. Ob die Kopplung erfolgreich war, wurde zunächst mit einer Coomassie- bzw. Silberfärbung überprüft. Dadurch wurden viele Proteine unterschiedlicher Größe (oberhalb des Antikörpers) im Gel sichtbar gemacht. Dies deutet, genauso wie der Nachweis von Fluoreszenz bei denselben Größen, darauf hin, dass die Synthese erfolgreich war. Die Bindung von T4 Lysozym (T4L) mit Poly(PEGA) führte ebenfalls dazu, dass viele verschieden große Proteine oberhalb von T4L nach Coomassie-Färbung im SDS-Gel nachgewiesen werden konnten (Bays *et al.*, 2009). In der Zukunft kann dieser gekoppelte Antikörper nun dazu verwendet werden, um zu untersuchen, ob RAGE nach Bindung des Antikörpers diesen genauso wie z.B. A $\beta$  internalisiert. Danach können Nanopartikel hergestellt werden, die den anti-RAGE Antikörper an der Oberfläche tragen und im Inneren bestimmte Medikamente enthalten. Transportstudien sollten dann zeigen, ob die Substanzen auf diesem Weg spezifisch in RAGE-exprimierende Zellen eingebracht werden können.

## 4.2 Stimulierung der Proteolyse von RAGE über GPCRs

Ein *Ectodomain Shedding*-Prozess kann unter anderem durch nicht-physiologische Stimulatoren (PMA, APMA), Calcium-Ionophore oder durch Stimulierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) aktiviert werden (Hayashida *et al.*, 2010). Die gezielte und regulierte Proteolyse von RAGE könnte einen wichtigen Beitrag zur Therapie von Krankheiten leisten, an deren Entstehung der Rezeptor beteiligt ist. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden drei verschiedene GPCRs untersucht, die unterschiedliche Signaltransduktionswege beeinflussen.

### 4.2.1 Stimulierung der RAGE-Proteolyse über den PAC1-Rezeptor

#### 4.2.1.1 Bildung von sRAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PACAP und PMA

Die Behandlung von PAC1/RAGE-überexprimierenden Zellen mit PACAP-27 (300 nM) bzw. PMA (1  $\mu$ M) für 15 bis 360 Minuten führte zu einer schnellen Entstehung von

sRAGE. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf eine vermehrte Expression von RAGE zurückgeht, wurden die Zellen mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid behandelt. Die sRAGE Menge stieg in den ersten drei Stunden nahezu linear an und danach nur noch gering (siehe Bild 3.15 und Bild 3.16). Diese rasche Produktion des Spaltungsprodukts ist typisch für *Shedding*-Prozesse. Die Zugabe von PMA führt bereits nach zehn Minuten dazu, dass eine beträchtliche Anzahl der Oberflächenproteine gespalten wird (Arribas und Borroto, 2002). Ein Beispiel hierfür ist der Interleukin 6-Rezeptor, nach Zugabe von PMA ist bereits nach 40 Minuten eine erhebliche Menge an sekretiertem Protein nachweisbar (Mullberg *et al.*, 1992). Weitere Beispiele sind die Transmembranproteine L-Selectin und proTGF- $\alpha$ . Gesteigerte Mengen an sekretierten Proteinen konnten bereits nach 20 Minuten Behandlung mit PMA im Medium nachgewiesen werden (Arribas *et al.*, 1996). Eine geringe Abnahme von *full-length* RAGE im Zelllysate konnte nur nach sechsstündiger Behandlung mit PMA beobachtet werden, nicht jedoch in PACAP-behandelten Zellen. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied ist, dass PMA die Proteinkinase C direkt stimuliert und keine Signalwege dazwischengeschaltet sind wie nach Aktivierung des PAC1-Rezeptors (Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG, Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration). Außerdem ist die Stimulierung mit PMA langanhaltender, da es langsamer als DAG abgebaut wird. Die Aktivierung der PKC über den PAC1-Rezeptor ist des Weiteren von vielen Faktoren abhängig. Zum einen von der PAC1-Rezeptordichte sowie der eingesetzten PACAP-Konzentration, denn je höher die Anzahl der Rezeptormoleküle bzw. die Ligandenkonzentration, desto stärker ist die induzierte Proteolyse. Zum anderen wird eine Herabregulierung der PAC1-Rezeptor vermittelten Effekte herbeigeführt. Dies geschieht durch Phosphorylierung des Rezeptors, dadurch findet eine Konformationsänderung statt, die die Wechselwirkung mit den G-Proteinen verhindert oder zur Internalisierung des Rezeptors führt.

#### **4.2.1.2 Signaltransduktionswege des PAC1-Rezeptors und deren Einfluss auf die Proteolyse von RAGE**

Der PAC1-Rezeptor erhöht über die Kopplung mit G $\alpha_s$  die Konzentration an intrazellulärem cAMP und führt damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase A. Über diesen Weg werden neuroprotektive (Kienlen Campard *et al.*, 1997) und neurotrophe Effekte

(Contestabile *et al.*, 2005) von PACAP vermittelt. Daher wurde überprüft, ob die RAGE-Proteolyse auch über diesen Weg stimuliert werden kann. Allerdings führten sowohl die Inkubation von PAC1/RAGE-exprimierenden Zellen mit zwei verschiedenen Inhibitoren der PKA (siehe Bild 3.18 und Bild 3.19) als auch die Stimulierung der Adenylatzyklase mit Forskolin bzw. der PKA mit 8-Bromo-cAMP zu keiner Veränderung in der Bildung von sRAGE (siehe Bild 3.20). Daher kann eine Beteiligung dieses Signalweges ausgeschlossen werden. Bei dem durch PACAP vermittelten *Shedding* von APP konnte ebenfalls keine Mitwirkung der PKA nachgewiesen werden (Kojro *et al.*, 2006).

Durch Versuche mit den entsprechenden Inhibitoren konnte festgestellt werden, dass sowohl eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch die PKC-Isozyme  $\alpha/\beta$ I und die CaMKII-Kinase eine steigernde Wirkung auf die Produktion von sRAGE haben. Ein durch den PAC1-Rezeptor vermittelter Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist bekannt (Eggenberger *et al.*, 1999) und konnte auch in den PAC1/RAGE-exprimierenden Zellen mit Hilfe des Farbstoffs Fura-2/AM beobachtet werden (siehe Bild 3.21). Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wird durch die Bildung des *second messenger*  $\text{IP}_3$  ausgelöst.  $\text{IP}_3$  und DAG werden durch Spaltung von  $\text{PIP}_2$  durch die PLC gebildet.  $\text{IP}_3$  bindet daraufhin an  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums, was zur Öffnung dieser Liganden-gesteuerten Calcium-Kanäle führt. Durch die Verwendung eines Inhibitors, der die Öffnung der  $\text{IP}_3$ -abhängigen Calcium-Kanäle verhindert, konnte die PACAP-stimulierte Menge an sRAGE im Überstand stark verringert werden (siehe Bild 3.23).  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG aktivieren letztendlich gemeinsam die PKC. Die Proteinkinase C ist ein Schlüsselenzym bei der Aktivierung von *Ectodomain Shedding*-Prozessen (Hayashida *et al.*, 2010), wobei verschiedene PKC-Isozyme für das *Shedding* unterschiedlicher Substrate verantwortlich zu sein scheinen. Zum Beispiel ist PKC $\epsilon$  bei der Proteolyse von TNF $\alpha$  beteiligt (Wheeler *et al.*, 2003), PKC $\delta$  bei der Proteolyse des HB-EGF (*Heparin Binding Epidermal Growth Factor*) (Izumi *et al.*, 1998) und PKC $\delta$  und PKC $\eta$  beim *Shedding* des Interleukin-6 Rezeptors (Thabard *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit einem spezifischen Inhibitor die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Isozyme  $\alpha$  und/oder  $\beta$ I als verantwortliche PKCs bei der Stimulierung der RAGE-Proteolyse sowohl nach 30-minütiger als auch nach zweistündiger Inkubation mit PACAP-27 nachgewiesen werden

(siehe Bild 3.22 und Bild 3.26). Die Stimulierung der Spaltung von APP zu APP $\alpha$  durch ADAM-10 über Muskarinrezeptoren erfolgt ebenfalls über PKC $\alpha$  (Canet-Aviles *et al.*, 2002). Auch an der durch den PAC1-Rezeptor stimulierten Bildung von APP $\alpha$  spielt PKC eine wichtige Rolle (Kojro *et al.*, 2006). Die Beteiligung der CaMKII wurde untersucht, weil diese eine weitere Kinase ist, die durch erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in der Zelle aktiviert wird. Außerdem wurde bereits nachgewiesen, dass eine durch PACAP aktivierte Stimulierung von CaMKII möglich ist (Wong *et al.*, 2005). Allerdings ist eine Beteiligung dieses Proteins an der Induktion von *Shedding*-Prozessen bisher noch nicht beschrieben worden. Die Kinase ist aber, wie in Bild 3.24 gezeigt wird, in die Stimulierung der RAGE-Proteolyse involviert. Der MEK/ERK-Weg ist ein weiterer Signaltransduktionsweg, über den die Stimulierung vieler ADAM vermittelter *Ectodomain Shedding*-Prozesse stattfindet (Huovila *et al.*, 2005). Daher und weil bekannt ist, dass der PAC1-Rezeptor auch diesen Signalweg anschaltet (Villalba *et al.*, 1997; Moroo *et al.*, 1998), wurde eine Beteiligung dieser Enzyme an der RAGE-Proteolyse untersucht und konnte nachgewiesen werden. Eine verringerte Menge an sRAGE war nach Behandlung mit dem MEK1-Inhibitor nach zwei Stunden Behandlung mit PACAP-27 im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar, allerdings noch nicht nach 30-minütiger Behandlung mit dem Hormon (siehe Bild 3.25 und Bild 3.27 A). Dasselbe Bild ergibt sich bei Verwendung eines Inhibitors der PI3-Kinase (siehe Bild 3.27 B). Dies lässt darauf schließen, dass der MAPK-Weg und die PI3-Kinase zunächst nicht zur Stimulierung der RAGE-Protease beitragen und die PKC vorerst die wichtigste Rolle dabei spielt. Es ist anzunehmen, dass der MAPK-Weg bzw. die PI3-Kinase unabhängig von PKC die Aktivierung der Protease auslösen.

