

DIE ALPHA-SEKRETASE ADAM10 IM GESUNDEN
ALTERUNGSPROZESS UND ALS THERAPIEZIEL BEI DER
ALZHEIMER'SCHEN ERKRANKUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

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

Florian Schuck
geboren in Mainz

Mainz, 2017

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 01. September 2017

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum von November 2010 bis September 2015 unter der Betreuung von [REDACTED] in der Arbeitsgruppe "Molekulare Mechanismen des gesunden Alterns und der Neurodegeneration" der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel/Quellen benutzt habe als die in dieser Arbeit angegebenen.

Weiterhin erkläre ich, dass kein anderes Prüfungsverfahren beantragt oder diese Arbeit anderweitig als Prüfungsarbeit in einer anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Florian Schuck

Mainz, den _____

Danksagung

Entfällt in der elektronischen Version.

PER ASPERA AD ASTRA

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Englischsprachige Zusammenfassung (Abstract)	IX
1 Einleitung	1
1.1 Der Begriff des "gesunden" Alterns	1
1.2 Neurodegenerative Erkrankungen	5
1.2.1 Morbus Alzheimer: Übersicht.....	6
1.2.2 Neurologische Aspekte und aktuelle Therapieansätze.....	8
1.2.3 Molekulare Grundlagen der Alzheimer'schen Demenz.....	10
1.2.4 Das Amyloid-Vorläuferprotein	12
1.2.5 Die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins	13
1.2.6 Die beta-Sekretase BACE-1	17
1.2.7 Die alpha-Sekretase ADAM10.....	19
1.2.8 Therapeutische Interventionen mit A-beta als Zielmolekül.....	21
1.2.9 ADAM10 als therapeutisches Ziel	23
1.3 "Repurposing" Strategien in der pharmazeutischen Entwicklung.....	26
1.3.1 Neue Indikationen für bereits zugelassene Medikamente.....	27
1.3.2 Naturstoffe als potentielle Therapeutika	28
2 Zielsetzung dieser Arbeit	30
3 Ergebnisse und Diskussion.....	32
3.1 Die alpha-Sekretase ADAM10 im gesunden Alterungsprozess.....	32
3.1.1 Charakterisierung APP-prozessierender Enzyme in Thrombozyten.....	34

3.1.2	ADAM10 Proteinmenge bei Probanden der " <i>Normal Aging</i> " Studie	37
3.1.3	Einfluss von kognitivem Training auf die ADAM10 Menge in Thrombozyten	39
3.1.4	Enzymatische Aktivität von ADAM10 in Thrombozytenproben	41
3.2	Identifizierung von Heilpflanzenextrakten als Aktivatoren der ADAM10 Genexpression	44
3.2.1	Analyse einer Sammlung koreanischer Heilpflanzenextrakte auf selektive Induktoren des ADAM10 Promotors	45
3.2.2	Effekte nach akuter Behandlung von Mäusen mit Kandidatenextrakten	48
3.2.3	Beteiligung von Metabolismus und Blut-Hirn-Schranke an der Wirkung von Extrakten auf den ADAM10 Promotor	50
3.2.4	Identifizierung von bioaktiven Fraktionen im <i>Caragana sinica</i> Extrakt	53
3.3	Etablierung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus	58
3.3.1	Strategie zur Generierung der Mauslinie	59
3.3.2	Identifizierung von korrekt transfizierten embryonalen Stammzellen	61
3.3.3	Luziferase Aktivitätsmessung in embryonalen Stammzellen	63
4	Schlussfolgerung und Ausblick	65
5	Literaturverzeichnis	68
6	Liste der Veröffentlichungen und eigener Beitrag	86
6.1	Originalarbeiten	86
6.2	Posterbeiträge	88
7	Anhang	90
7.1	Veröffentlichungen	90
7.2	Curriculum Vitae	146

Abkürzungsverzeichnis

A-beta	Amyloid-beta
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AD	" <i>Alzheimer's disease</i> "
ADAM	" <i>a disintegrin and metalloproteinase</i> "
AFU	" <i>arbitrary fluorescence units</i> "
AICD	" <i>APP intracellular domain</i> "
ALAT	Alanin Aminotransferase
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
Aph-1	" <i>anterior pharynx-defective 1</i> "
APLP	" <i>amyloid precursor like protein</i> "
APOE	Apolipoprotein E
APP	" <i>amyloid precursor protein</i> "
ATP	Adenosintriphosphat
atRA	all-trans-Retinsäure
BACE-1	" <i>beta site APP cleaving enzyme-1</i> "
bp	Basenpaar
CD61	Integrin beta-3
CDK5	" <i>cyclin dependent protein kinase 5</i> "
cDNA	" <i>complementary DNA</i> "
CDT	" <i>clock drawing test</i> "
CRABP	" <i>cellular retinoic acid binding protein</i> "
CREBP	" <i>cAMP response element binding protein</i> "
CSF	" <i>cerebrospinal fluid</i> "
CYP	Cytochrom P450
DIA-SSQ	" <i>expert system for diagnosis of psychiatric disorders: stem screening questionnaire</i> "
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	" <i>deoxyribonucleic acid</i> "
EGF	" <i>epidermal growth factor</i> "
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
EOAD	" <i>early onset AD</i> "
ER	endoplasmatischen Retikulum
ES	embryonalen Stammzelle(n)
FAD	familiäre AD
Fe65	" <i>amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1</i> "
FoxO	" <i>forkhead box O</i> "
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	" <i>glucocorticoid responsive element</i> "
GSK-3 beta	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
Hep3B	humane Leberzelllinie
HPLC	" <i>high performance liquid chromatography</i> "
i.p.	intraperitoneal
IDCL	" <i>international diagnosis checklist</i> "
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LOAD	" <i>late onset AD</i> "

LTP	"long term potentiation"
m	"mature" (gereift, Form eines Proteins)
MADM	"mammalian disintegrin-metalloprotease"
MAP	"microtubule associated protein"
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
Maz	"Myc-associated zinc finger protein"
MBP	Myelin-basisches Protein
MDR1	"multidrug resistance protein 1"
miRNA	Mikro RNA
MMSE	"mini-mental state exam"
mRNA	"messenger RNA"
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
mTOR	"mechanistic target of rapamycin"
Nct	Nicastrin
NF-kappaB	"nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells"
NFT	"neurofibrillary tangles"
NG2	Neuron/Glia Antigen 2
NICD	"notch intracellular domain"
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	"non-steroidal anti-inflammatory drugs"
nt	"no template" (keine Vorlage, Kontrolle ohne DNA bei der PCR)
p	Proform (eines Proteins)
PBEC	"porcine brain endothelial cells"
PBMC	"peripheral blood mononuclear cells"
PC7	Prohormon Konvertase 7
PCR	"polymerase chain reaction "
P-gp	P-Glykoprotein
Pen-2	"Presenilin enhancer 2"
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP-2A	Protein Phosphatase 2A
PSEN	Presenilin
qPCR	quantitative PCR
RAR	"retinoid acid receptor"
RNA	"ribonucleic acid"
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzelllinie
siRNA	"small interfering RNA"
SOD 1)	Superoxid Dismutase 1
Sp1	"specificity protein 1"
SUP-17	Suppressor 17
T2A	Thosea asigna Virus 2A
TACE	"tumor necrosis factor alpha converting enzyme"
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
THA	1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-amin, Tacrin
TNFalpha	"tumor necrosis factor alpha"
U373	Astrogliazellen
USF	"upstream stimulatory factor"
UTR	"untranslated region"
WHO	"World Health Organization"
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung der durchschnittlichen Lebenserwartung in Deutschland.....	2
Abbildung 2:	Die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins.....	14
Abbildung 3:	Expression AD-relevanter Proteine in unterschiedlichen humanen Zellen. ..	35
Abbildung 4:	ADAM10 Proteinmenge in Thrombozyten während des gesunden Alterungsprozesses.....	38
Abbildung 5:	Einfluss von kognitivem Training auf die Expression von ADAM10 in Thrombozyten.	40
Abbildung 6:	Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf pro-fluoreszierende Peptide.....	42
Abbildung 7:	Enzymatische Aktivität von ADAM10 in Thrombozyten.	43
Abbildung 8:	Untersuchung von 313 koreanischen Pflanzenextrakten auf selektive Promotoraktivierung.....	47
Abbildung 9:	ADAM10 Expression in Gehirn und Leber nach akuter Behandlung von Versuchstieren mit Kandidatenextrakten.	49
Abbildung 10:	Einfluss von Kandidatenextrakt-Behandlung auf die Expression ausgewählter CYP450-Enzyme.....	51
Abbildung 11:	Analyse von Pflanzenextrakte auf Blut-Hirn-Schrankengängigkeit.	52
Abbildung 12:	Ausschnitt des 3D-Chromatogramms der Fraktionierung von Pflanzenextrakt 3534.1 aus Caragana sinica.	54
Abbildung 13:	Promotorassay mit fraktioniertem Pflanzenextrakt aus Caragana sinica.	56
Abbildung 14:	Vergleich von alpha-Viniferin mit Fraktion D7 aus dem Pflanzenextrakt. ...	57
Abbildung 15:	Schematische Darstellung der geplanten Adam10-Luziferase Insertion.	60
Abbildung 16:	Ausschnitte aus Gelbildern nach PCR an cDNA von embryonalen Stammzellen.	62
Abbildung 17:	Bestimmung der Menge an Luziferase in embryonalen Stammzellen.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische Daten Probandenkollektiv " <i>Normal Aging</i> " Studie.....	34
Tabelle 2: Dekodierung relevanter Pflanzenextrakte	45

Zusammenfassung

Die Alzheimer'sche Erkrankung stellt die am weitesten verbreitete Form der Demenz dar. Für die immer tödlich endende Krankheit existieren aktuell keine kurativen Therapieformen. Eines der charakteristischen Merkmale der Erkrankung stellen die sogenannten senilen Plaques im Gehirn betroffener Patienten dar. Diese Plaques bestehen hauptsächlich aus Ablagerungen von Amyloid-beta Peptid.

Bisherige Forschungen mit dem Ziel therapeutischer Interventionen mit dem Amyloid-beta Peptid im Fokus waren weitestgehend erfolglos. Durchgeführte Studien beschäftigten sich vor allem mit der Hemmung der beta-Sekretase als dem Enzym, das für die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) und damit der Generierung des Amyloid-beta Peptids verantwortlich ist (amyloidogener Weg). Alternative Ansätze verfolgen das Ziel, die Expression der alpha-Sekretase ADAM10 zu steigern, um das Ungleichgewicht der APP Spaltung zugunsten des nicht-amyloidogenen Wegs zu beeinflussen. Auf diese Weise würde nicht nur die Menge an Amyloid-beta verringert, sondern auch mit dem alternativem Spaltprodukt APPs-alpha ein neuroprotektiver Faktor freigesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von ADAM10 in Thrombozyten bei kognitiv gesund alternden Probanden untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die periphere Menge an ADAM10 im normalen Alterungsprozess ansteigt. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, die einen Zusammenhang von zerebraler mit peripherer Menge von ADAM10 zeigten, kann damit erstmalig ein Verlauf der alpha-Sekretase Expression im gesunden Alterungsprozess gezeigt werden.

Weiterhin wird in dieser Arbeit die Analyse einer Bibliothek von 313 koreanischen Heilpflanzenextrakten beschrieben. In Zellkulturversuchen wurden die Extrakte auf ihre Fähigkeit hin untersucht, selektiv den humanen ADAM10 Promotor zu aktivieren. In ersten Versuchen mit wildtypischen Mäusen wurden durch *in vitro* Versuche vorselektionierte Kandidatenextrakte auch *in vivo* getestet. Hierbei konnte die generelle Verträglichkeit der Extrakte, sowie die ADAM10-steigernde Wirkung eines Extrakts aus *Caragana sinica* in der Leber von behandelten Tieren bestätigt werden. Über weiterführende Analysen und eine Fraktionierung des Extrakts konnten bioaktive Fraktionen isoliert werden. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen wurde alpha-Viniferin als die für die ADAM10 Expressionssteigerung verantwortliche Komponente des Extrakts identifiziert.

Schließlich wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Projekt zur Generierung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus unterstützt. Hierbei sollte eine Mauslinie erzeugt werden, bei der eine Luziferase parallel zum endogenen ADAM10 Protein translatiert wird. In dieser Arbeit wurden mittels PCR Klone von embryonalen Stammzellen ausgewählt, die nach Elektroporation mit einem Zielvektor wie gewünscht transfiziert waren. Weiterhin konnte durch Lumineszenzmessungen an Stammzellmaterial auch ein funktionaler Beleg der erfolgreichen Inserierung der Zielsequenz erbracht werden. Auf Basis dieser Ergebnisse konnten Klone identifiziert werden, die für die Implantation in Ammentiere in Frage kommen und somit zur Erzeugung der Gründertiere der Reporter Mauslinie dienen.

Englischsprachige Zusammenfassung (Abstract)

Alzheimer's disease represents the most common form of dementia. Currently, no curative therapies exist for the always lethal malady. One of the characteristics of the disease are so-called senile plaques in the brain of patients. These plaques mainly consist of depositions of the amyloid-beta peptide.

Previous research aiming at therapeutically targeting the amyloid-beta peptide so far was fruitless. Conducted studies typically had the goal to inhibit the beta-secretase as the enzyme responsible for cleaving the amyloid precursor protein (APP) and thereby generating the amyloid-beta peptide (amyloidogenic pathway). Alternative approaches aim at elevating the expression of the alpha-secretase ADAM10 in order to shift the imbalance of APP cleavage in favor of the non-amyloidogenic pathway. With this, not only the amount of amyloid-beta would be reduced, but with the alternative cleavage product APPs-alpha a neurotrophic factor could be generated.

In this thesis, the expression of ADAM10 in thrombocytes of cognitively healthy aging volunteers was assessed. It was demonstrated that the peripheral amount of ADAM10 increases during normal aging. Together with the results of other groups showing a correlation of cerebral and peripheral amount of ADAM10, the course of alpha-secretase expression during healthy aging could be demonstrated for the first time.

Furthermore, in this thesis the screening of a collection of 313 Korean medicinal plant extracts is described. The extracts were tested in cell culture experiments for their potential to selectively activate the human ADAM10 promoter. In first trials with wildtype mice, the *in vitro* preselected candidate extracts were also tested *in vivo*. There, the general tolerance of the extracts was demonstrated and additionally the ADAM10-elevating effect of the extract from *Caragana sinica* could be confirmed at least in the liver. Through further analyses and by means of fractionation, bioactive portions of the extract were isolated. Via mass-spectrometric analyses alpha-viniferin was identified as the active component of the extract responsible for elevating expression of ADAM10.

Finally, in course of this thesis a project of generating an ADAM10 promoter reporter mouse was supported. The goal was to create a mouse line in which a luciferase would be translated simultaneously with the endogenous ADAM10 protein. Within this thesis, embryonic stem cell clones were selected by PCR analysis, which carried a target vector after electroporation as desired. Furthermore, by means of luminescence assays with stem cell material, a

functional proof of successful insertion of the target sequence was provided. With these results, suitable clones for implantation in foster mice were identified which will lead to the generation of founding animals for the reporter mouse line.

1 Einleitung

1.1 Der Begriff des "gesunden" Alterns

Das Altern stellt einen zentralen Prozess bei den meisten bekannten Lebensformen dar. Eine moderne Definition des Phänomens des Alterns spricht von der Gesamtheit aller Veränderungen eines Lebewesens über die Zeit, die schlussendlich mit dem Tod enden (Bowen und Atwood, 2004). Ständige physische, psychologische, genetische, molekulare und auch soziale Veränderungen charakterisieren und prägen den normalen Alterungsprozess des Menschen (Weinert und Timiras, 2003). Hierbei ist hervorzuheben, dass diese Definition des Alterns nicht nur die zahlreichen Funktionen berücksichtigt, die sich über die Lebensspanne eines Individuums verschlechtern, wie beispielsweise eingeschränkte Sehkraft, verringertes Hörvermögen und abnehmende kognitive Leistungen (Koivisto *et al.*, 1995; Buckner, 2004). In dieser Definition werden auch Veränderungen wie zum Beispiel angeeignetes Wissen, gesammelte Erfahrungen und Eindrücke eingeschlossen (Bowen und Atwood, 2004).

In Folge des demographischen Wandels, der unter anderem bedingt ist durch verbesserte allgemeine Lebensumstände und medizinische Versorgung, erreichen immer mehr Menschen ein höheres Lebensalter (Abbildung 1). So stieg die durchschnittliche Lebenserwartung von Neugeborenen in Deutschland von 37 auf 75 Jahre (Jungen) bzw. von 40 auf 81 Jahre (Mädchen) vom Ende des 19. bis zum Ende des 20. Jahrhunderts (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2017). Hierbei kommt einer der wichtigsten Faktoren zum Tragen, die den Menschen von anderen Lebewesen unterscheidet: Mit fast jeder Generation steigt der technologische Fortschritt und damit die Möglichkeit des Menschen sich immer besser gegen äußere, umweltbedingte Gefahren und vor allem auch gegen Krankheiten zu schützen (Carnes und Witten, 2014).

Ein wichtiger Aspekt einer alternden Bevölkerung ist, dass aufgrund von steigender Lebenserwartung größere Herausforderungen auf die Gesellschaft und vor allem auf das Gesundheitswesen zukommen. Pathologische Veränderungen treten mit steigendem Alter mit einer immer größeren Häufigkeit beim Menschen auf. Aus statistischen Erhebungen ist bekannt, dass beispielsweise die Inzidenzen für kardiovaskuläre Erkrankungen (North und Sinclair, 2012), Diabetes Mellitus (Kirkman *et al.*, 2012) und Demenz (Corrada *et al.*, 2010) steigen, je älter ein Mensch ist. Durch solche Erkrankungen sinkt nicht nur die allgemeine

Lebensqualität, sondern auch weitere Begleiterkrankungen können leichter auftreten und dadurch zu einem multimorbiden Phänotyp führen.

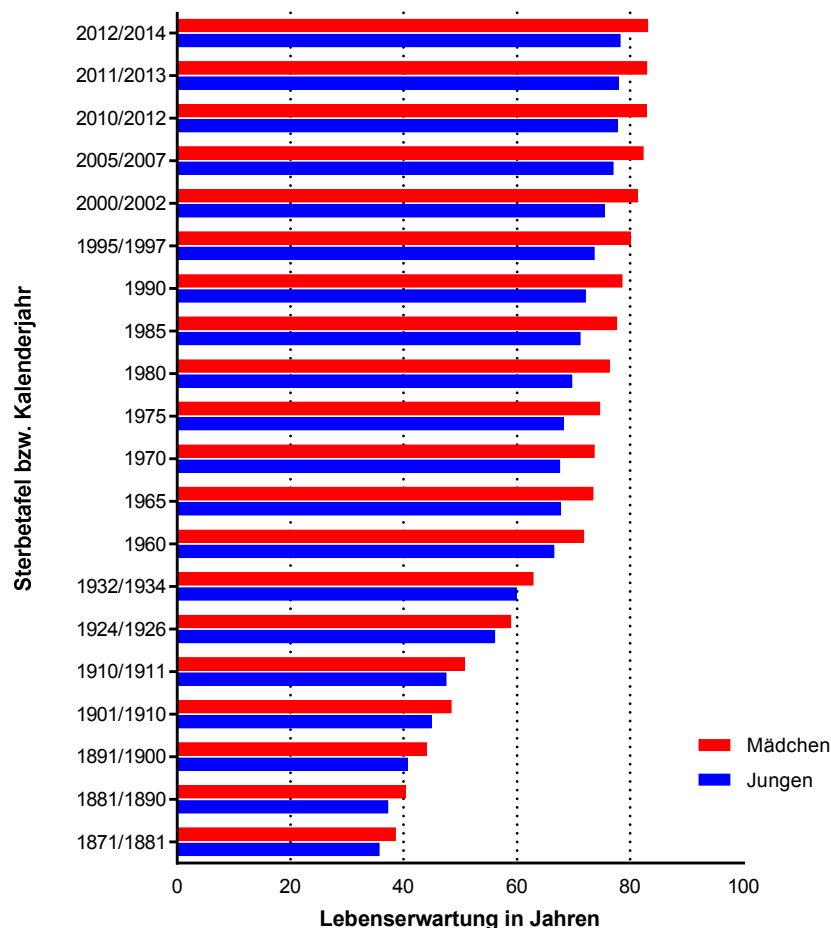


Abbildung 1: Entwicklung der durchschnittlichen Lebenserwartung in Deutschland.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Lebenserwartungen für neugeborene Jungen und Mädchen in Deutschland (in seinem jeweiligen Gebietsstand) im jeweiligen Kalenderjahr bzw. gemäß der angegebenen Sterbetafel. Datenquelle: Statistisches Bundesamt bzw. Eurostat (1960 bis 1989), modifiziert nach einer Abbildung des Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2017.

Viele Arbeitsgruppen haben sich bereits mit der Frage beschäftigt, wie der Alterungsprozess verlangsamt werden kann. So waren zumindest im Tiermodell beispielsweise kalorische Restriktion (Übersicht in Masoro, 2009) oder die Inhibierung von mTOR ("*mechanistic target of rapamycin*") durch Rapamycin dazu in der Lage, die maximale Lebensspanne behandelter Tiere zu erhöhen. Harrison und Kollegen konnten beispielsweise zeigen, dass die Lebenserwartung von mit Rapamycin behandelten weiblichen Mäusen um 14 % und von

männlichen Mäusen um 9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe stieg (Harrison *et al.*, 2009). Durch Forschungen am Süßwasserpolyphen der Gattung *Hydra* konnte zudem mit FoxO ("*forkhead box O*") ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der für die potentielle Unsterblichkeit dieses Tiers verantwortlich ist und auch in anderen Tierarten und im Menschen exprimiert wird (Boehm *et al.*, 2012).

Der Alterungsprozess wird mittlerweile als ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Prozesse verstanden (Kowald und Kirkwood, 1996; Holliday, 2006). Die Beobachtungen, dass es einige Menschen weit fortgeschrittenen Alters (Hundertjährige) gibt, die keine oder nur wenige altersbedingte Erkrankungen aufweisen (Evert *et al.*, 2003) und dass Menschen unterschiedlich auf äußere störende Einflüsse wie beispielsweise Stress oder traumatische Erlebnisse reagieren (Werner, 1992), stimulierte die Forschung nach den zugrundeliegenden Faktoren. Für diese Faktoren und deren Wirkung wurde der Oberbegriff der "Resilienz" geprägt, der beschreibt, wie widerstandsfähig ein Individuum gegenüber der Entwicklung einzelner Pathologien ist.

Der Begriff der molekularen oder zellulären Resilienz ist derzeit nicht absolut definiert, sondern wird je nach Fachgebiet unterschiedlich verwendet. Eine mögliche Definition ist die Fähigkeit eines Systems oder einer Zelle, auf Veränderungen und Störeinflüsse zu reagieren, diese zu bewältigen und wieder zur ursprünglichen Ausgangssituation zurückzufinden (Smirnova *et al.*, 2015). Weiter gefasst schließt der Begriff der Resilienz auch die Fähigkeit dieser Systeme oder Zellen ein, aufbauend auf den erfahrenen Störeinflüssen und deren Bewältigung, bei zukünftigen, ähnlichen Veränderungen, schneller und effektiver zu reagieren. Dabei ist die Resilienz auch als eine Abgrenzung zur Vulnerabilität, der Verletzbarkeit, anzusehen (Smirnova *et al.*, 2015).

Vor allem auf dem Gebiet der Stress-Forschung hat sich der Resilienz-Begriff in den vergangenen Jahren durchgesetzt. Die Beobachtung, dass Art und Intensität der Versorgung von Nachwuchs durch das Muttertier auch noch im späteren Leben signifikanten Einfluss auf Verhalten und Gehirnfunktionen von jungen Ratten hat, wird hier mit der Ausbildung von Resilienz erklärt (Franklin *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Ratten, die eine intensive Pflege durch ihr Muttertier erhalten hatten, weniger ängstlich waren bei der Erkundung neuer Umgebungen, als Artgenossen die eine weniger intensive Pflege erhalten hatten (Francis *et al.*, 1999). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass die Art der Pflege durch die Muttertiere sich auf die Jungtiere überträgt: Intensiv durch ihr Muttertier gepflegte Weibchen zeigten ein vergleichbar intensives Pflegeverhalten beim eigenen

Nachwuchs (Francis *et al.*, 1999). Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Menschen gemacht werden: So wurde gezeigt, dass misshandelte oder missachtete Kinder in ihrem späteren Leben ein höheres Risiko besitzen, psychologische Erkrankungen zu entwickeln (Übersicht in Gilbert *et al.*, 2009). Es wird diskutiert, dass durch epigenetische Regulation von bestimmten Zielgenen im Gehirn eine gewisse "molekulare Erinnerung" an die Erlebnisse im frühen und frühesten Lebensalter geschaffen wird. Beispielsweise wurde gezeigt, dass bei den oben beschriebenen Ratten mit verschiedenen Intensitäten der Jungtierpflege beim Nachwuchs unterschiedliche DNA Methylierungsmuster im Promotor für den Glukokortikoidrezeptor (GR) gefunden wurden (Weaver *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2017). Hier waren essentielle Bereiche des Promotors in Jungtieren mit intensiver Pflege hypomethyliert, was auf eine verstärkte transkriptionelle Aktivität rückschließen lässt (Razin, 1998). Durch die gesteigerte Expression des GR wird eine verbesserte Rückkopplung durch Glukokortikoide erreicht, was schließlich zu einer verminderten Ausschüttung von Kortikoliberin und damit einer verminderten Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (sog. "Stressachse") führt (Hackman *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die intensive Pflege im frühen Lebensalter bereits molekulare Grundlagen für ein verringertes Stress- und Angstverhalten der Tiere geschaffen wurde (Weaver *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2017; Weaver *et al.*, 2017).

Ein weiterer Faktor für eine Art von molekularer Resilienz kann im *klotho* Gen gesehen werden. Das Genprodukt von *klotho* wurde bereits in der Maus als ein Suppressor für das Altern beschrieben (Kurosu *et al.*, 2005) und es konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Expression des Gens mit einem beschleunigten Altern einhergeht (Kuro-o *et al.*, 1997). Auch im Menschen konnten Genvarianten von *klotho* nachgewiesen werden, die mit Langlebigkeit und einem verringerten Auftreten von Herzerkrankungen korreliert waren (Arking *et al.*, 2005). Diese Genvarianten (F352V und C370S) führen zu einer erhöhten Sekretion und Aktivität von Klotho (Arking *et al.*, 2002; Tucker Zhou *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass diese Genvarianten von Klotho auch mit verbesserten kognitiven Leistungen (Dubal *et al.*, 2014) und einem größeren kortikalen Volumen einhergehen (Yokoyama *et al.*, 2015), zwei Faktoren die während des normalen Alterungsprozesses beeinträchtigt werden (z.B. Jack *et al.*, 1998; Buckner, 2004; McDonald *et al.*, 2009). Hier wird deutlich, dass mittels Klotho ein gewisses Maß an Resilienz gegenüber diesen alterungsbedingten Funktionsbeeinträchtigungen vermittelt werden kann. In einer Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Überexpression von Klotho in embryonalen Neuronen der Maus diese resistenter gegenüber oxidativem Stress und dem daraus folgenden Absterben macht (Zeldich

et al., 2014). Diese Erkenntnisse in Bezug auf kognitive und zerebrale Wirkungen lässt Resilienzfaktoren wie Klotho zu potentiellen Zielen für die Entwicklung neuer Therapien bei neurodegenerativen Erkrankungen werden.

1.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Im Zuge der physiologischen Entwicklung des Menschen sterben Nervenzellen ab, was ein für die Ausbildung und Stabilisierung neuronaler Netzwerke vor allem im Gehirn notwendiger Vorgang ist (Cowan *et al.*, 1984; Roth und D'Sa, 2001; Miura, 2011). Im Gegensatz dazu steht das Absterben von Nervenzellen, welches lange nach der Entwicklungsphase bei pathologischen Veränderungen einsetzen kann. Im letzteren Fall spricht man von einer neurodegenerativen Erkrankung (Okouchi *et al.*, 2007). Die genaue Ätiologie und zugrundeliegende Pathomechanismen dieser Erkrankungen sind teilweise nicht vollständig bekannt, zielgerichtete und kurative Therapien sind oftmals nicht verfügbar. Beispiele für neurodegenerative Erkrankungen sind die amyotrophe Lateralsklerose (ALS), das Parkinson Syndrom, Chorea Huntington oder die Alzheimer'sche Erkrankung.

Während bei der ALS vor allem Motoneurone im Hirnstamm zugrunde gehen, was zu Lähmungserscheinungen und Muskelatrophien führt (Übersicht in Martin, 2011), sind beim Parkinson-Syndrom hauptsächlich die Basalganglien betroffen, woraus verlangsamte Bewegungsabläufe und Ruhetremor resultieren (Übersicht in Jankovic, 2008). Beiden Erkrankungen gemeinsam ist die meist ungeklärte Entstehung des Krankheitsbildes oder deren Auslöser, jedoch ist bei der ALS auch ein sogenannter familiärer Typ der Erkrankung bekannt. Hier kommt es in ca. 20 % der Fälle zu einer Mutation des Gens für die Superoxid Dismutase 1 (SOD 1), wodurch es vermutlich vermehrt zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies kommt, die nervenschädigend wirken (Übersicht in Carri und Cozzolino, 2011).

Die Chorea Huntington stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, die autosomal-dominant vererbt wird (Übersicht in Walker, 2007). Durch pathologische Wiederholungen von Basentriplets auf Chromosom 4 kommt es zu Veränderung des Proteins Huntingtin, welches vermutlich Schädigungen am Striatum der betroffenen Personen verursacht (Rubinsztein und Carmichael, 2003; Cattaneo *et al.*, 2005; Subramaniam *et al.*, 2009). Aufgrund dessen gehen selektiv Neuronen zugrunde, die auf GABA (gamma-Aminobuttersäure) reagieren und es kommt im Verlauf der Erkrankung, die bereits zwischen

dem 30. und 50. Lebensalter einsetzt, zunächst zu willkürlichen Bewegungen und im weiteren Verlauf zum Verlust zielgerichteter Bewegungen (Walker, 2007).

Die Alzheimer'sche Erkrankung war Gegenstand dieser Arbeit und wird nachfolgend näher beschrieben.

1.2.1 Morbus Alzheimer: Übersicht

Die Alzheimer'sche Erkrankung ("*Alzheimer's Disease*", AD) stellt mit ca. 60 bis 80 % aller Fälle die häufigste Form der Demenz dar (Alzheimer's Association, 2017). Die Häufigkeit der Erkrankung steigt exponentiell mit dem Alter und verdoppelt sich etwa alle 5 Jahre ab einem Alter von 65 (Kukull *et al.*, 2002). Durch den Verlust von Gedächtnisleistung und Lernvermögen findet ein unaufhaltsam fortschreitender Prozess im Gehirn der betroffenen Personen statt, der schlussendlich im Verlust der Persönlichkeit des Individuums gipfelt und mit dem Tod des Patienten endet (Van Cauwenberghe *et al.*, 2016).

Die Erstbeschreibung dieser Krankheit erfolgte bereits im Jahr 1907 durch den deutschen Neurologen Alois Alzheimer, nach dem die Erkrankung später auch benannt wurde (Alzheimer, 1907). Alzheimer beschrieb im Gehirn einer verstorbenen Patientin, die in den letzten Jahren ihres Lebens deutliche Zeichen von Demenz, Verwirrtheit und Desorientierung zeigte, morphologische Auffälligkeiten. Diese bestanden aus neurofibrillären Bündeln innerhalb von Zellen und von ihm als "eigenartig" bezeichnete Ablagerungen in den oberen Schichten der Hirnrinde, die später als senile Plaques bezeichnet wurden (Wisniewski *et al.*, 1973).

Nach diesem ersten beschriebenen Fall konnten lange Zeit keine nennenswerten Fortschritte im Hinblick auf Ursache oder Hintergründe der Krankheit gemacht werden (Selkoe *et al.*, 2012). Erst in den 1960er Jahren konnten Untersuchungen an Gehirnschnitten aus verstorbenen AD Patienten die Feinstrukturen der bereits von Alzheimer beschriebenen Läsionen mithilfe von Elektronenmikroskopie aufklären (Terry, 1963; Kidd, 1964). Wenig später konnte gezeigt werden, dass neuropathologisch keine Unterschiede zwischen der häufig beobachteten senilen Demenz und der Demenz vom Alzheimer Typ bestehen (Blessed *et al.*, 1968). Spätestens ab diesem Zeitpunkt wurde der AD eine immer größere Aufmerksamkeit geschenkt und bereits wenig später sprach die Wissenschaft bereits von der Gefahr einer drohenden Epidemie, bedingt durch eine progressiv älter werdende Menschheit (Katzman, 1976).

Durch die Identifizierung des Amyloid beta Peptids (A-beta) als dem zentralen Bestandteil der von Alzheimer beschriebenen senilen Plaques (Glenner und Wong, 1984), und der anschließenden Klonierung des Amyloid-Vorläuferproteins ("*amyloid-precursor-protein*", APP, Kang *et al.*, 1987) rückte die Erkrankung und ihr neurologischer Phänotyp weiter in den Fokus der Forschung. Wenig später gelang mehreren Arbeitsgruppen zeitgleich der Nachweis des Tau Proteins als Bestandteil der von Alzheimer beschriebenen neurofibrillären Bündel (Brion *et al.*, 1985; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Nukina und Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986). Spätestens als zu Beginn der 1990er Jahre erste Mutationen im APP Gen bekannt wurden, die unter Verdacht standen eine AD auszulösen (Levy *et al.*, 1990; Goate *et al.*, 1991), beschäftigte sich die Forschung auch in den Bereichen der Molekulargenetik und der Proteinbiochemie mit der AD.

Heute unterscheidet man zwei grundlegende Formen der Erkrankung. Während das Alter den wichtigsten Risikofaktor für die AD darstellt (Hebert *et al.*, 1995) und ein Auftreten der Erkrankung vor einem Alter von 50 Jahren sehr selten ist, sind Fälle bekannt, in denen bereits erste klinische Symptome bei Personen deutlich jüngeren Alters auftreten (Portet *et al.*, 2003). Bei dieser Form ("*early onset AD*", EOAD) konnten Mutationen in Schlüsselgenen mit dem Auftreten einer speziellen Form der AD, der frühen, autosomal-dominanten familiären AD (FAD) assoziiert werden. Die betroffenen Gene, APP, Presenilin-1 (PSEN1) und Presenilin-2 (PSEN2), sind maßgeblich an der Bildung von A-beta beteiligt (siehe Kapitel 1.2.5), jedoch treten diese Mutationen nur in unter 5 % aller beschriebenen Fälle von AD auf (Tanzi, 2012).

Die große Mehrheit der AD Fälle ist demnach der sporadischen, altersabhängigen, spät auftretenden Form ("*late onset AD*", LOAD) zuzuordnen (Citron, 2010). Neben dem Alter als Hauptrisikofaktor werden auch genetische Einflüsse bei der Entwicklung einer LOAD diskutiert. Hier wird vor allem der Genotyp des Apolipoprotein E (*APOE*) mit der Entwicklung einer AD in Verbindung gebracht (Saunders *et al.*, 1993). Das epsilon4 Allel des *APOE* wird mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer LOAD assoziiert: Pro epsilon4 Allel steigt das Erkrankungsrisiko um das 2,8-fache, was bedeutet, dass epsilon4 homozygote Personen einem achtfach erhöhten Risiko ausgesetzt sind (Corder *et al.*, 1993). Dahingegen wird das epsilon3 Allel als neutral in Bezug auf AD gewertet und dem epsilon2 Allel sogar positive Eigenschaften zugeschrieben (Farrer *et al.*, 1997; Michaelson, 2014).

Trotz intensiver Forschung vor allem in den letzten Jahrzehnten und deutlicher neurologischer Kennzeichen sind die Ursachen für das Entstehen der altersabhängigen Form der Erkrankung nach wie vor noch nicht vollständig geklärt (Karantzoulis und Galvin, 2011; Mendiola-

Precoma *et al.*, 2016). Eine ursächliche Behandlung der Krankheit und damit verbunden eine Aussicht auf eine Remission der Neurodegeneration ist noch immer nicht möglich (Ballard *et al.*, 2011; Rosenblum, 2014).

1.2.2 Neurologische Aspekte und aktuelle Therapieansätze

Eines der herausragenden klinischen Merkmale der AD ist der progressive Untergang von Neuronen im Gehirn der betroffenen Personen und der damit verbundene graduelle Verlust von kognitiven Funktionen. Getestet werden solche Funktionen wie beispielsweise Aufmerksamkeit, Orientierung, Kurzzeitgedächtnis, Sprache und Rechnen, häufig mit dem "*Mini-Mental State Exam*" (MMSE; Folstein *et al.*, 1975) und dem "*Clock Drawing Test*" (CDT, Brodaty und Moore, 1997). Mithilfe dieser neurologischen Tests kann klinisch die Diagnose einer AD gestellt werden (Tarawneh und Holtzman, 2012). Jedoch geht man davon aus, dass der Beginn der Krankheit mehr als 10 Jahre vor dem Auftreten erster messbarer Symptome stattfindet (Vos *et al.*, 2013).

Postmortal zeigen Gehirne von Patienten ausgeprägte Atrophien, die durch großflächiges Zellsterben verursacht werden (Braak und Braak, 1991). Verbunden mit dem neuronalen Untergang ist auch eine verminderte Ausschüttung von Neurotransmittern, wie beispielsweise Acetylcholin (ACh), vor allem in den Bereichen des Gehirns, die mit Lernen, Gedächtnis, Verhalten und Emotionen assoziiert sind: dem Neocortex und dem Hippocampus (Anand und Singh, 2013). ACh ist für die Reizweiterleitung zwischen Nervenzellen verantwortlich und wird unmittelbar von der Acetylcholinesterase (AChE) hydrolysiert. In Gehirnen von AD Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Personen eine geringere Menge des Neurotransmitters nachgewiesen werden (Ladner und Lee, 1998). Frühe Therapieansätze zielten auf diesen Befund ab und versuchten durch die Inhibierung der AChE den Abbau von ACh zu hemmen und somit den Spiegel des Neurotransmitters im synaptischen Spalt zu erhöhen (Racchi *et al.*, 2004). Weiterhin konnte später gezeigt werden, dass die AChE weitere Funktionen ausübt, die eine Ablagerung von A-beta in senilen Plaques fördern könnte. So wurde festgestellt, dass bei doppelt transgenen Mäusen, die sowohl die schwedische Mutante des humanen APP, als auch die humane AChE überexprimieren, das erste Auftreten von zerebralen Plaque Ablagerungen etwa 30-50 % früher zu beobachten ist als in einfach transgenen Mäusen, die nur die mutierte APP Form tragen (Rees *et al.*, 2003). Darauf basierend wurde die AChE als ein primäres Ziel zur Behandlung der AD angesehen, um

sowohl die Menge an ACh in den atrophierenden Gehirnregionen zu erhöhen, als auch weiteren Ablagerungen von A-beta entgegen zu wirken (Anand und Singh, 2013).

Das erste zugelassene Medikament zur Behandlung der AD war der AChE Inhibitor Tacrin (1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-amin, THA). Tacrin wurde 1961 als reversibler Inhibitor der AChE beschrieben und 1993 zur Behandlung von AD zugelassen (Knapp *et al.*, 1994). Aufgrund von zahlreichen Nebenwirkung, unter anderem einer ausgeprägten Hepatotoxizität durch Steigerung der Alanin Aminotransferase (ALAT), wurde Tacrin kurz darauf wieder vom Markt genommen (Watkins *et al.*, 1994).

Zurzeit werden hauptsächlich die zentral wirksamen, reversiblen AChE Inhibitoren Donepezil (Rogers *et al.*, 1998), Rivastigmin (Rosler *et al.*, 1999) und Galantamin (Raskind *et al.*, 2000) zur Behandlung der AD verwendet (Allgaier und Allgaier, 2014). Jedoch ist diese Form der Therapie lediglich als symptomatisch zu verstehen und im besten Fall in der Lage das Voranschreiten der Krankheit zu verlangsamen. Weiterhin wird der tatsächliche klinische Nutzen dieser Therapeutika kritisch diskutiert (Bond *et al.*, 2012).

Ein weiterer Wirkstoff zur symptomatischen Behandlung der AD ist der NMDA-Rezeptor Antagonist Memantin (NMDA: N-Methyl-D-Aspartat; Bormann, 1989). Ein zentraler Mechanismus bei Lernen und Gedächtnisbildung ist die Langzeitpotenzierung ("*long term potentiation*", LTP), welche durch Glycin, NMDA oder Glutamat aktivierte NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Thomas und Grossberg, 2009). Im physiologischen Zustand wird freigesetztes Glutamat verstoffwechselt oder von benachbarten Zellen aufgenommen. Zellen, die einer chronischen Aktivierung ihrer NMDA-Rezeptoren ausgesetzt sind, werden apoptotisch und sterben ab (Bonfoco *et al.*, 1995; Dreyer *et al.*, 1995). Das für die AD charakteristische A-beta führt in Astroglia zu einer gehemmten Aufnahme von extrazellulärem Glutamat, wodurch NMDA-Rezeptoren überaktiviert werden (Harkany *et al.*, 2000). Memantin bindet antagonistisch an den NMDA Rezeptor und hemmt dessen Aktivierung (Kornhuber *et al.*, 1989). Durch die schnelle Dissoziation des Wirkstoffs vom Rezeptor beeinträchtigt Memantin jedoch nicht dessen Funktionen bei kognitiven Prozessen (Chen und Lipton, 1997). Die Zulassung des Medikaments wurde 2003 für mittelschwere bis schwere AD erteilt (Thomas und Grossberg, 2009). Jedoch ist auch dieses Therapeutikum umstritten: Während in frühen Stadien der AD keine signifikante Verbesserung der Gedächtnisleistung nach Einnahme von Memantin festgestellt werden konnte (Schneider *et al.*, 2011), wurde kürzlich eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs in späteren Stadien beschrieben (Jiang und Jiang, 2015).

Da keine der verfügbaren, zugelassenen Therapeutika die Ursache der AD zum Ziel haben, können sie ein Voranschreiten der Krankheit langfristig nicht aufhalten (Lopez *et al.*, 2002; Bond *et al.*, 2012). Es ist daher von akutem Interesse, neue Therapiemöglichkeiten zu finden, die in der Pathogenese der AD angreifen.

1.2.3 Molekulare Grundlagen der Alzheimer'schen Demenz

Zwei bereits von Alois Alzheimer beschriebene mikroskopische Veränderungen im Gehirn bilden den Hauptbestandteil des klinisch-pathologischen Befundes eines an AD erkrankten Patienten (Alzheimer, 1907). Bei diesen Veränderungen handelt es sich um die senilen Plaques und die neurofibrillären Bündel ("*neurofibrillary tangles*", NFT), die bereits kurz nach ihrer Identifikation als eine der Ursachen der Entstehung einer AD diskutiert wurden (Hardy und Higgins, 1992).

Bei den NFT handelt es sich um Aggregate aus dem pathologisch hyperphosphorylierten "Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau" (MAPT, bzw. Tau, Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Unter physiologischen Bedingungen ist das Tau Protein an der Stabilisierung von Tubulin beteiligt und fördert damit die Polymerisation von Mikrotubuli (Weingarten *et al.*, 1975; Avila *et al.*, 2004). Bei AD Patienten findet sich eine um vier- bis achtfach erhöhte Phosphorylierung des Proteins im Vergleich zu gesunden Personen (Khatoon *et al.*, 1992). Hierdurch wird der Aufbau von Mikrotubuli gestört und Tau lagert sich in Form von Fibrillen innerhalb der Nervenzellen ab (Übersicht in Iqbal und Grundke-Iqbal, 2008). Wichtige Fortschritte in der Forschung am Tau Protein waren unter anderem die Klonierung des Tau Gens aus der Maus (Lee *et al.*, 1988) und die Entdeckung verschiedener Isoformen durch alternatives Spleißen der prä-mRNA (Goedert *et al.*, 1989). Weiterhin waren die Identifizierung der Tau-phosphorylierenden Enzyme cdk5 ("*cyclin-dependent protein kinase 5*") und GSK-3 beta ("*glycogen synthase kinase-3 beta*"; Ishiguro *et al.*, 1988; Ishiguro *et al.*, 1993) und die verminderte Aktivität des Tau-dephosphorylierenden Enzyms PP-2A ("*protein phosphatase 2A*") im Gehirn von AD Patienten (Gong *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2005) wichtige Meilensteine der Tau-Forschung. Das übermäßig phosphorylierte Tau ist nicht nur unfähig den Aufbau neuer Mikrotubuli zu fördern, sondern destabilisiert auch die bereits vorhandenen Mikrotubuli indem es die Dissoziation von Tau und anderen Mikrotubuli-bindenden Proteinen wie beispielsweise MAP1 ("*microtubule associated protein 1*") und MAP2 fördert (Alonso *et al.*,

1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in einem Tau-transgenen Mausmodell eine verminderte Ausbildung von dendritischen Ausläufern stattfindet (Messing *et al.*, 2013).

Die senilen (oder neuritischen) Plaques bestehen zum größten Teil aus A-beta Peptiden, die anfangs aus vaskulären Ablagerungen isoliert und über eine Analyse ihrer Aminosäuresequenz identifiziert werden konnten (Glenner und Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985). Diese 4 kDa großen Peptide entstehen durch die Prozessierung von APP (siehe Kapitel 1.2.5). Neben diesem Peptid finden sich in den senilen Plaques unter anderem auch die dem APP eng verwandten Proteine APLP1 ("*amyloid precursor-like protein I*") und APLP2 (Crain *et al.*, 1996; Bayer *et al.*, 1997) und das Prion Protein (Ferrer *et al.*, 2001). Schrittweise wurden zahlreiche Mutationen in den Genen für APP, PSEN1 und PSEN2, die eine AD Pathologie vom frühen Typ (FAD) auslösen, entdeckt (Übersicht in Tanzi, 2012). Diese Erkenntnisse bereiteten den Weg für die Entwicklung der "Amyloid Kaskaden Hypothese" (Hardy und Higgins, 1992; Hardy und Selkoe, 2002; Tanzi und Bertram, 2005). Ankerpunkt dieser Hypothese ist die vermehrte Bildung von A-beta42 Peptiden und deren Ablagerung in den senilen Plaques mit einer daraus resultierenden Neurodegeneration. Hier ist hervorzuheben, dass vor allem A-beta42 eine vermehrte Neigung zur Aggregation aufweist, vor allem im Vergleich zum besser löslichen A-beta40 (Jarrett *et al.*, 1993). Es konnte später gezeigt werden, dass vermutlich eher Oligomere als A-beta Monomere, an einer generellen Neurotoxizität beteiligt sind (Dahlgren *et al.*, 2002; Cleary *et al.*, 2005). In Ratten wurde festgestellt, dass die Injektion von oligomerem A-beta42 das Gedächtnis der Tiere unter der Behandlung negativ beeinflusst, der Effekt jedoch 10 Tage nach Behandlung wieder aufgehoben ist (Lesne *et al.*, 2006). Weiterhin konnte zumindest *in vitro* demonstriert werden, dass auch intrazelluläres A-beta proapoptotische Wirkungen zeigt (Zhang *et al.*, 2002).

Die Amyloid Kaskaden Hypothese konnte die Tau Pathologie zunächst nicht erklären. Mit der Entdeckung, dass eine Mutation im Tau Gen eine Demenz des frontotemporalen Typs auslöst (Hutton *et al.*, 1998), deren Tau Pathologie vergleichbar ist mit der bei einer AD, konnte diese fehlende Verbindung zumindest im Ansatz geschlossen werden. Da der frontotemporale Demenztyp keine A-beta Pathologie zeigt, wohl aber Neurodegeneration, konnte die Tau Pathologie als eine spätere Folge der A-beta Pathologie bei AD eingeordnet werden (Karran *et al.*, 2011). Die genauen zeitlichen und mechanistischen Zusammenhänge zwischen A-beta und Tau sind nach wie vor nicht geklärt, jedoch scheint das A-beta Peptid eine zentrale Rolle in der Pathogenese der AD zu spielen (Karran *et al.*, 2011).

1.2.4 Das Amyloid-Vorläuferprotein

Das Amyloid-Vorläuferprotein ("*amyloid precursor protein*", APP) ist ein evolutionär hoch konserviertes Typ I Transmembranprotein (Kang *et al.*, 1987; Coulson *et al.*, 2000; Tharp und Sarkar, 2013). Das für APP kodierende Gen ist beim Menschen auf Chromosom 21 lokalisiert (Korenberg *et al.*, 1989). Entsteht von diesem Chromosom eine zusätzliche Kopie (Trisomie 21), so kommt es zur Entstehung des Krankheitsbildes des sogenannten Down-Syndroms (Antonarakis *et al.*, 2004). Charakteristische Kennzeichen für diese Erkrankung sind unter anderem ein Auftreten von A-beta Ablagerungen im Gehirn der Erkrankten (Bernstein *et al.*, 2003) und ein neuropathologischer Phänotyp, der große Ähnlichkeiten mit dem der AD zeigt (Masters *et al.*, 1985; Mann *et al.*, 1990). So wurden beispielsweise mittels Magnetresonanztomographie (MRT) Atrophien von Hippocampus und Kortex bei Patienten mit Down-Syndrom gefunden, die denen von Patienten mit dem familiären Typs der AD ähneln (Annus *et al.*, 2017).

Das APP Protein selbst ist gekennzeichnet ist durch eine große extrazelluläre und eine kleine intrazelluläre Domäne, die durch einen Transmembranbereich verbunden sind (Kitaguchi *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988; De Strooper und Annaert, 2000). Von APP sind drei Isoformen bekannt, die unterschiedliche Größen aufweisen und die durch ein alternatives Spleißen der prä-mRNA zustande kommen (Kitaguchi *et al.*, 1988). Außer in ihrer Größe unterscheiden sich die Isoformen auch in ihrer Lokalisation: Während die 695 Aminosäuren große Form (APP695) hauptsächlich von Neuronen exprimiert wird (Kang und Muller-Hill, 1990), finden sich die 751 und 770 Aminosäuren großen Formen APP751 und APP770 im gesamten Körper (Selkoe *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1989; Sandbrink *et al.*, 1994). Während seines Reifungsprozesses wird das Protein sowohl N-, als auch O-glykosyliert (Weidemann *et al.*, 1989), sowie phosphoryliert (Suzuki *et al.*, 1994) und gelangt anschließend über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran der Zelle.

Hier kann das Protein seine Funktionen ausüben, die jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt wurden. Bekannt ist beispielsweise, dass APP über seine extrazelluläre Domäne mit Laminin (Kibbey *et al.*, 1993) und Kollagen (Behr *et al.*, 1996) interagieren kann und deshalb vermutlich bei der Zell-Zell Adhäsion eine Rolle spielen könnte. Diese Vermutungen werden dadurch bekräftigt, dass APP transzelluläre Homo- bzw. mit APLP1 und APLP2 Heterodimere bilden kann (Baumkotter *et al.*, 2012). Weiterhin werden dem Protein noch Funktionen bei der Zellmigration (Sabo *et al.*, 2001) und bei der morphologischen Differenzierung kortikaler Neurone (Allinquant *et al.*, 1995) zugewiesen.

Durch den *knock-out* von APP in Mäusen wurden bei den Tieren zunächst keine offensichtlichen Veränderungen festgestellt (Zheng *et al.*, 1995). Jedoch wurde bei genaueren Studien ein vermindertes Körpergewicht, geringere Fortbewegungsfähigkeit und eine erhöhte Anfälligkeit für epileptische Anfälle gegenüber wildtypischen Mäusen beobachtet (Zheng *et al.*, 1995). Der zunächst unauffällige Phänotyp konnte später damit erklärt werden, dass die dem APP eng verwandten Proteine APLP1 und APLP2 vermutlich die Funktionen des fehlenden APP ersetzen können (Heber *et al.*, 2000; Herms *et al.*, 2004). Tatsächlich war ein doppelter *knock-out* von APP und APLP2 innerhalb der ersten Tage nach Geburt der Nachkommen letal, was eine essentielle Beteiligung von APP und der APP-ähnlichen Proteine bei der Entwicklung nahe legt (von Koch *et al.*, 1997). Später konnte gezeigt werden, dass diese doppelten *knock-out* Mäuse eine fehlerhafte Ausbildung neuromuskulärer Synapsen zeigen (Wang *et al.*, 2005), was vermutlich schlussendlich den frühen Tod der Tiere erklärt. Der dreifache *knock-out* von APP, APLP1 und APLP2 in Mäusen führt ebenfalls zum Tod der Neugeborenen kurz nach der Geburt (Herms *et al.*, 2004). Herms und Kollegen berichteten hierbei, dass die Tiere abnormale Kortizes aufwiesen, die einer Typ 2 Lissenzephalie ("*Cobblestone*"-Lissenzephalie) glichen. Die unregelmäßige Oberfläche des Kortex wurde hierbei offensichtlich durch ein übermäßiges Wandern von Zellen verursacht (Herms *et al.*, 2004).

1.2.5 Die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins

Neben den genannten möglichen Funktionen des Volllängen APP spielen auch seine Spaltprodukte entscheidende Rollen in neuronalen Prozessen (Ludewig und Korte, 2016). Grundsätzlich kann man die proteolytische Prozessierung von APP in zwei gegensätzliche Wege unterteilen, den amyloidogenen und den nicht-amyloidogenen (siehe Abbildung 2).

Beim amyloidogenen Weg entstehen nach initialer Spaltung durch die beta-Sekretase in der Ektodomäne des APP zum einen das lösliche APPs-beta und der membrangebundene, C-terminale Rest C99 (Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999). Letzterer wird durch den gamma-Sekretase Komplex innerhalb der Membran weiter prozessiert (Yankner *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 1994), was zur Freisetzung von löslichem A-beta und der AICD ("*APP intracellular domain*"), der intrazellulären Domäne des APP, führt. Der gamma-Sekretase Komplex besteht aus Aph-1 ("*anterior pharynx-defective 1*"), Nicastrin (Nct), Pen-2 ("*Presenilin enhancer 2*") und den katalytisch aktiven Aspartatproteasen PSEN1

oder PSEN2 in einer isostöchiometrischen Zusammensetzung (Haass und Steiner, 2002; Edbauer *et al.*, 2003; Spasic und Annaert, 2008). Die gamma-Sekretase ist in der Lage, das C99 Fragment an mehreren Stellen zu prozessieren. Je nach Spaltstelle werden verschieden große A-beta Peptide mit identischem N-Terminus generiert, wobei in der Mehrheit 40 und deutlich weniger 42 Aminosäuren lange Produkte entstehen (A-beta40 bzw. A-beta42, Naslund *et al.*, 1994). Vor allem letzteres bildet aufgrund seiner geringeren Löslichkeit leicht Oligomere und Fibrillen (Jarrett *et al.*, 1993) und findet sich als Hauptbestandteil in senilen Plaques bei Patienten mit AD (Roher *et al.*, 1993; Iwatsubo *et al.*, 1994). Die AICD fungiert möglicherweise als Transkriptionsfaktor, indem sie das Adapterprotein Fe65 aktiviert und schließlich mit diesem in den Kern transloziert (Cao und Sudhof, 2004; Hebert *et al.*, 2006).

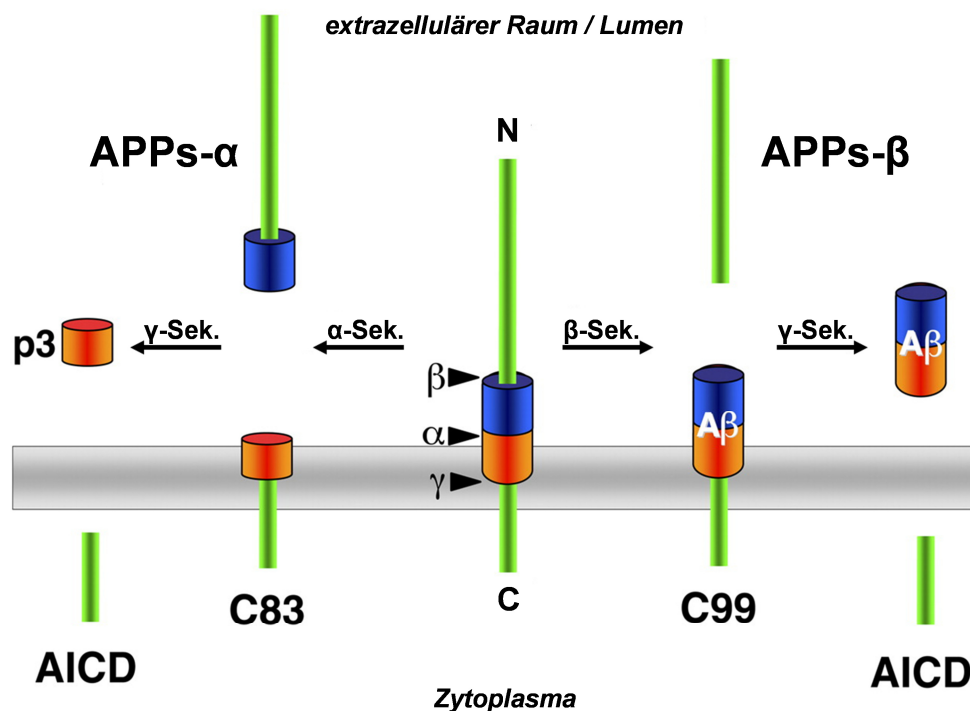


Abbildung 2: Die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins.

Das Amyloid-Vorläuferprotein wird initial auf dem nicht-amyloidogenen Weg durch die alpha-Sekretase oder auf dem amyloidogenen Weg durch die beta-Sekretase gespalten. Dies führt zur Generierung der löslichen Spaltprodukte APPs-alpha oder APPs-beta. Die in der Membran verbleibenden Reste C83 oder C99 werden anschließend von der gamma-Sekretase weiter prozessiert, wodurch die löslichen Peptide p3 oder A-beta extrazellulär, bzw. in beiden Fällen die AICD intrazellulär freigesetzt werden. Abbildung modifiziert nach Kaether und Haass, 2004.

Beim alternativen, nicht-amyloidogenen Weg findet die initiale Spaltung des APP durch die alpha-Sekretase statt (Esch *et al.*, 1990; Lichtenthaler und Haass, 2004). Da diese Proteolyse innerhalb der A-beta Sequenz des APP stattfindet, wird die Generierung von A-beta bereits hier unterbunden (Esch *et al.*, 1990). Durch die Prozessierung von APP durch die alpha-Sekretase wird ein lösliches APPs-alpha Fragment generiert und ein membrangebundener Rest (C83) bleibt erhalten. Letzterer wird ebenfalls vom gamma-Sekretase Komplex gespalten, was zur Bildung des löslichen p3 Peptids führt. Im Unterschied zu A-beta weist dieses keine neurotoxischen Eigenschaften auf und wird nicht in senilen Plaques gefunden (Haass *et al.*, 1993; Lichtenthaler und Haass, 2004). Neben diesem Peptid wird analog zum amyloidogenen Weg auch die AICD durch die gamma-Sekretase gebildet.

Dem im ersten Schritt entstandenen APPs-alpha konnten in verschiedenen Studien neuroprotektive und neurotrophe Wirkungen zugewiesen werden (Thornton *et al.*, 2006; Corrigan *et al.*, 2011; Kogel *et al.*, 2012). So konnte gezeigt werden, dass APPs-alpha hippocampale Neuronen vor oxidativen Schäden durch A-beta schützen kann (Goodman und Mattson, 1994), das Neuritenwachstum positiv beeinflusst (Qiu *et al.*, 1995; Ohsawa *et al.*, 1997), die Synaptogenese fördert (Bell *et al.*, 2008) und zu einer erhöhten Neurogenese beiträgt (Caille *et al.*, 2004). Weiterhin konnte an hippocampalen Schnitten gezeigt werden, dass die synaptische Plastizität durch APPs-alpha positiv beeinflusst wird (Ishida *et al.*, 1997; Hick *et al.*, 2015).

Als potentielle alpha-Sekretasen wurden Mitglieder der ADAM ("*a disintegrin and metalloproteinase*") Familie diskutiert, hierbei vor allem ADAM9, ADAM10 und ADAM17. Zwar wurde für ADAM9 gezeigt, dass es die Sekretion von APPs-alpha steigern kann (Koike *et al.*, 1999). Die Proteolyse von APP durch ADAM9 findet jedoch zwei Aminosäuren von der typischen alpha-Schnittstelle versetzt statt (Roghani *et al.*, 1999). ADAM9 *knock-out* Mäuse zeigen weiterhin keine verminderte alpha-Sekretase Aktivität und damit normale Level von APPs-alpha und p3 Peptid (Weskamp *et al.*, 2002). Aus diesem Grund kam die Funktion als primäre alpha-Sekretase für ADAM9 nicht weiter infrage.

ADAM10 und ADAM17 wurde beiden eine alpha-Sekretase Aktivität zugesprochen (Buxbaum *et al.*, 1998; Lammich *et al.*, 1999; Slack *et al.*, 2001). Für ADAM17 oder TACE ("*tumor necrosis factor alpha cleaving enzyme*") konnte in einer sekundären Nierenzelllinie (HEK293) nachgewiesen werden, dass bei Überexpression vermehrt APPs-alpha gebildet wird (Slack *et al.*, 2001; Endres *et al.*, 2005). Für ADAM10 wurden ebenso in HEK293 Zellen vergleichbare Ergebnisse erzielt und es konnte zudem gezeigt werden, dass die

Spaltung von APP durch ADAM10 an der physiologischen alpha-Schnittstelle zwischen Lysin 16 und Leucin 17 (Nummerierung ausgehend vom N-Terminus der A-beta Sequenz) stattfindet (Lammich *et al.*, 1999). Embryonale Fibroblasten aus ADAM17 *knock-out* Mäusen (Buxbaum *et al.*, 1998) und solche aus ADAM10 *knock-out* Mäusen (Hartmann *et al.*, 2002) waren jeweils in der Lage APP proteolytisch zu spalten. Dadurch waren beide Enzyme potentielle primäre alpha-Sekretase Kandidaten. Die durch die Proteinkinase C (PKC)-stimulierte Sekretion von APPs-alpha durch Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) war jedoch bei den ADAM17 *knock-out* Zellen nicht mehr möglich, wodurch ADAM17 weniger wahrscheinlich war (Buxbaum *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse für ADAM10 konnten im Mausmodell bestätigt werden: Eine Überexpression von ADAM10 in AD Modellmäusen führte zu erhöhten APPs-alpha Mengen und verringerter A-beta Plaque Bildung. Damit konnte die physiologische Relevanz von ADAM10 als alpha-Sekretase bestätigt werden (Postina *et al.*, 2004). Später zeigte der siRNA-vermittelte *knock-down* von ADAM10 in primären Neuronen ein Ausbleiben der alpha-Sekretase Aktivität, jedoch nicht der *knock-down* von ADAM17 (Kuhn *et al.*, 2010). Weiterhin konnte bei Mäusen mit einem konditionellen *knock-out* von ADAM10 gezeigt werden, dass eine verminderte Menge von APPs-alpha in embryonalen Neuronen vorhanden war (Jorissen *et al.*, 2010). Auf dieser Grundlage geht man heute davon aus, dass ADAM10 die physiologische und konstitutiv aktive alpha-Sekretase in Neuronen darstellt. Mit der Erkenntnis, dass ADAM9 in der Lage ist ADAM10 zu spalten, ist eine Regulation von ADAM10 durch ADAM9 denkbar (Parkin und Harris, 2009; Tousseyn *et al.*, 2009; siehe Kapitel 1.2.7).

Die primäre, physiologische beta-Sekretase konnte bereits früh als BACE-1 ("*beta site APP cleaving enzyme 1*") identifiziert werden (Vassar *et al.*, 1999). Das diesem Protein eng verwandte BACE-2 wurde auch als beta-Sekretase diskutiert, jedoch zeigt das Protein eine nur sehr geringe Expression im Gehirn (Bennett *et al.*, 2000; Farzan *et al.*, 2000). Weiterhin kann BACE-2 zwar *in vitro* A-beta generieren, bevorzugt spaltet es das APP aber in einer nicht-amyloidogenen Weise innerhalb der A-beta Sequenz (Fluhrer *et al.*, 2002; Basi *et al.*, 2003). Mit Meprin-beta konnte vor kurzem ein weiteres Enzym mit beta-Sekretase Aktivität identifiziert werden, welches A-beta unabhängig von BACE-1 aus APP freisetzen kann (Bien *et al.*, 2012). Weiterhin wurde für dieses Enzym gezeigt, dass es durch die Spaltung der unreifen Form von ADAM10 die Reifung und Aktivität der alpha-Sekretase erhöhen kann (Jefferson *et al.*, 2013). Jedoch gilt ADAM10 selbst auch als Protease für Meprin-beta, was in

HEK293 Zellen demonstriert wurde (Herzog *et al.*, 2014). Die physiologische Bedeutung von Meprin-beta ist damit noch nicht vollständig geklärt, da es sowohl dazu in der Lage ist, A-beta in einer beta-sekretorischen Weise zu generieren, aber auch gegensätzlich den nicht-amyloidogenen Weg durch Förderung der alpha-Sekretase stimuliert (siehe Kapitel 1.2.6).

1.2.6 Die beta-Sekretase BACE-1

Die Entdeckung der physiologischen beta-Sekretase gelang mehreren Gruppen gleichzeitig und unabhängig voneinander. Durch Klonierung, Überexpression und Aufreinigung des Enzyms, sowie durch die Analyse von Spaltprodukten wurde eine Aspartatprotease identifiziert, die von den beforschenden Gruppen die Namen BACE, Asp2 oder memapsin 2 bekam (Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). Alle beteiligten Gruppen identifizierten das gleiche 501 Aminosäuren lange Protein, das später als BACE-1 bekannt wurde und die physiologische beta-Sekretase darstellt (Übersicht in Vassar *et al.*, 2014).

Die mRNA von BACE-1 besteht aus neun Exons und acht Introns. Die Genregion umfasst 30,6 Kilobasen (kb) und ist auf Chromosom 11 lokalisiert (Sambamurti *et al.*, 2004). Um den Promotor des Gens zu charakterisieren, klonierten Christensen und Kollegen einen 2.668 Basenpaar (bp) langen Abschnitt des 5'-untranslatierten Bereichs (5'UTR) von BACE-1 (Christensen *et al.*, 2004). In dieser Studie konnte der minimale Promotor als ein 665 bp langer Bereich zwischen bp -619 und +46 identifiziert werden. Der Promotorbereich des Gens weist innerhalb der ersten 1,5 kB stromaufwärts des Translationsstarts weder TATA noch CAAT Motive auf und hat einen hohen GC-Gehalt, wodurch er dem von sogenannten "*house-keeping*" Genen ähnelt (Sambamurti *et al.*, 2004). Mit diesen Eigenschaften ist er auch dem Promotorbereich von APP (Salbaum *et al.*, 1988; Lahiri, 1995) sehr ähnlich (ADAM10 Promotor siehe Kapitel 1.2.7). Weiterhin befinden sich im Promotor von BACE-1 einige Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise CREBP ("*cAMP response element binding protein*"), GRE ("*glucocorticoid responsive element*") und NF-kappaB (Sambamurti *et al.*, 2004). Es wurde beobachtet, dass die BACE-1 Proteinmengen in Gehirnen von AD Patienten erhöht, die Menge an BACE-1 mRNA jedoch unverändert war (Holsinger *et al.*, 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die 5'UTR des Gens seine Expression erniedrigt (Lammich *et al.*, 2004).

BACE-1, ein Typ I Transmembranprotein, wird als Zymogen translatiert. Bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird die katalytische Domäne des Enzyms gefaltet (Haniu *et al.*, 2000). Seine Prodomäne wird im Golgi-Apparat von Furin Proprotein-Konvertasen abgespalten (Bennett *et al.*, 2000; Benjannet *et al.*, 2001) und das Protein wird N-glykosyliert (Capell *et al.*, 2000; Haniu *et al.*, 2000) und phosphoryliert (Pastorino *et al.*, 2002). Durch eine mögliche Acetylierung von BACE-1 wird vermutlich dessen Halbwertszeit und die Reifung des Proteins beeinflusst (Costantini *et al.*, 2007; Ko und Puglielli, 2009). Die Expression von BACE-1 ist am höchsten im Pankreas und im Gehirn (Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999), wobei die enzymatische Aktivität von BACE-1 im Pankreas durch alternatives Spleißen sehr gering ist (Sinha *et al.*, 1999; Mowrer und Wolfe, 2008). Die mRNA von BACE-1 wurde zwar regionsunabhängig in allen Neuronen des Gehirns, jedoch nicht in Gliazellen gefunden (Marcinkiewicz und Seidah, 2000).

Durch die proteolytische Aktivität von BACE-1, die hauptsächlich im Golgi-Apparat und in Endosomen mit einem sauren pH Wert ausgeprägt ist (Huse *et al.*, 2000), wird APP an der beta-Sekretase Spaltstelle (zwischen Met-596 und Asp-597 von APP695) prozessiert, was nach weiterer Prozessierung durch den gamma-Sekretase Komplex zur Bildung von A-beta führt (siehe Kapitel 1.2.5).

Um die Relevanz von BACE-1 als der physiologischen beta-Sekretase zu bestätigen, wurden entsprechende *knock-out* Mäuse (BACE-1^{-/-}) generiert (Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001). In den Erstbeschreibungen dieser Tiere wurden keine Auffälligkeiten hinsichtlich des generellen Phänotyps, der Lebenserwartung, des Verhaltens oder physiologischer Parameter berichtet. Es konnte gezeigt werden, dass bei Kreuzung von BACE-1^{-/-} Tieren mit APP-transgenen Tieren die Bildung von A-beta und von senilen Plaques ausblieb (Ohno *et al.*, 2004; Laird *et al.*, 2005), was BACE-1 zu einem wichtigen therapeutischen Ziel in der AD Forschung werden ließ (Vassar, 2014; Yan und Vassar, 2014).

Durch die konzentrierte Lokalisation von BACE-1 an präsynaptischen Nervenenden wird für das Protein eine wichtige Rolle an der Synapse angenommen (Deng *et al.*, 2013; Kandalepas *et al.*, 2013). In der Tat zeigten auch neuere Studien an den BACE^{-/-} Tieren, dass diese doch komplexere neurologische Phänotypen aufweisen, als bisher angenommen. So konnte gezeigt werden, dass die Tiere unter anderem Hypomyelinierung von peripheren Nerven zeigen (Willem *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008), kognitive Defizite aufweisen, anfällig sind für epileptische Anfälle (Kobayashi *et al.*, 2008), sowie Retinadefekte ausbilden können (Cai *et al.*, 2012). Als Therapieziel ist BACE-1 durch diese Nebenfunde demnach nicht ohne

potentielle Einschränkungen zu sehen. Die im Tiermodell beschriebenen Phänotypen könnten bei einer BACE-1-reduzierenden oder -inhibierenden Therapie im Menschen vergleichbare unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen (Übersicht in Yan und Vassar, 2014).

1.2.7 Die alpha-Sekretase ADAM10

Die physiologisch relevante und konstitutiv aktive alpha-Sekretase in Neuronen ist ADAM10 (Postina *et al.*, 2004; Jorissen *et al.*, 2010; Kuhn *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2012). Zuerst isoliert und gereinigt wurde das Protein im Jahr 1989 aus Membranen von Myelinscheiden des Rinderhirns, bei denen eine Metalloproteaseaktivität beschrieben wurde, die das Myelin-basische Protein (MBP) spalten konnte (Chantry *et al.*, 1989). Die erste Klonierung, damals unter dem Namen MADM ("*mammalian disintegrin-metalloprotease*") erfolgte 1996 aus cDNA des Rinds (Howard *et al.*, 1996). Es konnte später gezeigt werden, dass dieses Protein, zwischenzeitlich bekannt als ADAM10, dazu in der Lage ist rekombinantes TNF-alpha ("*tumor necrosis factor alpha*") zu spalten (Lunn *et al.*, 1997). Der Nachweis der Prozessierung von APP durch ADAM10 in HEK293 Zellen gelang wenig später (Lammich *et al.*, 1999). Homologe Formen von ADAM10 wurden im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* unter dem Namen SUP-17 (Tax *et al.*, 1997; Wen *et al.*, 1997) und "Kuzbanian" in der Fliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen (Rooke *et al.*, 1996).

Im Menschen ist das Gen für ADAM10 auf Chromosom 15 lokalisiert, in der Maus auf Chromosom 9. Es kodiert für 16 Exons und 15 Introns (Yamazaki *et al.*, 1997a; Yamazaki *et al.*, 1997b). Mithilfe von Luziferase Reportergen Analysen wurde eine 2.179 bp große Region als Promotorregion identifiziert, die keine TATA Bindestellen, jedoch einen CAAT Bereich enthält (Prinzen *et al.*, 2009). Der Kernbereich des Promotors wurde in der gleichen Studie zwischen bp -508 und -300 identifiziert und weist neben Bindemotiven für die Transkriptionsfaktoren Sp1 ("*specificity protein 1*"), USF ("*upstream stimulatory factor*") und Maz ("*Myc-associated zinc finger protein*") auch solche für RXR ("*retinoid-X receptor*") auf. Weiterhin konnte mit Hilfe von Versuchen an neuronentypigen SH-SY5Y Zellen *in vitro* gezeigt werden, dass all-*trans*-Retinsäure (atRA) über RAR/RXR (RAR: "*retinoid acid receptor*") Heterodimere den Promotor von ADAM10 aktiviert, zu erhöhten Mengen an ADAM10 mRNA und Protein führt und eine vermehrte Bildung von APPs-alpha zur Folge hat (Endres *et al.*, 2005; Tippmann *et al.*, 2009). Die mRNA von ADAM10 weist zudem eine 469 bp große 5'UTR auf, die in der Lage ist die Translation des Proteins zu inhibieren, wie an

Versuchen mit HEK293 Zellen gezeigt wurde (Lammich *et al.*, 2010). Weiterhin enthält die 3'UTR von ADAM10 Erkennungssequenzen für micro RNA Spezies (miRNA). So konnte in Leberzellen (Hep3B) gezeigt werden, dass miRNA-122 die Expression von ADAM10 negativ reguliert (Bai *et al.*, 2009). In SH-SY5Y Zellen wurde dies sowohl für miRNA-144 und 451 (Cheng *et al.*, 2013), als auch für miRNA-103, 107 und 1306 (Augustin *et al.*, 2012) beobachtet.

ADAM10, ein Typ I Transmembranprotein, wird in allen Geweben exprimiert (Wolfsberg *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1996). Nach Abspaltung seiner Signalsequenz besteht humanes ADAM10 aus 729 Aminosäuren, die eine große glykosylierte extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze, 55 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne bilden (Übersicht in Saftig und Lichtenthaler, 2015). Translatiert wird ADAM10 zunächst als Proform, deren Propeptid von 193 Aminosäuren durch die Prohormon Konvertase 7 (PC7, Anders *et al.*, 2001; Lopez-Perez *et al.*, 2001) oder durch Furin (Anders *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2006) bei der Passage durch das Golgi-Netzwerk entfernt wird. Das Propetid zeigt zwar inhibitorische Wirkung auf ADAM10 und muss für dessen physiologische Funktion entfernt werden (Moss *et al.*, 2007), ist jedoch offensichtlich wichtig für die korrekte Faltung des Proteins. Letzteres konnte in HEK293 Zellen gezeigt werden, bei denen nach Transfektion einer ADAM10 Mutante ohne Prodomäne die APPs-alpha Sekretion nicht anstieg, jedoch nach Kotransfektion mit der reinen Prodomäne des Proteins (Anders *et al.*, 2001). Die Reifung des Proteins ist ein stark regulierter Prozess, der auch unter anderem von der Glykosylierung an den vier potentiellen Stellen der extrazellulären Domäne von ADAM10 abhängt (Escrevente *et al.*, 2008).

ADAM10, das wie alle ADAM Proteine zur Gruppe der Metzinkine gehört (Stocker *et al.*, 1995; Maskos *et al.*, 1998), besitzt mehrere charakteristische Domänen in seinem extrazellulären Bereich. Zu nennen sind hier die EGF-ähnliche ("*epidermal growth factor*") Domäne, die Cystein-reiche Domäne, die Disintegrin-ähnliche Domäne und die für die Aktivität unerlässliche katalytische Domäne mit einem typischen Zinkbindemotiv (HEXXHXXGXXH; H: Histidin, E: Glutamat, G: Glycin, X: jede beliebige Aminosäure; Wolfsberg *et al.*, 1995; Black und White, 1998). Nach wie vor ist jedoch die dreidimensionale Struktur des extrazellulären Bereichs nicht vollständig aufgeklärt (Saftig und Lichtenthaler, 2015).

Im Gegensatz zum unreifen ADAM10, das vor allem im Golgi-Netzwerk der Zelle zu finden ist, lokalisiert reifes ADAM10 vor allem an der Zelloberfläche (Lammich *et al.*, 1999).

Neben dem APP hat ADAM10 noch zahlreiche weitere physiologische Substrate. Zum Beispiel finden sich hierunter das unreife TNF-alpha (Rosendahl *et al.*, 1997), Kollagen Typ IV (Millichip *et al.*, 1998), Ephrin-A2 (Hattori *et al.*, 2000), EGF (Sahin *et al.*, 2004) und Notch-1 und dessen Ligand Delta (Pan und Rubin, 1997; Six *et al.*, 2003). Bemerkenswert ist die Letalität von ADAM10 *knock-out* Mäusen am embryonalen Tag 9,5 (Hartmann *et al.*, 2002). Dies verhinderte zunächst die weitere Untersuchung ADAM10-defizienter Mäuse. Vor allem in Bezug auf das letztgenannte Notch kann diese Beobachtung erklärt werden. Durch seine zentrale Rolle bei Embryonalentwicklung, Neurogenese und Hämatopoese ist der Notch Rezeptor unerlässlich bei Entwicklungsprozessen (Übersicht in Sato *et al.*, 2012). Seine Funktion erhält der Notch Rezeptor durch die extrazelluläre Spaltung durch ADAM10 (Lieber *et al.*, 2002) und die weitere Prozessierung innerhalb der Membran durch den gamma-Sekretase Komplex (Struhl und Greenwald, 1999). Diese Art der Spaltung, gibt die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors, die NICD ("*notch intracellular domain*") frei, die nach Translokation in den Kern als Transkriptionsfaktor wirken kann (De Strooper *et al.*, 1999).

Auch im Hinblick auf die postnatale Entwicklung hat ADAM10 tragende Funktionen. So konnten bei Tieren mit einem konditionellem *knock-out* des Enzyms eine erhöhte Anfälligkeit für epileptische Anfälle und ein verringertes Lernvermögen der Tiere festgestellt werden (Prox *et al.*, 2013). Weiterhin wurde beschrieben, dass N-Cadherin ein Substrat von ADAM10 darstellt, wodurch der Sekretase auch eine Rolle bei der Ausbildung von zellübergreifenden Kontakten zukommt (Reiss *et al.*, 2005). Schließlich wurde in embryonalen Fibroblasten der Maus gezeigt, dass auch Neuroligin-1 durch ADAM10 gespalten werden kann (Suzuki *et al.*, 2012). Neuroligin-1 ist ein postsynaptisches Zelladhäsionsmolekül, das bei der exzitatorischen Signalweiterleitung glutamaterger Neuronen von zentraler Bedeutung ist (Sudhof, 2008). Im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Intervention mit ADAM10 als Zielstruktur sind solche Befunde wichtig, nicht allein um potentielle unerwünschte Wirkungen abschätzen zu können (Übersicht in Endres und Deller, 2017).

1.2.8 Therapeutische Interventionen mit A-beta als Zielmolekül

Die bereits zuvor beschriebene Amyloid-Kaskaden Hypothese und das A-beta Peptid als dessen zentralen Ankerpunkt waren im vergangenen Jahrzehnt Ausgangspunkt für zahlreiche

Therapieansätze zur Behandlung der AD, die alle eine Reduktion von A-beta zum Ziel hatten (Übersicht in Yan und Vassar, 2014). Die Sekretasen, die am amyloidogenen Weg der APP Prozessierung beteiligt sind, waren demnach die logischen Ansatzpunkte für potentielle pharmakologische Interventionen (Übersicht in Salloway *et al.*, 2008).

Die Strategie der Inhibierung der gamma-Sekretase ist vor allem darauf begründet, dass die am meisten vorkommenden Mutationen, die zu einer FAD führen, in den Presenilinen liegen (De Strooper *et al.*, 1998). Jedoch scheiterte bereits die erste klinische Studie in diesem Bereich, die den gamma-Sekretase Modulator Tarenflurbil (R-Flurbiprofen) bei Patienten mit milder AD untersuchte (Green *et al.*, 2009). *In vitro* wurde gezeigt, dass das nichtsteroidale Antiphlogistikum (NSAID, "*non-steroidal anti-inflammatory drug*") Flurbiprofen direkt auf die gamma-Sekretase wirkt und im Tiermodell konnte belegt werden, dass es die Menge an A-beta42 in APP-transgenen Mäusen senkt (Eriksen *et al.*, 2003). Jedoch konnte in der klinischen Studie am Menschen keine Verringerung der kognitiven Einschränkung gegenüber dem Placebo festgestellt werden und Flurbiprofen führte bei einigen Patienten zudem zu Nebenwirkungen wie Schwindel, Anämie und Infektionen (Green *et al.*, 2009). Auch weitere klinische Studien wie beispielsweise für Semagacestat (Bateman *et al.*, 2009) und Avagacestat (Tong *et al.*, 2012) konnten in Phase I anfänglich positive Ergebnisse in Bezug auf die A-beta Menge in gesunden Probanden zeigen. Auch diese scheiterten später in Studien der Phase III aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen, wie schlechtere kognitive Leistungen im Vergleich zur Placebo Gruppe und dem Auftreten von Hautkrebs und Infektionen (Coric *et al.*, 2012; Doody *et al.*, 2013). Vor allem die letztgenannten Nebenwirkungen, die mit einer gestörten Immunantwort einhergehen, sind vermutlich auf die gehemmte Prozessierung von Notch-1 durch die gamma-Sekretase zurückzuführen (Jack *et al.*, 2001; Geling *et al.*, 2002). Außerdem wurde die Vermutung aufgestellt, dass die verwendeten gamma-Sekretase Inhibitoren eher die Prozessierung von Notch als von APP hemmen (Chavez-Gutierrez *et al.*, 2012).