Die Inkubation mit den Inhibitoren für die PKCs, CaMKII und den IP<sub>3</sub>-Rezeptor führte nach PACAP-Behandlung zur Reduktion der gebildeten sRAGE-Menge, die ungefähr dem Wert des basalen *Sheddings* entsprach. Der Effekt des MEK1-Inhibitors war dagegen nicht so stark. Außerdem wurde das basale *Shedding* durch all diese Inhibitoren nur geringfügig, aber nicht signifikant gehemmt. Dies spricht dafür, dass die nicht-stimulierte Proteolyse über andere Wege als die induzierte Proteolyse reguliert wird und dass vielleicht sogar andere Proteasen daran beteiligt sind. Hinweise auf weitere

Enzyme wurden in alveolären Epithelzellen der Lunge gefunden, hier scheinen MMP-3 und MMP-13 während Entzündungsreaktionen für die Proteolyse von RAGE verantwortlich zu sein (Yamakawa *et al.*, 2011). Dass verschiedene Proteasen für das induzierte und basale *Shedding* verantwortlich sind, ist auch für andere Proteine gezeigt worden. ADAM-17 ist z.B. für das aktivierte *Shedding* von L-Selectin verantwortlich und eine weitere Protease für das basale (Walcheck *et al.*, 2003).

## 4.2.2 Stimulierung der RAGE-Proteolyse über den Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptor

### 4.2.2.1 Die Stimulierung der RAGE-Proteolyse ist auch über Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptoren möglich

Zunächst musste geklärt werden, ob die Entstehung von sRAGE über einen der beiden Rezeptoren ( $V_2R$  und OTR) stimuliert werden kann. Nach den erhaltenen Ergebnissen mit den PAC1/RAGE-Zellen war die Vermutung, dass nur über den OT-Rezeptor eine Aktivierung erfolgt und nicht über den  $V_2$ -Rezeptor. Diese Annahme begründete sich auf der Tatsache, dass der Vasopressin-Rezeptor charakteristischerweise nur die PKA aktiviert (Dousa *et al.*, 1972) und dieser Weg keinen Einfluss auf die RAGE-Proteolyse in den vorangegangenen Versuchen hatte. Der Oxytocin-Rezeptor dagegen sollte eine Stimulierung bewirken können, da dieser nach Ligandenbindung eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt (Gimpl und Fahrenholz, 2001). Allerdings stellte sich heraus, dass eine erhöhte Menge an sRAGE nach Behandlung von  $V_2R$ /RAGE- und von OTR/RAGE-exprimierenden Zellen mit dem jeweiligen Hormon nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse wurden durch Versuche mit den Antagonisten OPC-31260 (für  $V_2R$ ) und Atosiban (für OTR) bestätigt, da bei gleichzeitiger Inkubation mit AVP bzw. OT keine Stimulierung der Proteolyse erfolgte (siehe Bild 3.29). Die Behandlung von HEK-Zellen, die nur RAGE exprimieren, mit den beiden Hormonen führte ebenfalls zu keiner erhöhten Bildung von sRAGE (siehe Bild 3.30). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die beiden GPCRs einen positiven Effekt auf die Spaltung von RAGE ausüben. Weder für den Vasopressin- noch den Oxytocin-Rezeptor wurde bisher eine Mitwirkung an der Stimulierung der RAGE-spaltenden Proteasen ADAM-10 oder MMP-9 beschrieben. Andererseits sind eine Reihe von GPCRs

bekannt, die *Shedding*-Prozesse stimulieren, z.B. Rezeptoren für LPA (Lysophosphatidsäure) und Bombesin sowie der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor und der PAC1-Rezeptor aktivieren ADAM-Proteine (Endres und Fahrenholz, 2010). Der Angiotensin-Rezeptor (Le Gall *et al.*, 2003) und VPAC1-Rezeptor aktivieren hingegen MMP-9 (El Zein *et al.*, 2008). Vom OT-Rezeptor ist bisher nur bekannt, dass er die Expression von MMP-11, -17 und -26 erhöht (Cassoni *et al.*, 2006). Allerdings ist eine Stimulierung von *Shedding*-Prozessen durch den OTR naheliegend, da er einen positiven Effekt auf die PKC ausübt und diese eines der Schlüsselenzyme beim induzierten *Shedding* ist. Die Stimulierung durch den V<sub>2</sub>-Rezeptor ist allerdings unerwartet und wird im Kapitel 4.2.2.3 noch ausführlich diskutiert.

#### **4.2.2.2 Bildung von sRAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit AVP und OT**

Die Inkubation der beiden Zelllinien (V<sub>2</sub>R/RAGE und OTR/RAGE) mit dem jeweiligen Hormon in einer Zeitspanne von 15 bis 360 Minuten nach Behandlung mit Cycloheximid führte zu demselben Ergebnis wie mit den PAC1/RAGE-Zellen. Die Konzentrationen an sRAGE im Zellkulturüberstand nahmen innerhalb der ersten drei Stunden deutlich zu und danach nur noch gering (siehe Bild 3.31 und Bild 3.32). Diese rasche Zunahme ist charakteristisch für das *Ectodomain Shedding*, wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben. Der Gehalt an *full-length* RAGE in den Zelllysaten änderte sich nicht, genau wie nach Stimulierung mit PACAP-27, was wiederum auf die starke Expression und das intrazelluläre Vorliegen von RAGE zurückzuführen ist.

#### **4.2.2.3 Signaltransduktionswege des Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptors und deren Einfluss auf die Proteolyse von RAGE**

Zum Beweis, dass die vom V<sub>2</sub>R bzw. OTR vermittelte RAGE-Proteolyse auch durch Metalloproteinasen katalysiert wird, wurde der Inhibitor GM6001 eingesetzt. Dies führte - wie erwartet - bei beiden Rezeptoren zu einer stark verminderten sRAGE Bildung (siehe Bild 3.33). Dieser Inhibitor blockiert ebenfalls die durch den PAC1-Rezeptor stimulierte Bildung von APP $\alpha$  (Kojro *et al.*, 2006). Dies lässt darauf schließen, dass durch die drei GPCRs die gleichen Proteasen, also MMP-9 und ADAM-10, aktiviert werden.

Die zeitgleiche Inkubation der Zellen mit AVP bzw. OT und einem spezifischen PKA-Inhibitor führte bei den OTR/RAGE-Zellen zu keiner Veränderung der sRAGE Menge im Zellkulturüberstand im Vergleich zur Kontrolle. Da bekannt ist, dass der OTR keinen Einfluss auf die Adenylatzyklase und somit auf die PKA ausübt und dies auch für das vorliegende Zellsystem nachgewiesen werden konnte (siehe Bild 3.35), ist dieses Ergebnis zu erwarten gewesen. Im Überstand der V<sub>2</sub>R/RAGE-Zellen dagegen wurde bei Behandlung mit dem Inhibitor eine etwas höhere Menge sRAGE gefunden als bei den Kontrollen. Hier führte die Blockierung der Proteinkinase A zu einer erhöhten Spaltung von RAGE, was zeigt, dass der Rezeptor noch weitere Signalwege anschalten muss. Dies wurde überprüft, indem sowohl der OT- als auch der V<sub>2</sub>-Rezeptor auf die Entstehung eines Ca<sup>2+</sup>-Signals nach Bindung des Liganden getestet wurden. Wie vermutet, wurde ein starkes Signal beim OT-Rezeptor gemessen, aber auch der V<sub>2</sub>-Rezeptor löste ein solches aus (siehe Bild 3.36). Erklärt werden kann dies durch die Beobachtung, dass bei einer Expression von über 100 000 V<sub>2</sub>-Rezeptormolekülen pro Zelle auch eine Kopplung mit der PLC stattfindet (Zhu *et al.*, 1994). In IMCD-(*Inner Medullary Collecting Duct*)-Zellen, die den V<sub>2</sub>-Rezeptor endogen exprimieren, konnte auch nachgewiesen werden, dass es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Behandlung mit AVP kommt (Ecelbarger *et al.*, 1996). Dies scheint in den IMCD-Zellen zum einen über die Bildung von cAMP durch die Adenylatzyklase und die Stimulierung des *exchange protein activated by cAMP* (Epac) stattzufinden (Yip, 2006) und zum anderen primär über die PLC und Bildung von IP<sub>3</sub> und somit cAMP unabhängig (O'Connor und Cowley, 2007). Um die nachfolgenden Signalwege genauer zu untersuchen, wurden der spezifische Inhibitor Gö6976 für Ca<sup>2+</sup>-abhängige PKCs und ein Inhibitor (2-APB), der die IP<sub>3</sub>-abhängige Calcium-Kanalöffnung des Liganden-gesteuerten InsP<sub>3</sub>-Rezeptors im ER verhindert, verwendet. Die Ergebnisse mit beiden Rezeptoren zeigten eine Beteiligung der PKC $\alpha$ /PKC $\beta$  sowie von IP<sub>3</sub> an der Stimulierung der RAGE-spaltenden Proteasen (siehe Bild 3.37 und Bild 3.38).

Eine Stimulierung der CaMKII wird durch eine erhöhte Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen ausgelöst, daher wurde der Einfluss dieser Kinase auf das RAGE-*Shedding* mit Hilfe des Inhibitors CK59 näher untersucht. Dies führte ebenfalls zu einer verringerten Menge an

sRAGE im Überstand, was darauf schließen lässt, dass dieses Enzym ebenso einen positiven Effekt auf die RAGE-Proteolyse ausübt (siehe Bild 3.39). Dies war auch bei dem durch den PAC1-Rezeptor stimulierten RAGE-*Shedding* nachgewiesen worden.

Der MAPK-Weg wird nicht nur über den OTR (Ohmichi *et al.*, 1995) sondern auch über den V<sub>2</sub>R (Charest *et al.*, 2007) angeschaltet, daher wurde die Wirkung des MEK1-Inhibitors PD98059 an den Zelllinien OTR/RAGE und V<sub>2</sub>R/RAGE untersucht. Allerdings konnte im Gegensatz zu den Versuchen mit den PAC1/RAGE-Zellen keine Abnahme der sRAGE Konzentration im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (siehe Bild 3.40 und Bild 3.41). Da die Funktionalität des Inhibitors durch die Überprüfung des Phosphorylierungsstatus sichergestellt ist, lässt dies auf einen MAPK unabhängigen Weg schließen. Dies ist der einzige Unterschied zwischen den Ergebnissen mit dem PAC1-Rezeptor und den OTR/V<sub>2</sub>-Rezeptoren. Der Grund für diese Abweichung könnte an den unterschiedlichen Signalwegen liegen, die zur Phosphorylierung von ERK1/2 führen. Beim PAC1-Rezeptor wird der MAPK-Weg hauptsächlich über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des GPCRs oder über den PLC/PKC-Weg angeschaltet (van Biesen *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2001). Sowohl für den V<sub>2</sub>- als auch den OT-Rezeptor konnte nachgewiesen werden, dass ERK1/2 durch  $\beta$ -Arrestin vermittelte Internalisierung des jeweiligen Rezeptors phosphoryliert wird. Dies geschieht beim V<sub>2</sub>-Rezeptor unabhängig von der PLC, PKC und PI<sub>3</sub>-Kinase (Charest *et al.*, 2007; Grotegut *et al.*, 2011). Für den Oxytocin-Rezeptor ist noch ein weiterer Signalweg beschrieben, dieser läuft über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des GPCRs, anschließende Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und letztendliche Stimulierung von ERK1/2 über Ras, dabei hängt es vom Zelltyp ab, ob die PLC und die PKC beteiligt sind oder nicht (Zhong *et al.*, 2003). Diese Differenzen könnten die Ursache dafür sein, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 vermittelt durch den V<sub>2</sub>- bzw. OT-Rezeptor nicht zur Stimulierung einer Protease führt, die zur RAGE-Spaltung beiträgt.

#### 4.2.3 Stimulierung der RAGE-Proteolyse in vivo

Um der Frage nachzugehen, ob eine erhöhte Produktion von sRAGE nach Stimulierung von PACAP-Rezeptoren auch *in vivo* möglich ist, wurde APP[V717I] Mäusen drei Monate PACAP-38 intranasal verabreicht. Diese Mäuse besitzen eine Mutation im humanen

APP-Gen, was zu einer erhöhten Bildung von A $\beta$ (42) und A $\beta$ (40) führt (Moechars *et al.*, 1999). Das A $\beta$ (42)-Peptid besitzt eine starke Tendenz zur Bildung von Amyloid-Plaques und trägt damit zur Entstehung der Alzheimer-Demenz bei. Auf Grund der geringen Expression von RAGE in den Gehirnen der Mäuse konnte weder *full-length* RAGE noch sRAGE nachgewiesen werden. Da in der Lunge eine hohe RAGE-Konzentration vorliegt (Demling *et al.*, 2006), wurden die sRAGE-Mengen nach PACAP-Behandlung in diesem Organ näher untersucht. Die VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren liegen hier in einer hohen Dichte vor (Lam *et al.*, 1990; Sreedharan *et al.*, 1995) und auch der PAC1-Rezeptor wird in der Lunge exprimiert (Ichikawa *et al.*, 1995; Pei, 1997). Die dreimonatige Behandlung führte tatsächlich zu einem um 60 % erhöhten *Shedding* von RAGE im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Bild 3.42). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch die endogen vorhandene Menge an PACAP-Rezeptoren ausreicht, um die Proteolyse von RAGE zu stimulieren und dass diese nicht nur bei Überexpression des Rezeptors aktiviert werden kann. Diese Resultate stimmen auch mit der Beobachtung überein, dass die Bildung von APPs $\alpha$  in Gehirnen von Mäusen durch Behandlung mit PACAP gesteigert werden kann (Rat *et al.*, in press). Bisher wurden die neuroprotektiven Eigenschaften von PACAP vor allem mit diesem Effekt in Verbindung gebracht, doch die Ergebnisse *in vivo* sind ein Hinweis darauf, dass auch das *Shedding* von RAGE hierzu einen Beitrag leistet. Denn vergleichbare Effekte im Gehirn würden dazu führen, dass das *Shedding* die Signalweiterleitung von RAGE unterbindet und somit neurodegenerative Prozesse und Entzündungsreaktionen vermindert werden.

#### 4.2.4 Therapeutische Bedeutung der GPCR-vermittelten RAGE-Proteolyse

Eine gesteigerte Menge an sRAGE könnte für die Behandlung vieler neurodegenerativer Erkrankungen sowie von *Diabetes mellitus*, Arteriosklerose oder von Krebs eine wichtige Bedeutung haben. Diese Erhöhung kann zum Beispiel durch die Gabe von rekombinantem sRAGE erreicht werden oder durch eine Steigerung der Proteolyse von *full-length* RAGE. Die zweite Methode ist der ersten vorzuziehen, da hier mehrere positive Effekte zum Tragen kommen. Zum einen wird die Konzentration des membrangebundenen RAGE herabgesetzt und zum anderen wird die Menge an sRAGE

gesteigert. Dadurch werden die Liganden, indem sie an sRAGE binden, abgefangen und die Signalweiterleitung bzw. der Transport von A $\beta$  über die BHS wird durch fehlendes *full-length* RAGE verhindert. Außerdem wird somit die Bildung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren, die eine gesteigerte Expression von RAGE auslösen, gehemmt. Wie wichtig die Konzentration von sRAGE ist, zeigt sich daran, dass diese bei einer Vielzahl von Krankheiten im Plasma niedriger ist verglichen zu gesunden Menschen. Dazu gehören Bluthochdruck (Geroldi *et al.*, 2005), rheumatoide Arthritis (Pullerits *et al.*, 2005), koronare Herzkrankheiten (Falcone *et al.*, 2005), leichte kognitive Beeinträchtigungen (Ghidoni *et al.*, 2008) und AD (Emanuele *et al.*, 2005). Bei Alzheimer liegt zusätzlich eine erhöhte Menge an *full-length* RAGE in den Gehirnen der betroffenen Patienten vor. Auch bei einem erhöhten Body-Mass-Index (BMI) wurde eine erniedrigte Menge an sRAGE bei den Probanden festgestellt (Norata *et al.*, 2009). Alle diese Studien deuten darauf hin, dass sRAGE eine schützende Funktion innerhalb des Organismus ausübt und dass eine verminderte Bildung mit der Entstehung von Krankheiten einhergeht. Die Steigerung der sRAGE Produktion wäre somit ein möglicher Therapieansatz. Bisher ist in der Literatur nur eine Stimulierung mit Hilfe der nicht-physiologischen Substanzen PMA, APMA und Ionomycin bekannt (Galichet *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Da sich diese nicht als Therapeutika eignen, wurden in dieser Arbeit physiologisch wirksame Substanzen getestet. Die Stimulierung der sRAGE-Produktion über die drei untersuchten GPCRs stellt eine mögliche Therapieform dar. Die Behandlung mit PACAP könnte eine Rolle bei der Behandlung von AD spielen, da zu den betroffenen Regionen im Gehirn vor allem der zerebrale Kortex und Hippocampus zählen (Thal *et al.*, 2006) und sowohl der PAC1-Rezeptor als auch RAGE in beiden Regionen exprimiert werden (Chen *et al.*, 2007b; Thangthaeng *et al.*, 2008; Vaudry *et al.*, 2009). Daher könnte eine durch PACAP stimulierte Proteolyse die Bindung von Liganden an RAGE hemmen und somit entzündliche Prozesse, die u.a. zum Absterben von Neuronen führen, verhindern. Ein weiterer positiver Effekt, der mit PACAP in Verbindung gebracht wird, ist die Stimulierung der APP $\alpha$ -Entstehung, wodurch die Bildung von A $\beta$  unterbunden wird. Somit würde die Alzheimer-Demenz an verschiedenen Schaltstellen gleichzeitig therapiert werden. Des Weiteren wurde in AD-Patienten und

bei unterschiedlichen AD-Mausmodellen eine verminderte Expression von PACAP und des PAC1-Rezeptors im Vergleich zu gesunden Menschen bzw. Tieren nachgewiesen (Wu *et al.*, 2006). Da die dreimonatige Verabreichung des Peptids zu einer erhöhten Bildung der PACAP- und PAC1-Rezeptor-mRNA bei Mäusen führte (Rat *et al.*, in press), könnte das PACAP/PAC1-Defizit möglicherweise auch bei AD-Patienten durch eine PACAP-Behandlung aufgehoben und das endogene PACAP/PAC1-System reaktiviert werden. Dies wäre ein zusätzlicher positiver Beitrag, der durch die Gabe des Hormons geleistet wird und zur AD-Therapie beitragen könnte.

Des Weiteren werden PACAP-Rezeptoren in Endothelzellen exprimiert, dort wirkt das Hormon protektiv gegenüber oxidativem Stress (Racz *et al.*, 2007). Auf vaskuläre glatte Muskelzellen hat es eine vasorelaxierende Wirkung (Bruch *et al.*, 1997). Eine mögliche Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen mit PACAP ist daher von großem Interesse, darüber hinaus würde ein erhöhtes *Shedding* von RAGE stattfinden. Dies könnte verhindern, dass Entzündungsprozesse durch AGEs, S100-Proteine oder HMGB1 ausgelöst werden. Alle diese RAGE-Liganden spielen bei Diabetes und der Entstehung von Arteriosklerose eine entscheidende Rolle und es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass bei Mäusen durch die Behandlung mit sRAGE die Entstehung von Arteriosklerose gehemmt werden konnte (Lindsey *et al.*, 2009). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit liegt in der Therapie von Tumoren, denn sowohl RAGE als auch PACAP-Rezeptoren werden in den entarteten Zellen stark exprimiert und die Blockierung der Bindung von HMGB1 an RAGE führte im Mausmodell bereits zu einer reduzierten Wachstumsrate dieser Zellen (Taguchi *et al.*, 2000).

Eine ähnliche Wirkung könnte auch die Behandlung mit Oxytocin haben, denn OT-Rezeptoren werden ebenfalls in einer Reihe von Tumoren exprimiert (Ito *et al.*, 1996; Cassoni *et al.*, 2004). Die Behandlung der Prostatakrebs-Zelllinie DU145 mit dem Hormon OT führte zu einem erheblich geringeren Zellwachstum. Diese Zelllinie ist auch für die starke Expression von RAGE sowie HMGB1 bekannt und eine Inhibierung der Wechselwirkung von RAGE mit dem Liganden AGE-BSA führte ebenfalls zu einer Erniedrigung des Wachstums (Ishiguro *et al.*, 2005). Die erzielten Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die geringere Proliferation der Krebszellen nach Behand-

lung mit Oxytocin auf das *Shedding* von RAGE zurückführbar sein könnte.

Der OT-Rezeptor wird ebenfalls von Endothelzellen exprimiert und Oxytocin wirkt auf diese Zellen vasorelaxierend (Thibonnier *et al.*, 1999). OT könnte also genau wie PACAP einen positiven Einfluss auf die Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten ausüben. Des Weiteren liegt der OT-Rezeptor auch im Hippocampus vor, was eine mögliche Therapie von AD ermöglicht (Zaninetti und Raggenbass, 2000), da dies eine der Hauptregionen ist, in der die Ablagerung der Plaques stattfindet. Die Rezeptoren für AVP werden ebenfalls in dieser Region exprimiert und mit Gedächtnis- sowie Lernprozessen in Verbindung gebracht (Hirasawa *et al.*, 1994). Bei AD-Patienten wurde nach deren Tod eine erniedrigte Konzentration von AVP im Hippocampus, Nucleus accumbens und Globus pallidus interna gefunden (Mazurek *et al.*, 1986). Eine Behandlung mit AVP könnte also ebenfalls eine Möglichkeit darstellen, die Interaktion von RAGE mit Liganden zu verhindern, da die Gabe von AVP bei hippocampalen Neuronen zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führte (Brinton *et al.*, 1994) und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der RAGE- und APP-Proteolyse spielt. Besonders geeignet sind die AVP-Rezeptoren außerdem für die AD-Therapie, da sie von Endothelzellen der BHS exprimiert werden und dort ebenfalls das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erhöhen (Hess *et al.*, 1991). Dies würde das *Shedding* von RAGE auslösen und den Transport von A $\beta$  über die BHS somit stark verringern.