Auch in Bezug auf Inhibierung der beta-Sekretase wurden mehrere Strategien entwickelt und in medizinischen Studien überprüft. In der Literatur ist eine protektive Genvariante des APP (APP-A673T) beschrieben, direkt benachbart zur beta-Sekretase Schnittstelle (Jonsson *et al.*, 2012). Das Vorkommen von A-beta Peptiden in Trägern dieser Variante ist um ca. 40 % reduziert und die Variante schützt offensichtlich vor kognitiven Beeinträchtigungen, was die Strategie der beta-Sekretase Inhibierung in den letzten Jahren nochmals bekräftigt hat. Weiterhin konnte in Studien mit heterozygoten BACE-1^{-/+} Mäusen gezeigt werden, dass bei

einer 50 % Reduktion der beta-Sekretase zwar nur ca. 20 % weniger A-beta im Gehirn der Tiere messbar war, jedoch in APP-transgenen Tieren mit diesem BACE-1 Genotyp etwa 75 % weniger Plaque Ablagerungen als in vergleichbaren Tieren mit BACE-1^{+/+} Genotyp auftraten (McConlogue *et al.*, 2007). Hieraus wurde geschlossen, dass eine moderate Senkung der BACE-1 Aktivität bereits drastische Effekte in Bezug auf die AD Pathologie haben könnte (McConlogue *et al.*, 2007).

Einige Studien zu beta-Sekretase Inhibitoren wurden bereits in Tiermodellen durchgeführt. So konnte beispielsweise für den Inhibitor OM99-2 gezeigt werden, dass eine Passage über die Blut-Hirn-Schranke des peptidischen Inhibitors auch nach intraperitonealer Gabe möglich war und geringere Mengen an zerebralem A-beta in einem APP-transgenen Tiermodell gemessen werden konnten (Chang *et al.*, 2004). Ein weiterer BACE-1 Inhibitor ist CTS-21166 der Firma CoMentis, der eine gute Permeabilität ins Gehirn zeigte und in einer Phase I Studie an gesunden Probanden eine Reduktion von A-beta im Plasma um ca. 80 % erzielte (Hey *et al.*, 2008; Koelsch, 2008; Hsu, 2010). Jedoch sind aktuell keine weiteren Ergebnisse hierzu publiziert, vor allem in Bezug auf zentralnervöse AD Charakteristika wie die Menge von A-beta oder Tau in der zerebrospinalen Flüssigkeit (Albert, 2009; Ghosh *et al.*, 2012).

Bei einer beta-Sekretase Inhibierung ist von Vorteil, dass Nebenwirkungsprofile mit Beteiligung der gamma-Sekretase ausgeschlossen werden können. Jedoch muss bedacht werden, dass auch in BACE-1^{-/-} Tieren Phänotypen auftraten, die auf verschiedene mögliche unerwünschte Wirkungen bei Modulation von BACE-1 rückschließen lassen (siehe Kapitel 1.2.6).

1.2.9 ADAM10 als therapeutisches Ziel

Neben der Möglichkeit, die Menge an toxischen A-beta Peptiden durch Inhibierung der beta- und gamma-Sekretase zu senken, stellt die pharmakologische Intervention mit Ziel einer Erhöhung der alpha-Sekretase Menge und/oder Aktivität eine vielversprechende Alternative dar (Übersicht in Saftig und Reiss, 2011; Endres und Fahrenholz, 2012; Saftig und Lichtenthaler, 2015). So konnte bereits im Tiermodell erfolgreich demonstriert werden, dass durch moderate Überexpression von ADAM10 in APP-transgenen Tieren die Menge an charakteristischen senilen Plaques in den Gehirnen der Tiere signifikant erniedrigt war (Postina *et al.*, 2004). In der gleichen Studie konnte weiterhin demonstriert werden, dass Lerndefizite in der Morris *water-maze* der APP-transgenen Tiere durch die Überexpression

von ADAM10 aufgehoben wurden: Die APP x ADAM10 transgenen Tiere zeigten vergleichbare Lernkurven wie Kontrolltiere. Weiterhin wurden keine negativen phänotypischen Auffälligkeiten bei den Tieren festgestellt. Hier ist hervorzuheben, dass die Intensität der Steigerung von ADAM10 für therapeutische Ansätze von großer Bedeutung zu sein scheint. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in Mäusen eine starke Überexpression von ADAM10 zu stärkeren und länger anhaltenden Krampfanfällen nach Kainat-Induktion führt (Clement *et al.*, 2008). Weiterhin ist beschrieben, dass in humanen Astrogliazellen (U373) bei starker Überexpression der alpha-Sekretase eine um ca. 50 % reduzierte Phosphorylierung der Akt auftritt, diese Beobachtung bei einer moderaten Überexpression von ADAM10 jedoch ausbleibt (Freese *et al.*, 2009).

Vermutlich treten diese unerwünschten Wirkungen aufgrund der zahlreichen weiteren Substrate von ADAM10, abgesehen von APP, auf. So konnten *in vitro* zahlreiche Substrate der alpha-Sekretase gefunden werden (Übersicht in Pruessmeyer und Ludwig, 2009; Endres und Deller, 2017), die auch bereits teilweise *in vivo* bezüglich ihrer physiologischen Relevanz bestätigt werden konnten (siehe auch Kapitel 1.2.7). Beispielsweise spaltet ADAM10 das Neuron/Glia Antigen 2 (NG2), welches in Vorläuferzellen von Oligodendrozyten exprimiert wird (Sakry *et al.*, 2014). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von NG2 nicht nur von ADAM10 abhängt, sondern die alpha-Sekretase dadurch auch maßgeblich an der Regulation neuronaler Netzwerke beteiligt ist. Belegt wurde dies an Gehirnschnitten, bei denen nach Inhibierung von ADAM10 eine verringerte Langzeitpotenzierung im somatosensorischen Kortex gezeigt werden konnte (Sakry *et al.*, 2014). Auch solche Wirkungen der alpha-Sekretase müssen in Betracht gezogen werden, wenn eine therapeutische Intervention mit ADAM10 als Ziel angestrebt wird. Überdies ist auch bei einigen Tumorarten eine erhöhte Expression von ADAM10 beschrieben (Guo *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), was auch bedeuten könnte, dass eine zu starke positive Modulation der alpha-Sekretase Expression über einen längeren Zeitraum zu einem vermehrten Auftreten von Tumoren führen könnte.

Die Beobachtung, dass bereits eine moderate Erhöhung der Proteinmenge von ADAM10 um ca. 30 % das Lernverhalten (Schmitt *et al.*, 2006) und die A-beta Plaque Menge (Postina *et al.*, 2004) signifikant verbessern kann, lässt jedoch weiterhin die alpha-Sekretase ADAM10 als sinnvolles Therapieziel bei der AD erscheinen. Durch eine moderat gesteigerte Erhöhung der Menge und/oder Aktivität der Protease kann vermutlich die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP genügend gefördert werden um ein Voranschreiten der

Neurodegeneration bei der AD zu verlangsamen, ohne zu sehr weitere Substrate von ADAM10 zu beeinflussen.

Eine moderate Erhöhung der Genexpression von ADAM10 konnte bereits im Tiermodell durch pharmakologische Intervention demonstriert werden. Die Promotorsequenz von ADAM10 weist zwei potentielle RXR-Bindestellen auf (Prinzen *et al.*, 2005). Nach Bindung von Retinsäure an RAR-alpha oder -beta kann das RAR/RXR Heterodimer an den ADAM10 Promotor binden und dessen Transkription erhöhen. Durch die Behandlung von humanen (SH-SY5Y) und murinen (N2A) Neuroblastomzellen mit Retinsäure konnte *in vitro* eine um ca. 50 % gesteigerte Aktivierung des ADAM10 Promotors beobachtet werden, die bei SH-SY5Y Zellen zu einer um ca. 20 % gesteigerten Proteinexpression führte (Endres *et al.*, 2005; Tippmann *et al.*, 2009). Erhöhte Mengen freier Retinsäure weisen diverse unerwünschte Wirkungen wie beispielsweise allergische Reaktionen und idiopathische intrakranielle Hypertension (sogenannter "*Pseudotumor cerebri*") auf (Sano *et al.*, 1998; Anderson und Gebauer, 2014). Durch Substanzen mit einer höheren Selektivität für RAR-alpha könnten bei vergleichbarer Wirkung auf den Promotor von ADAM10 weniger schädliche Nebenwirkungen auftreten. Tamibaroten (Am80) ist ein solcher RAR-alpha spezifischer Ligand, der die Proteinmenge von ADAM10 erhöht und damit die Sekretion von APPs-alpha steigert und von A-beta senkt (Kawahara *et al.*, 2009; Kitaoka *et al.*, 2013). Weiterhin konnte Acitretin, ein Medikament zugelassen zur Behandlung der Hauterkrankung Psoriasis, als Aktivator der ADAM10 Expression identifiziert werden (Tippmann *et al.*, 2009). Durch Bindung an das zelluläre Bindeprotein der Retinsäure ("*cellular retinoic acid binding protein*", CRABP) verdrängt Acitretin die Retinsäure und setzt diese somit in physiologischen Konzentrationen frei (Armstrong *et al.*, 2005). Für Acitretin konnte schließlich in AD-Modellmäusen gezeigt werden, dass bereits eine einmalige stereotaktische Injektion ausreicht, um A-beta Peptide im Gehirn der Tiere nach 48 Stunden um ca. 50 % zu reduzieren (Tippmann *et al.*, 2009).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte in einer klinischen Studie der Phase IIa mit 21 AD Patienten demonstriert werden, dass Acitretin auch im Menschen zu einer erhöhte alpha-Sekretase Aktivität führt: Das Medikament wurde während der vierwöchigen Behandlungszeit von Patienten mit milder bis moderater AD gut vertragen und die Menge an APPs-alpha in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) der behandelten Personen im Vergleich zur Kontrollgruppe stieg signifikant an (Endres *et al.*, 2014). Weiterführende Studien mit größeren Kohorten und längeren Behandlungszeiträumen müssen nun überprüfen, ob die

Behandlung von AD Patienten mit Acitretin auch Einfluss auf kognitive Funktionen hat und den Krankheitsverlauf der AD somit positiv beeinflussen könnte.

Die Identifizierung von weiteren Substanzen, die vergleichbare Eigenschaften wie Acitretin aufweisen, würde die Therapieoptionen bei AD deutlich verbessern. So könnten potentiell auftretende Nebenwirkung durch die Acitretinbehandlung mit einem alternativen Wirkstoff umgangen werden. Weiterhin ist eine Kombination von Arzneimitteln denkbar, um Patienten mit schlechtem Ansprechen auf eine Monotherapie weiterhin Chancen auf Verbesserung ihrer Erkrankung zu ermöglichen.

1.3 "Repurposing" Strategien in der pharmazeutischen Entwicklung

Die Entwicklung neuer Therapeutika und Arzneimittel kann mitunter einen sehr langen und kostenintensiven Prozess darstellen. So wird geschätzt, dass zwischen dem Erstantrag auf ein Patent für einen neuen Wirkstoff bis hin zur Kommerzialisierung eines Therapeutikums ausgehend von diesem Stoff mehr als 12 Jahre vergehen können und ein durchschnittliches Investitionsvolumen von über einer bis zwei Milliarden US-Dollar notwendig ist (Sternitzke, 2010; Gupta *et al.*, 2013). Schätzungen gehen weiterhin davon aus, dass nur ca. 10 % der in Vorversuchen als effektiv getestete Substanzen tatsächlich eine Zulassung als Arzneimittel erhalten und weniger als 20 % der zugelassenen Arzneimittel die Kosten für ihre Entwicklung decken können (Khanna, 2012). Die größten Probleme in diesem Entwicklungsprozess sind vermehrt die fehlende Wirksamkeit oder die mangelhafte Sicherheit der getesteten Substanzen, die sich oftmals erst in klinischen Studien der Phase III mit größeren Kohorten herausstellen, zu einem Zeitpunkt bei dem schon große Summen an Investitionsmitteln aufgebracht wurden (Miller, 2010).

Vor allem im letzten Jahrzehnt hat sich ausgehend von diesen Tatsachen eine neue Art der der Entwicklung neuer Therapieansätze vor allem in der pharmazeutischen Industrie entwickelt: Mit der Suche nach neuen Indikationen für bereits zugelassene Arzneistoffe versuchen Forscher die kosten- und zeitintensiven vorklinischen Phasen der Entwicklung zu überspringen (Ashburn und Thor, 2004; Sternitzke, 2014). Ziel dieser sogenannten "Repurposing" Strategien ist es, die gesammelten Daten zu Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von bereits zugelassenen Medikamenten zu nutzen und diesen zum Teil

bereits seit langer Zeit vermarkteten Produkten neue Indikationsfelder zuzuführen (Sternitzke, 2014).

Neben den Vorteilen auf klinischer Seite, kann mit solchen Strategien zum Teil auch solchen Therapeutika ein sinnvolles Einsatzgebiet zugewiesen werden, die in klinischen Prüfungen der Phase II zwar keine sicherheitsrelevanten Bedenken aufkommen ließen, jedoch in ihrer Wirksamkeit für die ursprünglich angedachte Indikation keine ausreichend zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen konnten (Sleigh und Barton, 2010). Mit dieser Art der pharmazeutischen Entwicklung besteht demnach auch die Chance, Entwicklungskosten von primär "gescheiterten" Medikamenten doch noch zu kompensieren, indem neue Anwendungsbereiche gefunden werden.

1.3.1 Neue Indikationen für bereits zugelassene Medikamente

Mehr als 84 % aller in den USA vermarkteten Medikamente sind für mehr als eine Indikation zugelassen und aktuelle Forschung hat zum Ziel, diesen Anteil noch weiter zu steigern (Sandner und Ziegelbauer, 2008). Durch Aufklärung pathologischer Mechanismen von Erkrankungen können immer wieder molekulare Strukturen identifiziert werden, die mitunter bereits Ziel eines zugelassenen Arzneistoffs sind und somit potentiell eine Erweiterung des Indikationsfelds für diesen Stoff darstellen (Strittmatter, 2014).

In jüngerer Zeit konnte beispielsweise für das für Typ 2 Diabetes zugelassene Arzneimittel Metformin eine potentiell erweiterte Indikation bei kardiovaskulären Erkrankungen postuliert werden (Übersicht in Pryor und Cabreiro, 2015). Metformin wurde erstmals 1957 von Jean Sterne für die Behandlung von Typ 2 Diabetes vorgeschlagen, da es in der Lage war Hyperglykämie effektiv zu behandeln (Übersicht in Bailey und Day, 2004). Heute ist der Wirkstoff, ein Biguanid abgeleitet aus Inhaltsstoffen der Geißraute (*Galega officinalis*), das am meisten verschriebene antidiabetische Arzneimittel weltweit (Bailey und Day, 2004). Bereits in Studien mit an Diabetes erkrankten Patienten konnten kardiovaskulär protektive Eigenschaften unter der Behandlung mit Metformin festgestellt werden (Johnson *et al.*, 2005; Holman *et al.*, 2008). Jüngere Studien an Ratten konnten zudem zeigen, dass auch ohne einen diabetischen Hintergrund eine Metforminbehandlung beispielsweise bei einem Myokardinfarkt einen positiven Einfluss auf die Genesung der Tiere hatte (Yin *et al.*, 2011). Aktuell werden mehrere klinische Studien durchgeführt, die diese Ergebnisse auch bei nicht-diabetischen Menschen belegen sollen (Pryor und Cabreiro, 2015).

Ein weiteres Beispiel für ein erweitertes Indikationsfeld ist der gegen Malaria eingesetzte Wirkstoff Artesunat (Übersicht in Augustin *et al.*, 2015). Artesunat ist ein halbsynthetisches, wasserlösliches Derivat des Artemisinin, einem sekundären Pflanzenstoff aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*), welches bereits seit einiger Zeit als Mittel der Wahl gegen die von *Plasmodium falciparum* verursachte Malaria eingesetzt wird. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass Artesunat ebenfalls gegen mehrere Krebszelllinien zytotoxische Eigenschaften aufweist (Efferth *et al.*, 2001). Mittlerweile konnten bereits erste klinische Studien an krebserkrankten Patienten diese Wirkung belegen: So konnte in einer Phase I Studie an zehn Patientinnen mit Zervixkarzinom gezeigt werden, dass eine Remission der klinischen Symptome und eine signifikante Senkung von Tumormarkern erreicht werden konnte (Jansen *et al.*, 2011). Erst kürzlich konnte in einer weiteren doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie demonstriert werden, dass auch bei kolorektalen Karzinomen Artesunat antiproliferative Wirkungen zeigt (Krishna *et al.*, 2015).

Schließlich ist das bereits erwähnte Acitretin, ein Wirkstoff zur Behandlung der Psoriasis, in einer Phase IIa Studie erfolgreich an AD Patienten getestet worden. So konnte für dieses Medikament gezeigt werden, dass die Menge an APPs-alpha im CSF von behandelten Patienten mit milder bis moderater AD signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe anstieg (Endres *et al.*, 2014; siehe auch Kapitel 1.2.9).

1.3.2 Naturstoffe als potentielle Therapeutika

Naturstoffe und aus ihnen abgeleitete Substanzen stellen eine wertvolle Ressource für die Arzneistoffentwicklung dar: Zwischen 1981 und 2010 betrug ihr Anteil an den neu zugelassenen Medikamenten 26 % (Newman und Cragg, 2012). Der Einfluss dieser Naturstoffe wird besonders sichtbar, wenn man die Krebstherapie betrachtet. Hier sind Chemotherapeutika zu nennen wie die Vinca Alkaloide (z. B. Vincristin), die Taxane (z. B. Paclitaxel) oder die Anthracycline (z. B. Doxorubicin), die alle Naturstoffe oder aus ihnen abgeleitete Substanzen darstellen und heute essentiell für die Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen sind (Übersicht in Efferth *et al.*, 2007). Viele solcher Naturstoffe wurden bereits in der sogenannten traditionellen Medizin verwendet.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) versteht unter traditioneller Medizin "Gesundheitspraktiken, Herangehensweisen, Wissen und Überzeugungen, die pflanzen-, tier- und mineralienbasierte Medizin, spirituelle Therapien, manuellen Techniken und Übungen,

einzelnen oder kombiniert anwendet, um Krankheiten zu behandeln, zu diagnostizieren und zu verhindern oder das Wohlbefinden zu erhalten" (World Health Organization, 2003). Vor allem die traditionelle chinesische Medizin (TCM) stellt hier mit einer mehr als 2000 Jahre überspannenden Tradition eine besonders vielfältige Sammlung an Theorien und Erfahrungen bei der Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen mit Heilpflanzen dar (Cheung, 2011).

Auch im Bereich der AD sind bereits Arzneimittel zugelassen oder befinden sich in der Erforschung, die sich von Naturstoffen ableiten (Übersicht in Kumar *et al.*, 2012). So ist beispielsweise der AChE Hemmer Galantamin zu nennen, ein Alkaloid isoliert aus unterschiedlichen Mitgliedern der Familie der *Amaryllidaceae*, der bei milder bis moderater AD eingesetzt wird (Übersicht in Tan *et al.*, 2014).

Weiterhin ist für Huperzin A, ein AChE Inhibitor isoliert aus *Huperzia serrata*, in einigen Studien eine verbesserte kognitive Funktion und ein Anstieg der allgemeinen Aktivität bei behandelten AD Patienten beschrieben worden (Yang *et al.*, 2013). Viele dieser Studien wurden in China durchgeführt, jedoch nur wenige in englischer Sprache und dafür für die westliche Welt breit zugänglich veröffentlicht (Fu und Li, 2011). Außerdem waren bei einigen dieser Studien die Fallzahlen vergleichsweise zu gering, um verlässliche Aussagen über die Wirksamkeit von Huperzin A treffen zu können. Es zeigte sich aber generell eine gute Verträglichkeit und nur wenige unerwünschte Nebenwirkungen (Li *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013).

Eine der wichtigen Aufgaben der pharmazeutischen Forschung in Bezug auf die Translation traditioneller Therapien in die westliche Medizin ist die Aufklärung zugrundeliegender Wirkmechanismen (Cheung, 2011). Mithilfe dieses Wissens könnten weitere, bereits seit Jahrhunderten verwendete Heilpflanzen und ihre Extrakte für die Forschung nach neuen Leitsubstanzen zur Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen genutzt werden. Durch das Wissen der traditionellen Medizin können auch gezielt solche Pflanzen untersucht werden, für die bereits fundierte Erfahrungen bei der Therapie und deren Nebenwirkungen verfügbar sind (Übersicht in Howes und Houghton, 2012). Jedoch besteht auch hier das Potential, durch eine Art von "*Repurposing*" neue Indikationen für Stoffe aus Heilpflanzen zu finden, die es in der traditionellen Medizin noch nicht gab. Vor allem in Bezug auf die Aufklärung der pharmakologisch aktiven Komponenten aus Pflanzen ergibt sich die Möglichkeit, neue Leitsubstanzen für die weitere Forschung nach Arzneimitteln zu entdecken.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit sollten folgende Aspekte behandelt werden: Eine Untersuchung zur Expression der alpha-Sekretase ADAM10 in kognitiv normal alternden Probanden, die Identifizierung von Kandidaten aus einer Sammlung von 313 koreanischen Heilpflanzenextrakten zur selektiven ADAM10-Expressionssteigerung und das Fortführen eines Projekts zur Etablierung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus.

Beim Vorliegen einer Demenz des Alzheimer Typs wird vermehrt A-beta im Gehirn betroffener Personen gebildet. Weiterhin ist bekannt, dass bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Menge der alpha-Sekretase ADAM10 im Gehirn vorhanden ist. Eine verringerte Expression von ADAM10 kann demnach mit der Entstehung des Alzheimer-Phänotyps in Verbindung gebracht werden. Wie sich die Menge an zerebralem ADAM10 jedoch im gesunden Alterungsprozess verhält ist bisher nur wenig erforscht worden. Ein ausschlaggebendes Hindernis hierbei stellt die fehlende Verfügbarkeit von Gehirnprouben während des gesunden Alterungsprozesses dar.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die alpha-Sekretase auch in Thrombozyten exprimiert wird. Diese Erkenntnis lieferte die Basis für weiterführende Untersuchungen an peripher leicht zugänglichen Blutproben. Bei AD-Patienten wurde bestätigt, dass die Menge an ADAM10 in Thrombozyten mit der Menge von APPs-alpha in der zerebrospinalen Flüssigkeit korreliert. Der Schluss liegt nahe, dass unabhängig von einer Erkrankung auch bei gesunden Menschen eine vergleichbare Korrelation vorhanden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einem gesunden Probandenkollektiv die ADAM10-Menge in Thrombozytenproben untersucht werden. Die dafür rekrutierte Kohorte war in drei Altersgruppen unterteilt, die Personen jüngeren (25 Jahre), mittleren (65 Jahre) und fortgeschrittenen (80 Jahre) Alters aufwies. Den Personen sollte peripheres Blut entnommen und daraus eine Thrombozytenfraktion isoliert werden. Die so erhaltenen Proben sollten im Anschluss proteinbiochemisch auf ADAM10 analysiert werden, um die ADAM10 Menge im gesunden Alterungsprozess zu untersuchen. Daneben sollte auch die Aktivität der alpha-Sekretase mit Hilfe eines pro-fluorogenen Peptids in den Thrombozyten quantifiziert werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit stellte die Identifizierung möglicher Substanzen zur selektiven ADAM10-Expressionssteigerung dar. Der potentielle Nutzen als Therapieoption

um die Menge an ADAM10 bei Patienten mit AD zu erhöhen wurde bereits bei dem in fortgeschrittenen Studien getesteten Wirkstoff Acitretin bestätigt.

Mit Hilfe einer bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Methode sollten 313 koreanische und 69 chinesische Heilpflanzenextrakte auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, den humanen ADAM10 Promotor zu aktivieren, ohne den humanen BACE-1 Promotor zu beeinflussen. Hierfür sollte ein dualer Promotor Reporter Vektor verwendet werden, der die Promotorsequenzen beider Gene enthielt. Da die zwei Promotoren die Expression zweier verschiedener Luziferasen kontrollierten, sollte somit eine parallele Quantifizierung beider Promotoraktivitäten ermöglicht werden. Die gefundenen Kandidaten aus dieser Analyse sollten nachfolgend im Hinblick auf ihre Fähigkeit den humanen APP Promotor zu aktivieren untersucht werden. Schließlich sollte eine geeignete Auswahl von Extrakten getroffen werden, die dann in ersten Tierversuchen erprobt werden könnten.

Schließlich sollte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus vorangetrieben werden. Gegenstand dieses Projekts war die gentechnische Generierung einer Mauslinie, bei der unter Kontrolle des murinen Adam10 Promotors nicht nur die alpha-Sekretase, sondern auch eine Luziferase ko-exprimiert wird. Mit Hilfe einer solchen Mauslinie sollten Promotor Reporter Studien *in vivo* ermöglicht werden. Dies würde eine neue präklinische Methode für Substanzanalysen darstellen, die unter anderem für die Findung von neuen Substanzen zur ADAM10-Expressionssteigerung genutzt werden könnte. In dieser Arbeit sollten hierfür embryonale Stammzellen auf das Vorhandensein des eingebrachten Zielvektors mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht werden. Weiterhin sollte mittels Lumineszenzmessungen die Expression der transgenen Luziferase in den Stammzellen analysiert werden. Auf Basis dieser Ergebnisse sollte schließlich der am besten geeignetste Kandidat für die Einbringung in ein scheinträchtiges Muttertier identifiziert werden. Hieraus würden schließlich Jungtiere hervorgehen, die für die Begründung einer Reporter-Mauslinie verwendet werden könnten.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die alpha-Sekretase ADAM10 spielt als zentrales Protein der nicht-amyloidogenen Prozessierung des APP eine entscheidende Rolle bei der Alzheimer'schen Demenz (AD) und gilt als ein mögliches Therapieziel (vgl. Kapitel 1.2.9). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer Studie an kognitiv gesunden Probanden die Menge und Aktivität von ADAM10 während der normalen Alterung untersucht. Hierzu wurde die alpha-Sekretase auf Blutplättchen als peripheres, leicht zugängliches Material unter Verwendung von *Western Blot* und Fluoreszenzmessungen quantifiziert.

Weiterhin wurden Sammlungen koreanischer und chinesischer Heilpflanzenextrakte einer Analyse in Zellkultur unterzogen, um mögliche Aktivatoren des humanen ADAM10-Promotors zu identifizieren. Die so identifizierten Extrakte wurden anschließend weiter eingegrenzt, um mit den erfolgversprechendsten Kandidaten der koreanischen Extrakte schließlich erste Versuche in der Maus durchzuführen. Schließlich wurde der am besten für eine potentielle Therapie geeignete Extrakt mittels HPLC-MS Technik analysiert um seine bioaktiven Komponenten zu identifizieren.

Außerdem wurde in dieser Arbeit an der Etablierung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus mitgewirkt. Hierfür wurden embryonale Stammzellen mittels PCR Technik auf das Vorhandensein eines transgenen Konstrukts hin untersucht und erste Luziferase-Messungen mit dem Zellmaterial durchgeführt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit beschrieben und diskutiert. Diese wurden bereits zum größten Teil in Fachjournalen veröffentlicht (siehe Kapitel 6).

3.1 Die alpha-Sekretase ADAM10 im gesunden Alterungsprozess

Man geht davon aus, dass während der Pathogenese der AD ein Ungleichgewicht zwischen amyloidogener und nicht-amyloidogener Spaltung des APP vorliegt, welches schließlich zu einer vermehrten Produktion von A-beta Molekülen führt (Übersicht Endres und Fahrenholz, 2012). Jedoch ist über die alpha-Sekretase ADAM10 im Verlauf des gesunden Alterungsprozesses bisher nur wenig bekannt. Als einzige Autoren berichten Bernstein und Kollegen von einem Anstieg der Menge des Proteins im Verlauf des Alterns (Bernstein *et al.*, 2003). In ihrer Arbeit verglich die Gruppe dafür Gewebeschnitte des temporalen Kortex von

totgeborenen Kindern und normal gealterten Erwachsenen. Hierbei beobachteten sie in den Proben der älteren Individuen mehr ADAM10 in Neuronen als bei den jüngeren.

Bei der Suche nach peripheren Biomarkern, die für die Diagnose der AD herangezogen werden könnten, sind seit einiger Zeit Blutplättchen (Thrombozyten) als leicht zugängliches Material in den Fokus der Forschung gerückt (Veitinger *et al.*, 2014). So konnte gezeigt werden, dass sowohl die alpha-Sekretase ADAM10, als auch die beta-Sekretase BACE-1 auf Thrombozyten zu finden sind (Colciaghi *et al.*, 2004). Außerdem konnten Colciaghi und Kollegen demonstrieren, dass die Menge an ADAM10 auf Thrombozyten bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erniedrigt ist (Colciaghi *et al.*, 2002). Weiterhin wurde von Manzine und Kollegen berichtet, dass die Menge an ADAM10 auf Blutplättchen mit der Leistung von AD-Patienten in den "*Mini Mental State Examination* (MMSE)" und "*Clock Drawing*" Tests korreliert (Manzine *et al.*, 2013a; Manzine *et al.*, 2014). Thrombozyten wurden in diesem Rahmen auch als potentielle Biomarker für AD diskutiert, die im Gegensatz zur zerebrospinalen Flüssigkeit peripher leicht zugänglich sind (Manzine *et al.*, 2013b).

Für die vorliegende Arbeit wurden von einem gesunden, normal gealterten Probandenkollektiv Blutproben entnommen. Die Probanden wurden bereits zuvor im Rahmen einer anderen Studie an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie in Mainz rekrutiert ("*Normal Aging*" Studie, Fischer *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2014). Aus den Blutproben wurden Thrombozyten isoliert und die Menge an ADAM10 bestimmt. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Studie beschrieben und diskutiert, welche größtenteils bereits in Schuck *et al.*, 2016 veröffentlicht wurden.

Die insgesamt 36 Teilnehmer der Studie wurden basierend auf ihrem Alter in drei Gruppen eingeteilt (25, 65 und 80 Jahre). Die demographischen Charakteristika des Probandenkollektivs sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Bereits im Rahmen der erwähnten Studie von Wolf und Kollegen (Wolf *et al.*, 2014) unterzogen sich die Probanden psychologischen Tests wie dem DIA-SSQ und der "*International Diagnosis Checklist*" (IDCL), um psychiatrische, neurologische oder kognitive Störungen auszuschließen. Weiterhin wurden solche Personen von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen, die Medikamente zur kognitiven Leistungssteigerung einnahmen. Eine Bestimmung des *APOE* Genotyps (durchgeführt nach Yakushev *et al.*, 2012) wurde allen Teilnehmern angeboten, war aber keine Bedingung für einen Studieneinschluss. Aus diesem Grund liegen diese Daten nicht für alle Teilnehmer vor.

Tabelle 1: Demographische Daten Probandenkollektiv "Normal Aging" Studie

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Anzahl Probanden	12	10	14
Altersdurchschnitt	25.4 ± 4.3	65.4 ± 3.4	80.0 ± 3.8
Altersspanne	22 - 37	60 - 69	75 - 85
Geschlecht			
männlich	50%	50%	21%
weiblich	50%	50%	79%
<i>APOE</i> epsilon4 Status*			
Träger/nicht-Träger	7 / 5	1 / 6	3 / 7

*: nicht alle Teilnehmer der Studie haben der Genotypisierung zugestimmt.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Studie wurden im Anschluss an eine ambulante Blutentnahme, die bei allen Probanden am frühen Vormittag stattfand, Thrombozyten nach einer Methode von Colciaghi und Kollegen isoliert und gereinigt (Colciaghi *et al.*, 2002).

3.1.1 Charakterisierung APP-prozessierender Enzyme in Thrombozyten

Zunächst wurde eine Charakterisierung der APP-prozessierenden Enzyme in einer Thrombozytenprobe vorgenommen. Hierfür wurde ein qualitativer *Western Blot* durchgeführt, bei dem neben nach oben genannter Art aufbereiteten Thrombozyten auch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) der gleichen Testperson analysiert wurden. Letztere wurden mit Hilfe von "*BD Vacutainer*" nach Angaben des Herstellers aufbereitet (Details siehe Schuck *et al.*, 2016). Außerdem wurde zum Vergleich auch eine Probe der in der AD-Forschung weit verbreiteten humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 zu sehen.

Bei der Analyse von ADAM10 zeigten sich bei der SH-SY5Y Zelllinie die typischen Banden bei ca. 64 kDa und 90 kDa, die der gereiften ("*mature*", "*m*") bzw. der unreifen Vorläuferform ("*proform*", "*p*") des Proteins entsprechen. Wie bereits zuvor durch andere Gruppen beschrieben (Colciaghi *et al.*, 2002), war in der Thrombozytenprobe die 64 kDa-Bande deutlich intensiver. Da Thrombozyten keinen eigenen Zellkern besitzen, erscheint dieser Befund sinnvoll. Dass eine 90 kDa-Bande überhaupt sichtbar ist, könnte darauf

zurückzuführen sein, dass Thrombozyten auch in Abwesenheit eines eigenen Zellkerns noch mRNA aus ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, enthalten. Mit Hilfe dieser mRNA kann weiterhin eine *de novo* Proteinsynthese in diesen Zellen aufrechterhalten werden (Schubert und Devine, 2010). Im Unterschied zu den mit einem kompletten Proteinbiosyntheseapparat ausgestatteten SH-SY5Y Zellen, geschieht in Blutplättchen vermutlich nur eine marginale Neubildung von unreifem ADAM10. Bei den PBMC, die hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten bestehen (Janeway, 2002), war ein vergleichbares Bandenmuster wie bei den SH-SY5Y Zellen zu sehen.

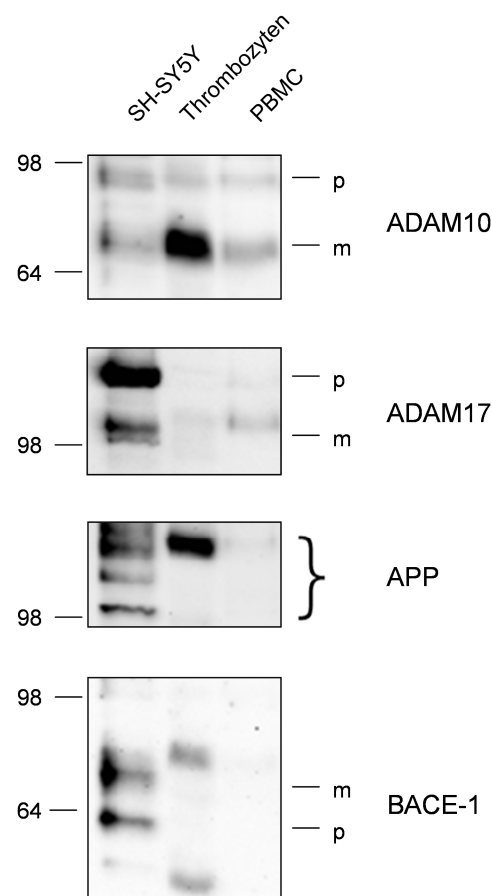


Abbildung 3: Expression AD-relevanter Proteine in unterschiedlichen humanen Zellen.

Je 10 µg Protein der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y bzw. von Thrombozytenmembranen oder peripheren mononukleären Blutzellen desselben Spenders wurden in *Western Blot* Analysen verglichen. Es wurden die relativen Mengen der alpha-Sekretasen ADAM10 und ADAM17 sowie der des Substrats APP und der beta-Sekretase BACE-1 betrachtet. m: *mature*, gereifte Form, p: *proform*, unreife Vorläuferform des Proteins. Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2016, Abbildung 1.

Für die alternative alpha-Sekretase ADAM17 (Buxbaum *et al.*, 1998) waren in der Probe der Neuroblastom-Zelllinie Banden bei ca. 100 kDa und 120 kDa zu detektieren, die jeweils der

gereiften ("m") bzw. der Vorläuferform ("p") des Enzyms entsprechen (Abbildung 3). Die Vorläuferform ist bei den SH-SY5Y Zellen deutlich prominenter als die reife Form, bei den PBMC ist das Bild umgekehrt. In der Thrombozytenprobe sind hingegen kaum Banden zu erkennen. Dies lässt zusammen mit dem Befund für ADAM10 den Schluss zu, dass die Beteiligung von ADAM17 an der gesamten Aktivität der alpha-Sekretase in Blutplättchen vernachlässigbar ist.

Beim Nachweis des Amyloid-Vorläuferproteins APP wurde mit Hilfe des Antikörpers 6E10, der den N-terminalen Bereich des A-beta Moleküls detektiert, in der Thrombozytenprobe eine Bande bei ca. 120 kDa beobachtet. Diese kann der ubiquitär im Körper exprimierten Form des Proteins mit einer Gesamtlänge von 770 bzw. 751 Aminosäuren zugeordnet werden. Zusätzlich war in der SH-SY5Y Probe eine Bande bei ca. 110 kDa sichtbar, die der ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimierten APP695-Form (Kang und Muller-Hill, 1990) zugeschrieben wurde. Eine weitere, bei ca. 100 kDa beobachtete Bande in der Probe der Zelllinie könnte auf eine bereits zuvor beschriebene unreife Form des APP zurückzuführen sein (Buizza *et al.*, 2013). Auffällig war weiterhin, dass bei der PBMC Probe nur eine Bande (ca. 120 kDa) mit sehr geringer Intensität für APP nachgewiesen werden konnte.

Für BACE-1 wurden bei der Neuroblastom-Zelllinie Banden bei ca. 60 kDa und 75 kDa detektiert (Abbildung 3). Diese entsprechen der Vorläufer- ("p") bzw. der reifen ("m") Form des Proteins (Zeng *et al.*, 2015). Während in den Thrombozyten die bereits zuvor beschriebenen Banden bei ca. 55 kDa und 70 kDa zu sehen war (Colciaghi *et al.*, 2004; Decourt *et al.*, 2013), konnten keine Signale bei der PBMC Probe detektiert werden.

Dieser Befund zeigt, dass für eine Gesamtsicht der APP-Prozessierung in peripheren Zellen die Blutplättchen den PBMC überlegen sind. In Letzteren waren nur geringe Mengen an APP und kein BACE-1 erkennbar. Auch und vor allem im direkten Vergleich mit den neuronartigen SH-SY5Y Zellen sind Thrombozyten demnach ein adäquateres Modell zur Abbildung der Vorgänge bei der Prozessierung des APP. Die relative Unterrepräsentation von ADAM17 im Vergleich zu ADAM10 lässt weiterhin einen gezielteren Blick auf die bei der AD relevante alpha-Sekretase zu.

3.1.2 ADAM10 Proteinmenge bei Probanden der "Normal Aging" Studie

Um die Menge an ADAM10 im Verlauf des gesunden Alterungsprozesses zu untersuchen, wurden die Proben der isolierten Thrombozytenmembranen der Studienteilnehmer einer *Western Blot* Analyse unterzogen. Als Normierungsfaktor diente die parallele Bestimmung von Integrin beta-3 (CD61), welches ein auf Thrombozyten exprimiertes und für die Plättchenaggregation unerlässliches Protein darstellt (Bennett, 2005). Ein repräsentativer Ausschnitt der *Western Blot* Analyse ist in Abbildung 4A zu sehen.

Nach der Normierung auf CD61 und der gruppenweisen Analyse der Ergebnisse des *Western Blots* zeigte sich ein 1,2fach erhöhte Menge von ADAM10 im Vergleich der jüngsten zur ältesten Probandengruppe (Abbildung 4B). Dieses Ergebnis einer im kognitiv gesunden Alterungsprozess steigenden Menge an alpha-Sekretase, zumindest auf Thrombozyten, wird durch die positive Korrelation des Quotienten aus ADAM10/CD61 mit dem Alter des entsprechenden Probanden bestätigt (Pearson Korrelationskoeffizient $r=0,376$, $p=0.024$, Daten nicht gezeigt). Bei den teilnehmenden Personen handelte es sich um überdurchschnittlich intelligente Menschen. Dies wurde anhand von Intelligenztestes im Rahmen der zuvor von Wolf und Kollegen durchgeführten Studie festgestellt (Wolf *et al.*, 2014). Um den potentiell beeinflussenden Faktor der Intelligenz mit einzuberechnen, wurde dieser als Kontrollvariable in einer partiellen Korrelation mitberücksichtigt. Die Ergebnisse blieben jedoch auch hierbei signifikant (Schuck *et al.*, 2016).

Weiterführende Analysen in Bezug auf das Geschlecht (Abbildung 4C) ergaben keinen Einfluss auf die Menge an ADAM10 in Thrombozyten. Hierbei wurden aufgrund der geringen Gruppengrößen die verschiedenen Altersklassen gemeinsam betrachtet. Ohne dieses Zusammenfassen der drei Altersklassen konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Zwar waren bei der separaten geschlechterspezifischen Auswertung der drei Altersklassen Trends feststellbar, die auf leicht geringere Mengen an ADAM10 bei Frauen hinwiesen, jedoch konnte keine verlässliche statistische Analyse der Daten erfolgen (siehe auch Schuck *et al.*, 2016, Abbildung 4A). Vor allem durch die epidemiologisch belegte höhere Prävalenz der AD bei Frauen (Munro, 2014) ist eine solche Fragestellung interessant.