Auf Grund der Tatsache, dass durch die vorliegende Arbeit die Signalwege bekannt sind, die wichtig zu sein scheinen, um die RAGE-Proteolyse zu stimulieren, können auch andere Rezeptoren für Therapie Zwecke in Betracht gezogen werden. Vor allem die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration ist sehr wichtig, um das *Shedding* auszulösen. Mögliche geeignete Rezeptoren außer GPCRs sind Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Liganden-kontrollierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Zum Beispiel könnte der Insulin-Rezeptor dazu verwendet werden, da bereits bekannt ist, dass dieser über ADAM-10 das *Shedding* von Klotho reguliert (Chen *et al.*, 2007a).

### 4.3 Stimulierung der Proteolyse von Meprin $\beta$

Meprin ist eine zinkabhängige Metalloendopeptidase, die zur Superfamilie der Astacine und Metzincine gehört. Das Enzym besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die Homo- und Heterodimere bilden können. Die Transmembrandomäne von Meprin  $\alpha$  wird während der Biosynthese im ER abgespalten, sodass diese Untereinheit daraufhin als lösliches Protein vorliegt. Nur bei einer Wechselwirkung mit Meprin  $\beta$ , welches ein Membranprotein vom Typ 1 ist, ist Meprin  $\alpha$  mit der Zellmembran assoziiert (Bond *et al.*, 2005). Da während der Promotion die Proteolyse von Meprin  $\beta$  untersucht werden sollte, wurde auch nur dieses Protein in den HEK-Zellen überexprimiert. Es wird vermutet, dass diese Metalloprotease an der Entstehung der AD beteiligt ist. Zum einen weil sie genauso wie BACE1 eine  $\beta$ -Sekretase-Eigenschaft besitzt und ihre Affinität zu APP sogar um  $10^4$  größer ist. Zum anderen, weil die entstehenden A $\beta$ -Peptide am N-Terminus die Aminosäure Glutamat aufweisen und dadurch eine stark erhöhte Tendenz zur Bildung von Aggregaten haben verglichen zu A $\beta$  mit einem N-terminalen Aspartat, das durch die BACE1-Spaltung entsteht (Jefferson *et al.*, submitted). Da die Stimulierung von ADAM-10 sowohl die Proteolyse von APP als auch von RAGE erhöht und diese eine Therapiemöglichkeit der AD darstellt, sollte überprüft werden, ob Meprin  $\beta$  ebenfalls von derselben Protease gespalten wird. Sowohl die Behandlung mit PMA als auch mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 führten zu einer Erhöhung von löslichem Meprin  $\beta$  im Zellkulturmedium um das 2,5- bis Vierfache (siehe Bild 3.43). Dies deckt sich mit den Untersuchungen an COS-Zellen, auch hier konnte das *Shedding* von Meprin  $\beta$  durch PMA-Behandlung gesteigert werden (Hahn *et al.*, 2003). In den Zellysaten wurde allerdings weder nach Inkubation mit PMA noch mit A23187 eine geringere Menge an membrangebundenem Meprin  $\beta$  nachgewiesen (siehe Bild 3.44). Dies ist, wie auch in den vorangegangenen Versuchen der GPCR-stimulierten RAGE-Proteolyse, auf die starke Expression des Proteins in den Zellen zurückzuführen. Die Verwendung eines Breitspektrum-Metalloproteinase-Inhibitors konnte sowohl die PMA als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor induzierte Spaltung vollständig unterbinden (siehe Bild 3.45 und Bild 3.46). Zur weiteren Eingrenzung der Protease wurde ein Inhibitor verwendet, der bei niedriger Dosierung ADAM-10 ( $\text{IC}_{50}$ = 5,3 nM) gegenüber ADAM-17 ( $\text{IC}_{50}$ = 541 nM) spe-

zifisch hemmt (Hundhausen *et al.*, 2003). Um die Blockierung von ADAM-17 auszuschließen, wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen von GI254023X gearbeitet. Bei der niedrigeren (100 nM) ist die Spezifität gegeben. Eine Konzentration von 25  $\mu$ M führte sowohl zur Inhibierung des PMA-induzierten *Sheddings* als auch des basalen. Die niedrigere Menge des Inhibitors erzeugte ebenfalls eine Unterdrückung beider *Shedding*-Prozesse, wobei diese Inhibierung etwas geringer war (siehe Bild 3.47). Daraus lässt sich schließen, dass ADAM-10 hauptsächlich für die Spaltung von Meprin  $\beta$  verantwortlich ist, aber auch ADAM-17 einen Teil beizutragen scheint. Die Untersuchungen an den COS-Zellen zeigten ebenfalls eine Beteiligung von ADAM-17 (Hahn *et al.*, 2003), die Wirkung von ADAM-10 wurde dort nicht untersucht. Allerdings kann auch die Beteiligung von MMP-9 nicht ausgeschlossen werden, da es Erkenntnisse dazu gibt, dass GI254023X auch bei einer Konzentration von 100 nM diese Protease hemmen kann (Ludwig *et al.*, 2005).

## 5 Zusammenfassung/Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Zu den Liganden des Zelloberflächenrezeptors RAGE gehören AGEs, S100-Proteine, HMGB1 und A $\beta$ . RAGE wird daher eine Rolle bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen sowie Diabetes, Arteriosklerose und Krebs zugesprochen. Des Weiteren geht eine Verringerung der Menge an sRAGE häufig mit diesen Krankheiten einher. Aus diesen Gründen stellt die pharmakologische Stimulierung der Proteolyse von RAGE eine vielversprechende Therapieform dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der sRAGE-Bildung über PAC1-, V<sub>2</sub>- und OT-Rezeptoren möglich ist. Die Untersuchung der PAC1-Signalwege zeigte, dass PKC $\alpha$ /PKC $\beta$ i, CaMKII, Ca<sup>2+</sup>-Ionen, PI<sub>3</sub>-Kinase und der MAP-Kinase-Weg wichtig für die Stimulierung sind und dass der PKA-Weg nicht beteiligt ist. Die dreimonatige Behandlung von Mäusen mit PACAP-38 weist darauf hin, dass eine Stimulierung des *Ectodomain Sheddings* von RAGE auch *in vivo* erfolgen kann. Die Untersuchung der Signalwege, ausgehend von den V<sub>2</sub>- und OT-Rezeptoren, zeigte, dass ebenfalls PKC $\alpha$ /PKC $\beta$ i, CaMKII, Ca<sup>2+</sup>-Ionen zur Aktivierung der Proteasen führen, dagegen konnte weder ein Einfluss des PKA- noch des MAP-Kinase-Weges festgestellt werden. Außerdem wurden sowohl MMP-9 als auch ADAM-10 als RAGE-spaltende Proteasen identifiziert. Die nähere Untersuchung der RAGE-Spaltstelle erbrachte, dass keine spezifische Sequenz, sondern vielmehr die Sekundärstruktur eine Rolle bei der Erkennung durch die Proteasen spielt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin ein anti-RAGE Antikörper anhand einer neu entwickelten Methode zunächst gereinigt und dann erfolgreich an ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiertes Polymer gekoppelt.

Die Stimulierung der Proteolyse von Meprin  $\beta$  wurde auch untersucht und es konnte ebenfalls eine Beteiligung von ADAM-10 an der Spaltung nachgewiesen werden.

## 5.2 Summary

The ligands of the cell surface receptor RAGE are AGEs, S100 proteins, HMGB1 and A $\beta$ . Therefore RAGE is linked with different neurological diseases as well as diabetes, arteriosclerosis and cancer. Furthermore, a decrease of the sRAGE amount is being accompanied by these diseases. Thus, the pharmacological stimulation of proteolysis of RAGE is a promising therapy strategy.

Within this doctoral thesis it was possible to stimulate shedding of RAGE by activating PAC1, V<sub>2</sub> and OT receptors. The study of PAC1-associated signaling pathways demonstrated that PKC $\alpha$ /PKC $\beta$ I, CaMKII, Ca<sup>2+</sup> signaling, PI<sub>3</sub> kinase and MAP kinases are important for this stimulation; whereas PKA had no influence. The treatment of mice with PACAP-38 for three months resulted in an enhanced RAGE shedding *in vivo*. The analysis of V<sub>2</sub> and OT receptor-associated signaling indicated that PKC $\alpha$ /PKC $\beta$ I, CaMKII and Ca<sup>2+</sup> signaling is also responsible for enhancing the protease activity; whereas PKA and MAP kinase had no effect. In addition, MMP-9 and ADAM-10 were identified to be the proteinases responsible for RAGE cleavage. Further investigation of the RAGE cleavage site revealed an important role for the secondary structure, which is recognized by proteinases. Within this thesis an anti-RAGE antibody was purified applying a new method and then coupled with a Rhodamin-conjugated polymer.

In addition, stimulation of Meprin  $\beta$  shedding was analyzed and the involvement of ADAM-10 was demonstrated.

## 6 Literaturverzeichnis

- Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Brain Res Mol Brain Res* 138:45-57.
- Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, Song F, Bakr S, Szabolcs M, D'Agati V, Liu R, Homma S, Schmidt AM, Yan SF, Ramasamy R (2008) RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1823-1832.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.
- Anderson ST, Sawangjaroen K, Curlewis JD (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts within the medial basal hypothalamus to inhibit prolactin and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:3424-3429.
- Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Karteszi M, Laszlo FA (1984) Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. *Peptides* 5:519-522.
- Arancio O, Zhang HP, Chen X, Lin C, Trinchese F, Puzzo D, Liu S, Hegde A, Yan SF, Stern A, Luddy JS, Lue LF, Walker DG, Roher A, Buttini M, Mucke L, Li W, Schmidt AM, Kindy M, Hyslop PA, Stern DM, Du Yan SS (2004) RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J* 23:4096-4105.
- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129:2787-2789.
- Arribas J, Borroto A (2002) Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 102:4627-4638.
- 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.
- Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J (1996) Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 271:11376-11382.
- Ascuitto RJ, Ross-Ascuitto NT, Waddell AE, Kadowitz PJ (1996) Contractile and coronary vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in neonatal pig hearts. *Cardiovasc Res* 31 Spec No:E153-159.
- Balasubramanian L, Sham JS, Yip KP (2008) Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking. *Pflugers Arch* 456:747-754.
- Barberis C, Mouillac B, Durroux T (1998) Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 156:223-229.