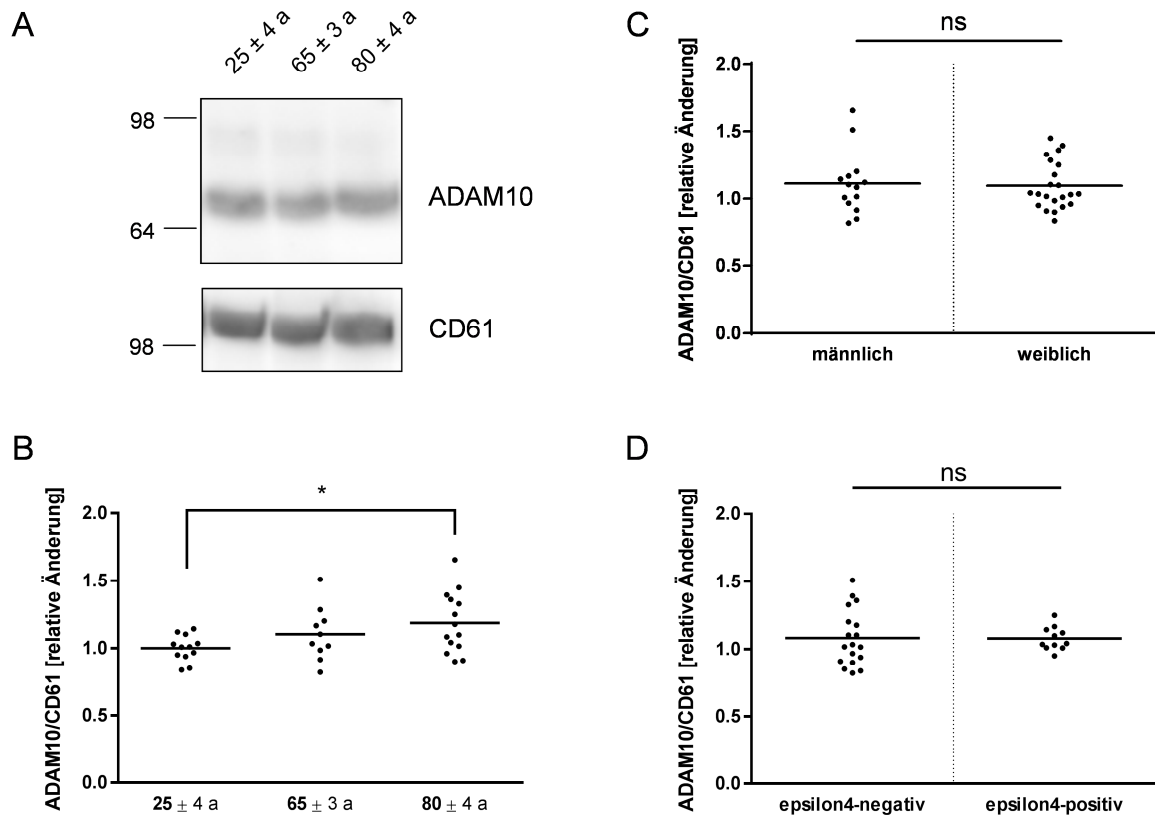


Abbildung 4: ADAM10 Proteinmenge in Thrombozyten während des gesunden Alterungsprozesses.

A: Die Mengen der alpha-Sekretase ADAM10 und des thrombozytären Oberflächenproteins CD61 (Integrin beta-3) wurden mittels *Western Blot* Analyse untersucht. Für die anschließende Auswertung wurden die Probanden in drei Altersgruppen unterteilt. Gezeigt sind die Ergebnisse von jeweils 10 µg Protein der Thrombozytenproben beispielhafter Personen. **B:** Die densitometrisch erfasste Menge an ADAM10 in den Thrombozytenproben wurde durch die Menge an CD61 geteilt. Der Mittelwert der jüngsten Altersgruppe wurde dabei auf 1 gesetzt. Es konnte eine signifikant höhere Menge an ADAM10 in der ältesten Probandengruppe im Vergleich zur jüngsten gezeigt werden. **C:** Das Probandenkollektiv wurde in männliche und weibliche Teilnehmer aufgeteilt. Es wurden keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der ADAM10 Menge auf Thrombozyten entdeckt. **D:** Eine Aufteilung des Probandenkollektivs in Träger des *APOE* epsilon4 Allels und solche ohne epsilon4 Allel erbrachte keinen Unterschied in der Menge an ADAM10. (ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2016, Abbildungen 2 und 4.

Da das *APOE* epsilon4 Allel einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung einer AD darstellt (Corder *et al.*, 1993; Michaelson, 2014), wurden die erhaltenen Ergebnisse aus dem *Western Blot* auch in dieser Hinsicht untersucht (Abbildung 4D). Erneut wurden für diese Analyse die Daten der drei Altersgruppen kombiniert und nach Vorhandensein des epsilon4 Allels aufgeteilt. Jedoch konnte auch hierbei kein Einfluss auf die ADAM10 Menge in Thrombozyten festgestellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die entsprechende

Genotypisierung nicht bei allen Teilnehmern durchgeführt wurde, war die Datenlage für eine Betrachtung in separaten Genotypen auch hierbei zu gering, um verlässliche Aussagen treffen zu können (siehe auch Schuck *et al.*, 2016, Abbildung 4C).

3.1.3 Einfluss von kognitivem Training auf die ADAM10 Menge in Thrombozyten

Die Probanden der vorliegenden Studie nahmen im Vorfeld bereits an einer anderen Studie von Wolf und Kollegen teil. Hierbei wurde eine zusätzliche Gruppe der mittleren Altersklasse (65 Jahre) einem kognitiven Training über 4 Wochen unterzogen (Wolf *et al.*, 2014). Für die bisherigen Analysen wurden nur die Daten der Kontrollgruppe (ohne kognitives Training) verwendet.

Im nachfolgenden Ansatz wurde für die mittlere Altersgruppe der Effekt des Trainings auf die Menge an ADAM10 in den Thrombozytenproben der Probanden analysiert. Die Kontrollgruppe diente hier als Normierungskollektiv und der Mittelwert von ADAM10/CD61 wurde für diese Gruppe auf 1 gesetzt. Der direkte Vergleich der beiden Gruppen zeigte keine Unterschiede zwischen den Kollektiven in Bezug auf die relative Menge an ADAM10 (Abbildung 5A und B, unveröffentlichte Daten).

Einer der möglichen Ursachen, dass das kognitive Training keinen Einfluss auf die Menge an ADAM10 in den Thrombozyten der Probanden hatte, könnte in der relativ langen Zeitspanne begründet sein, die zwischen dem Training und der Blutentnahme lag. So waren zum Zeitpunkt der hier dargestellten Studie bereits über neun Monate vergangen. Wolf und Kollegen konnten zwar bei 71 % der Probanden eine kurzfristige Steigerung des non-verbalen Denkens direkt im Anschluss an die vierwöchige Trainingsphase erkennen (ermittelt anhand des Leistungsprüfsystem 4 Tests). Bei einer weiteren Untersuchung nach drei Monaten war der Trainingserfolg jedoch nur noch bei 22 % dieser Gruppe vorhanden (Wolf *et al.*, 2014). Es ist daher durchaus denkbar, dass ein messbarer positiver Effekt auf die Kognition nach einem einmaligen Training neun Monate später keine Auswirkungen mehr auf die ADAM10 Menge in Thrombozyten hatte. Aufgrund der bekannten Korrelation zwischen der kognitiven Leistung und der ADAM10 Menge in Thrombozyten bei AD Patienten (Manzine *et al.*, 2013a), könnten bei einer Messung der ADAM10 Menge kurze Zeit nach einem erfolgten kognitiven Training durchaus positive Effekte in Thrombozyten messbar sein. Für die

Bestimmung eines optimalen Messzeitpunkts muss jedoch auch die mittlere Lebensdauer der Thrombozyten von acht bis neun Tagen (Harker *et al.*, 2000) mit beachtet werden.

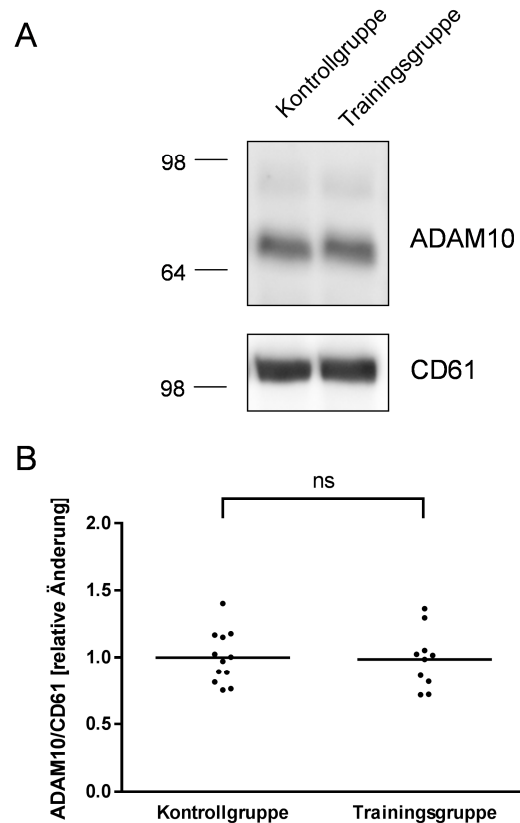


Abbildung 5: Einfluss von kognitivem Training auf die Expression von ADAM10 in Thrombozyten.

A: Exemplarischer *Western Blot* mit jeweils 10 µg Protein aus Thrombozytenproben. Die Probanden der mittleren Altersklasse (65 ± 3 Jahre) wurden nach Teilnahme am kognitivem Training (Trainingsgruppe, $n = 10$) und untrainiertem Zustand (Kontrollgruppe, $n = 12$) unterteilt. Gezeigt sind repräsentative Bilder der entwickelten *Western Blots*. **B:** Nach Normierung auf CD61 wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe willkürlich auf 1 gesetzt. Es waren keine Unterschiede zur Trainingsgruppe zu beobachten. (ns: nicht signifikant, zweiseitiger *t*-Test).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die kognitive Verbesserung, die bei den Probanden gemessen wurde, generell keinen Einfluss auf die Menge an ADAM10 hat. Wenn ein solcher Einfluss tatsächlich besteht, könnte es weiterhin sein, dass zwar die Menge an ADAM10 im Gehirn nach dem Training ansteigt, diese aber nicht kurzfristig auf die Menge an ADAM10 in Thrombozyten übertragen werden kann. Diese Fragestellungen konnten im Rahmen der vorliegenden Studie nicht beantwortet werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

3.1.4 Enzymatische Aktivität von ADAM10 in Thrombozytenproben

Um zu überprüfen, ob die im normalen Alterungsverlauf gesteigerte Menge an ADAM10 in Thrombozyten auch zu einer gesteigerten Funktionsfähigkeit der alpha-Sekretase führt, wurden Versuche mit einem pro-fluoreszierenden Peptid durchgeführt. Solche Peptide enthalten eine fluorogene Gruppe, die im intakten Zustand des Peptids aufgrund einer weiteren absorbierenden Gruppe bei Anregung kein Licht emittiert. Die Intensität von gemessener Fluoreszenz steigt jedoch in Anwesenheit eines das Peptid spaltenden Enzyms mit der Zeit an, da nach und nach immer mehr fluorogene von den absorbierenden Gruppen getrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der ADAM10 Aktivität ein TNFalpha-basiertes Peptid (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) verwendet, da der Versuch die Aktivität der alpha-Sekretase mit einem vom APP abgeleiteten Peptid (Merck, Darmstadt, Deutschland) zu untersuchen erfolglos blieb. Das APP-basierte und als alpha-Sekretase Substrat vermarktete Peptid zeigte nur unzureichende Spezifität für eine Spaltung durch die alpha-Sekretase: Die Fluoreszenzentwicklung bei Zugabe des Substrats zu SH-SY5Y Zellen konnte mit Hilfe von GM6001, einem Hemmstoff für Metalloproteinasen, nicht inhibiert werden. Mit dem TNFalpha-basierten Peptid gelang dies jedoch (Abbildung 6A, unveröffentlichte Daten).

Stattdessen konnte gezeigt werden, dass Membranen von SH-SY5Y Zellen nach Behandlung mit einem beta-Sekretase Inhibitor (Merck, Darmstadt, Deutschland) eine verminderte Entwicklung von Fluoreszenz zeigten (Abbildung 6B, unveröffentlichte Daten). Das vom APP abgeleitete Peptid war daher nicht für den Nachweis der alpha-Sekretase Aktivität verwendbar.

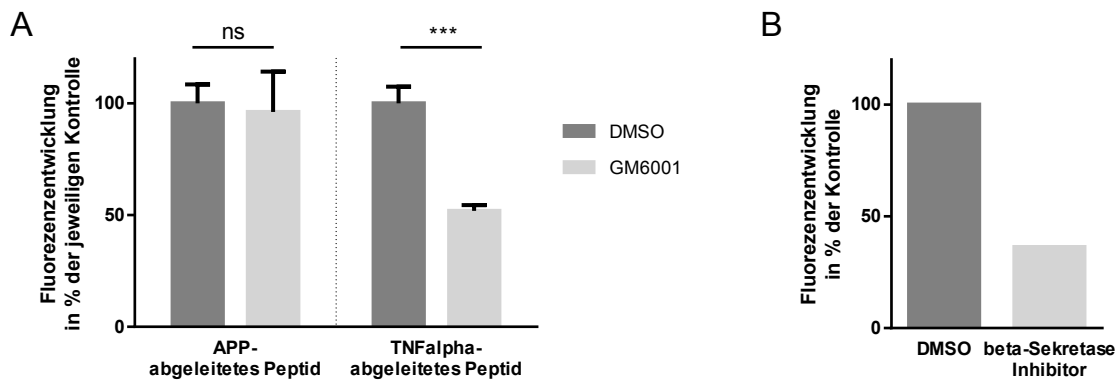


Abbildung 6: Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf pro-fluoreszierende Peptide

A: Je $4,5 \times 10^4$ SH-SY5Y Zellen wurden in 96-Loch Platten 48 h kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen vorsichtig mit Phosphat-Pufferlösung (PBS) gespült und mit $10 \mu\text{M}$ pro-fluorogenem Substrat und $10 \mu\text{M}$ GM6001 bzw. DMSO (Kontrolle) versetzt. Die Fluoreszenzentwicklung wurde bei $340 \text{ nm} / 500 \text{ nm}$ (Exzitation / Emission, APP-basiertes Peptid) bzw. bei $320 \text{ nm} / 405 \text{ nm}$ (TNFalpha-abgeleitetes Peptid) gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung nach 120 min aus jeweils drei technischen Replikaten, normiert auf den jeweiligen Proteingehalt der Vertiefungen. (ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, zweiseitiger *t*-Test). **B:** Zu je $10 \mu\text{g}$ einer Membranfraktion von SH-SY5Y Zellen wurde $10 \mu\text{M}$ APP-basiertes pro-fluoreszierendes Substrat und $25 \mu\text{M}$ beta-Sekretase Inhibitor bzw. DMSO (Kontrolle) gegeben. Die Fluoreszenzentwicklung wurde wie bei (A) gemessen. Gezeigt sind die erhaltenen Werte nach 120 min aus einer einzelnen Messung.

Mit Hilfe des kommerziellen, synthetisch hergestellten alpha-Sekretase Substrates, welches von der Sequenz des TNFalpha abgeleitet war, wurde die ADAM10 Aktivität in den Thrombozytenproben ermittelt (Abbildung 7). Bereits bei der Betrachtung von einzelnen Thrombozytenproben konnten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Fluoreszenzentwicklung festgestellt werden (Abbildung 7A). Es konnte bestätigt werden, dass die Entwicklung der Fluoreszenz größtenteils auf die Aktivität von ADAM10 in den Proben zurückzuführen ist. So wurde mit Hilfe von rekombinantem ADAM10 gezeigt, dass die Fluoreszenzentwicklung direkt proportional zur vorhandenen Menge an Enzym ist (Schuck *et al.*, 2016, Abbildung 3A). Weiterhin wurde mit einer kombinierten Thrombozytenprobe von unterschiedlichen Spendern gezeigt, dass die Fluoreszenzentwicklung nach Zugabe von GM6001 stark abgeschwächt werden kann (Schuck *et al.*, 2016, Abbildung 3B). Vorhandenes ADAM17 würde ein von TNFalpha abgeleitetes Peptid zwar ebenso spalten wie ADAM10, die Menge der alternativen alpha-Sekretase in den vorliegenden Proben war aber nur marginal im Vergleich zum prominent vertretenen ADAM10 (Abbildung 3).

Bei der erneut gruppenweisen Betrachtung der gemessenen Fluoreszenz 30 Minuten nach Zugabe des zu spaltenden Peptids zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der jüngsten und der ältesten Altersgruppe (Abbildung 7B). Die zuvor erhaltenen Ergebnisse der *Western Blot* Analysen konnten somit auch auf Aktivitätsebene von ADAM10 bestätigt werden.

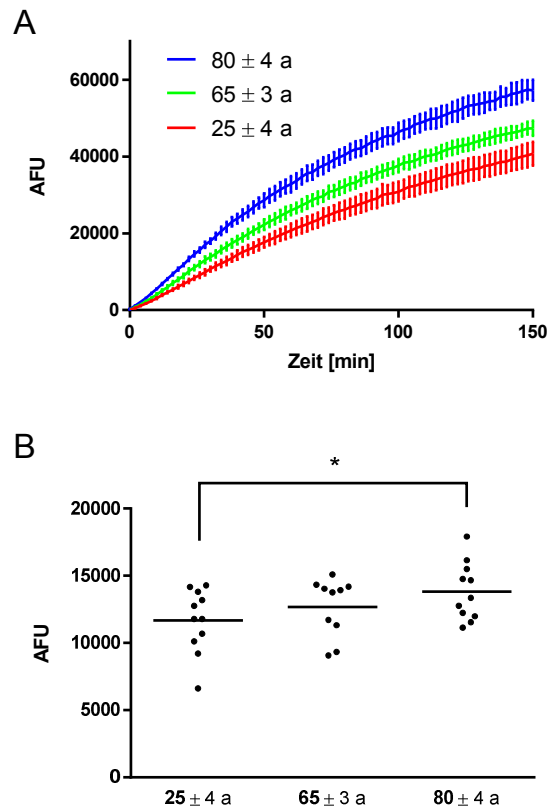


Abbildung 7: Enzymatische Aktivität von ADAM10 in Thrombozyten.

A: Je 10 µg Protein aus Thrombozytenproben wurden mit einem pro-fluoreszierenden Peptid versetzt, welches durch die alpha-Sekretase gespalten werden konnte. Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz (AFU, "arbitrary fluorescence units") wurde anschließend verfolgt. Gezeigt sind die Ergebnisse aus dieser Messung für drei exemplarische Proben aus je einer der getesteten Altersgruppen. **B:** Aus den kinetischen Messungen wurde der Wert nach 30 Minuten für jede Probe bestimmt. Ein Vergleich zwischen den Altersgruppen zeigte eine signifikante Steigerung der entwickelten Fluoreszenz zwischen der ältesten und der jüngsten Altersgruppe. (*: $p < 0,05$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2016, Abbildung 3.

In dieser Studie konnte demnach erstmalig gezeigt werden, dass im Verlauf des normalen Alterungsprozesses die Menge und die Aktivität an ADAM10 in Thrombozyten ansteigt. Blutplättchen weisen eine gewisse biochemische Ähnlichkeit zu Neuronen auf. So sind sie

beispielsweise dazu in der Lage, bestimmte Neurotransmitter wie Serotonin und Glutamat freizusetzen (Cupello *et al.*, 2005; Rainesalo *et al.*, 2005). Aufgrund der oben erwähnten Befunde, dass die ADAM10 Menge in Thrombozyten bei AD-Patienten mit deren Leistung in psychiatrischen Tests korreliert, werden Blutplättchen als möglicher peripherer Biomarker bei dieser Erkrankung diskutiert (Manzine *et al.*, 2013b). Durch die relativ leichte Verfügbarkeit der Thrombozyten könnten diese eine wertvolle Erweiterung der aktuellen AD-Diagnostik darstellen.

3.2 Identifizierung von Heilpflanzenextrakten als Aktivatoren der ADAM10 Genexpression

Die Aktivierung der alpha-Sekretase ADAM10 stellt eine mögliche therapeutische Strategie bei der AD dar (Endres und Fahrenholz, 2012; Saftig und Lichtenthaler, 2015; siehe auch Kapitel 1.2.9). Wie zuvor erwähnt, konnte für das bereits für die Behandlung der Psoriasis zugelassene Medikament Acitretin gezeigt werden, dass es die Menge an APPs-alpha in der zerebrospinalen Flüssigkeit bei AD Patienten steigert (Endres *et al.*, 2014). Eine Steigerung der ADAM10 Aktivität hat nicht nur den Vorteil der neurotrophen Eigenschaften von APPs-alpha, sondern bedeutet auch im Umkehrschluss eine verminderte Bildung von neurotoxischem A-beta (siehe Kapitel 1.2.5).

Es konnten in der Arbeitsgruppe im Rahmen eines Screenings 23 Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die das Verhältnis der ADAM10 zu BACE-1 Promotoraktivität beeinflussen (Reinhardt *et al.*, 2014). Durch die Identifizierung von Aktivatoren einzelner Transkriptionsfaktoren könnten weitere potentielle Arzneimittel gefunden werden, die eine Behandlung der AD unterstützen würden. Die Identifikation weiterer Therapeutika zur Steigerung der alpha-Sekretase Expression würde darüber hinaus zu einer größeren Flexibilität bei der Therapie führen. So könnten potentielle individuelle Nebenwirkungen eines Medikaments durch den Einsatz einer Alternative umgangen oder ein Nicht-Ansprechen der Primärtherapie mit einer weiteren Substanz kompensiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Bibliothek mit 313 Extrakten koreanischer Heilpflanzen auf ihre gezielte Aktivierung des ADAM10 Promotors in neuronaler Zellkultur und im Mausmodell hin untersucht. Die Ergebnisse der Studie wurden veröffentlicht in Schuck *et al.*, 2015 und werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

Weiterhin wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Myriam Meineck, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin Mainz) 69 chinesische Heilpflanzenextrakte in einem vergleichbaren Ansatz untersucht. Die dabei gewonnenen Daten sind ebenfalls veröffentlicht (Meineck *et al.*, 2016), im Rahmen der Ergebnisdiskussion dieser Dissertation wird hierauf jedoch nicht näher eingegangen.

3.2.1 Analyse einer Sammlung koreanischer Heilpflanzenextrakte auf selektive Induktoren des ADAM10 Promotors

Der besseren Lesbarkeit halber werden im Verlauf dieser Arbeit die Klarnamen der Extrakte durch die Nummerierung innerhalb der verwendeten Bibliothek ersetzt. Eine Dekodierung aller Extraktnummern ist der genannten Originalpublikation als Anlage beigelegt (Schuck *et al.*, 2015, Ergänzungstabelle 1). Die für diese Arbeit relevanten Extrakte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Dekodierung relevanter Pflanzenextrakte

Extrakt Nummer	Pflanze	Pflanzenteil
1982.1	<i>Luzula capitata</i>	ganze Pflanze
2395.3	<i>Quercus acutissima</i>	Stängel, Rinde
2423.1	<i>Quercus salicina</i>	Blätter
2423.2	<i>Quercus salicina</i>	Stängel, Kernholz
2423.3	<i>Quercus salicina</i>	Stängel, Rinde
2554.1	<i>Pleuropterus ciliinervis</i>	ganze Pflanze
3307.3	<i>Prunus serrulata var. spontanea</i>	Stängel, Rinde
3367.1	<i>Pyrus calleryana var. fauriei</i>	Früchte
3413.3	<i>Maackia fauriei</i>	Stängel, Rinde
3534.1	<i>Caragana sinica</i>	Stängel
3607A.3	<i>Citrus tachibana</i>	Stängel, Rinde
3642.1	<i>Euphorbia jolkinii</i>	Oberirdische Teile
4161.2	<i>Symplocos chinensis f. pilosa</i>	Stängel
4353.1	<i>Scutellaria indica</i>	ganze Pflanze

Die Extrakte wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Efferth, Johannes Gutenberg-Universität Mainz bereitgestellt und entstammen der "Korea Plant Extract Bank" des Korea

Institute of Bioscience and Biotechnology in Südkorea. Zur Erstellung der Bibliothek wurden Pflanzen in verschiedenen Regionen in Südkorea gesammelt, identifiziert und getrocknet. Anschließend wurden aus den Pflanzenmaterialien Methanol-Extrakte hergestellt und diese anschließend in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst. Diese Lösungen wurden im Rahmen dieser Arbeit einem Screening unterzogen, um Aktivatoren von ADAM10 zu identifizieren.

Dem Ansatz aus Reinhardt *et al.*, 2014 folgend, wurden zunächst die Auswirkungen der Extrakte auf die Vitalität der in den Zellkulturversuchen eingesetzten humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y getestet. Hierzu wurden die Extrakte zunächst in einer für die Zellen tolerierbaren Konzentration des Lösungsmittels DMSO von 0,1 % (v/v) eingesetzt. Die Menge an ATP innerhalb der Zellen wurde nach 48stündiger Behandlung mit den Extrakten im Vergleich zu nur mit Lösungsmittel behandelten Zellen quantifiziert. Bei gemessenen ATP-Gehalten von unter 75 % oder über 125 % der Kontrolle, wurden vier Extrakte weiter verdünnt um finale Lösungsmittelkonzentrationen von 0,07 % und 0,05 % zu erreichen. Die Ergebnisse einer erneuten Testung zeigten, dass anschließend alle Extrakte einen ATP-Gehalt und damit eine Vitalität vergleichbar zur DMSO-Kontrolle aufwiesen (Abbildung 8A).

Anschließend wurde parallel in einem Versuch die Promotoraktivitäten des ADAM10 und des BACE-1 Promotors nach Behandlung von SH-SY5Y Zellen für 48 Stunden mit den Extrakten getestet. Durch die vorherige transiente Transfektion der behandelten Zellen mit einem dualen Luziferase-Reporter-Vektor konnten die Promotoraktivitäten der alpha- und beta-Sekretase parallel bestimmt werden (Abbildung 8B). Der verwendete Vektor wies neben der humanen ADAM10 Promotorregion (Prinzen *et al.*, 2005), welche die Expression einer Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) Luziferase steuerte, auch den humanen BACE-1 Promotor (Christensen *et al.*, 2004) auf, der für die Expression einer Luziferase der Qualle *Renilla reniformis* verantwortlich war. Mit diesem Ansatz wurden 14 Extrakte (entspricht den Extrakten in Tabelle 2) identifiziert, die die Promotoraktivität von ADAM10 auf über 125 % der Kontrolle erhöhten, während die BACE-1 Promotoraktivität unter 125 % der Kontrolle betrug.

Diese 14 initial gefunden Extrakte wurden anschließend auf ihren Einfluss auf den APP-Promotor hin untersucht, da die Expression von APP durch ein potentiell Therapeutikum der AD möglichst nicht beeinflusst werden sollte. So könnte eine vermehrte Bildung von APP zu einer vermehrten Bildung seines Spaltprodukts A-beta im pathologisch veränderten Gehirn von AD-Patienten führen. Darüber hinaus ist auch eine verminderte Expression von APP mit

Risiken verbunden. So konnten Senechal und Kollegen zeigen, dass nach einem siRNA-induzierten *knock-down* von APP in erwachsenen Mäusen das räumliche Gedächtnis beeinträchtigt war (Senechal *et al.*, 2007).

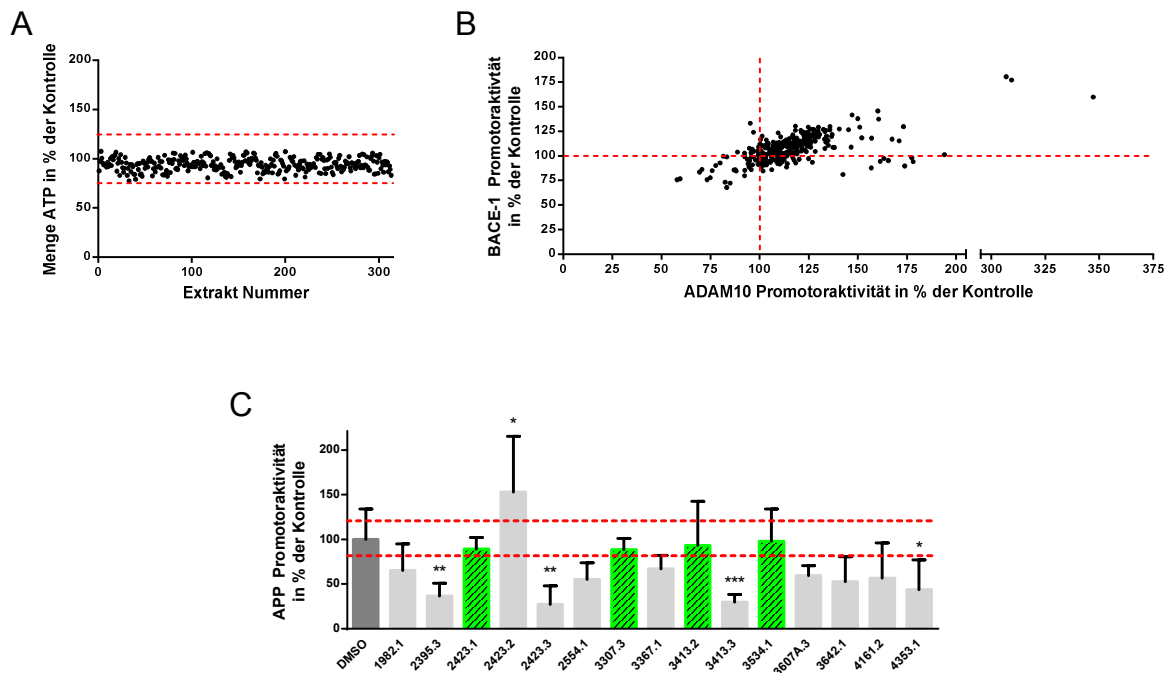


Abbildung 8: Untersuchung von 313 koreanischen Pflanzenextrakten auf selektive Promotoraktivierung.

A: Pflanzenextrakte oder DMSO (Kontrolle) wurden in einer Konzentration von 0,1 % in Zellkulturmedium zu humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) gegeben. Mit Hilfe einer Quantifizierung von vorhandenem ATP wurde die Vitalität der Zellen nach 48h Inkubation bestimmt. Rote Linien kennzeichnen 75 % bzw. 125 % Vitalität der Kontrolle. **B:** Die Aktivität von humanem ADAM10 und humanem BACE-1 Promotor wurde simultan in SH-SY5Y Zellen nach 48h Behandlung mit Pflanzenextrakten oder DMSO (Kontrolle) untersucht. Hierfür wurde ein dualer Promotor Reporter Vektor verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen, rote Linien kennzeichnen jeweils die Aktivität der Promotoren nach DMSO Behandlung der Zellen. **C:** SH-SY5Y Zellen, transient transfiziert mit einem Luziferase-Reporter Vektor mit humanen APP Promotor, wurden mit ausgewählten Kandidatenextrakten oder DMSO (Kontrolle) 48h behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. (ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2015, Abbildung 1.

Nach transienter Transfektion mit einem Luziferase-basierten Reporter Vektor, der den humanen APP Promotor beinhaltet, erfolgte die Behandlung von SH-SY5Y Zellen mit den 14 Kandidatenextrakten aus dem ersten Screening. Hierbei ergab sich für vier Extrakte eine Promotoraktivität zwischen 80 % und 120 % der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 8C, grün

gestreifte Balken). Aufgrund ihrer Eigenschaften in den zellkulturbasierten Screenings, wurden diese vier Extrakte für weiterführende Testungen ausgewählt.

Vor der ersten Anwendung im murinen Tiermodell wurden die vier Kandidatenextrakte (2423.1, 3307.3, 3413.2 und 3534.1) auf ihren Effekt auf den murinen Adam10 Promotor hin untersucht. Für die transiente Transfektion von SH-SY5Y Zellen wurde ein Luziferase-Reporter-Vektor verwendet, der die Sequenz des murinen Adam10 Promotors trug (Tippmann *et al.*, 2009). Die Behandlung der Zellen fand wie bereits oben beschrieben statt. Aus den erhaltenen Daten konnte eine Übertragbarkeit der Ergebnisse für den humanen Promotor auf das Mausmodell angenommen werden: Der murine Adam10 Promotor wurde nach Behandlung von Zellen mit den vier Kandidatenextrakten ebenfalls signifikant aktiviert (Schuck *et al.*, 2015).

3.2.2 Effekte nach akuter Behandlung von Mäusen mit Kandidatenextrakten

Um die Wirkung der ausgewählten Pflanzenextrakte im Tiermodell testen zu können und um deren generelle Verträglichkeit im lebenden Organismus zu überprüfen, wurden jeweils vier männlichen FVB/N Mäusen 1,6 ml/kg Körpergewicht der Extrakte oder das Lösungsmittel DMSO im entsprechenden Volumen intraperitoneal (*i.p.*) verabreicht. Diese Menge wurde genutzt, da es sich hierbei um die höchste berichtete Konzentration an DMSO handelt, die bei Mäusen keine Veränderungen des Verhaltens oder der generellen Fortbewegung verursacht (Castro *et al.*, 1995). Gleichzeitig sollte eine maximale Dosis für die erste Anwendung im Tier gewählt werden, um einen möglichst hohen Effekt auf die Promotoraktivität von ADAM10 zu erreichen.

Die Tiere wurden nach der Injektion über einen Zeitraum von 20 Minuten genau beobachtet. Es wurden keine Veränderungen im Verhalten der behandelten Mäuse festgestellt und die Behandlung wurde generell gut vertragen, was akut toxische Wirkungen der applizierten Pflanzenextrakte ausschließt. Um potentielle Veränderungen auf die Lokomotion zu untersuchen, wurden die behandelten Mäuse im Anschluss an die 20-minütige Beobachtung einem "Open-Field" Test unterzogen. Dieser Test wurde in einer 1 x 1 x 0,4 Meter messenden Arena durchgeführt, in der die Tiere sich frei bewegen konnten. Die innerhalb eines Zeitraums von 30 Minuten zurückgelegte Wegstrecke der Tiere wurde unter Zuhilfenahme eines automatischen Kamerasystems von einer Software berechnet. Im Vergleich zur

Kontrollgruppe (DMSO) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der allgemeinen Aktivität der mit Pflanzenextrakten behandelten Tiere (Schuck *et al.*, 2015).

Vier Stunden nach dem Verhaltensversuch wurden die Tiere unter Anästhesie getötet und das Gehirn, sowie die Leber entnommen. Die Gehirne wurden vom Zerebellum befreit und in zwei Hemisphären geteilt, die Leber wurde in einzelne Lappen getrennt. Je eine Hirnhälfte und ein Leberlappen wurden für anschließende RNA-Analysen bzw. für Proteinanalysen gesondert eingefroren.

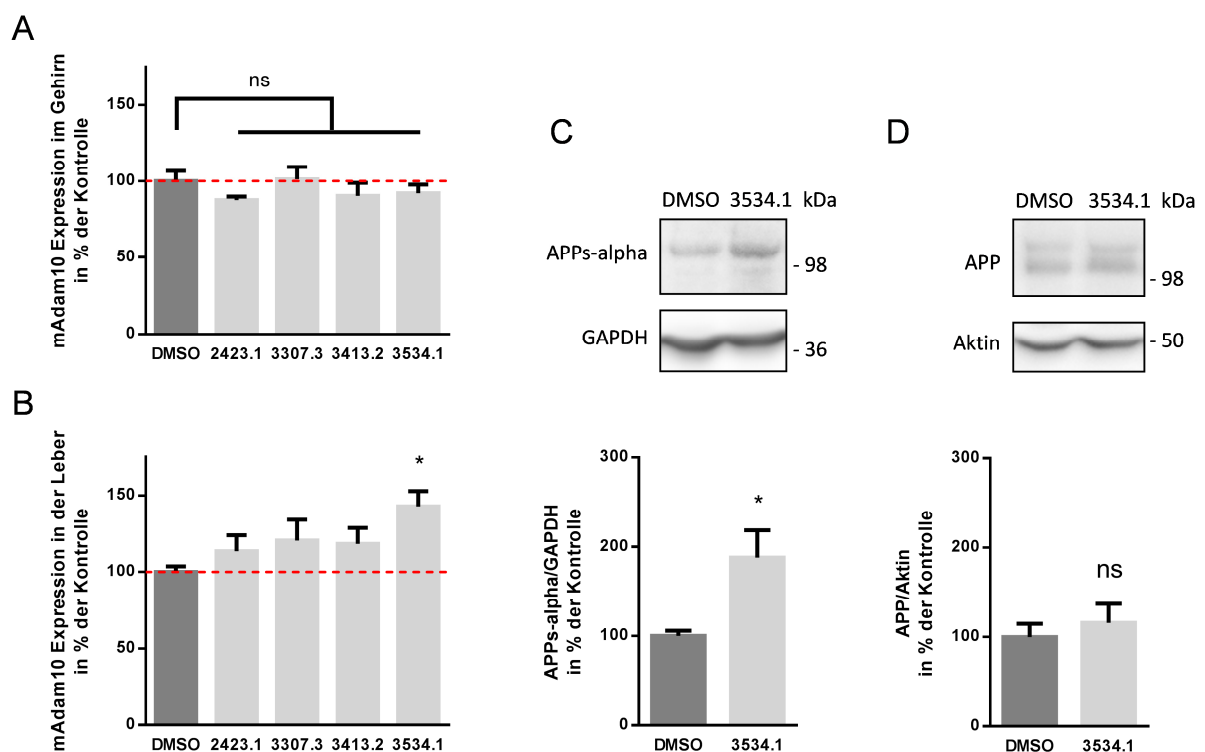


Abbildung 9: ADAM10 Expression in Gehirn und Leber nach akuter Behandlung von Versuchstieren mit Kandidatenextrakten.

A: Aus den Gehirnen (jeweils eine Hälfte, ohne Zerebellum) von mit Pflanzenextrakten oder DMSO (Kontrolle) behandelten Mäusen wurde RNA isoliert und einer qPCR Analyse unterzogen. Bestimmt wurde murines Adam10 neben Gapdh zur Normierung. **B:** Von den gleichen Mäusen wie bei (A) wurden die Lebern isoliert und jeweils ein Leberlappen zur RNA Extraktion genutzt. Mittels qPCR wurde murines Adam10 bestimmt, Gapdh diente zur Normierung. **C:** Mittels *Western Blot* wurde APPs-alpha in den Lebern von mit Extrakt 3534.1 oder DMSO behandelten Mäusen quantifiziert. **D:** Quantifizierung von APP mittels *Western Blot* aus Membranfraktionen der Leberproben aus (C). (ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2015, Abbildung 2.

Mit Hilfe von *real-time* RT-PCR wurden die Expressionslevel des murinen Adam10 Gens in den Gehirn- und Leberproben quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass im Gehirn keine Veränderung des ADAM10-Levels zu detektieren war (Abbildung 9A). In den Leberproben der mit Pflanzenextrakten behandelten Tiere im Vergleich zu mit DMSO behandelten Tieren konnte jedoch ein Anstieg der alpha-Sekretase mRNA nachgewiesen werden, der im Falle von Extrakt 3534.1 (aus *Caragana sinica*) auch Signifikanz erreichte (Abbildung 9B). Um diesen Befund weiter zu überprüfen, wurden die Leberproben der mit Extrakt 3534.1- und DMSO-behandelten Tiere auf die Menge an vorhandenem APPs-alpha hin untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass eine signifikant erhöhte Menge des alpha-Spaltprodukts von APP in den Lebern der mit *Caragana sinica* behandelten Tiere vorhanden war (Abbildung 9C), während APP selbst unverändert blieb (Abbildung 9D).

Um das Ausbleiben von sichtbaren Effekten der Pflanzenextrakt-Behandlung in den Gehirnen der verwendeten Tiere zu erklären, könnten verschiedene Gründe in Betracht kommen. Eine möglicherweise fehlende Passage über die Blut-Hirn-Schranke oder auch ein stattfindender Metabolismus in der Leber der behandelten Tiere könnten hierfür verantwortlich sein.

3.2.3 Beteiligung von Metabolismus und Blut-Hirn-Schranke an der Wirkung von Extrakten auf den ADAM10 Promotor

Ein Grund, weshalb in der Leber der mit Pflanzenextrakten behandelten Tiere eine Promotoraktivierung von ADAM10 beobachtet werden konnte, im Gehirn jedoch nicht (Abbildung 9), könnte eine erfolgte Verstoffwechslung der bioaktiven Fraktionen der Pflanzenextrakte nach *i.p.* Behandlung gewesen sein.

Um eine potentielle Veränderung des Expressionsmusters von metabolisch aktiven Leberenzymen, wie beispielsweise denen der Cytochrom P450-Familie (CYP) zu überprüfen, wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR an der RNA aus Leberproben der behandelten Tiere durchgeführt. Die murinen Enzyme Cyp1a2 und Cyp2d22 werden vorwiegend in der Leber exprimiert und entsprechen den humanen Homologen CYP1A2 und CYP2D6 (Renaud *et al.*, 2011). Diese Mitglieder der P450-Familie wurden als repräsentative Enzyme verwendet, die maßgeblich am Metabolismus von Xenobiotika und Pharmazeutika in der Leber beteiligt sind.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass im Fall von Cyp2d22 in den Mäusen keine Veränderung des Expressionslevels nach Behandlung mit Pflanzenextrakten vorlag

(Abbildung 10A). Für Cyp1a2 konnte eine leichte Steigerung der Expression nach Behandlung mit Extrakt 3307.3 und 3413.2, sowie eine leichte Absenkung der Expression nach Behandlung mit Extrakt 3534.1 beobachtet werden. Keine dieser Veränderung erreichte jedoch Signifikanz (Abbildung 10B). Ein direkter Beleg für einen Leberkatabolismus der wirksamen Komponenten der Pflanzenextrakte, der wiederum zum Ausbleiben der ADAM10 Promotoraktivierung im Gehirn der behandelten Mäuse geführt hätte, konnte damit nicht erbracht werden. Weiterhin ist hierbei auch zu bedenken, dass lediglich repräsentative Vertreter der Cytochrom P450-Familie untersucht wurden. Für eine gesamthafte Aussage zum Metabolismus müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

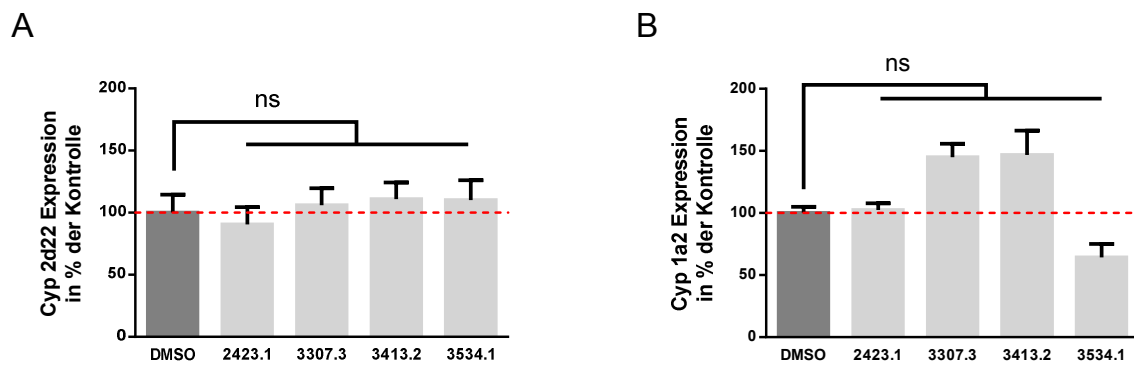


Abbildung 10: Einfluss von Kandidatenextrakt-Behandlung auf die Expression ausgewählter CYP450-Enzyme.

A: Aus isolierter mRNA der Leberproben von mit Pflanzenextrakten oder DMSO (Kontrolle) behandelten Mäuse wurde mittels qPCR murines Cyp2d22 (entspricht humanem CYP2D6) quantifiziert. **B:** In den gleichen Proben wie in (A) wurde mittels qPCR murines Cyp1a2 (entspricht humanem CYP1A2) quantifiziert. (ns: nicht signifikant). Modifiziert nach Abbildung 3, Schuck *et al.*, 2015.

Neben dem Metabolismus in der Leber könnte eine eingeschränkte Passage über die Blut-Hirn-Schranke ein Auslöser für die mangelnde zerebrale Aktivierung der alpha-Sekretase Expression sein. Zunächst wurde hierfür überprüft, ob aktive Fraktionen der verwendeten Pflanzenextrakte bereits Substrate für MDR1 ("*multidrug resistance protein 1*") sind. MDR1 ist ein wichtiger Transporter in Gehirn und Leber, der für den aktiven Transport von Substanzen in die Peripherie verantwortlich ist (Schinkel *et al.*, 1994). In einem *in vitro* Versuch konnten jedoch nur Bestandteile von Pflanzenextrakt 2423.1 als potentielle Substrate von MDR1 identifiziert werden (Schuck *et al.*, 2015).

Um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für die aktiven Wirkstoffe der eingesetzten Pflanzenextrakte zu untersuchen, wurde ein sogenanntes *Transwell*-Modell verwendet (Freese *et al.*, 2014). In diesem Modell wird zunächst eine Schicht aus primären Schweinehirn-Endothelzellen (PBEC, "*porcine brain endothelial cells*") auf ein Netz aus Polyester so ausgesät, dass eine dichte Barriere entsteht. Die Dichtigkeit der Barriere, die durch die sich ausbildenden *tight junctions* der Endothelzellen bedingt ist, wird mittels Widerstandsmessungen überprüft. Die Polyesternetze werden im Anschluss über bereits mit murinem Adam10 Promotor Reporter Vektor transient transfizierte SH-SY5Y Zellen gesetzt. Hierdurch entstehen zwei getrennte Kompartimente, aus denen Stoffe nur durch Überqueren der aus den Endothelzellen gebildeten Barriere in das jeweils andere übertreten können. Eine Zugabe von Pflanzenextrakten zum oberen Kompartiment kann demnach nur dann eine Aktivierung des murinen Adam10 Promotors in den SH-SY5Y Zellen bewirken, wenn die aktiven Fraktionen die Barriere überwinden können (Abbildung 11A).

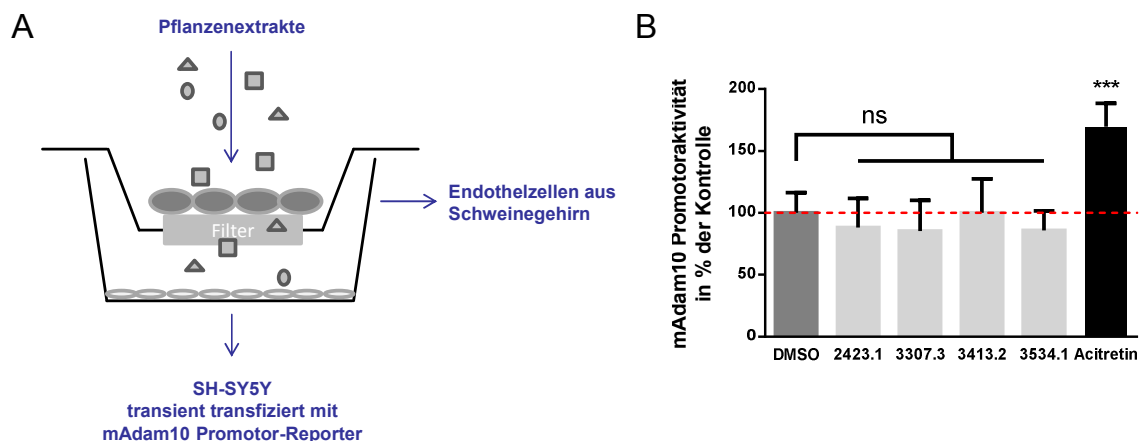


Abbildung 11: Analyse von Pflanzenextrakten auf Blut-Hirn-Schrankengängigkeit.

A: Schematische Darstellung des Blut-Hirn-Schranken Modells. Über mit einem murinen Adam10 Promotor Reporter Vektor transient transfizierten SH-SY5Y Zellen wurde ein Filter aufgebracht. Auf diesem Filter wurden zuvor primäre Endothelzellen aus Schweinegehirn (PBEC) bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Applikation von Pflanzenextrakten in das obere Kompartiment müssen die Bestandteile die artifizielle Schranke passieren, um das untere Kompartiment zu erreichen. Modifiziert nach Freese *et al.*, 2014. **B:** Promotoraktivität von murinem Adam10 in transfizierten SH-SY5Y Zellen nach Behandlung mit Pflanzenextrakten, DMSO (Kontrolle) oder Acitretin (Positivkontrolle). Extrakte oder Substanzen wurden so in das obere Kompartiment eingegeben, dass bei 100 % Durchdringung der Endothelzellen eine Konzentration von 0,1 % (entspricht den vorherigen Zellkulturversuchen) im unteren Kompartiment erreicht würde. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit drei verschiedenen Endothelzellspendern. (ns: nicht signifikant, ***: $p < 0,001$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2015, Abbildung 3.

Die bereits im Tierversuch eingesetzten Pflanzenextrakte 2423.1, 3307.3, 3413.2 und 3534.1 wurden zusammen mit einer Lösungsmittelkontrolle und der Positivkontrolle Acitretin im *Transwell*-Modell eingesetzt. Für Acitretin ist sowohl eine Aktivierung des murinen Adam10 Promotors beschrieben (Tippmann *et al.*, 2009), als auch die Fähigkeit, die murine Blut-Hirn-Schranke zu überqueren (Holthoewer *et al.*, 2012). Die Ergebnisse der Studie unter Verwendung des Blut-Hirn-Schranke Modells zeigten, dass die applizierten Pflanzenextrakte im Vergleich zu Acitretin nicht in der Lage waren, den ADAM10 Promotor in den transfizierten SH-SY5Y Zellen zu aktivieren (Abbildung 11B). Während die Promotoraktivität der alpha-Sekretase nach Acitretin Zugabe auf 170 % im Vergleich zu Kontrolle signifikant gesteigert wurde, konnte nach Behandlung mit Pflanzenextrakten keine Veränderung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die aktiven Fraktionen der verwendeten Pflanzenextrakte, die in Zellkulturversuchen zu einer Steigerung der ADAM10 Promotoraktivität führten, nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren konnten. Dies wiederum erklärt, weswegen in den Tierversuchen keine gesteigerte Expression von ADAM10 im Gehirn der behandelten Mäuse beobachtet werden konnte.

Aufgrund der Stärke der beobachteten ADAM10 Expressionssteigerung in der Leber von Versuchstieren (Abbildung 9B) wurde Extrakt 3534.1, aus *Caragana sinica*, als der vielversprechendste Pflanzenextrakt eingestuft. Die Tatsache, dass ein Überqueren der Blut-Hirn-Schranke offensichtlich für die aktive Komponente dieses Pflanzenextrakts nicht möglich ist, führte zu der Frage, welche Fraktionen des Extrakts für die Aktivierung des ADAM10 Promotors verantwortlich sind. Mit der Identifizierung der aktiven Komponente könnte mittels einer Anpassung seiner chemischen Struktur ein Penetrieren der Blut-Hirn-Schranke doch noch ermöglicht werden. Um diese Frage beantworten zu können, musste zunächst eine Fraktionierung des Extrakts erfolgen.

3.2.4 Identifizierung von bioaktiven Fraktionen im *Caragana sinica*

Extrakt

Die Fraktionierung des Pflanzenextrakts aus *Caragana sinica* (3534.1) geschah am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Eckhard Thines. Mit Hilfe von Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) wurden jeweils 25 µl Pflanzenextrakt in Fraktionen getrennt (genaue Versuchsbedingungen siehe

Schuck *et al.*, 2015). Die Detektion von Signalen erfolgte mittels eines Dioden-Array Detektors, der einen Wellenlängenbereich von 200nm bis 350nm kontinuierlich erfasste und somit ein genaues Elutionsprofil des Pflanzenextrakts lieferte (Abbildung 12). Der Fraktionensammler wechselte die Position nach jeweils 15 Sekunden, so dass insgesamt 92 Fraktionen in einer 96-Loch-Platte gesammelt wurden. Das Lösungsmittel wurde anschließend abgedampft und die Platte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

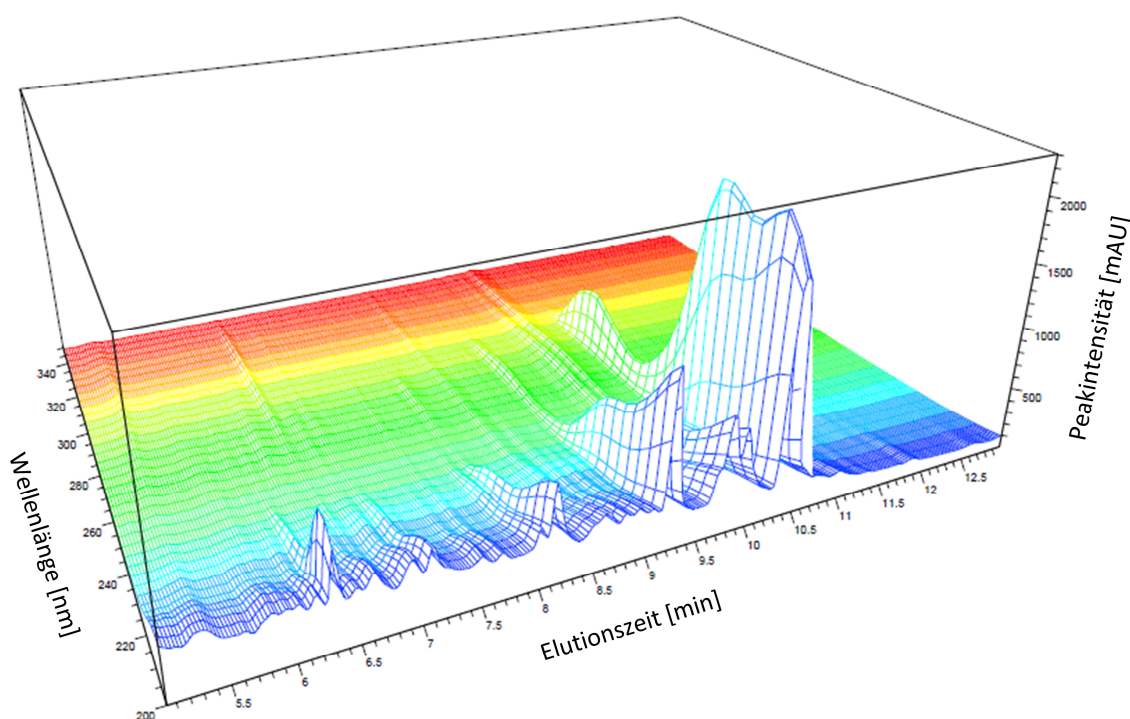


Abbildung 12: Ausschnitt des 3D-Chromatogramms der Fraktionierung von Pflanzenextrakt 3534.1 aus *Caragana sinica*.

25 µl Extrakt wurden über eine LiChrospher RP 18 Säule (3 x 125 mm; 5 µm) bei 40 °C Säulentemperatur mittels linearem Gradienten bestehend aus Wasser und Acetonitril (1 % auf 100 % Acetonitril nach 20 min) bei 1 ml/min Fließgeschwindigkeit aufgetrennt. Gezeigt ist das Chromatogramm (Photodiodenzeile des HPLC-Detektors) ab Minute 5 der Fraktionierung bis zu Minute 13, die ersten fünf Minuten wurden aufgrund von Überlagerung mit dem Lösemittel nicht gezeigt. Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2015, Ergänzungsabbildung 1.

Für den Einsatz im Zellkulturversuch wurden die ersten 60 getrockneten Fraktionen in Zellkulturmedium gelöst, da für diese noch detektierbare Signale im Chromatogramm erfasst wurden. Es handelt sich weiterhin aufgrund der gewählten Chromatographie-Bedingungen um den mehr polaren Anteil des Pflanzenextrakts. Aufgrund des festgestellten Unvermögens der aktiven Substanzen im Extrakt die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren, erschien dieser Ansatz

plausibel, da fettlösliche Substanzen einfacher ins Gehirn eindringen können (Abbott *et al.*, 2010).

Die gelösten Fraktionen wurden wie zuvor zu transient transfizierten SH-SY5Y Zellen gegeben. Es wurden zwei Vektoren für die Transfektion verwendet, die zum einen den murinen und zum anderen den humanen ADAM10 Promotor trugen. Die beiden Promotoren kontrollierten zwei unterschiedliche Luziferasen, um eine parallele Messung der Promotoraktivitäten durchführen zu können.

Die Ergebnisse waren für beide Promotoren vergleichbar: Die Behandlung mit den Fraktionen bei 0,50 min, 5,50 min und 10,25 min führte zu einer signifikanten Steigerung der gemessenen Luziferaseaktivität (muriner Adam10 Promotor: Abbildung 13A, humaner Promotor nicht gezeigt). Im dazugehörigen Chromatogramm konnten diesen Fraktionen einzelnen Peaks zugewiesen werden (Abbildung 13B).

Um die identifizierten bioaktiven Fraktionen chemischen Verbindungen zuordnen zu können, wurde eine erneute Fraktionierung des Gesamtextrakts am IBWF durchgeführt. Bei dieser Fraktionierung wurden die erhaltenen Fraktionen im Anschluss an die Trennung mit Hilfe eines Massenspektrometers analysiert. Es wurden Molekülmassen von 684 u für die Fraktion nach 0,50 min, 482 u für die Fraktion nach 5,50 min und 678 u für die Fraktion nach 10,25 min erhalten.

Auf Basis der Molekülmasse wurde für die Fraktion nach 10,25 min ("Fraktion D7") das Phytostilben alpha-Viniferin (Abbildung 14A) als möglicher Kandidat identifiziert. Der zugrundeliegende Extrakt wurde aus den Stängeln von *Caragana sinica* gewonnen. Es wurde bereits beschrieben, dass einer der Bestandteile des Wurzelextrakts der Pflanze alpha-Viniferin ist (Kitanaka *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 2002). Dies bestärkte die Vermutung, dass die gefundene Fraktion alpha-Viniferin enthält.

Um dies zu überprüfen, wurde kommerziell erhältliches alpha-Viniferin (Abbildung 14B) mittels einer eigens entwickelten HPLC-Methode (Details siehe Schuck *et al.*, 2015) mit der entsprechenden Fraktion D7 (Abbildung 14C) verglichen. Hierbei wurden identische Chromatogramme erhalten, die die Identität des Inhalts der Fraktion als alpha-Viniferin bestätigten.

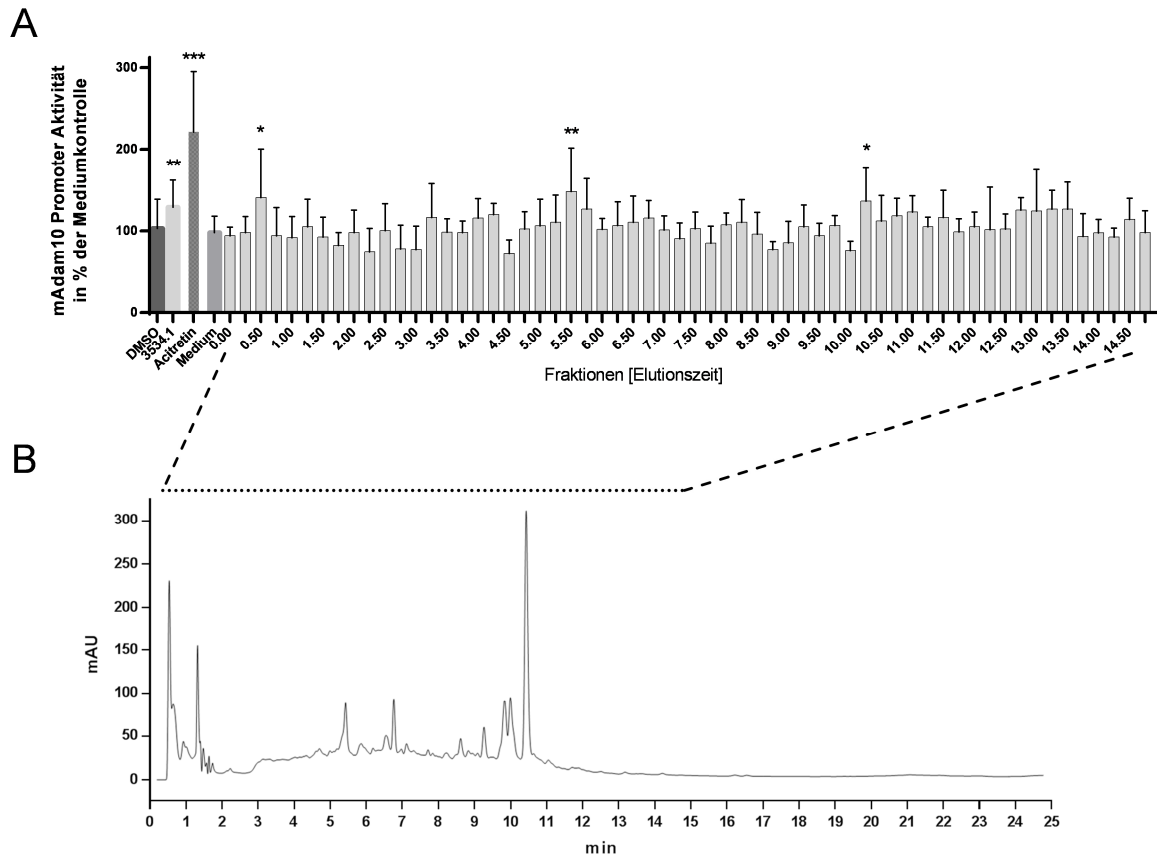


Abbildung 13: Promotorassay mit fraktioniertem Pflanzenextrakt aus *Caragana sinica*.

A: Die Promotoraktivität des murinen Adam10 Promotors wurde in mit Reporter Vektor transfizierten SH-SY5Y Zellen gemessen. Die Zellen wurden über 48 h mit in Kulturmedium aufgenommenen Fraktionen des *C. sinica* Extrakts behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit Acitretin oder vollständigem Exktrakt 3534.1 bzw. deren Lösungsmittel DMSO behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte nach Normierung auf den jeweiligen Proteingehalt aus vier unabhängigen Versuchen. **B:** Chromatogramm der Fraktionierung bei 300 nm. Die gestrichelte Linie zeigt schematisch den Bereich an Fraktionen, die in (A) verwendet wurden. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2015, Abbildung 4.

Durch eine Analyse mittels HPLC wurde die Konzentration an alpha-Viniferin im Gesamtextrakt aus *Caragana sinica* auf $0,15 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bestimmt. Ein Zellkultur-Versuch mit transient transfizierten SH-SY5Y zeigte, dass eine Induktion des murinen Adam10 Promotors sowohl mit der isolierten Fraktion, als auch mit $0,2 \mu\text{M}$ alpha-Viniferin möglich war (Abbildung 14D). Die erreichte Aktivierung des Promotors durch die Reinsubstanz und durch die aus dem Pflanzenextrakt isolierte Fraktion war vergleichbar, beide waren untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Hieraus wurde geschlossen, dass die für die ADAM10 Promotoraktivierung verantwortliche Substanz in Fraktion D7 aus Pflanzenextrakt 3534.1 aus *Caragana sinica* alpha-Viniferin ist.

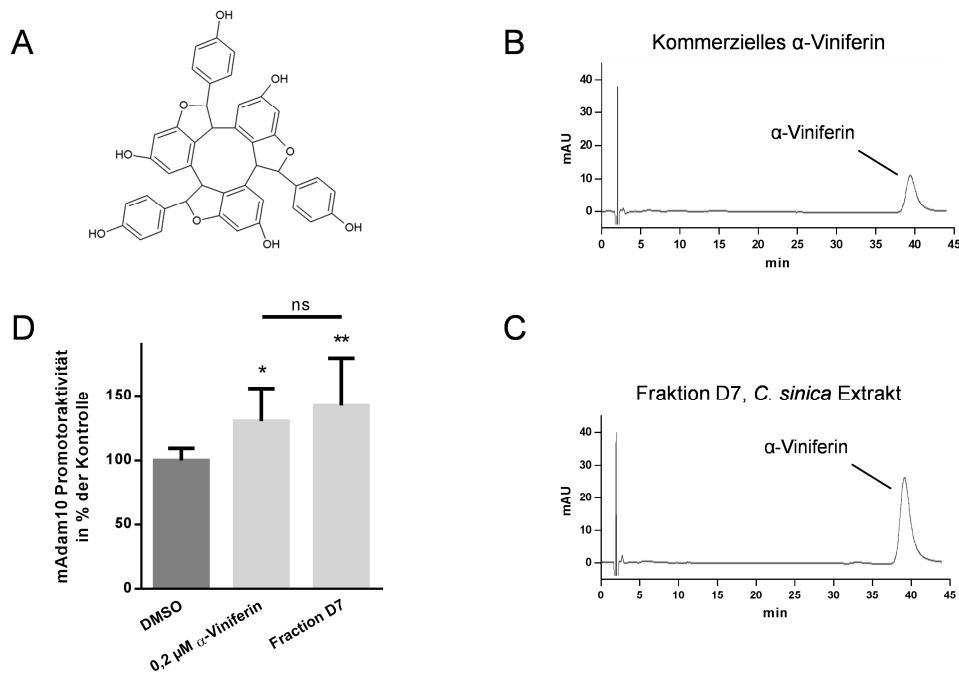


Abbildung 14: Vergleich von alpha-Viniferin mit Fraktion D7 aus dem Pflanzenextrakt.

A: Struktur des Oligostilbens α -Viniferin. **B:** Chromatogramm bei 210 nm von kommerziell erhältlichem α -Viniferin. 50 μ l (5 μ M) α -Viniferin wurden auf eine Hypersil C18 Säule (150 x 4 mm; 5 μ m) bei 30 °C und einer Flussrate von 1,5 ml/min aufgegeben. Der Eluent bestand aus 16,2 % Methanol, 12,8 % Acetonitril und 71 % 0,02 M Natriumacetatpuffer. **C:** Chromatogramm bei 210 nm von 50 μ l der aktiven Fraktion nach 10,25 min (D7) der Fraktionierung von *C. sinica*. Es wurden die gleichen Bedingungen wie in (A) verwendet. **D:** Mit murinem Adam10 Promotor Reporter Vektor transfizierte SH-SY5Y Zellen wurden mit kommerziell erhältlichem α -Viniferin (0,2 μ M), der aktiven Fraktion D7 oder DMSO (Kontrolle) für 48h behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Luziferaseaktivität nach Normierung auf den jeweiligen Proteingehalt aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. (ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$). Modifiziert nach Schuck *et al.*, 2015, Abbildung 5.

Über die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit von α -Viniferin und Polyphenolen im Allgemeinen ist bisher wenig bekannt (Vauzour, 2012). Mit Hilfe von Ko-Kulturmodellen, vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten *Transwell*-System, konnte jedoch zumindest für Flavonoide gezeigt werden, dass diese eine höhere Penetranz durch die Blut-Hirn-Schranke haben, je unpolarer sie sind (Youdim *et al.*, 2003). Durch die freien Hydroxylgruppen am α -Viniferin könnte dessen Passage ins Gehirn erschwert sein. Durch gezielte Modifikation, beispielsweise einer O-Methylierung, könnte versucht werden die Polarität der Substanz zu erniedrigen und somit eine bessere Blut-Hirn-Schrankengängigkeit zu erreichen.

Zwei weitere Fraktionen des *Caragana sinica* Extrakts (nach 0,50 min und nach 5,50 min) führten ebenfalls zu einer Promotoraktivierung von murinem Adam10. In welchem Maße sie zum beobachteten Effekt des Gesamtextrakts beitragen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Für alle Einzelkomponenten wäre weiterhin auch möglich, dass sie *in vivo* wenig bis keine Wirkungen zeigen, sondern nur in Kombination zu einer Steigerung der ADAM10 Promotoraktivität führen. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch schon bei der Wirkungsweise des Johanniskrauts gemacht: Hier wird der Gesamtextrakt aus *Hypericum perforatum* als der für die antidepressive Wirkung verantwortliche Bestandteil angesehen, einzelne Komponenten konnten keine vergleichbaren Effekte hervorrufen (Butterweck und Schmidt, 2007; Russo *et al.*, 2014).

3.3 Etablierung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus

Bei der Erforschung neuer Therapieformen sind Studien *in vivo* unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Etablierung einer Mauslinie unterstützt werden, die spezifische Untersuchungen von ADAM10 am lebenden Tier ermöglicht.

Um die Expression der alpha-Sekretase in der Maus verfolgen zu können, sollte die Leuchtkäfer-Luziferase (*Photinus pyralis*) parallel und im gleichen Maße wie das endogene ADAM10 des Tieres exprimiert werden. Der dafür gewählte Ansatz sah vor, die kodierende Sequenz der Luziferase mittels gezieltem *knock-in* zwischen den endogenen ADAM10 Promotor und das erste Exon der kodierenden Sequenz der endogenen ADAM10 Gens zu bringen. Die parallele Expression sollte mittels einer T2A ("*Thosea asigna* Virus 2A") Virussequenz ermöglicht werden, die zwischen den Sequenzen der Luziferase und ADAM10 platziert werden würde. Aufgrund dieser T2A Sequenz würde nach Aktivierung des endogenen ADAM10 Promotors die Transkription der Luziferase beginnen und über die T2A Sequenz fortgesetzt werden. Am Ende des T2A Abschnitts würde das Ribosom das Luziferase-T2A Fusionsprotein freisetzen und mit der Translation des endogenen ADAM10 fortfahren (sog. "*ribosome skipping*", Donnelly *et al.*, 2001). So würden im Endeffekt zwei unabhängige Proteine entstehen, die beide in gleichem Maße unter der Kontrolle des gleichen, endogenen ADAM10 Promotors exprimiert würden. Weiterhin würde die Funktionalität beider Proteine erhalten bleiben. Dies ist essentiell, da beispielsweise der *knock-out* von ADAM10 letal ist (Hartmann *et al.*, 2002). Die lösliche Form der Luziferase würde parallel zum Transmembranprotein ADAM10 entstehen.

Mit Hilfe von injiziertem Luziferin, welches dann durch die *Photinus pyralis* Luziferase umgesetzt würde, könnte die Photonenemission in einer entsprechenden Kamera aufgenommen werden. Diese Technik würde dann indirekt die Expression von ADAM10, bzw. deren Veränderung, *in vivo* in Echtzeit messbar machen. Die Messungen würden weiterhin mit einer hohen Bereichsgenauigkeit durchgeführt werden können. Für erweiterte präklinische Studien im Rahmen der Erforschung von Expressionsmodulatoren von ADAM10 wäre ein solches Modell ein großer Fortschritt.

3.3.1 Strategie zur Generierung der Mauslinie

Das Vorgehen zur Etablierung einer entsprechenden, sogenannten "ADAM10 Promotor Reporter Maus" war in mehreren Schritten geplant. In diversen Vorarbeiten (Antje Salg, Corinna Roth, Sarina Schulze, alle Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin Mainz) wurde zunächst *in vitro* gezeigt, dass das entstehende Luziferase-T2A Fusionsprotein noch dazu in der Lage ist, die Luziferin Reaktion zu katalysieren. Mit Hilfe von Lumineszenzmessungen von transient mit entsprechendem Expressionsvektor transfizierten Zellen konnte dies bestätigt werden. Es wurde weiterhin in Zellkulturversuchen gezeigt, dass die Expression von ADAM10 durch die genetische Veränderung nicht beeinflusst wird und dass die exprimierte alpha-Sekretase ebenfalls katalytisch aktiv ist. Hierfür wurde aus den Überständen von transient mit Expressionsvektor transfizierten Zellen das Spaltprodukt APPs-alpha bestimmt.

In einem weiteren Schritt wurde dann ein Zielvektor für die Elektroporation von embryonalen Stammzellen kloniert. Dieser Zielvektor basiert auf dem Gerüst des pEasyFloX (Addgene, Cambridge, MA, USA), welcher eine Neomycin Resistenz-Kassette enthält. Die Kassette kann für die Vorselektion von positiv transfizierten Zellen verwendet werden und ist flankiert von zwei *FRT* Abschnitten, die ein späteres Entfernen ermöglichen. In dieses Grundgerüst wurden zwei Homologiearme einkloniert, die jeweils ca. 3 kB umfassen. Diese Sequenzabschnitte sollten die spätere homologe Rekombination im gewünschten Bereich auf dem Maus-Chromosom 9 möglich machen. Der erste der beiden Arme beinhaltet demnach auch die gesamte murine Adam10 Promotorregion (Prinzen *et al.*, 2005). Direkt im Anschluss an den ersten Homologiearm, und damit direkt unter der Kontrolle des ADAM10 Promotors, wurde die cDNA der *Photinus pyralis* Luziferase einkloniert. Das Stopp-Codon wurde hierbei ersetzt (TAA > TAC), um einen Translationsabbruch zu unterbinden. Stattdessen wurde

downstream der Luziferase die T2A Virussequenz kloniert, die eine kombinierte Expression von zwei benachbarten codierenden Gensequenzen ermöglicht. Nach der T2A Sequenz wurde das erste Exon des murinen Adam10 Gens eingefügt, zusammen mit Teilen des ersten Introns. Nach der vektoreigenen Neomycin Resistenzkassette folgte schließlich der zweite Homologiearm, der aus weiteren Intron- und Exonanteilen des murinen Adam10 Gens bestand. Nach Elektroporation und der gewünschten homologen Rekombination sollte so in embryonalen Stammzellen ein gezielter *knock-in* der Luziferase cDNA vor den murinen Adam10 Genlocus geschehen (Abbildung 15).

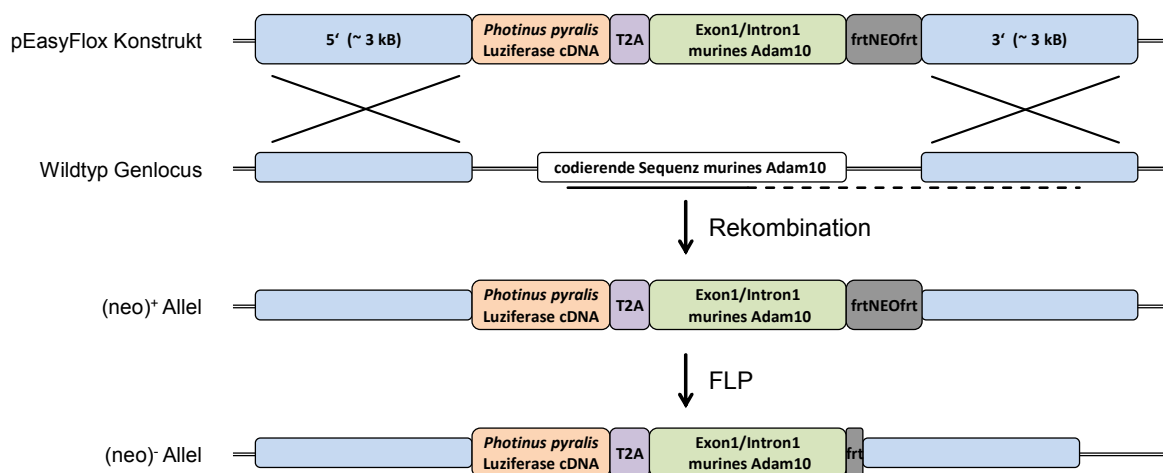


Abbildung 15: Schematische Darstellung der geplanten Adam10-Luziferase Insertion.

Der zur Transfektion verwendete Zielvektor basiert auf dem pEasyFlox Gerüst. Hierin einkloniert wurde ein Teil des wildtypischen Genlocus des murinen Adam10 Gens (5'). Weiterhin wurde die cDNA der *Photinus pyralis* Luziferase, gefolgt von einer T2A Sequenz, in den Vektor eingesetzt. Schließlich folgten die Sequenzen von Exon1 und Intron1 des murinen Adam10 Gens. Eine Neomycin Kassetten war im pEasyFlox bereits vorhanden. Schließlich folgte ein weiterer Teil des Wildtyp Genlocus von murinem Adam10 (3'). Mittels homologer Rekombination sollte über die beiden wildtypischen Genabschnitte ein Neomycin-positives Allel entstehen, welches schließlich durch Flippase-Reaktion von seiner Neomycin Kassetten befreit werden sollte (neo⁻ Allel).

Nach Einbringen eines positiven Klon in Blastozysten und deren Implantation in scheinträchtige Muttertiere würden Chimären entstehen, die ein rekombiniertes Allel mit der Neomycin Kassetten (neo⁺) beinhalten würden. Nach Kreuzung dieser Chimären mit einer für FLP-Rekombinase transgenen Maus (Takeuchi *et al.*, 2002) könnten Nachkommen selektiert werden, die eine somatische Entfernung der Resistenzkassetten aufzeigen. Nach einer weiteren Kreuzung dieser Nachkommen mit Wildtyp-Mäusen wäre dann auch die Entfernung der

Kassette in der Keimbahn möglich. Im Anschluss könnte die Züchtung der ADAM10-Promotor Reporter Maus beginnen.

In Vorarbeiten wurde das pEasyFlox-Konstrukt bereits vollständig kloniert (Corinna Roth, Sarina Schulze). Die Elektroporation von embryonalen Stammzellen fand an der "*German Mouse Clinic*" am Helmholtz-Institut für Experimentelle Genetik in München (Dr. Ralf Kühn, Dr. Oskar Ortiz) statt. Weiterhin fand im Rahmen von Vorarbeiten bereits die erste Selektion von potentiellen embryonalen Stammzellklonen (ES-Klone) mittels PCR statt (Corinna Roth). Als Selektionskriterium diente hierbei sowohl das Vorhandensein der Neomycin Resistenzkassette, als auch der *Photinus pyralis* Luziferase. Diese Vorselektion ergab insgesamt 18 ES-Klone, die in München weiter expandiert wurden. Auf dieser Basis wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jene ES-Klone identifiziert, die den gewünschten *knock-in* aufzeigten.

3.3.2 Identifizierung von korrekt transfizierten embryonalen Stammzellen

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind derzeit noch nicht publiziert und werden daher in größerer Detailgenauigkeit dargestellt.

Von den 18 identifizierten Klonen konnten am Helmholtz-Institut drei nicht weiter expandiert werden, weswegen insgesamt nur 15 ES-Klone zur weiteren Analyse zur Verfügung standen. Aus den erhaltenen Zellen wurde RNA extrahiert (NucleoSpin® RNA II Kit, Macherey-Nagel, Düren) und mittels reverser Transkription *in vitro* cDNA Proben erstellt (0,5 µg RNA in 20 µl Gesamtvolumen, MMLV HP RT Kit, Epicentre, Madison, WI, USA).

Im Anschluss wurde mittels PCR indirekt das Vorhandensein verschiedener mRNA Spezies überprüft (Abbildung 16). Die Reaktionen wurden gemäß den Vorgaben des verwendeten Kits (Perfect *Taq* DNA Polymerase Kit, 5Prime, Hamburg) unter Verwendung von 2 µl cDNA Ansatz aus der reversen Transkriptionsreaktion in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden Oligonukleotide für murines Gapdh (Quantitect Primer Assay QT00309099, Quiagen, Hilden), murines Adam10 (Quantitect Primer Assay QT00106351, Quiagen, Hilden) bzw. für die *Photinus pyralis* Luziferase (AS_L_for1: CGTCATCGTCGGGAAGAC, AS_L_rev: CCTTCTTGGCCTTTATGAGG, jeweils 4 µmol pro Ansatz) verwendet. Die PCR Bedingungen waren wie folgt: 94 °C für 3 min, anschließend zyklisch wiederholend 94 °C für 30 sec, 55 °C (Gapdh, murines Adam10) bzw. 54 °C (Luziferase) für 30 sec, 72 °C für 20 sec (Gapdh, murines Adam10) bzw. 15 sec

(Luziferase), insgesamt 25 (Gapdh) bzw. 30 (murines Adam10, Luziferase) Zyklen, schließlich 72 °C für 10 min.

Murines Gapdh diene zunächst dazu, die generelle Eignung der erhaltenen Zellen und die Güte von RNA-Extraktion und reverser Transkription zu überprüfen. Mittels des Nachweises von murinem Adam10 sollte bestätigt werden, dass der Genlocus trotz homologer Rekombination noch intakt ist und die entsprechende mRNA daraus gebildet werden kann. Für beide Prüfungen zeigten alle 15 getesteten ES-Klone entsprechende Banden in den Gelbildern (beispielhafte Ergebnisse siehe Abbildung 16). Schließlich wurde das Transkript der *Photinus pyralis* Luziferase nachgewiesen, um sicherzustellen, dass der Zielvektor auch tatsächlich im Mausgenom vorhanden ist. Auch hierbei zeigten alle 15 getesteten ES-Klone entsprechende Banden in den Gelbildern, jedoch teilweise in unterschiedlichen Stärken (beispielhafte Ergebnisse siehe Abbildung 16).

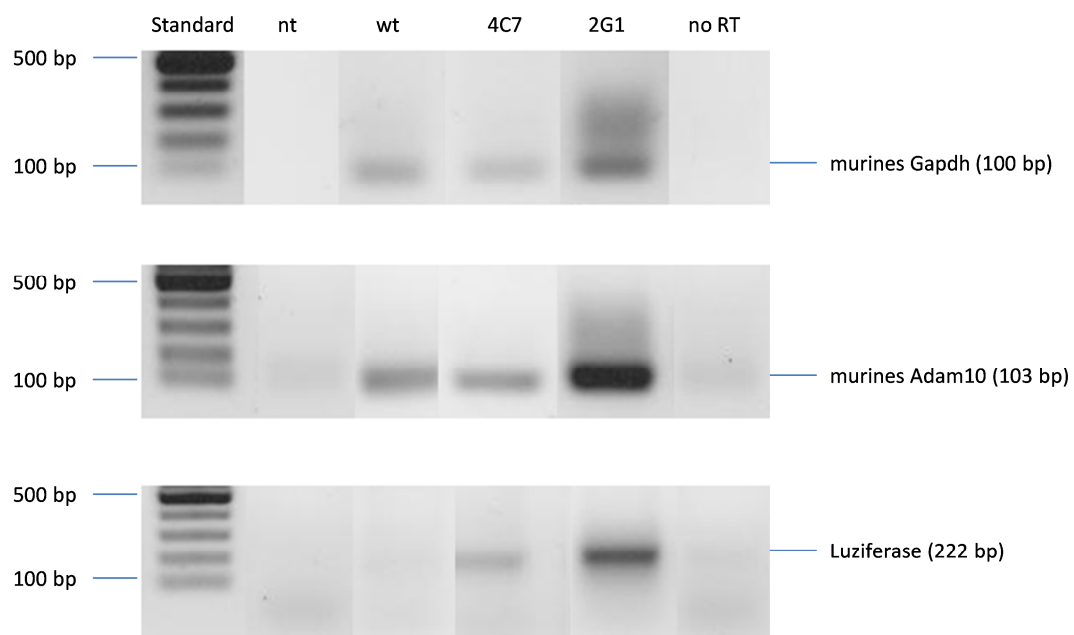


Abbildung 16: Ausschnitte aus Gelbildern nach PCR an cDNA von embryonalen Stammzellen.