- Basille M, Gonzalez BJ, Desrues L, Demas M, Fournier A, Vaudry H (1995) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C activity in rat cerebellar neuroblasts. *J Neurochem* 65:1318-1324.
- Basta G (2008) Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 196:9-21.
- Bays E, Tao L, Chang CW, Maynard HD (2009) Synthesis of semitelechelic maleimide poly(PEGA) for protein conjugation by RAFT polymerization. *Biomacromolecules* 10:1777-1781.
- Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R (2003) Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* 63:5224-5229.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*.
- Bhave SV, Hoffman PL (2004) Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J Neurochem* 88:359-369.
- Bierhaus A, Nawroth PP (2009) Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 52:2251-2263.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83:876-886.
- Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP (1997) Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96:2262-2271.
- Bierhaus A, Haslbeck KM, Humpert PM, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, Sayed AA, Andrassy M, Schiekofer S, Schneider JG, Schulz JB, Heuss D, Neundorfer B, Dierl S, Huber J, Tritschler H, Schmidt AM, Schwaninger M, Haering HU, Schleicher E, Kasper M, Stern DM, Arnold B, Nawroth PP (2004) Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest* 114:1741-1751.
- Birnbaumer M (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11:406-410.
- Blanks AM, Shmygol A, Thornton S (2007) Regulation of oxytocin receptors and oxytocin receptor signaling. *Semin Reprod Med* 25:52-59.
- Blobe GC, Obeid LM, Hannun YA (1994) Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 13:411-431.
- Bond JS, Matters GL, Banerjee S, Dusheck RE (2005) Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Lett* 579:3317-3322.

- Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28:1746-1752.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, *et al.* (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143:1699-1712.
- Brinton RD, Gonzalez TM, Cheung WS (1994) Vasopressin-induced calcium signaling in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 661:274-282.
- Bruch L, Bychkov R, Kastner A, Bulow T, Ried C, Gollasch M, Baumann G, Luft FC, Haller H (1997) Pituitary adenylate-cyclase-activating peptides relax human coronary arteries by activating K(ATP) and K(Ca) channels in smooth muscle cells. *J Vasc Res* 34:11-18.
- Buckley ST, Ehrhardt C (2010) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol* 2010:917108.
- Cagampang FR, Piggins HD, Sheward WJ, Harmar AJ, Coen CW (1998) Circadian changes in PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA in the rat suprachiasmatic and supraoptic nuclei. *Brain Res* 813:218-222.
- Campbell RM, Scanes CG (1992) Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul* 2:175-191.
- Canet-Aviles RM, Anderton M, Hooper NM, Turner AJ, Vaughan PF (2002) Muscarine enhances soluble amyloid precursor protein secretion in human neuroblastoma SH-SY5Y by a pathway dependent on protein kinase C(alpha), src-tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase but not phospholipase C. *Brain Res Mol Brain Res* 102:62-72.
- Cao YJ, Gimpl G, Fahrenholz F (1995) The amino-terminal fragment of the adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor functions as a high affinity PACAP binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 212:673-680.
- Cassoni P, Marrocco T, Sapino A, Allia E, Bussolati G (2004) Evidence of oxytocin/oxytocin receptor interplay in human prostate gland and carcinomas. *Int J Oncol* 25:899-904.
- Cassoni P, Marrocco T, Bussolati B, Allia E, Munaron L, Sapino A, Bussolati G (2006) Oxytocin induces proliferation and migration in immortalized human dermal microvascular endothelial cells and human breast tumor-derived endothelial cells. *Mol Cancer Res* 4:351-359.
- Cataldegirmen G, Zeng S, Feirt N, Ippagunta N, Dun H, Qu W, Lu Y, Rong LL, Hofmann MA, Kislinger T, Pachydaki SI, Jenkins DG, Weinberg A, Lefkowitz J, Rogiers X, Yan SF, Schmidt AM, Emond JC (2005) RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF-alpha and NF-kappaB. *J Exp Med* 201:473-484.
- Cauvin A, Robberecht P, De Neef P, Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Christophe J (1991) Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord. *Regul Pept* 35:161-173.

- Charest PG, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M, Bouvier M (2007) The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal* 19:32-41.
- Chartrel N, Tonon MC, Vaudry H, Conlon JM (1991) Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology* 129:3367-3371.
- Chatterjee TK, Sharma RV, Fisher RA (1996) Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 271:32226-32232.
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP (2003) The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198:1507-1515.
- Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR (2007a) Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19796-19801.
- Chen X, Walker DG, Schmidt AM, Arancio O, Lue LF, Yan SD (2007b) RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 7:735-742.
- Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 137:4-19.
- Cho HJ, Son SM, Jin SM, Hong HS, Shin DH, Kim SJ, Huh K, Mook-Jung I (2009) RAGE regulates BACE1 and Abeta generation via NFAT1 activation in Alzheimer's disease animal model. *FASEB J* 23:2639-2649.
- Chou DK, Zhang J, Smith FI, McCaffery P, Jungalwala FB (2004) Developmental expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), amphoterin and sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate in mouse cerebellum and their role in neurite outgrowth and cell migration. *J Neurochem* 90:1389-1401.
- Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, Sexton PM (2003) Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem* 278:3293-3297.
- Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, Audia JE, Nissen JS, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB, Holtzman DM (2003) In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* 23:8844-8853.
- Clynes R, Moser B, Yan SF, Ramasamy R, Herold K, Schmidt AM (2007) Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr Mol Med* 7:743-751.
- Contestabile A, Fila T, Bartesaghi R, Ciani E (2005) Cyclic AMP-mediated regulation of transcription factor Lot1 expression in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 280:33541-33551.
- Dagert M, Ehrlich S (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. In: *Gene*, pp 23-28.

- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95-105.
- Deane R, Zlokovic BV (2007) Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4:191-197.
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV (2004) RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates Alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35:2628-2631.
- Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9:907-913.
- Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH, van Oost BA (1994) Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264:92-95.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D (1999) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 162:1707-1716.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Kan Y, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE, Gomariz RP, Ganea D (1998) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *J Biol Chem* 273:31427-31436.
- Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP (2006) Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 323:475-488.
- Dickson L, Finlayson K (2009) VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther* 121:294-316.
- Dickson L, Aramori I, Sharkey J, Finlayson K (2006a) VIP and PACAP receptor pharmacology: a comparison of intracellular signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1070:239-242.
- Dickson L, Aramori I, McCulloch J, Sharkey J, Finlayson K (2006b) A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology* 51:1086-1098.
- Ding Q, Keller JN (2005) Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. *Neurosci Lett* 373:67-72.
- Dogrukol-Ak D, Tore F, Tuncel N (2004) Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Curr Pharm Des* 10:1325-1340.
- Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, Aruga T, Shioda S (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul Pept* 109:83-88.

- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668.
- Dousa TP, Walter R, Schwartz IL, Sands H, Hechter O (1972) Role of cyclic AMP in the action of neurohypophyseal hormones on kidney. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1:121-135.
- Dow RC, Bennie J, Fink G (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. *J Endocrinol* 142:R1-4.
- Ecelbarger CA, Chou CL, Lolait SJ, Knepper MA, DiGiovanni SR (1996) Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 270:F623-633.
- Eggenberger M, Born W, Zimmermann U, Lerner EA, Fischer JA, Muff R (1999) Maxadilan interacts with receptors for pituitary adenylyl cyclase activating peptide in human SH-SY5Y and SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuropeptides* 33:107-114.
- El Zein N, Badran B, Sariban E (2008) The neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates Ca<sup>2+</sup> and pro-inflammatory functions in human monocytes through the G protein-coupled receptors VPAC-1 and formyl peptide receptor-like 1. *Cell Calcium* 43:270-284.
- Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, Bernardi L, Maletta R, Bruni AC, Geroldi D (2005) Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 62:1734-1736.
- Endres K, Fahrenholz F (2010) Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope? *FEBS J* 277:1585-1596.
- Evin G, Weidemann A (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Aβ amyloid peptides. *Peptides* 23:1285-1297.
- Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D (2005) Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1032-1037.
- Falktoft B, Georg B, Fahrenkrug J (2009) Calmodulin interacts with PAC1 and VPAC2 receptors and regulates PACAP-induced FOS expression in human neuroblastoma cells. *Neuropeptides* 43:53-61.
- Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2004) Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 91:1231-1243.
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr., Woodgett JR, Mills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11960-11965.
- Farah AE (1983) Glucagon and the circulation. *Pharmacol Rev* 35:181-217.
- Favaretto AL, Ballejo GO, Albuquerque-Araujo WI, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM (1997) Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in

- vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides* 18:1377-1381.
- Filipsson K, Tornøe K, Holst J, Ahren B (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates insulin and glucagon secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3093-3098.
- Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I (2002) Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21:5213-5223.
- Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 148:811-824.
- Galichet A, Weibel M, Heizmann CW (2008) Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 370:1-5.
- Garcia JG, Wang P, Liu F, Hershenson MB, Borbiev T, Verin AD (2001) Pertussis toxin directly activates endothelial cell p42/p44 MAP kinases via a novel signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1233-1241.
- Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, Dempsey PJ, Raines EW (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.
- Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Calcagnino M, Buzzi MP, Scioli GA, Fogari R (2005) Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 23:1725-1729.
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol* 136:159-166.
- Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Geroldi D, Emanuele E, Binetti G (2008) Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in mild cognitive impairment. *J Neural Transm* 115:1047-1050.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629-683.
- Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680.
- Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrad S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM (2001) Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 159:513-525.
- Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A (1990) Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 127:272-277.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36:59-72.

- Grotegut CA, Feng L, Mao L, Heine RP, Murtha AP, Rockman HA (2011) beta-Arrestin mediates oxytocin receptor signaling, which regulates uterine contractility and cellular migration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E468-477.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* 392:77-80.
- Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, Boccara G, Derrick S, Chouinard L, Gallo-Payet N (1998) Vasopressin : a potent auto-crine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res* 24:703-710.
- Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM (1997) Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev* 77:465-515.
- Hahn D, Pischitzis A, Roesmann S, Hansen MK, Leuenberger B, Luginbuehl U, Sterchi EE (2003) Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprinbeta metalloprotease. *J Biol Chem* 278:42829-42839.
- Harmar AJ (2001) Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3013.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 50:265-270.
- Hay DL, Poyner DR, Sexton PM (2006) GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 109:173-197.
- Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y, Park PW (2010) Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat Rec (Hoboken)* 293:925-937.
- Henle F, Fischer C, Meyer DK, Leemhuis J (2006) Vasoactive intestinal peptide and PACAP38 control N-methyl-D-aspartic acid-induced dendrite motility by modifying the activities of Rho GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases. *J Biol Chem* 281:24955-24969.
- Hess J, Jensen CV, Diemer NH (1991) The vasopressin receptor of the blood-brain barrier in the rat hippocampus is linked to calcium signalling. *Neurosci Lett* 132:8-10.
- Hirasawa A, Nakayama Y, Ishiharada N, Honda K, Saito R, Tsujimoto G, Takano Y, Kamiya H (1994) Evidence for the existence of vasopressin V2 receptor mRNA in rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1702-1706.
- Ho MY, Carter DA, Ang HL, Murphy D (1995) Bovine oxytocin transgenes in mice. Hypothalamic expression, physiological regulation, and interactions with the vasopressin gene. *J Biol Chem* 270:27199-27205.
- Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M (2007) HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 17:72-79.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser

- J, Stern D, Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, *et al.* (1995) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270:25752-25761.
- Hosoya M, Onda H, Ogi K, Masuda Y, Miyamoto Y, Ohtaki T, Okazaki H, Arimura A, Fujino M (1993) Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun* 194:133-143.
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A, *et al.* (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta* 1129:199-206.
- Huang M, Shirahase H, Rorstad OP (1993) Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. *Peptides* 14:755-762.
- Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM (2008) Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J* 22:1572-1580.
- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, 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.
- Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM (2005) Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30:413-422.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275:40096-40105.
- Ichikawa S, Sreedharan SP, Owen RL, Goetzl EJ (1995) Immunohistochemical localization of type I VIP receptor and NK-1-type substance P receptor in rat lung. *Am J Physiol* 268:L584-588.
- Inooka H, Ohtaki T, Kitahara O, Ikegami T, Endo S, Kitada C, Ogi K, Onda H, Fujino M, Shirakawa M (2001) Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Biol* 8:161-165.
- Ishiguro H, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Fujinami K, Kubota Y, Uemura H (2005) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphotericin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *Prostate* 64:92-100.
- Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8:811-819.

- Ito Y, Kobayashi T, Kimura T, Matsuura N, Wakasugi E, Takeda T, Shimano T, Kubota Y, Nobunaga T, Makino Y, Azuma C, Saji F, Monden M (1996) Investigation of the oxytocin receptor expression in human breast cancer tissue using newly established monoclonal antibodies. *Endocrinology* 137:773-779.
- Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Seha-  
ra-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E (1998) A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ecto-  
domain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth fac-  
tor. *EMBO J* 17:7260-7272.
- Jefferson T, Čaušević M, auf dem Keller U, Schilling O, Isbert S, Geyer R, Maier W,  
Tschickardt S, Postina R, Metz VV, Jumpertz T, Weggen S, Bond JS, Overall C,  
Pietrzik CU, Becker-Pauly C (submitted) The metalloprotease meprin  $\beta$   
processes the amyloid precursor protein in vivo and exhibits exceptional  $\beta$ -  
secretase activity. *J Biol Chem*.
- Jeng YJ, Lolait SJ, Strakova Z, Chen C, Copland JA, Mellman D, Hellmich MR, Soloff MS  
(1996) Molecular cloning and functional characterization of the oxytocin recep-  
tor from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Neuropeptides* 30:557-565.
- Journot L, Spengler D, Pantaloni C, Dumuis A, Sebben M, Bockaert J (1994) The PACAP  
receptor: generation by alternative splicing of functional diversity among G  
protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin Cell Biol* 5:263-272.
- Kienlen Campard P, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP (1997) PA-  
CAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the  
cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol* 16:323-333.
- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the  
beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the  
nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276:40288-40292.
- Kimura C, Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Itoh Y, Onda H, Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Stibbs  
HH, *et al.* (1990) A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular  
cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem Biophys  
Res Commun* 166:81-89.
- Kiss P, Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Jozsa R, Somogyvari-Vigh A, Szilvassy Z,  
Nemeth J (2007) Changes of PACAP levels in the brain show gender differences  
following short-term water and food deprivation. *Gen Comp Endocrinol*  
152:225-230.
- Kojro E, Postina R, Buro C, Meiringer C, Gehrig-Burger K, Fahrenholz F (2006) The neu-  
ropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the  
Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB J* 20:512-514.
- Koshimizu TA, Nasa Y, Tanoue A, Oikawa R, Kawahara Y, Kiyono Y, Adachi T, Tanaka T,  
Kuwaki T, Mori T, Takeo S, Okamura H, Tsujimoto G (2006) V1a vasopressin re-  
ceptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume  
and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7807-7812.
- Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni  
G, Dejana E, Bartfai T, Winkler FK, Hennig M (2001) X-ray structure of junctional  
adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimeri-  
zation motif. *EMBO J* 20:4391-4398.

- Laburthe M, Couvineau A (2002) Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept* 108:165-173.
- Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Kanse SM, Polak JM, Bloom SR (1990) Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung. *Eur J Biochem* 193:725-729.
- 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.
- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM (1997) Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 272:17810-17814.
- Langer I, Perret J, Vertongen P, Waelbroeck M, Robberecht P (2001) Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates  $[Ca^{2+}]_i$  and cyclic AMP in CHO cells expressing Galphai6. *Cell Calcium* 30:229-234.
- Langer I, Vertongen P, Perret J, Waelbroeck M, Robberecht P (2002) A small sequence in the third intracellular loop of the VPAC(1) receptor is responsible for its efficient coupling to the calcium effector. *Mol Endocrinol* 16:1089-1096.
- Le Gall SM, 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.
- Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A (2007) S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem* 282:31317-31331.
- Lieu SN, Oh DS, Pisegna JR, Germano PM (2006) Neuroendocrine tumors express PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1070:399-404.
- Lindsey JB, Cipollone F, Abdullah SM, McGuire DK (2009) Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diab Vasc Dis Res* 6:7-14.
- Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T (2007) RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 7:777-789.
- Lopez-Illasaca M (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* 56:269-277.
- Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD (2005) Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:161-171.
- Lue LF, Walker DG, Jacobson S, Sabbagh M (2009) Receptor for advanced glycation end products: its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Future Neurol* 4:167-177.
- Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, Stern DM, Yan SD (2001) Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts

- (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol* 171:29-45.
- Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ (1993) The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* 334:3-8.
- Macdonald DS, Weerapura M, Beazely MA, Martin L, Czerwinski W, Roder JC, Orser BA, MacDonald JF (2005) Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src. *J Neurosci* 25:11374-11384.
- MacKenzie CJ, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, Holland PJ, Mitchell R (2001) Mechanisms of phospholipase C activation by the vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor. *Endocrinology* 142:1209-1217.
- Mammi C, Frajese GV, Vespasiani G, Mariani S, Gnessi L, Farini D, Fabbri A, Frajese G, Moretti C (2006) PAC1-R null isoform expression in human prostate cancer tissue. *Prostate* 66:514-521.
- Manning M, Cheng LL, Klis WA, Stoev S, Przybylski J, Bankowski K, Sawyer WH, Barberis C, Chan WY (1995) Advances in the design of selective antagonists, potential tocolytics, and radioiodinated ligands for oxytocin receptors. *Adv Exp Med Biol* 395:559-583.
- Marcinkiewicz M, Seidah NG (2000) Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 75:2133-2143.
- Martin JL, Dietl MM, Hof PR, Palacios JM, Magistretti PJ (1987) Autoradiographic mapping of [mono[125I]iodo-Tyr10, MetO17]vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat brain. *Neuroscience* 23:539-565.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 268:9194-9197.
- Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Tsuda M, Fujino M (1992) Binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain Res* 575:113-123.
- Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M, Fujino M (1993) Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res* 602:57-63.
- Mazurek MF, Beal MF, Bird ED, Martin JB (1986) Vasopressin in Alzheimer's disease: a study of postmortem brain concentrations. *Ann Neurol* 20:665-670.
- McClain MS, Iwamoto H, Cao P, Vinion-Dubiel AD, Li Y, Szabo G, Shao Z, Cover TL (2003) Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 278:12101-12108.
- McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, MacKenzie CJ, Mitchell R (2000) Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 921:175-185.

- McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, MacKenzie CJ, Holland PJ, Mitchell R (2001) ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC(1) receptor splice variant. *Mol Pharmacol* 59:1523-1532.
- McRory J, Sherwood NM (1997) Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology* 138:2380-2390.
- McRory JE, Parker RL, Sherwood NM (1997) Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA Cell Biol* 16:95-102.
- Mingarro I, Whitley P, Lemmon MA, von Heijne G (1996) Ala-insertion scanning mutagenesis of the glycoporphin A transmembrane helix: a rapid way to map helix-helix interactions in integral membrane proteins. *Protein Sci* 5:1339-1341.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 170:643-648.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.
- Moroo I, Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Saito J, Saito Y, Hirai A (1998) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res* 795:191-196.
- Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y (2004) Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol* 173:1681-1688.
- Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Heinrich PC, Rose-John S (1992) Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189:794-800.
- Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G (2007) GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J* 26:1702-1712.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562-573.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998-15004.

- Noel D, Nikaido K, Ames GF (1979) A single amino acid substitution in a histidine-transport protein drastically alters its mobility in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 18:4159-4165.
- Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Tibolla G, Raselli S, Redaelli L, Bucciante G, Catapano AL (2009) Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with body mass index and waist/hip ratio in the general population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:129-134.
- Norrholm SD, Das M, Legradi G (2005) Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Regul Pept* 128:33-41.
- O'Connor PM, Cowley AW, Jr. (2007) Vasopressin-induced nitric oxide production in rat inner medullary collecting duct is dependent on V2 receptor activation of the phosphoinositide pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F526-532.
- Obara Y, Horgan AM, Stork PJ (2007) The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 101:470-482.
- Ogi K, Kimura C, Onda H, Arimura A, Fujino M (1990) Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun* 173:1271-1279.
- Ohmichi M, Koike K, Nohara A, Kanda Y, Sakamoto Y, Zhang ZX, Hirota K, Miyake A (1995) Oxytocin stimulates mitogen-activated protein kinase activity in cultured human puerperal uterine myometrial cells. *Endocrinology* 136:2082-2087.
- Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S (2006) ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1-10.
- Okazaki K, Itoh Y, Ogi K, Ohkubo S, Onda H (1995) Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides* 16:1295-1299.
- Onoue S, Hanato J, Yamada S (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates streptozotocin-induced apoptotic death of RIN-m5F cells through regulation of Bcl-2 family protein mRNA expression. *FEBS J* 275:5542-5551.
- Origlia N, Righi M, Capsoni S, Cattaneo A, Fang F, Stern DM, Chen JX, Schmidt AM, Arancio O, Yan SD, Domenici L (2008) Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. *J Neurosci* 28:3521-3530.
- Osipenko ON, Barrie AP, Allen JM, Gurney AM (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide activates multiple intracellular signaling pathways to regulate ion channels in PC12 cells. *J Biol Chem* 275:16626-16631.
- Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, Heizmann CW, Kroenke PM, Fritz G (2007) Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J* 26:3868-3878.
- Pan D, Rubin GM (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271-280.