50 % (murines Gapdh), 75 % (murines Adam10) bzw. 100 % (Luziferase) des PCR Produkts aus einem 20 µl Ansatz wurden auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente GeneRuler 100 bp DNA Ladder von ThermoFisher. Als Vergleich zu zwei beispielhaften ES-Klonen (4C7 und 2G1) diente jeweils eine PCR Probe, in der keine DNA zugegeben war (nt), eine Probe mit cDNA einer C57BL/6 Wildtyp Maus (wt) und eine Probe aus der reversen Transkriptionsreaktion mit wt-RNA, in der keine reverse Transkriptase vorhanden war (no RT). Anmerkung: Es sind exemplarische Proben gezeigt, das Gelbild wurde nachträglich elektronisch zusammengefügt.

Der Versuch, das komplette Konstrukt der homologen Rekombination in den embryonalen Stammzellen mit Hilfe von PCR nachzuweisen scheiterte trotz des Einsatzes verschiedenster Oligonukleotidkombinationen (nicht näher beschrieben).

Das Vorhandensein einer Bande im Gelbild für das Luziferase Amplifikat ließ zwar einen ersten Schluss darauf zu, dass eine Expression des Gens in den Zellen vorlag, ein funktionaler Beleg konnte jedoch damit noch nicht erbracht werden. Ob die nachgewiesene mRNA auch tatsächlich in funktionsfähiges Protein translatiert wird und wie stark die Ausprägung der Luziferase-Expression ist, konnte alleine durch die verwendete PCR Analyse nicht bestätigt werden.

3.3.3 Luziferase Aktivitätsmessung in embryonalen Stammzellen

Um die Funktionalität der in den ES-Zellen gebildeten Luziferase zu bestimmen, wurde eine Aktivitätsmessung des Enzyms mit Hilfe von Luziferin im Luminometer durchgeführt. Als Material für diese Analyse diente Lysat der embryonalen Stammzellen, die am Helmholtz-Institut expandiert wurden.

Um sicherzustellen, dass die gemessenen Signale nur aus der Reaktion der *Photinus pyralis* Luziferase mit Luziferin stammen, wurde das erhaltene Signal nach einer bestimmten Zeit gezielt gelöscht. Durch die Zugabe von EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure) konnte das zur Katalyse notwendige Magnesium (Übersicht Marques und Esteves da Silva, 2009) komplexiert und damit der Luziferasereaktion entzogen werden. Die Differenz aus initial gemessenem und dem nach Zugabe von EGTA noch vorhandenem Signal konnte dann als reine Luziferase-abhängige Photonenentwicklung gewertet werden.

Nach einer Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Proben konnte durch den direkten Vergleich mit im selben Versuch analysiertem rekombinanter *Photinus pyralis* Luziferase die Menge an Enzym in den Zellen bestimmt werden (Abbildung 17). Hierbei wurde vorausgesetzt, dass die Entwicklung von Photonen aus der Luziferasereaktion im betrachteten Bereich annähernd proportional zur Menge an vorhandenem Enzym ist (Produktdatenblatt Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI, USA). In einem Vorversuch konnte dies bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

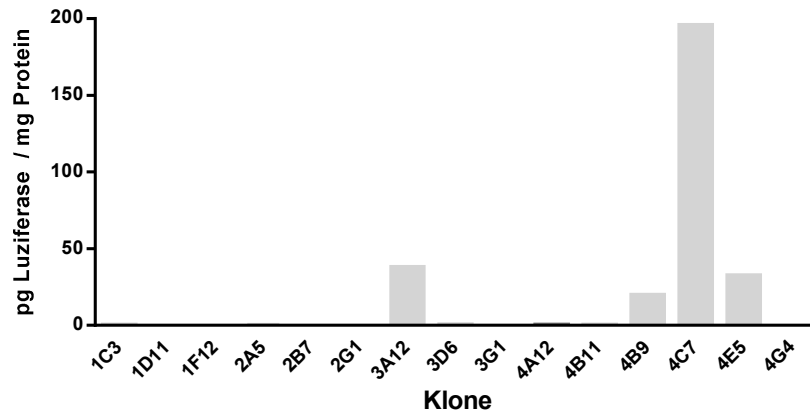


Abbildung 17: Bestimmung der Menge an Luziferase in embryonalen Stammzellen.

Lysat von ausgewählten, expandierten embryonalen Stammzellen wurde mit Luziferin in einem Lumineszenzassay untersucht. Der Proteingehalt der eingesetzten Proben wurde bestimmt. Durch Vergleich mit der Lumineszenzentwicklung einer definierten Menge von rekombinanter *Photinus pyralis* Luziferase wurde berechnet, wie viel pg Luziferase pro mg Protein in den Proben der ES-Klone vorhanden war.

Auf Basis dieser Ergebnisse konnten schließlich finale Kandidaten der ES-Klone für eine Einbringung in Blastozysten an das Helmholtz-Institut gemeldet werden: Die Klone 4C7, 4B9, 3A12 und 4E5 zeigten in den PCR Analysen Banden bei den getesteten Amplifikaten (Abbildung 16) und die Funktionalität der gebildeten Luziferase konnte nachgewiesen werden (Abbildung 17).

Für die Implantation in Muttertiere und die Etablierung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus stellen diese Klone den vielversprechendsten Ausgangspunkt dar.

4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Alzheimer Demenz stellt die nach Fallzahl häufigste Form der Demenz dar (Alzheimer's Association, 2017). Die Erkrankung ist damit eine der schwerwiegendsten in der alternden Bevölkerung, bei der es aktuell keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten gibt. Ein zentraler Punkt der Krankheitsentstehung ist die Spaltung des Amyloid Vorläuferproteins durch die beta-Sekretase und der dadurch bedingten Erzeugung des Amyloid-beta Peptids. Dies kann effektiv verhindert werden, indem die Expression der alpha-Sekretase ADAM10 erhöht wird (Postina *et al.*, 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit konnten erstmals Erkenntnisse über die Menge der alpha-Sekretase ADAM10 in Thrombozyten während des gesunden Alterungsprozesses gewonnen werden. Mit Hilfe einer Studie an gesunden Probanden jüngeren, mittleren und fortgeschrittenen Alters konnte gezeigt werden, dass die Menge an ADAM10 in Blutplättchen mit höherem Alter ansteigt. In früheren Studien konnte bereits dargelegt werden, dass die Menge an alpha-Sekretase in diesen peripheren Zellen als potentieller Surrogat-Marker für die zerebrale Menge an ADAM10 dienen könnte (Colciaghi *et al.*, 2002; Manzine *et al.*, 2013b). Zusammen mit bereits veröffentlichten Daten von *post mortem* Gehirngewebe, in denen auch ein Anstieg an ADAM10 mit steigendem Alter nachgewiesen wurde (Bernstein *et al.*, 2003), konnte diese These anhand der neu gewonnenen Daten weiter unterstützt werden. Weiterhin konnte die Vergleichbarkeit von Thrombozyten mit der für die Forschung anerkannten sekundären Zelllinie SH-SY5Y in Bezug auf die Expression AD-relevanter Proteine demonstriert werden.

Die in der durchgeführten Studie verwendete Probanden Kohorte umfasste zwar nur 36 Personen, jedoch konnten signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Expression und Aktivität der alpha-Sekretase erzielt werden. In weiterführenden Forschungen könnte durch größere Kollektive eine verbesserte Auflösung der zeitlichen Abhängigkeit der erzielten Ergebnisse erreicht werden. Weiterhin könnte bei konsequenter Charakterisierung des *APOE* Genstatus auch hierbei eine potentielle Abhängigkeit aufgedeckt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie konnte leider keine Erkenntnisse diesbezüglich erbringen. Vermutlich lag dies vor allem an der zu geringen Anzahl an genotypisierten Probanden.

Ein weiterer interessanter Aspekt für zukünftige Studien ist auch der Einfluss von kognitivem Training auf die Menge an ADAM10. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hierzu lagen vermutlich zeitlich zu weit entfernt von dem durch einige Probanden

durchgeführtem Training. Durch solche Analysen könnten potentiell präventive Maßnahmen, die zur Erhöhung von ADAM10 und damit vermutlich einer geringeren Gefahr an AD zu erkranken gefunden werden.

Schließlich könnten zur weiteren Bestätigung der hier gefundenen Ergebnisse auch longitudinale Folgestudien in Betracht gezogen werden. Durch das Verfolgen der individuellen ADAM10 Menge bei einer ausreichend großen Zahl Menschen über die Zeit ihres Lebens, könnten die genauesten Werte erhalten werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden mittels einer Analyse von 313 koreanischen Heilpflanzenextrakten vier potentielle Kandidaten identifiziert, die die Expression von ADAM10 steigern. Die Wirksamkeit der Extrakte wurde in Zellkulturversuchen demonstriert, ein erster Tierversuch zeigte deren generelle Verträglichkeit *in vivo*. Die Steigerung der Expression von ADAM10 konnte in den behandelten Tieren zumindest in der Leber für einen Extrakt gezeigt werden. Das Ausbleiben vergleichbarer Ergebnisse für das Gehirn behandelter Tiere konnte auf eine eingeschränkte Permeationsfähigkeit der einzelnen aktiven Komponenten durch die Blut-Hirn-Schranke zurückgeführt werden.

Der gefundene Extrakt, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Expressionssteigerung von ADAM10 führte, wurde aus den Stängeln des chinesischen Erbsenstrauchs (*Caragana sinica*) gewonnen. Mittels HPLC wurde der Extrakt in einzelne Fraktionen aufgetrennt und durch weiterführende Zellkulturversuche und HPLC-MS konnte eine seiner bioaktiven Fraktionen als alpha-Viniferin identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Phytostilben maßgeblich für die Promotoraktivierung von ADAM10 durch den *Caragana sinica* Extrakt verantwortlich ist.

Weiterführende Arbeiten sollten sich mit dem Aspekt beschäftigen, dass in den bereits durchgeführten Tierversuchen keine Expressionssteigerung von ADAM10 im Gehirn gemessen werden konnte. Aus den durchgeführten Versuchen lässt sich schließen, dass dies in der schlechten Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke von alpha-Viniferin begründet sein könnte. Mit Hilfe chemischer Modifikationen an alpha-Viniferin könnte eine verbesserte Hirngängigkeit erreicht werden. Folgende Studien müssten weiterhin zeigen, dass das so verbesserte alpha-Viniferin zur Expressionssteigerung von ADAM10 im Gehirn führt. Anschließende Evaluierungen, ob die Reinsubstanz als mögliche therapeutische Option in Frage kommt, würde weiterführende präklinische Versuche, beispielsweise auch in Alzheimer-Modellmäusen erfordern.

Schließlich konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Projekt zur Entwicklung einer ADAM10-Promotor Reporter Maus vorangetrieben werden. Positiv mit Zielvektor transfizierte embryonale Stammzellklone wurden mittels PCR und Aktivitätsmessung der gebildeten Luziferase bestimmt. Zur initialen Implantation der vielversprechendsten Klone in Muttertiere wurden die Ergebnisse an das Helmholtz-Institut in München gemeldet.

Weiterführende Forschungen müssen sich vor allem mit der Genotypisierung von entstehendem Nachwuchs aus der initialen Implantation beschäftigen. Es steht weiterhin auch noch der Beleg aus, dass der eingebrachte Zielvektor auch tatsächlich zur homologen Rekombination an der gewünschten Stelle im Mausgenom geführt hat. Mit Hilfe eines *Southern Blots* könnte dieser Beleg erbracht werden. Weiterhin muss nachfolgend die Zucht der zu etablierenden Reporter Maus initialisiert werden. Hierfür stehen die Entfernung der Neomycin Resistenzkassette und die Rückkreuzung mit wildtypischen Mäusen aus, um ein tatsächliches Gründer-Tier für die neue Mauslinie zu generieren.

Durch die Erschaffung einer ADAM10 Promotor Reporter Maus könnte erstmals ein Tiermodell erschaffen werden, bei dem die Expression von ADAM10 *in vivo* in Echtzeit verfolgt werden könnte. Damit wäre ein Modell verfügbar, welches für die Forschung nach neuen Therapieoptionen zur ADAM10-Regulation unerlässlich werden würde.

5 Literaturverzeichnis

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37: 13-25.
- Albert JS. Progress in the development of beta-secretase inhibitors for Alzheimer's disease. *Prog Med Chem.* 2009; 48: 133-161.
- Allgaier M, Allgaier C. An update on drug treatment options of Alzheimer's disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014; 19: 1345-1354.
- Allinquant B, Hantraye P, Mailleux P, Moya K, Bouillot C, Prochiantz A. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol.* 1995; 128: 919-927.
- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 298-303.
- Alzheimer's Association. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association.* 2017; 13: 325-373.
- Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Centralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie.* 1907; 30: 177-179.
- Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res.* 2013; 36: 375-399.
- Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 2001; 15: 1837-1839.
- Anderson A, Gebauer K. Periorbital allergic contact dermatitis resulting from topical retinoic acid use. *Australas J Dermatol.* 2014; 55: 152-153.
- Annus T, Wilson LR, Acosta-Cabronero J, Cardenas-Blanco A, Hong YT, Fryer TD, Coles JP, Menon DK, Zaman SH, Holland AJ, Nestor PJ. The Down syndrome brain in the presence and absence of fibrillar beta-amyloidosis. *Neurobiol Aging.* 2017; 53: 11-19.
- Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.* 2004; 5: 725-738.
- Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.* 2005; 96: 412-418.
- Arking DE, Krebsova A, Macek M, Sr., Macek M, Jr., Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I, Dietz HC. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 856-861.
- Armstrong JL, Ruiz M, Boddy AV, Redfern CP, Pearson AD, Veal GJ. Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer.* 2005; 92: 696-704.
- Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 673-683.
- Augustin R, Endres K, Reinhardt S, Kuhn PH, Lichtenthaler SF, Hansen J, Wurst W, Trumbach D. Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the Alzheimer-related gene ADAM10. *BMC Med Genet.* 2012; 13: 35.
- Augustin Y, Krishna S, Kumar D, Pantziarka P. The wisdom of crowds and the repurposing of artesunate as an anticancer drug. *Ecancermedicalscience.* 2015; 9: ed50.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 2004; 84: 361-384.
- Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem.* 2009; 284: 32015-32027.
- Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International.* 2004; 21: 115-117.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011; 377: 1019-1031.

- Basi G, Frigon N, Barbour R, Doan T, Gordon G, McConlogue L, Sinha S, Zeller M. Antagonistic effects of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzymes 1 and 2 on beta-amyloid peptide production in cells. *J Biol Chem.* 2003; 278: 31512-31520.
- Bateman RJ, Siemers ER, Mawuenyega KG, Wen G, Browning KR, Sigurdson WC, Yarasheski KE, Friedrich SW, Demattos RB, May PC, Paul SM, Holtzman DM. A gamma-secretase inhibitor decreases amyloid-beta production in the central nervous system. *Ann Neurol.* 2009; 66: 48-54.
- Baumkötter F, Wagner K, Eggert S, Wild K, Kins S. Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Exp Brain Res.* 2012; 217: 389-395.
- Bayer TA, Paliga K, Weggen S, Wiestler OD, Beyreuther K, Multhaup G. Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1997; 94: 519-524.
- Behr D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem.* 1996; 271: 1613-1620.
- Bell KF, Zheng L, Fahrenholz F, Cuervo AC. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging.* 2008; 29: 554-565.
- Benjannet S, Elagöz A, Wickham L, Mamabachi M, Munzer JS, Basak A, Lazure C, Cromlish JA, Sisodia S, Checler F, Chretien M, Seidah NG. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem.* 2001; 276: 10879-10887.
- Bennett BD, Denis P, Hanu M, Teplow DB, Kahn S, Louis JC, Citron M, Vassar R. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 37712-37717.
- Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3363-3369.
- Bernstein HG, Bukowska A, Krell D, Bogerts B, Ansorge S, Lendekel U. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol.* 2003; 32: 153-160.
- Bien J, Jefferson T, Causevic M, Jumpertz T, Munter L, Multhaup G, Weggen S, Becker-Pauly C, Pietrzik CU. The metalloprotease meprin beta generates amino terminal-truncated amyloid beta peptide species. *J Biol Chem.* 2012; 287: 33304-33313.
- Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 654-659.
- Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry.* 1968; 114: 797-811.
- Boehm AM, Khalturin K, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Klostermeier UC, Lopez-Quintero JA, Oberg HH, Puchert M, Rosenstiel P, Wittlieb J, Bosch TC. FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal Hydra. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 19697-19702.
- Bond M, Rogers G, Peters J, Anderson R, Hoyle M, Miners A, Moxham T, Davis S, Thokala P, Wailoo A, Jeffreys M, Hyde C. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. *Health Technol Assess.* 2012; 16: 1-470.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 7162-7166.
- Bormann J. Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol.* 1989; 166: 591-592.
- Bowen RL, Atwood CS. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology.* 2004; 50: 265-290.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82: 239-259.
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol.* 1985; 17: 89-96.
- Brodsky H, Moore CM. The Clock Drawing Test for dementia of the Alzheimer's type: A comparison of three scoring methods in a memory disorders clinic. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1997; 12: 619-627.
- Buckner RL. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron.* 2004; 44: 195-208.

- Buizza L, Prandelli C, Bonini SA, Delbarba A, Cenini G, Lanni C, Buoso E, Racchi M, Govoni S, Memo M, Uberti D. Conformational altered p53 affects neuronal function: relevance for the response to toxic insult and growth-associated protein 43 expression. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e484.
- Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2017: Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland nach Geschlecht, Sterbetafel 1871/1881 bis 2012/2014. http://www.bib-demografie.de/DE/ZahlenundFakten/08/Abbildungen/a_08_23_lebenserwartung_geburt_d_geschlecht_ab1871.html?nn=3072818 (Zugriffsdatum: 10.04.2017)
- Butterweck V, Schmidt M. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 157: 356-361.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 1998; 273: 27765-27767.
- Cai J, Qi X, Kociok N, Skosyrski S, Emilio A, Ruan Q, Han S, Liu L, Chen Z, Bowes Rickman C, Golde T, Grant MB, Saftig P, Serneels L, de Strooper B, Jousen AM, Boulton ME. beta-Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. *EMBO Mol Med.* 2012; 4: 980-991.
- Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 2004; 131: 2173-2181.
- Cao X, Sudhof TC. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 24601-24611.
- Capell A, Steiner H, Willem M, Kaiser H, Meyer C, Walter J, Lammich S, Multhaup G, Haass C. Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 30849-30854.
- Carnes BA, Witten TM. How long must humans live? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014; 69: 965-970.
- Carri MT, Cozzolino M. SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *J Bioenerg Biomembr.* 2011; 43: 593-599.
- Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 50: 521-526.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 919-930.
- Chang WP, Koelsch G, Wong S, Downs D, Da H, Weerasena V, Gordon B, Devasamudram T, Bilcer G, Ghosh AK, Tang J. In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J Neurochem.* 2004; 89: 1409-1416.
- Chantry A, Gregson NA, Glynn P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 1989; 264: 21603-21607.
- Chavez-Gutierrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, Lismont S, Zhou L, Van Cleynenbreugel S, Esselmann H, Wiltfang J, Serneels L, Karran E, Gijzen H, Schymkowitz J, Rousseau F, Broersen K, De Strooper B. The mechanism of gamma-Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.* 2012; 31: 2261-2274.
- Chen HS, Lipton SA. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *J Physiol.* 1997; 499 (Pt 1): 27-46.
- Cheng C, Li W, Zhang Z, Yoshimura S, Hao Q, Zhang C, Wang Z. MicroRNA-144 is regulated by activator protein-1 (AP-1) and decreases expression of Alzheimer disease-related a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem.* 2013; 288: 13748-13761.
- Cheung F. TCM: Made in China. *Nature.* 2011; 480: S82-S83.
- Christensen MA, Zhou W, Qing H, Lehman A, Philipsen S, Song W. Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 865-874.
- Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 387-398.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 79-84.
- Clement AB, Hanstein R, Schroder A, Nagel H, Endres K, Fahrenholz F, Behl C. Effects of neuron-specific ADAM10 modulation in an in vivo model of acute excitotoxic stress. *Neuroscience.* 2008; 152: 459-468.

- Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, M. DL. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med*. 2002; 8: 67-74.
- Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, Zimmermann M, Caltagirone C, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004; 62: 498-501.
- Colombo A, Wang H, Kuhn PH, Page R, Kremmer E, Dempsey PJ, Crawford HC, Lichtenthaler SF. Constitutive alpha- and beta-secretase cleavages of the amyloid precursor protein are partially coupled in neurons, but not in frequently used cell lines. *Neurobiol Dis*. 2012; 49C: 137-147.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993; 261: 921-923.
- Coric V, van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW, Soininen H, Thein S, Shiovitz T, Pilcher G, Colby S, Rollin L, Dockens R, Pachai C, Portelius E, Andreasson U, Blennow K, Soares H, Albright C, Feldman HH, Berman RM. Safety and tolerability of the gamma-secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2012; 69: 1430-1440.
- Corrada MM, Brookmeyer R, Paganini-Hill A, Berlau D, Kawas CH. Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: the 90+ study. *Ann Neurol*. 2010; 67: 114-121.
- Corrigan F, Pham CL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, Cappai R. The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res*. 2011; 1378: 137-143.
- Costantini C, Ko MH, Jonas MC, Puglielli L. A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J*. 2007; 407: 383-395.
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*. 2000; 36: 175-184.
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB. Regressive events in neurogenesis. *Science*. 1984; 225: 1258-1265.
- Crain BJ, Hu W, Sze CI, Slunt HH, Koo EH, Price DL, Thinakaran G, Sisodia SS. Expression and distribution of amyloid precursor protein-like protein-2 in Alzheimer's disease and in normal brain. *Am J Pathol*. 1996; 149: 1087-1095.
- Cupello A, Favale E, Audenino D, Scarrone S, Gastaldi S, Albano C. Decrease of serotonin transporters in blood platelets after epileptic seizures. *Neurochem Res*. 2005; 30: 425-428.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. 2002; 277: 32046-32053.
- De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. 2000; 113 (Pt 11): 1857-1870.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999; 398: 518-522.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 1998; 391: 387-390.
- Decourt B, Walker A, Gonzales A, Malek-Ahmadi M, Liesback C, Davis KJ, Belden CM, Jacobson SA, Sabbagh MN. Can platelet BACE1 levels be used as a biomarker for Alzheimer's disease? Proof-of-concept study. *Platelets*. 2013; 24: 235-238.
- Deng M, He W, Tan Y, Han H, Hu X, Xia K, Zhang Z, Yan R. Increased expression of reticulon 3 in neurons leads to reduced axonal transport of beta site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Biol Chem*. 2013; 288: 30236-30245.
- Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol*. 2001; 82: 1013-1025.

- Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering C, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R, Semagacestat Study G. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013; 369: 341-350.
- Dreyer EB, Zhang D, Lipton SA. Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA-mediated cell death. *Neuroreport*. 1995; 6: 942-944.
- Dubal DB, Yokoyama JS, Zhu L, Broestl L, Worden K, Wang D, Sturm VE, Kim D, Klein E, Yu GQ, Ho K, Eilertson KE, Yu L, Kuro-o M, De Jager PL, Coppola G, Small GW, Bennett DA, Kramer JH, Abraham CR, Miller BL, Mucke L. Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep*. 2014; 7: 1065-1076.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*. 2003; 5: 486-488.
- Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol*. 2001; 18: 767-773.
- Efferth T, Li PC, Konkimalla VS, Kaina B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2007; 13: 353-361.
- Endres K, Deller T. Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In vitro and In vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10: 56.
- Endres K, Fahrenholz F. Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. *Exp Brain Res*. 2012; 217: 343-352.
- Endres K, Fahrenholz F, Lotz J, Hiemke C, Teipel S, Lieb K, Tuscher O, Fellgiebel A. Increased CSF APPs-alpha levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology*. 2014; 83: 1930-1935.
- Endres K, Postina R, Schroeder A, Mueller U, Fahrenholz F. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J*. 2005; 272: 5808-5820.
- Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH, Golde TE. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *J Clin Invest*. 2003; 112: 440-449.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 1990; 248: 1122-1124.
- Escrevente C, Morais VA, Keller S, Soares CM, Altevogt P, Costa J. Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1780: 905-913.
- Evert J, Lawler E, Bogan H, Perls T. Morbidity profiles of centenarians: survivors, delayers, and escapers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003; 58: 232-237.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997; 278: 1349-1356.
- Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H. BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 9712-9717.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Puig B, Ribera R, Rey MJ, Ribalta T. Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2001; 101: 49-56.
- Fischer FU, Wolf D, Scheurich A, Fellgiebel A. Association of structural global brain network properties with intelligence in normal aging. *PLoS One*. 2014; 9: e86258.
- Fluhrer R, Capell A, Westmeyer G, Willem M, Hartung B, Condron MM, Teplow DB, Haass C, Walter J. A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J Neurochem*. 2002; 81: 1011-1020.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975; 12: 189-198.
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*. 1999; 286: 1155-1158.
- Franklin TB, Saab BJ, Mansuy IM. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*. 2012; 75: 747-761.

- Freese C, Garratt AN, Fahrenholz F, Endres K. The effects of alpha-secretase ADAM10 on the proteolysis of neuregulin-1. *FEBS J.* 2009; 276: 1568-1580.
- Freese C, Reinhardt S, Hefner G, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Endres K. A novel blood-brain barrier co-culture system for drug targeting of Alzheimer's disease: establishment by using acitretin as a model drug. *PLoS One.* 2014; 9: e91003.
- Fu L, Liu N, Han Y, Xie C, Li Q, Wang E. ADAM10 regulates proliferation, invasion, and chemoresistance of bladder cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35: 9263-9268.
- Fu LM, Li JT. A systematic review of single chinese herbs for Alzheimer's disease treatment. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 640284.
- Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* 2002; 3: 688-694.
- Ghosh AK, Brindisi M, Tang J. Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2012; 120 Suppl 1: 71-83.
- Gilbert R, Widom CS, Browne K, Fergusson D, Webb E, Janson S. Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. *Lancet.* 2009; 373: 68-81.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 120: 885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991; 349: 704-706.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1989; 3: 519-526.
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience.* 1994; 61: 765-772.
- Goodman Y, Mattson MP. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol.* 1994; 128: 1-12.
- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH, Tarenfluril Phase 3 Study G. Effect of tarenfluril on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2009; 302: 2557-2564.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 4913-4917.
- Guo J, He L, Yuan P, Wang P, Lu Y, Tong F, Wang Y, Yin Y, Tian J, Sun J. ADAM10 overexpression in human non-small cell lung cancer correlates with cell migration and invasion through the activation of the Notch1 signaling pathway. *Oncol Rep.* 2012; 28: 1709-1718.
- Gupta SC, Sung B, Prasad S, Webb LJ, Aggarwal BB. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34: 508-517.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem.* 1993; 268: 3021-3024.
- Haass C, Steiner H. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol.* 2002; 12: 556-562.
- Hackman DA, Farah MJ, Meaney MJ. Socioeconomic status and the brain: mechanistic insights from human and animal research. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11: 651-659.
- Haniu M, Denis P, Young Y, Mendiaz EA, Fuller J, Hui JO, Bennett BD, Kahn S, Ross S, Burgess T, Katta V, Rogers G, Vassar R, Citron M. Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21099-21106.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297: 353-356.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; 256: 184-185.
- Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Toth B, Sasvari M, Konya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarandi M, Soos K, Penke B, Luiten PG. beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci.* 2000; 12: 2735-2745.

- Harker LA, Roskos LK, Marzec UM, Carter RA, Cherry JK, Sundell B, Cheung EN, Terry D, Sheridan W. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood*. 2000; 95: 2514-2522.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009; 460: 392-395.
- Hartmann D, de SB, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena IA, von FK, Saftig P. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 2002; 11: 2615-2624.
- Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*. 2000; 289: 1360-1365.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Muller U. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*. 2000; 20: 7951-7963.
- Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA, Albert MS, Pilgrim DM, Chown MJ, Funkenstein HH, Evans DA. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA*. 1995; 273: 1354-1359.
- Hebert SS, Serneels L, Tolia A, Craessaerts K, Derks C, Filippov MA, Muller U, De Strooper B. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep*. 2006; 7: 739-745.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Muller U. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J*. 2004; 23: 4106-4115.
- Herzog C, Haun RS, Ludwig A, Shah SV, Kaushal GP. ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *J Biol Chem*. 2014; 289: 13308-13322.
- Hey JA, Koelsch G, Bilcer G, Jacobs A, Tolar M, Tang J, Ghosh AK, Hsu HH. Single dose administration of the β -secretase inhibitor CTS21166 (ASP1720) reduces plasma A β 40 in human subjects. International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD); Chicago, IL 2008. 2008.
- Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschape JA, Borgers M, Mercken M, Roth FC, Draguhn A, Slomianka L, Wolfer DP, Korte M, Muller UC. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPsalpha in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol*. 2015; 129: 21-37.
- Holliday R. Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1067: 1-9.
- Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1577-1589.
- Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2002; 51: 783-786.
- Holthoewer D, Endres K, Schuck F, Hiemke C, Schmitt U, Fahrenholz F. Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener Dis*. 2012; 10: 224-228.
- Howard L, Lu X, Mitchell S, Griffiths S, Glynn P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J*. 1996; 317 (Pt 1): 45-50.
- Howes MJ, Houghton PJ. Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9: 67-85.
- Hsu HH. Clinical trials for disease-modifying drugs such as BACE inhibitors. In: John V, Hrsg. BACE: Lead Target for Orchestrated Therapy of Allheimer's Disease. John Wiley & Sons, 2010.
- Hu X, He W, Diaconu C, Tang X, Kidd GJ, Macklin WB, Trapp BD, Yan R. Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *FASEB J*. 2008; 22: 2970-2980.
- Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem*. 2000; 275: 33729-33737.

- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci*. 1999; 14: 419-427.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998; 393: 702-705.
- Hwang EM, Kim SK, Sohn JH, Lee JY, Kim Y, Kim YS, Mook-Jung I. Furin is an endogenous regulator of alpha-secretase associated APP processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349: 654-659.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med*. 2008; 12: 38-55.
- Ishida A, Furukawa K, Keller JN, Mattson MP. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*. 1997; 8: 2133-2137.
- Ishiguro K, Ihara Y, Uchida T, Imahori K. A novel tubulin-dependent protein kinase forming a paired helical filament epitope on tau. *J Biochem*. 1988; 104: 319-321.
- Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*. 1993; 325: 167-172.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994; 13: 45-53.
- Jack C, Berezovska O, Wolfe MS, Hyman BT. Effect of PS1 deficiency and an APP gamma-secretase inhibitor on Notch1 signaling in primary mammalian neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001; 87: 166-174.
- Jack CR, Jr., Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1998; 51: 993-999.
- Janeway C, Hrsg. Immunologie. Heidelberg ; Berlin: Spektrum, Akadem. Verl., 2002.
- Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79: 368-376.
- Jansen FH, Adoubi I, J CK, T DEC, Jansen N, Tschulakow A, Efferth T. First study of oral Arteminol-R in advanced cervical cancer: clinical benefit, tolerability and tumor markers. *Anticancer Res*. 2011; 31: 4417-4422.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 695: 144-148.
- Jefferson T, Auf dem KU, Bellac C, Metz VV, Broder C, Hedrich J, Ohler A, Maier W, Magdolen V, Sterchi E, Bond JS, Jayakumar A, Traupe H, Chalaris A, Rose-John S, Pietrzik CU, Postina R, Overall CM, Becker-Pauly C. The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 309-333.
- Jiang J, Jiang H. Efficacy and adverse effects of memantine treatment for Alzheimer's disease from randomized controlled trials. *Neurol Sci*. 2015; 36: 1633-1641.
- Johnson JA, Simpson SH, Toth EL, Majumdar SR. Reduced cardiovascular morbidity and mortality associated with metformin use in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2005; 22: 497-502.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhargale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jonsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012; 488: 96-99.
- Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessaerts K, Thathiah A, Tesseur I, Bartsch U, Weskamp G, Blobel CP, Glatzel M, de SB, Saftig P. The

- disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci.* 2010; 30: 4833-4844.
- Kaether C, Haass C. A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation. *J Cell Biol.* 2004; 167: 809-812.
- Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R. The Alzheimer's beta-secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 329-352.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 1987; 325: 733-736.
- Kang J, Muller-Hill B. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 166: 1192-1200.
- Karantzoulis S, Galvin JE. Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Rev Neurother.* 2011; 11: 1579-1591.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10: 698-712.
- Katzman R. Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer. *Arch Neurol.* 1976; 33: 217-218.
- Kawahara K, Nishi K, Suenobu M, Ohtsuka H, Maeda A, Nagatomo K, Kuniyasu A, Staufenbiel M, Nakagomi M, Shudo K, Nakayama H. Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain beta-amyloid peptides in APP23 mice. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 1307-1309.
- Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Discov Today.* 2012; 17: 1088-1102.
- Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem.* 1992; 59: 750-753.
- Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, Neve RL, Van Nostrand WE, Kleinman HK. beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 10150-10153.
- Kidd M. Alzheimer's Disease--an Electron Microscopical Study. *Brain.* 1964; 87: 307-320.
- Kirkman MS, Briscoe VJ, Clark N, Florez H, Haas LB, Halter JB, Huang ES, Korytkowski MT, Munshi MN, Odegard PS, Pratley RE, Swift CS. Diabetes in Older Adults. *Diabetes Care.* 2012; 35: 2650-2664.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature.* 1988; 331: 530-532.
- Kitanaka S, Ikezawa T, Yasukawa K, Yamanouchi S, Takido M, Sung HK, Kim IH. (+)-Alpha-viniferin, an anti-inflammatory compound from Caragana chamlagu root. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1990; 38: 432-435.
- Kitaoka K, Shimizu N, Ono K, Chikahisa S, Nakagomi M, Shudo K, Ishimura K, Sei H, Yoshizaki K. The retinoic acid receptor agonist Am80 increases hippocampal ADAM10 in aged SAMP8 mice. *Neuropharmacology.* 2013; 72: 58-65.
- Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, Pendlebury WW, Davis CS, Gracon SI. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *JAMA.* 1994; 271: 985-991.
- Ko MH, Puglielli L. Two endoplasmic reticulum (ER)/ER Golgi intermediate compartment-based lysine acetyltransferases post-translationally regulate BACE1 levels. *J Biol Chem.* 2009; 284: 2482-2492.
- Kobayashi D, Zeller M, Cole T, Buttini M, McConlogue L, Sinha S, Freedman S, Morris RG, Chen KS. BACE1 gene deletion: impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2008; 29: 861-873.
- Koelsch G. Beta-Secretase Inhibitor CTS-21166 Reduces Plasma Abeta40 in Human Subjects. Keystone Symposium on Alzheimer's Disease, Keystone, Colorado; March 24-28 2008. 2008.
- Kogel D, Deller T, Behl C. Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp Brain Res.* 2012; 217: 471-479.

- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J.* 1999; 343 Pt 2: 371-375.
- Koivisto K, Reinikainen KJ, Hanninen T, Vanhanen M, Helkala EL, Mykkanen L, Laakso M, Pyorala K, Riekkinen PJ, Sr. Prevalence of age-associated memory impairment in a randomly selected population from eastern Finland. *Neurology.* 1995; 45: 741-747.
- Korenberg JR, Pulst SM, Neve RL, West R. The Alzheimer amyloid precursor protein maps to human chromosome 21 bands q21.105-q21.05. *Genomics.* 1989; 5: 124-127.
- Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hubers M, Riederer P. Memantine displaces [3H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol.* 1989; 166: 589-590.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 4044-4048.
- Kowald A, Kirkwood TB. A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res.* 1996; 316: 209-236.
- Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed ME, Cowan M, Finlayson C, Kovacsevics H, Jansen H, Kreamsner PG, Efferth T, Kumar D. A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2015; 2: 82-90.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 2010; 29: 3020-3032.
- Kukull WA, Higdon R, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Schellenberg GD, van Belle G, Jolley L, Larson EB. Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch Neurol.* 2002; 59: 1737-1746.
- Kumar H, More SV, Han SD, Choi JY, Choi DK. Promising therapeutics with natural bioactive compounds for improving learning and memory--a review of randomized trials. *Molecules.* 2012; 17: 10503-10539.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997; 390: 45-51.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science.* 2005; 309: 1829-1833.
- Ladner CJ, Lee JM. Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: the cholinergic hypothesis revisited. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998; 57: 719-731.
- Lahiri DK. Molecular analysis of the promoter region of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein. *Indian J Biochem Biophys.* 1995; 32: 329-335.
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci.* 2005; 25: 11693-11709.
- Lammich S, Buell D, Zilow S, Ludwig AK, Nuscher B, Lichtenthaler SF, Prinzen C, Fahrenholz F, Haass C. Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region. *J Biol Chem.* 2010; 285: 15753-15760.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 3922-3927.
- Lammich S, Schobel S, Zimmer AK, Lichtenthaler SF, Haass C. Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep.* 2004; 5: 620-625.
- Lee G, Cowan N, Kirschner M. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science.* 1988; 239: 285-288.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006; 440: 352-357.

- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990; 248: 1124-1126.
- Li J, Wu HM, Zhou RL, Liu GJ, Dong BR. Huperzine A for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008: CD005592.
- Lichtenthaler SF, Haass C. Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1384-1387.
- Lieber T, Kidd S, Young MW. kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev*. 2002; 16: 209-221.
- Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 1456-1460.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. 2005; 22: 1942-1950.
- Lopez-Perez E, Zhang Y, Frank SJ, Creemers J, Seidah N, Checler F. Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem*. 2001; 76: 1532-1539.
- Lopez OL, Becker JT, Wisniewski S, Saxton J, Kaufer DI, DeKosky ST. Cholinesterase inhibitor treatment alters the natural history of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002; 72: 310-314.
- Ludewig S, Korte M. Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Front Mol Neurosci*. 2016; 9: 161.
- Lunn CA, Fan X, Dalie B, Miller K, Zavodny PJ, Narula SK, Lundell D. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett*. 1997; 400: 333-335.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*. 2001; 4: 231-232.
- Mann DM, Royston MC, Ravindra CR. Some morphometric observations on the brains of patients with Down's syndrome: their relationship to age and dementia. *J Neurol Sci*. 1990; 99: 153-164.
- Manzine PR, Barham EJ, Vale FA, Selistre-de-Araujo HS, Iost Pavarini SC, Cominetti MR. Correlation between mini-mental state examination and platelet ADAM10 expression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013a; 36: 253-260.
- Manzine PR, Barham EJ, Vale FA, Selistre-de-Araujo HS, Pavarini SC, Cominetti MR. Platelet a disintegrin and metallopeptidase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014; 29: 414-420.
- Manzine PR, de Franca Bram JM, Barham EJ, do Vale FA, Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Iost Pavarini SC. ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: a study with Brazilian elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2013b; 35: 58-66.
- Marcinkiewicz M, Seidah NG. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem*. 2000; 75: 2133-2143.
- Marques SM, Esteves da Silva JC. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*. 2009; 61: 6-17.
- Martin LJ. Mitochondrial pathobiology in ALS. *J Bioenerg Biomembr*. 2011; 43: 569-579.
- Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R, Bourenkov GP, Bartunik H, Ellestad GA, Reddy P, Wolfson MF, Rauch CT, Castner BJ, Davis R, Clarke HR, Petersen M, Fitzner JN, Cerretti DP, March CJ, Paxton RJ, Black RA, Bode W. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 3408-3412.
- Masoro EJ. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790: 1040-1048.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82: 4245-4249.

- McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, Games D, Johnson-Wood K, Lee M, Zeller M, Liu W, Motter R, Sinha S. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem*. 2007; 282: 26326-26334.
- McDonald CR, McEvoy LK, Gharapetian L, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, Jr., Holland D, Koyama A, Brewer JB, Dale AM. Regional rates of neocortical atrophy from normal aging to early Alzheimer disease. *Neurology*. 2009; 73: 457-465.
- Meineck M, Schuck F, Abdelfatah S, Efferth T, Endres K. Identification of Phlogacantholide C as a Novel ADAM10 Enhancer from Traditional Chinese Medicinal Plants. *Medicines*. 2016; 3: 30.
- Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, Garcia-Alcocer G. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. 2016; 2016: 17.
- Messing L, Decker JM, Joseph M, Mandelkow E, Mandelkow EM. Cascade of tau toxicity in inducible hippocampal brain slices and prevention by aggregation inhibitors. *Neurobiol Aging*. 2013; 34: 1343-1354.
- Michaelson DM. APOE epsilon4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014; 10: 861-868.
- Miller G. Is pharma running out of brainy ideas? *Science*. 2010; 329: 502-504.
- Millichip MI, Dallas DJ, Wu E, Dale S, McKie N. The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245: 594-598.
- Miura M. Apoptotic and non-apoptotic caspase functions in neural development. *Neurochem Res*. 2011; 36: 1253-1260.
- Moss ML, Bomar M, Liu Q, Sage H, Dempsey P, Lenhart PM, Gillispie PA, Stoeck A, Wildeboer D, Bartsch JW, Palmisano R, Zhou P. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem*. 2007; 282: 35712-35721.
- Mowrer KR, Wolfe MS. Promotion of BACE1 mRNA Alternative Splicing Reduces Amyloid β -Peptide Production. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 18694-18701.
- Munro CA. Sex differences in Alzheimer's disease risk: are we looking at the wrong hormones? *Int Psychogeriatr*. 2014; 26: 1579-1584.
- Naslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P, et al. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 8378-8382.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012; 75: 311-335.
- North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2012; 110: 1097-1108.
- Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem*. 1986; 99: 1541-1544.
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004; 41: 27-33.
- Ohsawa I, Takamura C, Kohsaka S. The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 236: 59-65.
- Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9: 1059-1096.
- Pan D, Rubin GM. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*. 1997; 90: 271-280.
- Park SW, Lee JG, Seo MK, Ly NN, Lee CH, Cho HY, Hein LT, Choi AJ, Kim GM, Kim YH. Epigenetic modification of glucocorticoid receptor promoter I7 in maternally separated and restraint-stressed rats. *Neurosci Lett*. 2017; 650: 38-44.
- Parkin E, Harris B. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-mediated ectodomain shedding of ADAM10. *J Neurochem*. 2009; 108: 1464-1479.

- Pastorino L, Ikin AF, Nairn AC, Pursnani A, Buxbaum JD. The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(beta). *Mol Cell Neurosci.* 2002; 19: 175-185.
- Portet F, Dauvilliers Y, Campion D, Raux G, Hauw JJ, Lyon-Caen O, Camu W, Touchon J. Very early onset AD with a de novo mutation in the presenilin 1 gene (Met 233 Leu). *Neurology.* 2003; 61: 1136-1137.
- 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. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1456-1464.
- Prinzen C, Muller U, Endres K, Fahrenholz F, Postina R. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 2005; 19: 1522-1524.
- Prinzen C, Trumbach D, Wurst W, Endres K, Postina R, Fahrenholz F. Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC Genomics.* 2009; 10: 66.
- Prox J, Bernreuther C, Altmeyen H, Grendel J, Glatzel M, D'Hooge R, Stroobants S, Ahmed T, Balschun D, Willem M, Lammich S, Isbrandt D, Schweizer M, Horre K, De Strooper B, Saftig P. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J Neurosci.* 2013; 33: 12915-12928, 12928a.
- Pruessmeyer J, Ludwig A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20: 164-174.
- Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J.* 2015; 471: 307-322.
- Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ. Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci.* 1995; 15: 2157-2167.
- Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res.* 2004; 50: 441-451.
- Rainesalo S, Keranen T, Saransaari P, Honkaniemi J. GABA and glutamate transporters are expressed in human platelets. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 141: 161-165.
- Raskind MA, Peskind ER, Wessel T, Yuan W. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology.* 2000; 54: 2261-2268.
- Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* 1998; 17: 4905-4908.
- Rees T, Hammond PI, Soreq H, Younkin S, Brimijoin S. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol Aging.* 2003; 24: 777-787.
- Reinhardt S, Schuck F, Grosen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R, Grimm M, Endres K. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2014; 28: 978-997.
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 2005; 24: 742-752.
- Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol Sci.* 2011; 124: 261-277.
- Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrup H, Wijsman J, Wright S, McConlogue L. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 1317-1324.
- Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology.* 1998; 50: 136-145.

- Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*. 1999; 274: 3531-3540.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 10836-10840.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science*. 1996; 273: 1227-1231.
- Rosenblum WI. Why Alzheimer trials fail: removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult. *Neurobiol Aging*. 2014; 35: 969-974.
- Rosendahl MS, Ko SC, Long DL, Brewer MT, Rosenzweig B, Hedl E, Anderson L, Pyle SM, Moreland J, Meyers MA, Kohno T, Lyons D, Lichenstein HS. Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem*. 1997; 272: 24588-24593.
- Rosler M, Anand R, Cicin-Sain A, Gauthier S, Agid Y, Dal-Bianco P, Stahelin HB, Hartman R, Gharabawi M. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ*. 1999; 318: 633-638.
- Roth KA, D'Sa C. Apoptosis and brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001; 7: 261-266.
- Rubinsztein DC, Carmichael J. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Med*. 2003; 5: 1-21.
- Russo E, Scicchitano F, Whalley BJ, Mazzitello C, Ciriaco M, Esposito S, Patane M, Upton R, Pugliese M, Chimirri S, Mammi M, Palleria C, De Sarro G. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. *Phytother Res*. 2014; 28: 643-655.
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol*. 2001; 153: 1403-1414.
- Saftig P, Lichtenthaler SF. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol*. 2015; 135: 1-20.
- Saftig P, Reiss K. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*. 2011; 90: 527-535.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*. 2004; 164: 769-779.
- Sakry D, Neitz A, Singh J, Frischknecht R, Marongiu D, Biname F, Perera SS, Endres K, Lutz B, Radyushkin K, Trotter J, Mittmann T. Oligodendrocyte precursor cells modulate the neuronal network by activity-dependent ectodomain cleavage of glial NG2. *PLoS Biol*. 2014; 12: e1001993.
- Salbaum JM, Weidemann A, Lemaire HG, Masters CL, Beyreuther K. The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *EMBO J*. 1988; 7: 2807-2813.
- Salloway S, Mintzer J, Weiner MF, Cummings JL. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2008; 4: 65-79.
- Sambamurti K, Kinsey R, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter. *FASEB J*. 2004; 18: 1034-1036.
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem*. 1994; 269: 1510-1517.
- Sandner P, Ziegelbauer K. Product-related research: how research can contribute to successful life-cycle management. *Drug Discov Today*. 2008; 13: 457-463.
- Sano F, Tsuji K, Kunika N, Takeuchi T, Oyama K, Hasegawa S, Koike M, Takahashi M, Ishida M. Pseudotumor cerebri in a patient with acute promyelocytic leukemia during treatment with all-trans retinoic acid. *Intern Med*. 1998; 37: 546-549.
- Sato C, Zhao G, Ilagan MX. An overview of notch signaling in adult tissue renewal and maintenance. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9: 227-240.

- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993; 43: 1467-1472.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994; 77: 491-502.
- Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F, Schroeder A. Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res*. 2006; 175: 278-284.
- Schneider LS, Dagerman KS, Higgins JP, McShane R. Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2011; 68: 991-998.
- Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang*. 2010; 99: 112-122.
- Schuck F, Schmitt U, Reinhardt S, Freese C, Lee IS, Thines E, Efferth T, Endres K. Extract of *Caragana sinica* as a potential therapeutic option for increasing alpha-secretase gene expression. *Phytomedicine*. 2015; 22: 1027-1036.
- Schuck F, Wolf D, Fellgiebel A, Endres K. Increase of alpha-Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging. *J Alzheimers Dis*. 2016; 50: 817-826.
- Selkoe D, Mandelkow E, Holtzman D. Deciphering Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a011460.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 7341-7345.
- Senechal Y, Kelly PH, Cryan JF, Natt F, Dev KK. Amyloid precursor protein knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J Neurochem*. 2007; 102: 1928-1940.
- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN, et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol*. 1994; 45: 373-379.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*. 1999; 402: 537-540.
- Six E, Ndiaye D, Laabi Y, Brou C, Gupta-Rossi N, Israel A, Logeat F. The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 7638-7643.
- Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J*. 2001; 357: 787-794.
- Sleigh S, Barton C. Repurposing Strategies for Therapeutics. *Pharmaceutical Medicine*. Springer International Publishing, 2010, 151-159.
- Smirnova L, Harris G, Leist M, Hartung T. Cellular resilience. *ALTEX*. 2015; 32: 247-260.
- Spasic D, Annaert W. Building gamma-secretase: the bits and pieces. *J Cell Sci*. 2008; 121: 413-420.
- Sternitzke C. Knowledge sources, patent protection, and commercialization of pharmaceutical innovations. *Research Policy*. 2010; 39: 810-821.
- Sternitzke C. Drug repurposing and the prior art patents of competitors. *Drug Discov Today*. 2014; 19: 1841-1847.
- Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*. 1995; 4: 823-840.
- Strittmatter SM. Overcoming Drug Development Bottlenecks With Repurposing: Old drugs learn new tricks. *Nat Med*. 2014; 20: 590-591.
- Struhl G, Greenwald I. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature*. 1999; 398: 522-525.

- Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH. Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science*. 2009; 324: 1327-1330.
- Sudhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*. 2008; 455: 903-911.
- Sung SH, Kang SY, Lee KY, Park MJ, Kim JH, Park JH, Kim YC, Kim J, Kim YC. (+)-Alpha-viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25: 125-127.
- Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron*. 2012; 76: 410-422.
- Suzuki T, Oishi M, Marshak DR, Czernik AJ, Nairn AC, Greengard P. Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J*. 1994; 13: 1114-1122.
- Takeuchi T, Nomura T, Tsujita M, Suzuki M, Fuse T, Mori H, Mishina M. Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293: 953-957.
- Tan CC, Yu JT, Wang HF, Tan MS, Meng XF, Wang C, Jiang T, Zhu XC, Tan L. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2014; 41: 615-631.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, Kimura J, Nakamura S, Ueda K. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 165: 1406-1414.
- Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2.
- Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005; 120: 545-555.
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*. 1988; 331: 528-530.
- Tarawneh R, Holtzman DM. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a006148.
- Tax FE, Thomas JH, Ferguson EL, Horvitz HR. Identification and characterization of genes that interact with lin-12 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1997; 147: 1675-1695.
- Terry RD. The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1963; 22: 629-642.
- Tharp WG, Sarkar IN. Origins of amyloid-beta. *BMC Genomics*. 2013; 14: 290.
- Thomas SJ, Grossberg GT. Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging*. 2009; 4: 367-377.
- Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C. Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. 2006; 1094: 38-46.
- Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J*. 2009; 23: 1643-1654.
- Tong G, Wang JS, Sverdllov O, Huang SP, Slemmon R, Croop R, Castaneda L, Gu H, Wong O, Li H, Berman RM, Smith C, Albright CF, Dockens RC. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, single-ascending dose study of the oral gamma-secretase inhibitor BMS-708163 (Avagacestat): tolerability profile, pharmacokinetic parameters, and pharmacodynamic markers. *Clin Ther*. 2012; 34: 654-667.
- Toussey T, Thathiah A, Jorissen E, Raemaekers T, Konietzko U, Reiss K, Maes E, Snellinx A, Serneels L, Nyabi O, Annaert W, Saftig P, Hartmann D, de SB. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem*. 2009; 284: 11738-11747.
- Tucker Zhou TB, King GD, Chen C, Abraham CR. Biochemical and functional characterization of the klotho-VS polymorphism implicated in aging and disease risk. *J Biol Chem*. 2013; 288: 36302-36311.
- Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med*. 2016; 18: 421-430.

- Vassar R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2014; 6: 89.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999; 286: 735-741.
- Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, Lichtenthaler SF. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J Neurochem.* 2014; 130: 4-28.
- Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 914273.
- Veitinger M, Varga B, Guterres SB, Zellner M. Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 65.
- von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging.* 1997; 18: 661-669.
- Vos SJ, Xiong C, Visser PJ, Jasielec MS, Hassenstab J, Grant EA, Cairns NJ, Morris JC, Holtzman DM, Fagan AM. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 957-965.
- Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007; 369: 218-228.
- Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, Zheng H. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci.* 2005; 25: 1219-1225.
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA.* 1994; 271: 992-998.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004; 7: 847-854.
- Weaver ICG, Korgan AC, Lee K, Wheeler RV, Hundert AS, Goguen D. Stress and the Emerging Roles of Chromatin Remodeling in Signal Integration and Stable Transmission of Reversible Phenotypes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2017; 11: 41.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 1989; 57: 115-126.
- Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol (1985).* 2003; 95: 1706-1716.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72: 1858-1862.
- Wen C, Metzstein MM, Greenwald I. SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development.* 1997; 124: 4759-4767.
- Werner EE. The children of Kauai: resiliency and recovery in adolescence and adulthood. *J Adolesc Health.* 1992; 13: 262-268.
- Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashiyama S, Manova K, Ludwig T, Blobel CP. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 1537-1544.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, De Strooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science.* 2006; 314: 664-666.
- Wisniewski HM, Ghetti B, Terry RD. Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged rhesus monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1973; 32: 566-584.
- Wolf D, Fischer FU, Fesenbeckh J, Yakushev I, Lelieveld IM, Scheurich A, Schermuly I, Zschutschke L, Fellgiebel A. Structural integrity of the corpus callosum predicts long-term transfer of fluid intelligence-related training gains in normal aging. *Hum Brain Mapp.* 2014; 35: 309-318.
- Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol.* 1995; 169: 378-383.

- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 4040-4043.
- World Health Organization, 2003: Fact sheet N°134. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/> (Zugriffsdatum: 9. April 2017)
- Yakushev I, Muller MJ, Buchholz HG, Lang U, Rossmann H, Hampel H, Schreckenberger M, Fellgiebel A. Stage-dependent agreement between cerebrospinal fluid proteins and FDG-PET findings in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9: 241-247.
- Yamazaki K, Mizui Y, Sagane K, Tanaka I. Assignment of a disintegrin and metalloproteinase domain 10 (Adam10) gene to mouse chromosome 9. *Genomics*. 1997a; 46: 528-529.
- Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I. Radiation hybrid mapping of human ADAM10 gene to chromosome 15. *Genomics*. 1997b; 45: 457-459.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrichson RL, Gurney ME. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*. 1999; 402: 533-537.
- Yan R, Vassar R. Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol*. 2014; 13: 319-329.
- Yang G, Wang Y, Tian J, Liu JP. Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One*. 2013; 8: e74916.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*. 1989; 245: 417-420.
- Yin M, van der Horst IC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Sillje HH, de Boer RA. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301: H459-468.
- Yokoyama JS, Sturm VE, Bonham LW, Klein E, Arfanakis K, Yu L, Coppola G, Kramer JH, Bennett DA, Miller BL, Dubal DB. Variation in longevity gene KLOTHO is associated with greater cortical volumes. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015; 2: 215-230.
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem*. 2003; 85: 180-192.
- Zeldich E, Chen CD, Colvin TA, Bove-Fenderson EA, Liang J, Tucker Zhou TB, Harris DA, Abraham CR. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. *J Biol Chem*. 2014; 289: 24700-24715.
- Zeng H, Huang P, Wang X, Wu J, Wu M, Huang J. Galangin-induced down-regulation of BACE1 by epigenetic mechanisms in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*. 2015; 294: 172-181.
- Zhang W, Liu S, Liu K, Wang Y, Ji B, Zhang X, Liu Y. A disintegrin and metalloprotease (ADAM)10 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and is associated with tumour progression. *J Int Med Res*. 2014; 42: 611-618.
- Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol*. 2002; 156: 519-529.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, Stevens KA, Slunt HH, Sisoda SS, Chen HY, Van der Ploeg LH. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 1995; 81: 525-531.

6 Liste der Veröffentlichungen und eigener Beitrag

Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt. Ergebnisse, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden zum großen Teil bereits in Fachjournalen veröffentlicht und mit weiteren, teilweise unveröffentlichten Daten in Kapitel 3 dargestellt und diskutiert.

Nachfolgend findet sich eine Liste mit den dieser Arbeit zugrunde liegenden Veröffentlichungen, der eigene wissenschaftliche Beitrag zu diesen Arbeiten wird dargelegt. Die Originalarbeiten selbst finden sich im Anhang in Kapitel 7.1 ab Seite 90.

6.1 Originalarbeiten

(I) Schuck F., Wolf D., Fellgiebel A., Endres K. (2016) Increase of α -secretase ADAM10 in platelets along cognitively healthy aging. *J Alzheimers Dis* 50, 817-826. doi: 10.3233/JAD-150737

Bei dieser Arbeit war ich an der Einbestellung und Terminierung der Studienteilnehmer und der Koordination der Blutentnahmen maßgeblich beteiligt. Weiterhin habe ich die Aufbereitung der für die Studie relevanten Blutproben und die Isolation der Thrombozyten übernommen. Die Durchführung aller Experimente mit Thrombozytenproben und deren Auswertung erfolgte ebenso durch mich. Außerdem habe ich das Manuskript verfasst und alle Abbildungen erstellt.

(II) Schuck F., Schmitt U., Reinhardt S., Freese C., Lee I.S., Thines E., Efferth T., Endres K. (2015) Extract of *Caragana sinica* as a potential therapeutic option for increasing alpha-secretase gene expression. *Phytomedicine* 22, 1027–1036. doi: 10.1016/j.phymed.2015.08.001

Für diese Veröffentlichung wurden alle zellbasierten Experimente von mir durchgeführt, zusätzlich die Versuche mit P-gp *knock-out* Mäusen. Die gesamte HPLC Analytik, außer der Fraktionierung, wurde von mir geplant und umgesetzt. Ich habe die Daten ausgewertet und die entsprechenden Abbildungen erstellt. Das Manuskript habe ich in Zusammenarbeit mit Kristina Endres verfasst.

(III) Meineck M., Schuck F., Abdelfatah S., Efferth T., Endres K. (2016) Identification of Phlogacantholide C as a novel ADAM10 enhancer from Traditional Chinese Medicinal plants. *Medicines* 3, 30. doi:10.3390/medicines3040030.

Die Projektplanung und -leitung dieser Arbeit habe ich zusammen mit Kristina Endres durchgeführt. Weiterhin habe ich die Betreuung der durchführenden Diplomandin übernommen und war an der Durchführung und Auswertung der Versuche beteiligt. Bei der Erstellung des Manuskripts habe ich durch Kommentierung mitgewirkt.

(IV) Reinhardt S., Schuck F., Grösgen S., Riemenschneider M., Hartmann T., Postina R., Grimm M., Endres K. (2014) Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 28 (2), 978-997. doi: 10.1096/fj.13-234864.

Bei dieser Veröffentlichung war ich an der Klonierung eines der verwendeten Vektoren beteiligt. Zusätzlich habe ich an der kritischen Diskussion der Ergebnisse für die Manuskripterstellung mitgewirkt.

(V) Holthoewer D., Endres K., Schuck F., Hiemke C., Schmitt U., Fahrenholz F. (2012) Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener Dis* 10 (1-4), 224-228. doi: 10.1159/000334300.

Zu dieser Veröffentlichung habe ich durch Unterstützung bei Promotoranalysen beigetragen. Zusätzlich habe ich bei der Erstellung des Manuskripts sprachliche Verbesserungsvorschläge eingebracht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Studie unterstützt, die jedoch thematisch nicht in den unmittelbaren Kontext der vorliegenden Dissertation gebracht wurde:

(VI) Brandscheid C., Schuck F., Reinhardt S., Schäfer K.-H., Pietrzik C. U., Grimm M., Hartmann T., Schwiertz A., Endres K. (2016) Altered gut microbiome composition and tryptic activity oft he 5xFAD Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis* 56, 775-788. doi: 10.3233/JAD-160926.

Für diese Arbeit habe ich den initialen Aufbau und die Durchführung des Tierversuchs mitbetreut und die Erhebung der Vitalitätsparameter, sowie die Sammlung der Proben

übernommen. Weiterhin war ich an der Durchführung und Auswertung der Verhaltensversuche beteiligt. An der Manuskripterstellung habe ich durch Kommentierung mitgewirkt.

6.2 Posterbeiträge

Schuck F., Schmitt U., Reinhardt S., Freese C., Lee I.-S., Thines E., Efferth T., Endres K. (2015) Korean Medicinal Plant Extracts exhibit potential therapeutic value as alpha-secretase enhancers. *12th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, Nizza.*

Schuck F., Reinhardt S., Fellgiebel A., Endres K. (2014) alpha-Secretase ADAM10 is increased in platelets during cognitively healthy aging. *3rd Biennial Meeting of the Rhine Main Neuroscience Network rmn², Oberwesel.*

Duckro K., Schuck F., Reinhardt S., Endres K. (2013) Development of an ex vivo Alzheimer's Disease Cell Model. *12th Annual FTN/IAK Symposium in Molecular and Cellular Neuroscience, Mainz.*

Schuck F., Reinhardt S., Freese C., Schmitt U., Efferth T., Endres K. (2013) Evaluation of Korean Plant Extracts for their Potential in Alzheimer's Disease Therapy. *12th Annual FTN/IAK Symposium in Molecular and Cellular Neuroscience, Mainz.*

Roth C., Schuck F., Löffler S., Schmitt U., Efferth T., Endres K. (2013) Korean Medical Plants - A Novel Source for Alzheimer's Disease Therapy? *11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, Florenz.*

Reinhardt S., Schuck F., Grösgen S., Riemenschneider M., Grimm M., Postina R., Hartmann T., Endres K. (2013) Unfolded protein response signalling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is impaired in Alzheimer's disease. *11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, Florenz.*

Löffler S., Reinhardt S., Schuck F., Endres K. (2012) A dual mdrla/b promoter assay as a novel tool for identification of gene expression inducers. *Transporter und Barriere Tage, Bad Herrenalb.*

Schuck F., Reinhardt S., Efferth T., Endres K. (2011) Evaluation of Korean Medical Plant Extracts for their Potential in Alzheimer's Disease Therapy. *11th annual FTN/IAK symposium – Molecular and Cellular Neuroscience, Mainz.*

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen

Schuck F, Wolf D, Fellgiebel A, Endres K. Increase of alpha-Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging. *J Alzheimers Dis.* 2016; 50: 817-826.

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von iOS Press

Schuck F, Schmitt U, Reinhardt S, Freese C, Lee IS, Thines E, Efferth T, Endres K. Extract of *Caragana sinica* as a potential therapeutic option for increasing alpha-secretase gene expression. *Phytomedicine.* 2015; 22: 1027-1036.

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Elsevier

Meineck M, Schuck F, Abdelfatah S, Efferth T, Endres K. Identification of Phlogacantholide C as a Novel ADAM10 Enhancer from Traditional Chinese Medicinal Plants. *Medicines.* 2016; 3: 30.

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der MDPI AG

Reinhardt S, Schuck F, Grosgen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R, Grimm M, Endres K. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2014; 28: 978-997.

*Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Federation of American Societies for Experimental Biology;
HighWire Press*

Holthoewer D, Endres K, Schuck F, Hiemke C, Schmitt U, Fahrenholz F. Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener Dis.* 2012; 10: 224-228.

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der S. Karger AG

Increase of α -Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging

Florian Schuck, Dominik Wolf, Andreas Fellgiebel and Kristina Endres*

Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

Handling Associate Editor: Marcia Cominetti

Accepted 5 November 2015

Abstract. ADAM10 is one of the key players in ectodomain-shedding of the amyloid- β protein precursor (A β PP). Previous research with postmortem tissue has shown reduced expression and activity of ADAM10 within the central nervous system (CNS) of Alzheimer's disease (AD) patients. Determination of cerebral ADAM10 in living humans is hampered by its transmembrane property; only the physiological A β PP cleavage product generated by ADAM10, sA β PP α , can be assessed in cerebrospinal fluid. Establishment of surrogate markers in easily accessible material therefore is crucial. It has been demonstrated that ADAM10 is expressed in platelets and that platelet amount is decreased in AD patients. Just recently it has been shown that platelet ADAM10 and cognitive performance of AD patients positively correlate. In contrast to AD patients, to our knowledge almost no information has been published regarding ADAM10 expression during normal aging. We investigated ADAM10 amount and activity in platelets of cognitively healthy individuals from three different age groups ranging from 22–85 years. Interestingly, we observed an age-dependent increase in ADAM10 levels and activity in platelets.

Keywords: ADAM10, fluorescence activity, normal aging, platelets, resilience factor

INTRODUCTION

ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) is well associated with a potential protective function in regard to Alzheimer's disease (AD) (reviewed in [1]). Data from *in vitro* analyses [2] as well as from animal experiments [3–5] depicted this zinc metalloproteinase as the major α -secretase in neuronal cells, capable of preventing the formation of toxic amyloid- β (A β) peptides. By generating neurotrophic soluble amyloid- β protein precursor α (sA β PP α) through cleavage within the A β stretch, the α -secretase initiates the non-amyloidogenic pathway in contrast to β -secretase-dependent amyloidogenic processing of A β PP. Recent studies have also proposed a potential direct involvement of ADAM10 allelic variations

in AD progression: mutations close by the proprotein convertase cleavage site of the enzyme found in individuals with late-onset AD (LOAD) were reported to attenuate ADAM10 function in cell culture [6]. This was confirmed in transgenic mouse models, showing that these mutations shift A β PP processing to the amyloidogenic pathway [7]. These findings are in accordance with the majority of postmortem data that reflect an overall decrease of ADAM10 mRNA, protein, and/or activity in central nervous tissue in AD patients compared to age-matched controls (reviewed in [8]). In addition, a reduction of ADAM10 in peripheral tissue such as platelets has been demonstrated [9] and the enzyme therefore has been discussed as a potential biomarker [10].

Although markers in CSF such as A β and tau species can be used for an accurate diagnosis today [11, 12], the necessary invasive lumbar puncture limits their use in routine checks. A more peripheral substitute is needed in order to not only advance the diagnostic toolset for AD but also to be able to diagnose more individuals

*Correspondence to: Dr. Kristina Endres, Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Untere Zahlbacher Straße 8, 55131 Mainz, Germany. Tel.: +49 6131 17 2133; Fax: +49 6131 17 6690; E-mail: kristina.endres@unimedizin-mainz.de.

effectively at earlier stages of the disease and hopefully before clinical onset. As research claims that curative strategies will be more effective the earlier they can be started [13–15], diagnosing AD in its early stages could turn the tides in combatting its fatal neurodegeneration. Platelets prepared from human blood samples seem to represent a reliable source for a diversity of potential biomarkers related to AD (as reviewed in [16]) and just recently it has been shown that the amount of ADAM10 in platelets also correlates with cognitive performance of patients as measured by, e.g., clock drawing test [17] or Mini-Mental State Examination scores [18]. However, to our knowledge, ADAM10 amount in platelets has not yet been investigated during the process of normal, cognitively healthy aging. In the present study, we analyzed protein levels of ADAM10 as well as its catalytic capacity in a cohort of cognitively normal volunteers belonging to three groups of age (mean age of 25, 65, and 80 years) to unravel the fate of the α -secretase in platelets throughout normal aging.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Samples of 36 cognitively healthy subjects were analyzed (for cohort characteristics, see Table 1). Subjects were recruited through advertisement in a local newspaper, as well as notices in medical practices and public institutions. The study was conducted at the Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center of Mainz, Germany. It had been approved by the local Ethics Committee of the Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (state medical association of Rhineland-Palatinate) and all subjects gave written informed consent. Participants underwent a preceding psychiatric screening interview (DIA-SSQ) in combination with International Diagnosis Checklists (IDCL) as described before [19, 20]. Exclusion criteria were any psychiatric, neurologic, or

cognitive disease observed prior to the study or intake of medication known to influence cognitive performance. *APOE* genotyping was performed as described before [21]. Consenting to genotyping was no criterion for inclusion into the study, therefore not all participants were genotyped.

Blood sampling and preparation of blood components

For platelet preparation, following a protocol by [9], blood was collected in the morning by puncture of a peripheral arm vein into a 4.3 ml citrate monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The tube was gently inverted to mix blood with anticoagulant and subsequently further processed (at the latest within 25 min of blood collection, handling occurred at room temperature (RT) at all times). To obtain platelet-rich plasma, tubes were centrifuged at $200 \times g$ at RT for 10 min and the upper layer was aspirated using a plastic pipette with large opening, carefully avoiding the buffy coat, and transferred into a new tube. Platelets were prepared by centrifugation for 20 min at $1200 \times g$, RT. The pellet was washed twice in buffer A (sterile 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4) followed by centrifugation at $1200 \times g$, RT for 10 min. Following the last washing step, platelets were pelleted at $3000 \times g$, 4°C for 15 min and then thoroughly suspended in buffer B (buffer A supplemented with a complete set of protease inhibitors (Complete Mini, Roche, Mannheim, Germany), 1 mM EGTA and 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride). Suspensions were stored at -80°C . When all samples were collected, platelet suspensions were thawed on ice and, to achieve homogenization, subjected to three rounds of freezing in liquid nitrogen and subsequent thawing at room temperature before sonication at 0°C for 15 s. An aliquot was used for protein determination by Bradford assay (Rotiquant, Carl Roth, Karlsruhe, Germany).

For preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), blood was collected by venipuncture into evacuated collection tubes (BD Vacutainer CPT, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) containing sodium citrate as anticoagulant. A total volume of 8 ml blood per vial was collected, mixed gently and thoroughly immediately and PBMCs were prepared according to the manufacturer's instructions. An additional washing step was included using ice-cold red blood cell lysis solution (1.5M NH_4Cl , 100 mM NaHCO_3 , 1 mM EDTA tetrasodium salt, pH 7.4). Finally, the PBMC pellet was resuspended in culture medium (RPMI-1640 (Sigma Aldrich,

Table 1
Demographic data of study participants

	Group 1	Group 2	Group 3
N	12	10	14
Age	25.4 ± 4.3	65.4 ± 3.4	80.0 ± 3.8
Range	22–37	60–69	75–85
Gender			
Male	50%	50%	21%
Female	50%	50%	79%
<i>APOE</i> $\epsilon 4$ status*			
carrier/non-carrier	7 / 5	1 / 6	3 / 7

*: Not all participants were genotyped.

Steinheim, Germany), 5% heat inactivated FCS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1% Penicillin Streptomycin, 1% Glutamine (Sigma Aldrich)). Protein determination of an aliquot of PBMCs was performed by Bradford assay as stated above.

Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (ATCC: CRL-2266) was cultivated and harvested as described before (e.g., [22]).

Western blotting

For western blot experiments, 10 µg of protein dissolved in NuPAGE buffer (Life Technologies) containing 0.1 M DTT (Carl Roth) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 8% polyacrylamide gels and further transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) by electro-blotting using a tank blot system (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA). After blocking the membranes in blocking solution, following primary antibodies were applied overnight at 4°C: ADAM10 rabbit polyclonal antibody (used in a dilution of 1:1000, Merck, Darmstadt, Germany), integrin beta 3 (CD61) rabbit monoclonal antibody (1:1000, Epitomics, Burlingame, CA, USA), AβPP N-terminal mouse monoclonal antibody (6E10, 1:1000; Covance, Madison, WI, USA), ADAM17 rabbit polyclonal antibody (1:500, Chemicon, Merck), BACE rabbit monoclonal antibody (1:1000, D10E5, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Blots were developed after incubation with goat anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with SuperSignal West Femto ECL-reagent (Thermo Scientific). An appropriate picture was taken with a CCD-camera imaging system (Stella camera; Raytest, Straubenhardt, Germany) and quantitative analysis was carried out by AIDA image analyzer 4.26 software (Raytest). To achieve normalization and for comparing age groups, the mean values (ADAM10/CD61) of the youngest age-group on each blot were set to 1.0 and all samples were expressed in relation to that mean.

Fluorescence assay

40 µg of platelet protein were mixed with 10 µM fluorogenic peptide (sequence derived from TNFα: Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH₂, Cat. No. ES003, R&D Systems, Wiesbaden, Germany) in reaction buffer (final concentrations: 25 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 2.5 µM ZnCl₂) to yield a total volume of 100 µl per well in a black 96-well plate (Greiner Bio-One,

Frickenhausen, Germany). Increase in fluorescence intensity was determined with a microplate reader (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 320 nm excitation and 405 nm emission wavelength every 2 min for 160 min keeping the plate at 37°C during the measurement. A shaking step before each cycle of measurement was included to provide for a homogenous mixture of components. For comparative analysis, values obtained 30 min after initiation of the reaction were used, subtracted by a blank (buffer without protein). Analyses with recombinant ADAM10 protein (Merck, Schwalbach, Germany) were performed accordingly. To check for specificity of the obtained signal, platelet pool samples or recombinant ADAM10 were analyzed with and without the addition of 10 µM GM6001 (Merck) to the reaction and a pre-incubation of 5 min at 37°C in the dark before adding the fluorogenic peptide.

Statistical analysis

Results of group analyses were tested for statistical significance with Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test for multiple comparisons or by unpaired Student's *t* test for comparing two groups, as appropriate. For correlation analyses SPSS 22 (IBM, Ehningen, Germany) was used employing Pearson's test and partial correlation between ADAM10 and age was calculated using intelligence measures (HAWIE-R and LPS4) as covariates. Values of *p* < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Platelets as a tool for investigating AβPP processing

To demonstrate the value of platelets extracted from human blood for their application in AD research, we performed a western blot analysis to compare the commonly used human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (ATCC: CRL-2266), PBMCs, and platelets. For this analysis, PBMCs and platelets were prepared from blood of the same healthy volunteer to minimize individual differences in protein expression patterns. We were able to show that proteins associated with AβPP processing are favorably expressed in platelets (Fig. 1A). When analyzing ADAM10, we observed a prominent band of about 70 kDa in platelets (188% mean intensity in healthy donor samples as compared

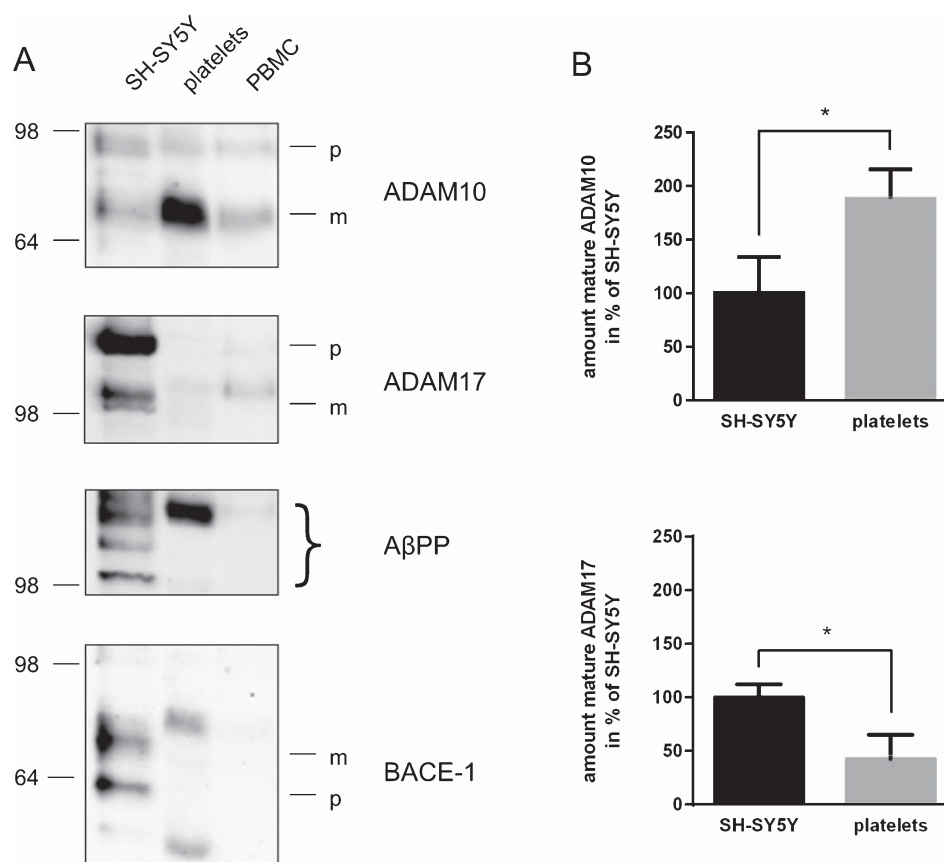


Fig. 1. Expression of AD-relevant proteins in a human cell line and blood cells. A) A total of 10 μ g protein each was analyzed by western blot for human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, human-derived platelets and PBMC to detect AD-relevant proteins ADAM10, ADAM17, A β PP, and BACE-1. p: pro-form; m: mature form. B) Quantification of mature ADAM10 (top) and mature ADAM17 (bottom) was performed representatively for aged individuals (66 ± 4 a, $n=4$) by western blot. Values were expressed in relation to signals obtained for neuroblastoma cell line SH-SY5Y ($n=2$). * $p < 0.05$, two-tailed Student's t -test.

to SH-SY5Y cells, Fig. 1B), representing the mature form of the protein, whereas a second band below 98 kDa, representing the enzyme's pro-form, was considerably fainter. Both bands are visible in SH-SY5Y cells and PBMCs in comparable intensities. When looking at expression of ADAM17 (TACE), the amount of this alternative α -secretase [23] is considerably lower in platelets (43% as compared to SH-SY5Y cells, Fig. 1B), showing only a very faint band around 100 kDa, representing the mature protein, whereas in SH-SY5Y cells and in PBMCs both the 100 kDa band and a band around 120 kDa (pro-form of ADAM17), were detected. When visualizing A β PP with antibody 6E10, only one band was detected in platelets at around 120 kDa. This band was only faintly detected in PBMCs, whereas it was clearly visible in SH-SY5Y cells. The latter also showed a band at around 110 kDa which was not detectable in our platelet and PBMC samples. Together, these bands represent the different isoforms

of the protein (A β PP695, 770, and 751) and respective maturation products. In SH-SY5Y cells, also an additional band at around 100 kDa was visible, which has been described before as an immature form of the protein [24]. Finally, the antibody used for detecting β -secretase BACE-1 produced bands both in the human cell line and in platelets, while only marginal amounts were detectable in PBMCs. In SH-SY5Y cells, bands at about 60 kDa and 75 kDa are visible, corresponding to the immature and mature form of the enzyme, respectively [25]. In platelets, we detected bands at around 55 kDa and 70 kDa. Both forms have been described in literature before [26, 27], pointing out that detection of BACE-1 is not trivial and dependent on the antibody used. In PBMCs, only the 70 kDa band was barely visible.

Taken together, this analysis demonstrates that for studying ADAM10 and its processing of A β PP in peripheral human-derived material, platelets represent

a valid model. Furthermore, due to the overrepresentation of ADAM10 in platelets in contrast to ADAM17, also shown by quantification of a representative set of platelet samples (protein levels normalized to SH-SY5Y cells, Fig. 1B), analysis of ADAM10 as the α -secretase might even give a more precise result in regard to its functional readouts than in secondary neuronal cell culture.

Amount and enzymatic activity of ADAM10 in cognitively normal subjects during aging

When analyzing the amount of ADAM10 in platelets of cognitively healthy subjects by western blot we used platelet-specific CD61 (integrin beta-3) as a normalization factor (Fig. 2A). Stability of CD61 expression along aging was confirmed by western blot and statistical analysis ($p=0.656$ between youngest and middle and $p=0.902$ between youngest and oldest age group). Moreover, CD61 correlated well with amounts of β -actin in samples ($p=0.017$, western blots not shown), corroborating its use as an age-independent house-keeping protein for platelet samples. After normalization to CD61, a significant 1.2-fold elevation of ADAM10 was detected between the youngest (arbitrarily set to 1 for comparison reasons) and the oldest group ($p=0.003$), indicating an increase in platelet ADAM10 expression during the course of cognitively healthy aging (Fig. 2B). Direct correlation of ADAM10 protein amount to the age of the respective subject gave a positive correlation coefficient of $r=0.376$ ($p=0.024$, Pearson, data not shown).

It is noteworthy that the analyzed cohort was highly intelligent, a fact that could confound interpretation of obtained results for a general population. However, when using general intelligence (as determined by HAWIE-R) or fluid intelligence (as determined by LPS 4 test [20]) as control variables, we still observed a significant positive correlation between platelet ADAM10 and age ($p=0.036$ and $p=0.031$ for HAWIE-R and LPS 4 as covariates, respectively).