- Pandiella A, Massague J (1991) Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1726-1730.
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4:1025-1031.
- Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38:9728-9734.
- Pei L (1997) Genomic structure and embryonic expression of the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *Regul Pept* 71:153-161.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
- Pestka S (1971) Inhibitors of ribosome functions. *Annu Rev Microbiol* 25:487-562.
- Petersson M, Alster P, Lundeborg T, Uvnas-Moberg K (1996) Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats. *Physiol Behav* 60:1311-1315.
- Pisegna JR, Wank SA (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6345-6349.
- Postina R (2008) A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res* 5:179-186.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue 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.
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888.
- Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A (2005) Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther* 7:R817-824.
- Racchi M, Solano DC, Sironi M, Govoni S (1999) Activity of alpha-secretase as the common final effector of protein kinase C-dependent and -independent modulation of amyloid precursor protein metabolism. *J Neurochem* 72:2464-2470.
- Racz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F, Jr., Tamas A, Jozsa R, Lubics A, Kiss P, Roth E, Fencz A, Toth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvari I, Somogyvari-Vigh A, Reglodi D (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 153:115-123.
- Raman KG, Sappington PL, Yang R, Levy RM, Prince JM, Liu S, Watkins SK, Schmidt AM, Billiar TR, Fink MP (2006) The role of RAGE in the pathogenesis of intestinal bar-

- rier dysfunction after hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G556-565.
- Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2010) Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids*.
- Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wieczerek E, Postina R, van Leuven F, Fahrenholz F, Kojro E (in press) The neuropeptide PACAP slows down Alzheimer's disease-like pathology in APP-transgenic mice. *FASEB J*.
- Rauci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME (2008) A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 22:3716-3727.
- Reglodi D, Tamas A, Somogyvari-Vigh A, Szanto Z, Kertes E, Lenard L, Arimura A, Lengvari I (2002) Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23:2227-2234.
- Reiss K, Saftig P (2009) The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 20:126-137.
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper 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.
- Renard C, Chappey O, Wautier MP, Nagashima M, Lundh E, Morser J, Zhao L, Schmidt AM, Scherrmann JM, Wautier JL (1997) Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Mol Pharmacol* 52:54-62.
- Reubi JC (2000) In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 921:1-25.
- Reubi JC, Laderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue JA (2000) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res* 60:3105-3112.
- Riehl A, Nemeth J, Angel P, Hess J (2009) The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal* 7:12.
- Robberecht P, Gourlet P, Cauvin A, Buscail L, De Neef P, Arimura A, Christophe J (1991) PACAP and VIP receptors in rat liver membranes. *Am J Physiol* 260:G97-102.
- Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, Christophe J (1992) Receptor occupancy and adenylate cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of pituitary adenylate cyclase-activating peptides amino-terminally shortened or modified at position 1, 2, 3, 20, or 21. *Mol Pharmacol* 42:347-355.
- Russ WP, Engelman DM (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296:911-919.
- Sabbagh MN, Agro A, Bell J, Aisen PS, Schweizer E, Galasko D (2010) PF-04494700, an Oral Inhibitor of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE), in Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*.

- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, *et al.* (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 267:14987-14997.
- Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30.
- Sexton PM, Morfis M, Tilakaratne N, Hay DL, Udawela M, Christopoulos G, Christopoulos A (2006) Complexing receptor pharmacology: modulation of family B G protein-coupled receptor function by RAMPs. *Ann N Y Acad Sci* 1070:90-104.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 21:619-670.
- Shirakawa F, Mizel SB (1989) In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol* 9:2424-2430.
- Shivers BD, Gorcs TJ, Gottschall PE, Arimura A (1991) Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology* 128:3055-3065.
- Shuto Y, Uchida D, Onda H, Arimura A (1996) Ontogeny of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor mRNA in the mouse brain. *Regul Pept* 67:79-83.
- Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW, Lee VM (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.
- Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT (2009) RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 7:17.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170-175.
- Sreedharan SP, Patel DR, Huang JX, Goetzl EJ (1993) Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 193:546-553.
- Sreedharan SP, Patel DR, Xia M, Ichikawa S, Goetzl EJ (1994) Human vasoactive intestinal peptide1 receptors expressed by stable transfectants couple to two distinct signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 203:141-148.
- Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Munch G (2009) Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.
- Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM (2002) Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1615-1625.

- Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ (1983) Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry* 22:61-68.
- Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T (1994) Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 23:408-419.
- Sun C, Song D, Davis-Taber RA, Barrett LW, Scott VE, Richardson PL, Pereda-Lopez A, Uchic ME, Solomon LR, Lake MR, Walter KA, Hajduk PJ, Olejniczak ET (2007) Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7875-7880.
- Suzuki N, Harada M, Hosoya M, Fujino M (1994) Enhanced production of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide by 1, N6-dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. *Eur J Biochem* 223:147-153.
- Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, Hudson LG, Stack MS (2007) Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 67:2030-2039.
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405:354-360.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 520:97-101.
- Talamagas AA, Efthimiopoulos S, Tsilibary EC, Figueiredo-Pereira ME, Tzinia AK (2007) Abeta(1-40)-induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPalpha release by association with cell surface APP. *Neurobiol Dis* 28:304-315.
- Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Waschek JA (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2012-2017.
- Thabard W, Collette M, Bataille R, Amiot M (2001) Protein kinase C delta and eta isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor alpha in myeloma cells. *Biochem J* 358:193-200.
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H (2006) The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ* 2006:re1.
- Thangthaeng N, Sumien N, Forster MJ (2008) Dissociation of functional status from accrual of CML and RAGE in the aged mouse brain. *Exp Gerontol* 43:1077-1085.
- Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC (1999) Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology* 140:1301-1309.

- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344 Pt 1:109-116.
- Tompkins JD, Hardwick JC, Locknar SA, Merriam LA, Parsons RL (2006) Ca<sup>2+</sup> influx, but not Ca<sup>2+</sup> release from internal stores, is required for the PACAP-induced increase in excitability in guinea pig intracardiac neurons. *J Neurophysiol* 95:2134-2142.
- Usdin TB, Bonner TI, Mezey E (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135:2662-2680.
- van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376:781-784.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Anouar Y, Fournier A, Vaudry H (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* 84:801-812.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269-324.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H (2000b) The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/CPP32. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13390-13395.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283-357.
- Vertongen P, Devalck C, Sariban E, De Laet MH, Martelli H, Paraf F, Helardot P, Robberecht P (1996) Pituitary adenylate cyclase activating peptide and its receptors are expressed in human neuroblastomas. *J Cell Physiol* 167:36-46.
- Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83-90.
- Vissing H, Aagaard L, Tommerup N, Boel E (1994) Localization of the human gene for advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) to chromosome 6p21.3. *Genomics* 24:606-608.
- Walcheck B, Alexander SR, St Hill CA, Matala E (2003) ADAM-17-independent shedding of L-selectin. *J Leukoc Biol* 74:389-394.
- Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, DiCicco-Bloom EM, Carpenter EM, Rodriguez WI (1998) Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide

- (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9602-9607.
- Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF (2006) RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 185:70-77.
- Wheeler DL, Ness KJ, Oberley TD, Verma AK (2003) Protein kinase Cepsilon is linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor-alpha ectodomain shedding and the development of metastatic squamous cell carcinoma in protein kinase Cepsilon transgenic mice. *Cancer Res* 63:6547-6555.
- Williams PD, Bock MG, Evans BE, Freidinger RM, Pettibone DJ (1998) Progress in the development of oxytocin antagonists for use in preterm labor. *Adv Exp Med Biol* 449:473-479.
- Wong AO, Li W, Leung CY, Huo L, Zhou H (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp. I. Functional coupling of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent signaling pathways in PACAP-induced GH secretion and GH gene expression in grass carp pituitary cells. *Endocrinology* 146:5407-5424.
- Word RA, Stull JT, Casey ML, Kamm KE (1993) Contractile elements and myosin light chain phosphorylation in myometrial tissue from nonpregnant and pregnant women. *J Clin Invest* 92:29-37.
- Wu ZL, Ciallella JR, Flood DG, O'Kane TM, Bozyczko-Coyne D, Savage MJ (2006) Comparative analysis of cortical gene expression in mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27:377-386.
- Xia M, Sreedharan SP, Goetzl EJ (1996) Predominant expression of type II vasoactive intestinal peptide receptors by human T lymphoblastoma cells: transduction of both Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP signals. *J Clin Immunol* 16:21-30.
- Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A (2008) Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 283:27255-27269.
- Xu Y, Toure F, Qu W, Lin L, Song F, Shen X, Rosario R, Garcia J, Schmidt AM, Yan SF (2010) Advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling and up-regulation of Egr-1 in hypoxic macrophages. *J Biol Chem* 285:23233-23240.
- Yamakawa N, Uchida T, Matthay MA, Makita K (2011) Proteolytic Release of the Receptor for Advanced Glycation End-Products from in vitro and in situ Alveolar Epithelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691.
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM (2010) Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol* 79:1379-1386.
- Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao X, Wilson B, Hong JS, Block ML (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38

- and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 319:595-603.
- Yao W, Sheikh SP, Ottesen B, Jorgensen JC (1996) Vascular effects and cyclic AMP production produced by VIP, PHM, PHV, PACAP-27, PACAP-38, and NPY on rabbit ovarian artery. *Peptides* 17:809-815.
- Yip KP (2006) Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F882-890.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370:1097-1109.
- Zampieri N, Xu CF, Neubert TA, Chao MV (2005) Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J Biol Chem* 280:14563-14571.
- Zaninetti M, Raggenbass M (2000) Oxytocin receptor agonists enhance inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus by activating interneurons in stratum pyramidale. *Eur J Neurosci* 12:3975-3984.
- Zhang L, Postina R, Wang Y (2009) Ectodomain shedding of the receptor for advanced glycation end products: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 66:3923-3935.
- Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R (2008) Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* 283:35507-35516.
- Zhong M, Yang M, Sanborn BM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation by myometrial oxytocin receptor involves Galpha(q)Gbetagamma and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activation. *Endocrinology* 144:2947-2956.
- Zhou CJ, Yada T, Kohno D, Kikuyama S, Suzuki R, Mizushima H, Shioda S (2001) PACAP activates PKA, PKC and Ca(2+) signaling cascades in rat neuroepithelial cells. *Peptides* 22:1111-1117.
- Zhu X, Gilbert S, Birnbaumer M, Birnbaumer L (1994) Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol* 46:460-469.
- Zong H, Madden A, Ward M, Mooney MH, Elliott CT, Stitt AW (2010) Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 285:23137-23146.



## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>μ</b>	mikro
<b>AD</b>	Alzheimer-Demenz
<b>ADAM</b>	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
<b>ANP</b>	Atriales natiuretisches Hormon
<b>AP-2</b>	<i>Activating Protein-2</i>
<b>APP</b>	Amyloid-Vorläuferprotein ( <i>Amyloid Precursor-Protein</i> )
<b>äq.</b>	Äquivalente
<b>As</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintrisphosphat
<b>AVP</b>	Arginin-Vasopressin
<b>Aβ</b>	Amyloid beta
<b>BHS</b>	Blut-Hirn-Schranke
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EGF</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i>
<b>GPCR</b>	G-Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>G-Protein Coupled Receptor</i> )

<b>GTP</b>	Guanosintrisphosphat
<b>HMGB1</b>	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
<b>ICAM-1</b>	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltrisphosphat
<b>M</b>	molar
<b>MAP-Kinase</b>	<i>Mitogen-Activated Protein-Kinase</i>
<b>min</b>	Minuten
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>n</b>	nano
<b>NF-IL6</b>	<i>Nuclear Factor-Interleukin 6</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor-κB</i>
<b>OT</b>	Oxytocin
<b>p(HPMA)-co-p(Maleinimido~methacrylat)</b>	Poly-N-2-Hydroxy-propylmethacrylamid-co-Poly-N-4-(Maleinimidomethyl)cyclohexancarbonsäureaminoethoxyethylmethacrylamid
<b>PACAP</b>	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>PDI</b>	<i>Polydispersity index</i>
<b>PI<sub>3</sub>K</b>	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<b>RAGE</b>	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )

<b>s</b>	Sekunden
<b>SCN</b>	Nucleus suprachiasmaticus
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfat</i> )
<b>SP-1</b>	<i>Specificity Protein-1</i>
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
<b>VIP</b>	Vasoaktives Intestinales Peptid ( <i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> )
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Bild 1.1: Darstellung der verschiedenen Spleißvarianten von RAGE und der durch Proteolyse entstandenen sRAGE-Form.....</i>	<i>3</i>
<i>Bild 1.2: Mechanismus des A<math>\beta</math>-Transportes über die Blut-Hirn-Schranke .....</i>	<i>6</i>
<i>Bild 1.3: Modell zur Bindung von PACAP an den PAC1-Rezeptor .....</i>	<i>13</i>
<i>Bild 1.4: Schematische Darstellung der PAC1-Rezeptor Varianten .....</i>	<i>15</i>
<i>Bild 1.5: PAC1-Rezeptor Signalwege .....</i>	<i>16</i>
<i>Bild 1.6: Signaltransduktionswege der Vasopressin-Rezeptoren .....</i>	<i>20</i>
<i>Bild 2.1: Schematische Darstellung des pMAL-c2 Vektors.....</i>	<i>37</i>
<i>Bild 2.2: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard.....</i>	<i>44</i>
<i>Bild 2.3: DNA-Größenstandard.....</i>	<i>44</i>
<i>Bild 2.4: Oligonukleotidadapter für pMAL-c2 Vektor .....</i>	<i>46</i>
<i>Bild 2.5: Reduktion von MTT zu Formazan – Das Prinzip des MTT-Tests .....</i>	<i>54</i>
<i>Bild 2.6: Prinzip des GloSensor cAMP-Tests.....</i>	<i>55</i>
<i>Bild 2.7: Das Prinzip des Ellman-Tests .....</i>	<i>66</i>
<i>Bild 3.1: Untersuchungen zur Stimulierung der RAGE-Proteolyse durch PMA .....</i>	<i>72</i>
<i>Bild 3.2: Identifizierung der RAGE-spaltenden Proteasen .....</i>	<i>73</i>
<i>Bild 3.3: Veränderungen in den Sequenzen der drei RAGE-Mutanten im Vergleich zu fl RAGE und esRAGE .....</i>	<i>74</i>
<i>Bild 3.4: Zellysate der RAGE-Mutanten nach Behandlung mit DMSO und PMA .....</i>	<i>75</i>
<i>Bild 3.5: Stimulierung der Proteolyse von drei verschiedenen RAGE-Mutanten mit PMA und APMA.....</i>	<i>76</i>
<i>Bild 3.6: Nachweis der HA-markierten RAGE-Varianten nach Reinigung über Ni-NTA-Säulen .....</i>	<i>78</i>
<i>Bild 3.7: Überprüfung der Expression von MBP-RAGE-Epi .....</i>	<i>79</i>
<i>Bild 3.8: Überprüfung der Reinigung von AK3259 über eine Amylose-Säule.....</i>	<i>80</i>
<i>Bild 3.9: Western Blots mit AK3259 vor und nach Reinigung über eine Amylose-Säule.....</i>	<i>80</i>
<i>Bild 3.10: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von RAGE-exprimierenden Zellen vor und nach Reinigung des AK3259.....</i>	<i>81</i>
<i>Bild 3.11: Schematische Darstellung der Kopplung des modifizierten Antikörpers mit Rhodamin-markiertem, Maleinimid-funktionalisiertem Polymer .....</i>	<i>82</i>
<i>Bild 3.12: Coomassie-Färbung der einzelnen Zwischenprodukte der Kopplung des Test-Antikörpers mit Polymer und Nachweis der Fluoreszenz im Gel .....</i>	<i>83</i>
<i>Bild 3.13: Silberfärbung des gekoppelten anti-RAGE Antikörpers und Nachweis der Fluoreszenz im Gel..</i>	<i>84</i>
<i>Bild 3.14: Der Einfluss von PACAP-27 auf die Viabilität von PAC1- und RAGE-überexprimierenden Zellen</i>	<i>86</i>
<i>Bild 3.15: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PACAP-27 .....</i>	<i>88</i>

<i>Bild 3.16: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit PMA</i> .....	89
<i>Bild 3.17: PAC1-Rezeptor Signalwege und verwendete Inhibitoren</i> .....	90
<i>Bild 3.18: Inhibierung der Proteinkinase A mit H89 bei PAC1/RAGE-Zellen</i> .....	91
<i>Bild 3.19: Inhibierung der Proteinkinase A mit KT5720 bei PAC1/RAGE-Zellen</i> .....	92
<i>Bild 3.20: Stimulierung der Adenylatzyklase (mit Forskolin) und der Proteinkinase A (mit 8-Br-cAMP)</i> .....	93
<i>Bild 3.21: Messung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in PAC1/RAGE-Zellen</i> .....	94
<i>Bild 3.22: Inhibierung der Proteinkinase C mit Gö6976 (A) und Gö6983 (B) bei PAC1/RAGE-Zellen</i> .....	95
<i>Bild 3.23: Blockierung des IP3-Rezeptors mit 2-APB bei PAC1/RAGE-Zellen</i> .....	96
<i>Bild 3.24: Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II mit CK59 bei PAC1/RAGE-Zellen</i> .....	97
<i>Bild 3.25: Nachweis des ERK1/2-Phosphorylierungsstatus in PAC1/RAGE-Zellen nach Stimulierung mit PACAP</i> .....	98
<i>Bild 3.26: Inhibierung der Proteinkinase C und 30-minütige Stimulierung mit PACAP-27</i> .....	99
<i>Bild 3.27: Inhibierung von MEK1 sowie der PI3-Kinase und 30-minütige Stimulierung mit PACAP-27</i> .....	100
<i>Bild 3.28: Nachweis des bV<sub>2</sub>- und OT-Rezeptors im Western Blot</i> .....	101
<i>Bild 3.29: Stimulierung der OT- und V<sub>2</sub>-Rezeptor Zellen</i> .....	102
<i>Bild 3.30: Kontrolle mit RAGE-exprimierenden Zellen</i> .....	103
<i>Bild 3.31: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Oxytocin</i> .....	104
<i>Bild 3.32: Sekretiertes RAGE in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Arginin-Vasopressin</i> .....	105
<i>Bild 3.33: Inhibierung von Metalloproteinasen mit GM6001</i> .....	106
<i>Bild 3.34: Inhibierung der Proteinkinase A mit KT5720</i> .....	107
<i>Bild 3.35: Messung der Veränderung der cAMP-Konzentration bei OTR/RAGE-Zellen nach Stimulierung mit Oxytocin</i> .....	108
<i>Bild 3.36: Messung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in OTR- und bV<sub>2</sub>/RAGE-Zellen</i> .....	109
<i>Bild 3.37: Inhibierung der Proteinkinase C mit Gö6976</i> .....	110
<i>Bild 3.38: Blockierung des IP3-Rezeptors mit 2-APB</i> .....	110
<i>Bild 3.39: Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II mit CK59</i> .....	111
<i>Bild 3.40: Inhibierung von ERK1/2 bei OTR/RAGE-Zellen und Nachweis des Phosphorylierungsstatus</i> .....	112
<i>Bild 3.41: Inhibierung von ERK1/2 bei bV<sub>2</sub>/RAGE-Zellen und Nachweis des Phosphorylierungsstatus</i> .....	113
<i>Bild 3.42: Einfluss einer intranasalen PACAP-Behandlung auf die Proteolyse von RAGE in murinen Lungen</i> .....	114
<i>Bild 3.43: Stimulierung von Meprin β-überexprimierenden Zellen mit PMA und A23187</i> .....	115
<i>Bild 3.44: Zelllysate von Meprin β-überexprimierenden Zellen nach Stimulierung mit PMA und A23187</i> .....	116
<i>Bild 3.45: Stimulierung mit PMA und zeitgleiche Inhibierung mit GM6001</i> .....	116
<i>Bild 3.46: Stimulierung mit A23187 und zeitgleiche Inhibierung mit GM6001</i> .....	117

*Bild 3.47: Stimulierung mit PMA und zeitgleiche Inhibierung von ADAM-10 bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors GI254023X..... 118*

## 7.3 Tabellenverzeichnis

*Tabelle 2.1: verwendete Chemikalien..... 23*

*Tabelle 2.2: verwendete Gebrauchsmaterialien..... 26*

*Tabelle 2.3: verwendete Laborgeräte ..... 27*

*Tabelle 2.4: verwendete Puffer, Lösungen und Medien ..... 29*

*Tabelle 2.5: verwendete Zellkulturmedien und Zusätze ..... 32*

*Tabelle 2.6: verwendete Inhibitoren und Aktivatoren ..... 32*

*Tabelle 2.7: verwendete Hormone ..... 33*

*Tabelle 2.8: verwendete Primärantikörper..... 34*

*Tabelle 2.9: verwendete Sekundärantikörper ..... 35*

*Tabelle 2.10: verwendete Enzyme ..... 36*

*Tabelle 2.11: verwendete Kit-Systeme ..... 36*

*Tabelle 2.12: verwendete Inhibitoren und eingesetzte Konzentrationen ..... 52*

*Tabelle 2.13: Bradford-Standardreihe ..... 62*

## 7.4 Lebenslauf



## **8 Danksagung**