To check if larger amounts of ADAM10 are also accompanied by higher levels of enzymatic activity, we employed an α -secretase activity assay using an artificial pro-fluorescent peptide. Linearity of TNF α -derived peptide cleavage by ADAM10 was demonstrated by using increasing amounts of recombinant ADAM10 (fluorescence determined after 30 min, Fig. 3A). In this test, fluorescence development could also be completely quenched by applying the metalloproteinase inhibitor GM6001 showing specificity of ADAM10 cleavage. Subsequently, we used a pooled

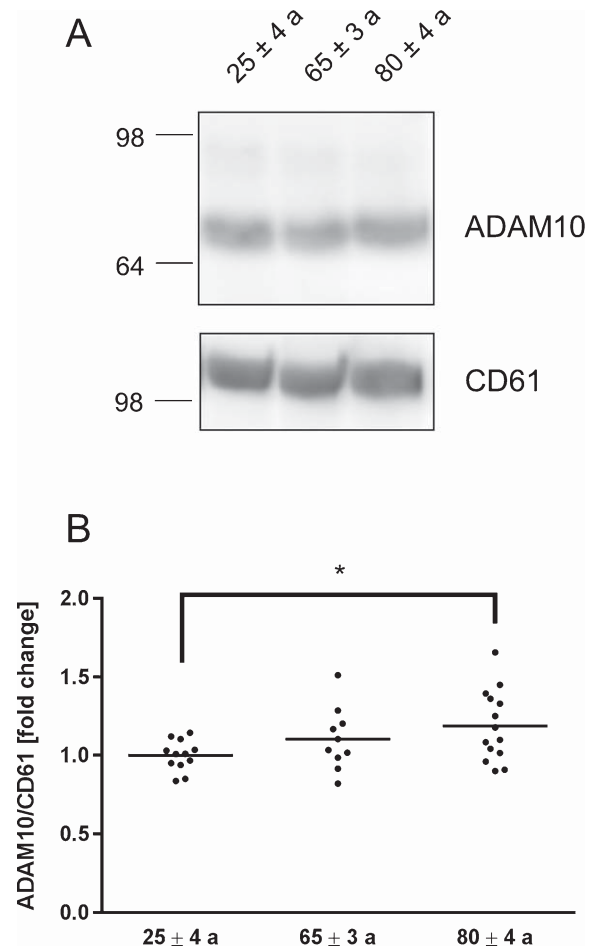


Fig. 2. ADAM10 amount in platelets during cognitively normal aging. A) To detect platelet ADAM10 in healthy subjects, 10 μ g of platelet membrane protein were analyzed by western blot. For normalization, platelet marker CD61 (integrin beta-3) was analyzed as a housekeeping and quality control protein. Shown are exemplary bands obtained from individuals from the three age groups. B) After normalization to CD61, ADAM10 expression in platelets from different age groups was analyzed. To compare different sets of western blots, the youngest age-group (25 ± 4 a) was set to 1 and data are therefore expressed as fold changes. * $p < 0.05$, one-way ANOVA, Fisher's LSD test.

platelet sample to measure fluorescence after 30 min of incubation with the pro-fluorescent peptide, where we also saw a significant higher value than when we pre-treated the pool sample with GM6001 (Fig. 3B, $p < 0.001$), proving that ADAM10 activity is detectable and also relevant in platelets. The reduction in fluorescence detected after 5 min pre-treatment with GM6001 to only 37% of the control activity might be explained by unspecific cleavage of the pro-fluorescent peptide by other proteases present on a cellular membrane background, lacking in experiments with recombinant

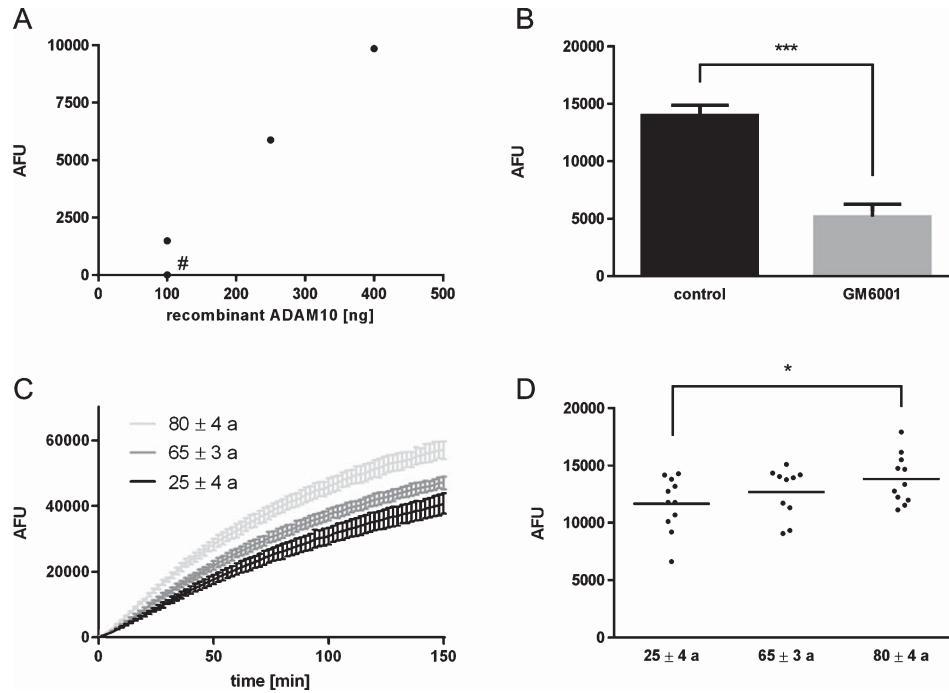


Fig. 3. Activity of platelet ADAM10 along normal aging as determined by fluorescence assay. A) To check for ADAM10-dependency of the fluorescence assay, different amounts of recombinant ADAM10 were incubated with 10 μ M fluorogenic peptide (TNF α -derived sequence: Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH $_2$) in reaction buffer at 37°C. Fluorescence intensity after 30 min was measured at 320 nm excitation and 405 nm emission wavelength. Metalloproteinase inhibitor GM6001 was used to assess specificity of the assay with 100 ng recombinant protein (hash). B) To determine specificity of measurements, a pool sample from different platelet donors was incubated with fluorogenic peptide as above with or without the addition of metalloproteinase inhibitor GM6001. C) Activity of ADAM10 in platelets was assessed by using 40 μ g of platelet membrane protein in the fluorescence assay as described above. Exemplary kinetics obtained from individuals of the three age groups are shown, measured each in technical replicates. D) To compare individuals and age groups, fluorescence intensity obtained after 30 min of incubation subtracted by a blank value (from incubation of fluorogenic peptide without platelet protein) was used. Due to restrictions in the amount of platelet protein, only samples of 32 donors were used. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA, Fisher's LSD test or two-tailed Student's t -test.

ADAM10. Therefore, measured fluorescence might not completely be a product of ADAM10-driven cleavage. However, major contribution of ADAM17-based cleavage is not predominant due to relatively much lower amounts of this alternative α -secretase observed in platelets (Fig. 1B).

To test ADAM10 activity in the platelet samples of the study cohort, we incubated them with pro-fluorescent peptide and measured fluorescence generation over time (Fig. 3C, exemplary measurements). For comparison between groups, we used the fluorescence measured after 30 min of incubation with pro-fluorescent peptide, where we saw a significant 1.2-fold increase in fluorescence from the youngest to the oldest group (Fig. 3D, $p = 0.032$), comparable to the elevation in ADAM10 amount observed in western blot experiments. However, a weak positive correlation between amount and activity of ADAM10 was only found when analyzing values obtained for the oldest group (Pearson $r = 0.138$). Therefore, further studies

have to reveal if the observed increase in activity along healthy aging is solely dependent on an increase in ADAM10 protein amount or if other factors might contribute to this finding.

Correlation of platelet ADAM10 with gender and APOE genotype

According to epidemiological studies, females have a higher prevalence of developing AD [28, 29]. Therefore, we were interested in the association of platelet ADAM10 with gender within the tested age groups. A direct comparison within each age-group gave a slight trend to lower platelet ADAM10 in females than in males (Fig. 4A), although sample sizes were arguably small. When analyzing the complete cohort, no statistical difference was detected between genders (Fig. 4B, $p = 0.809$).

It has previously been shown that low cholesterol can promote the non-amyloidogenic pathway [30, 31]

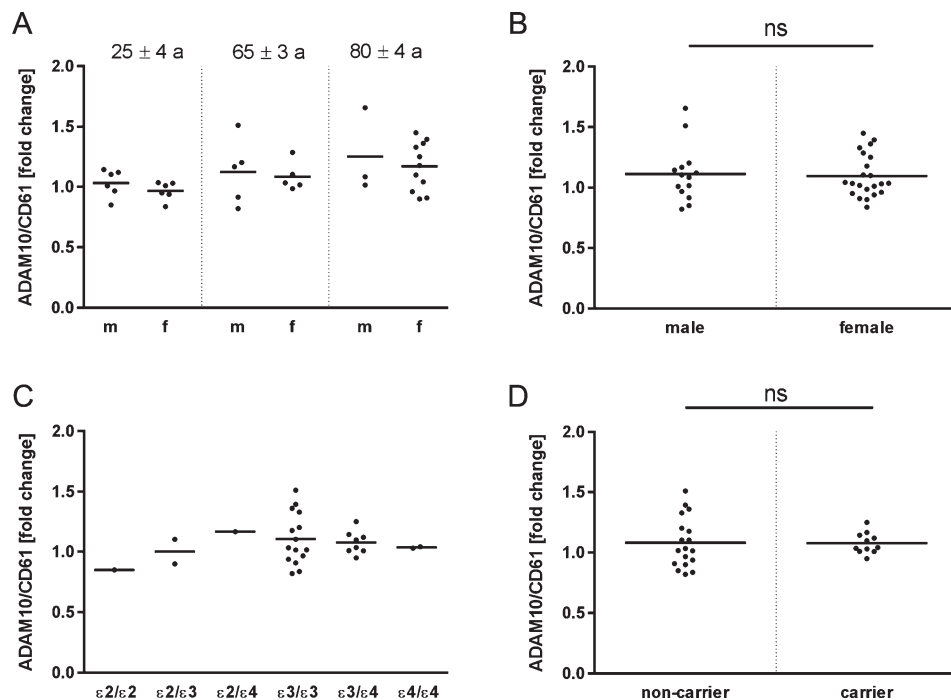


Fig. 4. Correlation of platelet ADAM10 to gender and *APOE* genotype. A) Age groups were each stratified for gender (m: male, f: female) and platelet ADAM10 was analyzed. Fold changes originate from normalization in western blot experiments (see Fig. 2). B) Stratification for gender was performed for the complete cohort and ADAM10 was analyzed accordingly. C) Platelet ADAM10 was analyzed following a separation of the study cohort into different possible *APOE* genotypes. Amount of samples was lower due to only 29 participants being genotyped. D) Analysis concerning *APOE* genotype was performed splitting study participants into carrier and non-carrier of the risk allele *APOE* $\epsilon 4$. ns: $p > 0.05$, two-sided Student's *t*-test.

and furthermore that cholesterol binding in neurons is influenced by *APOE* genotype [32]. As the *APOE* genotype $\epsilon 4$ also resembles a major risk factor for developing sporadic AD [33, 34], we analyzed our data on platelet amount of ADAM10 in this regard. When splitting the cohort into each of the possible allele combinations, no statement on the influence of *APOE* makeup can be incurred (Fig. 4C). Since not all participants gave their consent for genotyping, sample sizes were smaller than for other analyses. Furthermore, single allele combinations (e.g., $\epsilon 2/\epsilon 2$) were greatly underrepresented in comparison to other combinations (e.g., $\epsilon 3/\epsilon 3$), which is in accordance with global allele distribution in populations [35, 36]. However, a comparison between subjects carrying at least one $\epsilon 4$ allele and those who have none (carrier and non-carrier) also gave no significant influence of carrier status on platelet ADAM10 amount (Fig. 4D, $p = 0.959$).

DISCUSSION

The search for biomarkers in neurodegenerative diseases such as AD is of utmost importance in order to

clearly define and diagnose onset of disease. Platelets came into focus lately as a valuable source of potential peripheral biomarkers [16] because of a biochemical resemblance with neurons which can be demonstrated for example by their potential to release neurotransmitters such as serotonin [37] or glutamate [38]. As previous studies have also demonstrated [26], we saw in our own study that A β PP, the α -secretase ADAM10 and β -secretase BACE-1 are expressed in platelets, while the second α -secretase candidate, ADAM17, is only marginally expressed. Furthermore, a reduction in platelet ADAM10 and the product of its cleavage of A β PP, sA β PP α , correlating with CSF status, were previously reported in AD patients [9]. As recent studies have elucidated, lower platelet ADAM10 correlates well with cognitive decline in AD patients [17, 18]. One of the striking results of these studies undisputedly is that a peripherally expressed protein can be used to infer pathogenesis of the CNS. However, to our knowledge, there is no data available concerning platelet ADAM10 during the course of aging. Only one publication reports on ADAM10 during normal aging where the authors found that the amount of α -secretase

was increasing with age [39]. For that matter, Bernstein and colleagues compared the amount of ADAM10 in neurons of the temporal cortex in brains of stillborn children and those of normal aged adults. In our work presented here, we used blood samples of a cohort of young, middle-aged and older adults and observed an increase in peripheral ADAM10. Deregulation of ADAM10 has been shown to play a key role in disease pathogenesis [40] and a moderate elevation of this secretase has been demonstrated to ameliorate A β plaque load at least in mice [5, 41]. We therefore postulate that the α -secretase might contribute to or is a prerequisite for cognitively healthy aging.

A relationship between the age-dependent depletion of sex hormones [42] and AD pathogenesis is generally accepted and the effects seem to be more dramatic in women than in men [43]. As sex steroids were found to act in a neuroprotective way [44], hormone replacement therapy (HRT) was evaluated as a potential preventive strategy in post-menopausal women. Outcomes of these studies were controversial and a meta-study came to the conclusion that HRT was even contra-indicated [45]. In the cohort we analyzed, no statistical difference in platelet ADAM10 content between genders was observed, pointing at no direct correlation between sex hormones and the peripheral expression of the α -secretase. However, there will have been a certain difference in hormone balance between analyzed groups. Younger individuals (as in the first group) have different levels of sex hormones than older, probably post-menopausal ones (as in the middle aged or the oldest group). Also, one has to keep in mind that the data set we analyzed is rather small and further studies might be needed to verify these results.

The *APOE* ϵ 4 genotype is largely associated with an increased risk of developing AD, whereas the ϵ 2 allele is considered as being protective (reviewed in [34]). However, we did not find a relationship between platelet ADAM10 and different *APOE* makeups in the analyzed cohort. But, as was also true for gender, the analyses might be too preliminary in relation to sample size as to make profound assumptions.

The main finding of the present study is that platelet ADAM10, a factor previously well established to be a potential peripheral correlate to brain status, is increasing during cognitively healthy aging. Together with previous findings from other groups that platelet ADAM10 decreases in AD patients, this might indicate that the α -secretase plays a role in enhancing resilience to neurodegenerative processes. Just recently, the reduction of platelet ADAM10 has been shown to not be caused by reduced mRNA levels

[46]. In the present study, we did not assess ADAM10 mRNA levels and therefore are not able to contribute data to elucidate potential underlying mechanisms regarding the increase in α -secretase amount and activity. Combined with the knowledge that despite of their anucleate nature, *de novo* protein synthesis based on preservation of mRNA is a crucial feature of platelet function [47], this provides fertile ground for further investigations in search of pathways responsible for regulation of ADAM10 in platelets and also in tissue of the CNS.

As different factors such as FoxO3 [48] or klotho [49] have been lately associated with healthy aging and resistance to age-related diseases, a whole new field is currently emerging searching for protectors against degenerative diseases. For example, the cleavage product of klotho is thought to act as a hormone exhibiting anti-aging properties [50]. As klotho has also been reported to be a substrate of ADAM10 [51, 52], an elevation of α -secretase expression in the course of healthy aging might also contribute to the promotion of klotho's positive properties.

Within this study, we aimed for a naturalistic setting in order to provide results of a representative sample of cognitively healthy individuals. Future studies will also have to elucidate potential lifestyle factors and pharmaceuticals influencing ADAM10 in order to further investigate its potential role as a resilience factor. In this regard, investigations concerning a relationship between cognitive performance and platelet ADAM10 in healthy subjects would be highly interesting.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to participants of the study. Furthermore, the authors would like to acknowledge the help of the study center of the Department of Psychiatry and Psychotherapy with blood drawings. The excellent assistance of K. Duckro in preparing PBMCs is also acknowledged. This study was funded by a scholarship from the Focus Program Translational Neuroscience (FTN), University Medical Center Mainz, Germany, issued to F. Schuck.

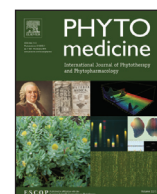
Authors' disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/15-0737r2>).

REFERENCES

- [1] Saftig P, Reiss K (2011) The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol* **90**, 527-535.

- [2] 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.
- [3] Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessaerts K, Thathiah A, Tesseur I, Bartsch U, Weskamp G, Blobel CP, Glatzel M, De SB, Saftig P (2010) The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* **30**, 4833-4844.
- [4] Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* **29**, 3020-3032.
- [5] 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.
- [6] Kim M, Suh J, Romano D, Truong MH, Mullin K, Hooli B, Norton D, Tesco G, Elliott K, Wagner SL, Moir RD, Becker KD, Tanzi RE (2009) Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate alpha-secretase activity. *Hum Mol Genet* **18**, 3987-3996.
- [7] Suh J, Choi SH, Romano DM, Gannon MA, Lesinski AN, Kim DY, Tanzi RE (2013) ADAM10 missense mutations potentiate beta-amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron* **80**, 385-401.
- [8] Endres K, Fahrenholz F (2012) Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. *Exp Brain Res* **217**, 343-352.
- [9] Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2002) [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer's disease patients. *Mol Med* **8**, 67-74.
- [10] Manzine PR, de Franca Bram JM, Barham EJ, de Vale FA, Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Iost Pavarini SC (2013) ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: A study with Brazilian elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* **35**, 58-66.
- [11] Genius J, Klafki H, Benninghoff J, Esselmann H, Wiltfang J (2012) Current application of neurochemical biomarkers in the prediction and differential diagnosis of Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **262**(Suppl 2), S71-S77.
- [12] Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, Jung HH, Hegi T, Nitsch RM, Hock C (2003) Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide42. *Arch Neurol* **60**, 1202-1206.
- [13] Amariglio RE, Donohue MC, Marshall GA, Rentz DM, Salmon DP, Ferris SH, Karantzoulis S, Aisen PS, Sperling RA (2015) Tracking early decline in cognitive function in older individuals at risk for Alzheimer disease dementia: The Alzheimer's Disease Cooperative Study Cognitive Function Instrument. *JAMA Neurol* **72**, 446-454.
- [14] Gauthier SG (2005) Alzheimer's disease: The benefits of early treatment. *Eur J Neurol* **12**(Suppl 3), 11-16.
- [15] Sperling RA, Jack CR Jr, Aisen PS (2011) Testing the right target and right drug at the right stage. *Sci Transl Med* **3**, 111cm33
- [16] Veitinger M, Varga B, Guterres SB, Zellner M (2014) Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? *Acta Neuropathol Commun* **2**, 65.
- [17] Manzine PR, Barham EJ, Vale FA, Selistre-de-Araujo HS, Pavarini SC, Cominetti MR (2014) Platelet a disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **29**, 414-420.
- [18] Manzine PR, Barham EJ, Vale FA, Selistre-de-Araujo HS, Iost Pavarini SC, Cominetti MR (2013) Correlation between minimal state examination and platelet ADAM10 expression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **36**, 253-260.
- [19] Fischer FU, Wolf D, Scheurich A, Fellgiebel A (2014) Association of structural global brain network properties with intelligence in normal aging. *PLoS One* **9**, e86258.
- [20] Wolf D, Fischer FU, Fesenbeckh J, Yakushev I, Lelieveld IM, Scheurich A, Schermuly I, Zschuttschke L, Fellgiebel A (2014) Structural integrity of the corpus callosum predicts long-term transfer of fluid intelligence-related training gains in normal aging. *Hum Brain Mapp* **35**, 309-318.
- [21] Yakushev I, Muller MJ, Buchholz HG, Lang U, Rossmann H, Hampel H, Schreckenberger M, Fellgiebel A (2012) Stage-dependent agreement between cerebrospinal fluid proteins and FDG-PET findings in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **9**, 241-247.
- [22] Reinhardt S, Schuck F, Grösgen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R, Grimm M, Endres K (2014) Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J* **28**, 978-997.
- [23] Slack BE, Ma LK, Seah CC (2001) Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J* **357**, 787-794.
- [24] Buizza L, Prandelli C, Bonini SA, Delbarba A, Cenini G, Lanni C, Buoso E, Racchi M, Govoni S, Memo M, Uberti D (2013) Conformational altered p53 affects neuronal function: Relevance for the response to toxic insult and growth-associated protein 43 expression. *Cell Death Dis* **4**, e484.
- [25] Zeng H, Huang P, Wang X, Wu J, Wu M, Huang J (2015) Galangin-induced down-regulation of BACE1 by epigenetic mechanisms in SH-SY5Y cells. *Neuroscience* **294**, 172-181.
- [26] Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, Zimmermann M, Caltagirone C, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2004) Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology* **62**, 498-501.
- [27] Decourt B, Walker A, Gonzales A, Malek-Ahmadi M, Liesback C, Davis KJ, Belden CM, Jacobson SA, Sabbagh MN (2013) Can platelet BACE1 levels be used as a biomarker for Alzheimer's disease? Proof-of-concept study. *Platelets* **24**, 235-238.
- [28] Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S (1998) The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* **55**, 809-815.
- [29] Munro CA (2014) Sex differences in Alzheimer's disease risk: Are we looking at the wrong hormones? *Int Psychogeriatr* **26**, 1579-1584.
- [30] Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5815-5820.
- [31] Kojro E, Fuger P, Prinzen C, Kanarek AM, Rat D, Endres K, Fahrenholz F, Postina R (2010) Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the

- non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *J Alzheimers Dis* **20**, 1215-1231.
- [32] Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K (2000) Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* **74**, 1008-1016.
- [33] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923.
- [34] Michaelson DM (2014) APOE epsilon4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **10**, 861-868.
- [35] Eisenberg DT, Kuzawa CW, Hayes MG (2010) Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: Climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys Anthropol* **143**, 100-111.
- [36] Singh PP, Singh M, Mastana SS (2006) APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol* **33**, 279-308.
- [37] Cupello A, Favale E, Audenino D, Scarrone S, Gastaldi S, Albano C (2005) Decrease of serotonin transporters in blood platelets after epileptic seizures. *Neurochem Res* **30**, 425-428.
- [38] Rainesalo S, Keranen T, Saransaari P, Honkaniemi J (2005) GABA and glutamate transporters are expressed in human platelets. *Brain Res Mol Brain Res* **141**, 161-165.
- [39] Bernstein HG, Bukowska A, Krell D, Bogerts B, Ansorge S, Lendeckel U (2003) Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol* **32**, 153-160.
- [40] 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.
- [41] Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F (2009) Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* **23**, 1643-1654.
- [42] Morley JE, Kaiser FE, Perry HM III, Patrick P, Morley PM, Stauber PM, Vellas B, Baumgartner RN, Garry PJ (1997) Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism* **46**, 410-413.
- [43] Vest RS, Pike CJ (2013) Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm Behav* **63**, 301-307.
- [44] Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM (2009) Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* **30**, 239-258.
- [45] Almeida OP, Flicker L (2005) Association between hormone replacement therapy and dementia: Is it time to forget? *Int Psychogeriatr* **17**, 155-164.
- [46] Manzine PR, Marcello E, Borroni B, Kamphuis W, Hol E, Padovani A, Nascimento CC, de Godoy Bueno P, Assis Carvalho Vale F, Iost Pavarini SC, Di Luca M, Cominetti MR (2015) ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. *Biomarkers* **20**, 196-201.
- [47] Schubert P, Devine DV (2010) De novo protein synthesis in mature platelets: A consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* **99**, 112-122.
- [48] Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2700-2705.
- [49] Dubal DB, Yokoyama JS, Zhu L, Broestl L, Worden K, Wang D, Sturm VE, Kim D, Klein E, Yu GQ, Ho K, Eilertson KE, Yu L, Kuro-o M, De Jager PL, Coppola G, Small GW, Bennett DA, Kramer JH, Abraham CR, Miller BL, Mucke L (2014) Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep* **7**, 1065-1076.
- [50] Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005) Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309**, 1829-1833.
- [51] Bloch L, Sineschekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C (2009) Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett* **583**, 3221-3224.
- [52] van Loon EP, Pulskens WP, van der Hagen EA, Lavrijsen M, Vervloet MG, van Goor H, Bindels RJ, Hoenderop JG (2015) Shedding of klotho by ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **309**, F359-F468.



Extract of *Caragana sinica* as a potential therapeutic option for increasing alpha-secretase gene expression



Florian Schuck^a, Ulrich Schmitt^a, Sven Reinhardt^a, Christian Freese^b, Ik-Soo Lee^c,
Eckhard Thines^d, Thomas Efferth^e, Kristina Endres^{a,*}

^a Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Untere Zahlbacher Strasse 8, 55131 Mainz, Germany

^b REPAIR-lab, Institute of Pathology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University and European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Langenbeckstrasse 1, 55101 Mainz, Germany

^c College of Pharmacy, Chonnam National University, 77 Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju 500-757, South Korea

^d Institute of Biotechnology and Drug Research, Johannes Gutenberg University, Duesbergweg 10-14, 55128 Mainz, Germany

^e Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg University, Staudinger Weg 5, 55128 Mainz, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2015

Revised 28 July 2015

Accepted 1 August 2015

Keywords:

Medicinal plant extracts

ADAM10

Caragana sinica

Alzheimer's disease

Blood–brain barrier

Alpha-viniferin

ABSTRACT

Background: Alzheimer's disease represents one of the main neurological disorders in the aging population. Treatment options so far are only of symptomatic nature and efforts in developing disease modifying drugs by targeting amyloid beta peptide-generating enzymes remain fruitless in the majority of human studies. During the last years, an alternative approach emerged to target the physiological alpha-secretase ADAM10, which is not only able to prevent formation of toxic amyloid beta peptides but also provides a neuroprotective fragment of the amyloid precursor protein – sAPPalpha.

Purpose: To identify novel alpha-secretase enhancers from a library of 313 extracts of medicinal plants indigenous to Korea, a screening approach was used and hits were further evaluated for their therapeutic value.

Methods: The extract library was screened for selective enhancers of ADAM10 gene expression using a luciferase-based promoter reporter gene assay in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Candidate extracts were then tested in wild type mice for acute behavioral effects using an open field paradigm. Brain and liver tissue from treated mice was biochemically analyzed for ADAM10 gene expression *in vivo*. An *in vitro* blood–brain barrier model and an *in vitro* ATPase assay were used to unravel transport properties of bioactive compounds from extract candidates. Finally, fractionation of the most promising extract was performed to identify biologically active components.

Results: The extract of *Caragana sinica* (Buc'hoz) Rehder was identified as the best candidate from our screening approach. We were able to demonstrate that the extract is acutely applicable in mice without obvious side effects and induces ADAM10 gene expression in peripheral tissue. A hindered passage across the blood–brain barrier was detected explaining lack of cerebral induction of ADAM10 gene expression in treated mice. By fractionating *C. sinica* extract we identified alpha-viniferin as one of the biologically active components.

Conclusion: The extract of *C. sinica* and alpha-viniferin as one of its bioactive constituents might serve as novel therapeutic options for treating Alzheimer's disease by increasing ADAM10 gene expression. The identification of alpha-viniferin represents a promising starting point to achieve blood–brain barrier penetrance in the future.

© 2015 Published by Elsevier GmbH.

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; Abeta, amyloid beta; AChE, acetylcholine esterase; AD, Alzheimer's disease; ADAM10, a disintegrin and metalloproteinase 10; APP, amyloid precursor protein; BACE-1, beta-site APP-cleaving enzyme 1; BBB, blood–brain barrier; CYP, cytochrome P450; i.p., intra-peritoneal; LC, liquid chromatography; LC-MS, liquid chromatography – mass spectrometry; MDR, multiple drug resistance; PBEC, porcine brain endothelial cell; PCR, polymerase chain reaction; P-gp, permeability glycoprotein; RLU, relative light units; RT-PCR, reverse transcriptase PCR.

* Corresponding author. Tel.: +49 6131 17 2133; fax: +49 6131 17 6690.

E-mail address: kristina.endres@unimedizin-mainz.de (K. Endres).

Introduction

Socioeconomic considerations leave no doubt that Alzheimer's disease (AD) prevention or at least a curative treatment is urgently needed in regard to demographic development. Until now, only symptomatic treatments are available for clinical use such as acetylcholine esterase (AChE) inhibitors. Albeit the fact that these medications can prolong the period of home health care and delay admission into nursing home, they only act in a symptomatic

manner and are unable to halt disease progression for the longer term (Lopez et al. 2009). Hence, defining effective molecular targets and developing disease-preventing or progression-slowing therapeutics is desperately needed. Large effort has been made in regard to beta- and gamma-secretase inhibitors or immunological strategies. However, the outcome of advanced clinical studies outmost was disappointing (e.g. Doody et al. 2014; Schor 2011). An alternative approach is given by activating the enzyme that cleaves one of the central proteins associated with AD pathogenesis, the amyloid precursor protein (APP), in a beneficial way: while beta- and gamma-secretase lead to production of neurotoxic Abeta peptides (Vassar et al. 1999; Yankner et al. 1989) alpha-secretase ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) prevents formation of these major culprits of AD pathology. Furthermore, this enzyme gives rise to sAPPalpha, a proteolytic fragment that has been reported to act neurotrophic and neuroprotective (e.g. Tyan et al. 2012). Overexpression of alpha-secretase in AD model mice resulted in drastically reduced plaque load and attenuated learning deficits (Postina et al. 2004). Therefore, ADAM10 has been identified as a valuable therapeutic target in AD (e.g. Saftig and Reiss 2011). We recently characterized several transcription factors that specifically induce ADAM10 gene expression (Reinhardt et al. 2014), indicating that endogenous signaling pathways exist that will lead to enhanced ADAM10 amount and subsequently catalytic potential. New compounds that selectively target these signaling pathways are needed for therapy development. The use of substances from traditional medicine as novel drug libraries resembles an innovative way of finding therapeutics (Appleby and Cummings 2013). Numerous natural products have already been used traditionally as memory enhancers and preventers of senescence-induced cognitive decline (summarized in Kumar et al. 2012). Galantamine for example is an alkaloid derivative isolated from members of the *Amaryllidaceae* family which proved to exhibit behavioral benefits (for a contemporary meta-analysis see Tan et al. 2014). Huperzine A is another natural choline esterase inhibitor isolated from the Chinese herb *Huperzia serrata* shown to improve cognitive function and general daily activity (Yang et al. 2013). Within this study we report a strategy using 313 different extracts from herbs of Korean traditional medicine - traditionally not directly assigned to memory and learning enhancement - to find novel inducers of ADAM10 gene expression.

Material and methods

Korean medicinal plant extracts

A collection of 313 different medicinal extracts of plants indigenous to Korea was used (Korea Plant Extract Bank, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Republic of Korea). Plants were collected at different locations in the Republic of Korea, identified at the PEB herbarium and voucher specimen deposited under reference numbers. Extraction of air-dried and powdered plant material (200 g) was performed using methanol (1.5 l, 99.9%, HPLC grade, herbal drug/solvent ratio 1:7.5) with a sonicator (SDN-900H, SD Ultrasonic Cleaner, Seoul, Korea) at 45 °C for 3 days (15 min sonication followed by 2 h standing; repeated 10 times per day). Methanol extracts were filtered and evaporated at 45 °C to dryness using a rotary evaporator (N-1000SWD, Eyela, Tokyo, Japan). Extracts were then conserved at 4 °C until further use. For drug-extract ratios (DER) please refer to Supplementary Table 1. For bioassays extracts were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml.

For clarity reasons we used the reference numbers of the plant extracts throughout the manuscript (a complete decoding list is given in Supplementary Table 1).

Cell culture

Cell lines were maintained at humidified air (95%), 5% CO₂ and 37 °C. Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was cultivated

Table 1

Decoding list of extracts that were entered in the APP promoter assay.

Extract number	Plant	Part
1982.1	<i>Luzula capitata</i> (Miq. ex Franch. & Sav.) Kom.	Whole plant
2395.3	<i>Quercus acutissima</i> Carruth.	Stems–Stembark
2423.1	<i>Quercus salicina</i> Blume	Leaves
2423.2	<i>Quercus salicina</i> Blume	Stems–Heartwood
2423.3	<i>Quercus salicina</i> Blume	Stems–Stembark
2554.1	<i>Pleuropterus ciliinervis</i> Nakai	Whole plant
3307.3	<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i> (Maxim.) E.H.Wilson	Stems–Stembark
3367.1	<i>Pyrus calleryana</i> var. <i>fauriei</i> (C.K.Schneid.) Rehder	Fruits
3413.3	<i>Maackia fauriei</i> (H.Lev.) Takeda	Stems–Stembark
3534.1	<i>Caragana sinica</i> Buc'hoz Rehder	Stems
3607A.3	<i>Citrus tachibana</i> (Makino) Yu.Tanaka	Stems–Stembark
3642.1	<i>Euphorbia jolkini</i> Boiss.	Aerial parts
4161.2	<i>Symplocos chinensis</i> f. <i>pilosa</i> (Nakai) Ohwi	Stems
4353.1	<i>Scutellaria indica</i> L.	Whole plant

in DMEM/F-12 (without phenol red, Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% glutamine (both GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Cells were passaged twice a week 1:2–1:4. The murine neuroblastoma cell line Neuro-2a stably overexpressing the APP695 Swedish mutant (N2a_APPswe) was maintained and cultured in DMEM (high glucose, with phenol red, Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated FCS and 1% glutamine and passaged twice per week 1:20.

Viability assay

4×10^4 cells per well were seeded into a white 96-well plate with glass bottom (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and cultivated overnight. Then medium was exchanged, extracts were added and cells incubated for 48 hours. All assays were performed using final concentrations of 0.1% solvent (DMSO, v/v, representing final maximal extract concentrations of 10 µg/ml). Finally, ATP content was determined with a Fluostar Optima luminometer (BMG Labtech, Cary, NC, USA) using the CellTiterGlo Assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's specifications. Cells were declared viable with values between 75% and 125% of solvent-treated cells; for non-viable cells, extracts were further diluted to reach concentrations of 0.07% and 0.05% and tested again (see Supplementary Table 1).

Dual luciferase reporter assay

For simultaneous determination of promoter activities of ADAM10 and BACE-1 a dual luciferase reporter assay was employed as previously described (Reinhardt et al. 2014). 4×10^4 SH-SY5Y cells per well were added to the transfection mix and cultivated for 16 h. The transfection mix was aspirated and cells were treated with extracts in final concentrations of 0.05% to 0.1% (v/v) in DMEM/F12 (according to results of the viability assay) and cultivated for 48 h. *Renilla* (*Renilla reniformis*) and firefly (*Photinus pyralis*) luciferase activities were assessed in cell lysates using the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) and a Fluostar Optima luminometer. Values for ADAM10 promoter activity (firefly luciferase) and BACE-1 promoter activity (*Renilla* luciferase) of solvent-treated cells were set to 100%, respectively. Values for extract-treated cells were considered as hits if firefly luciferase activity was >125% and *Renilla* luciferase activity <125% of solvent-treated cells and if at least for four out of five experiments effect sizes were similar.

APP and murine Adam10 promoter luciferase assay

Transfection of SH-SY5Y cells with APP promoter luciferase reporter vector (Reinhardt et al. 2014) was performed as described above. Empty pGL4.76 vector (mock, without promoter region, Promega) was separately transfected and values obtained used for normalization. Luciferase activity was measured with *Renilla* luciferase assay kit (Promega) following the manufacturer's protocol. Relative light units (RLUs) were normalized to protein content in the cell lysate, quantified by Bradford Nanoquant reagent (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and a BSA standard curve. The ratio of APP promoter vector to empty vector was calculated and values expressed in percent of solvent-treated cells. Extracts were considered as having no effect on APP promoter for calculated values >80% and <120% of solvent-treated cells. Murine Adam10 promoter reporter vector was generated by inserting the murine Adam10 promoter sequence (Tippmann et al. 2009) into the restriction sites *HindIII* and *NheI* of the luciferase expression vector pGL4.76 (Promega). Transfection of SH-SY5Y cells with the vector was performed as described above. For dose-response studies, extract was lyophilized and reconstituted in cell culture medium containing 0.1% DMSO (solvent) in order to reach higher extract concentrations while keeping the amount of DMSO identical to experiments performed before.

Animals

Male FVB/N wild type mice (ZVTE, Johannes Gutenberg University, Mainz) and *mdr1a*^{-/-}/*1b*^{-/-} double-knockout mice (P-gp knockout; FVB/N background; Taconic, Germantown, N.Y., USA), weighing 16–26 g were used for behavioral studies and biochemical analyses. Animals were housed in groups of five per cage (810 cm², type III) with sawdust bedding at 22 °C and 60% relative humidity. Food and water were provided *ad libitum* and a 12 h light-dark cycle was maintained. Handling occurred only during the light cycle. All experimental procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive regarding care and use of animals for experimental procedures and were approved by local authorities.

Open field experiments

To assess acute toxicity of extracts and their influence on general activity and locomotion of mice, an open field paradigm was used. Mice (*n* = 4 per group) were *i.p.* injected with 1.6 ml extract or solvent (DMSO) per kg bodyweight, diluted in sodium chloride to reach a constant injection volume of 150 µl per animal. 20 min after injection, a 30-min session in the test arena (100 × 100 × 40 cm) was performed and parameters such as distance moved were recorded automatically by a computerized video system. Hardware consisted of an IBM-type AT computer combined with a video digitizer and a CCD video camera. Data acquisition and analysis was carried out using EthoVision XT release 8.0 (Noldus Information Technology, Utrecht, Netherlands).

Tissue preparation

Mice used in behavioral studies were sacrificed 4 h after injection and brain and liver were removed. One brain hemisphere (without cerebellum) and one liver lobe were dissected and stabilized in RNA-later (Qiagen, Valencia, CA, USA) as recommended by the manufacturer. Second hemisphere (without cerebellum) and another liver lobe were stored on ice immediately after dissection and then at –80 °C until used for protein analysis.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from tissues stored in RNA-later using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's

protocol. Samples were diluted for application and subsequently 100 ng of RNA were subjected to real-time RT-PCR analysis using the thermocycler StepOne Plus (Life Technologies) and QuantiTect SYBR Green RT PCR Kit (Qiagen). Following primers were used for analysis: QuantiTect Primer Assays (Qiagen) for *Adam10* (Mm_Adam10_1_SG), *Gapdh* (Mm_Gapdh_2_SG), *Cyp2d22* (Mm_Cyp2d22_2_SG), *Cyp1a2* (Mm_Cyp1a2_1_SG). RNA quantities were calculated for each reaction based on calibration curves, normalized to *Gapdh* and set in relation to solvent-injected controls.

Western blot analysis

Protein fractions (membrane or soluble) were prepared as described previously (Endres et al. 2005) and protein content was quantified by Bradford assay. Samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 8% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare) by electro-blotting using a tank blot system (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA). Blocking of the membranes was achieved in 0.2% I-Block, 0.1% Tween-20 in PBS or 5% milk, 0.05% Tween-20 in PBS. The following primary antibodies were applied for overnight incubation at 4 °C: beta-actin rabbit polyclonal antibody (A2066, used at a dilution of 1:1000; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), GAPDH rabbit monoclonal antibody (14C10, 1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), MDR rabbit polyclonal antibody (H241, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), APP N-terminal mouse monoclonal antibody (6E10, 1:1000; Covance, Madison, WI, USA) or APP C-terminal antibody (6687, 1:1000; described previously in Steiner et al. 2000). After incubation with goat anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody (used 1:3000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), blots were developed with SuperSignal West Femto ECL-reagent (Thermo Scientific) and an appropriate picture was taken with a CCD-camera imaging system (Stella camera; Raytest, Straubenhardt, Germany). Densitometrical analysis was carried out by AIDA image analyzer software (Raytest).

Secretion of sAPPalpha and sAPPbeta

N2a_APPsw cells were seeded onto poly-L-lysine-coated 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well and cultured overnight in standard culture medium. Cells were washed once in DMEM/F-12 medium and subsequently treated with DMEM/F-12 medium containing extract or solvent in a final concentration of 0.1% DMSO. After 43 h, cells were washed with FCS-free DMEM/F-12 medium and further incubated in this medium containing extract or solvent for five hours. Conditioned media were collected and proteins precipitated as described before (Tippmann et al. 2009).

Determination of soluble APP processing products sAPPalpha and sAPPbeta was performed by Western blot analysis as described above using primary antibodies 6E10 (used at a dilution of 1:1000) and anti-APPbeta (SIG-39138-050; 1:250, both Covance).

ATPase assay

To check for substrate properties of extract components concerning MDR1, an ATPase assay kit (Predeasy, Solvo) was used according to the manufacturer's instructions. 1 µl of test compounds with final concentrations of 2% (high, representing *in vivo* assay conditions) or 0.1% (low, after pre-dilution to reach equal solvent concentration, representing *in vitro* assay conditions) or DMSO as solvent control were used. Verapamil (40 µM) served as a positive control representing a strong P-gp substrate.

Blood–brain barrier model

A recently described model (Freese et al. 2014) was used for testing the ability of extract components to penetrate the blood–brain

barrier (BBB). For transfection of SH-SY5Y cells a murine Adam10 luciferase reporter vector (see above) was used. The integrity of the endothelial barrier was checked by trans-endothelial electrical resistance (TEER) measurement using chopstick electrodes before and after extract incubation periods and additionally by staining of tight-junction proteins (data not shown). Extracts were applied into the top compartment in concentrations equal to 0.1% final concentration given unhindered passage through the barrier. After incubating the system for 48 h, SH-SY5Y cells were lysed as described above and aliquots of the lysate used for protein determination and luciferase assay.

Extract fractionation and identification of bioactive components

Extract 3534.1 was analyzed and fractionated by HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a LiChrospher RP 18 column (3 × 125 mm; 5 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The column was used at 40 °C and a flow rate of 1 ml/min was applied with a linear elution gradient composed of water and acetonitrile ranging from 1% acetonitrile to 100% acetonitrile after 20 min. The compounds were detected via a diode array detector. For every run 25 µl of extract were injected and a total of 92 fractions were generated with each fraction comprising eluent of 15 s. Fractions were then evaporated and subsequently stored at –20 °C until further analysis.

Residues of the first 60 fractions representing the more polar part of the extract were dissolved in 270 µl DMEM/F-12 and 100 µl per well used in a promoter reporter gene assay as described above using both murine (controlling a *Renilla* luciferase gene) and human

(controlling a firefly luciferase gene (Prinzen et al. 2005)) ADAM10 promoter constructs. Values obtained from dual measurements of luciferase activity were normalized to protein amount of respective wells and compared to medium-treated control wells.

The molecular weight of selected peaks corresponding to positively tested fractions was determined using LC-MS (Agilent 1260 Series LC and 6130 Series Quadrupole MS System). The mass spectra were recorded using electro spray ionization (ESI) with positive and negative polarization. A Superspher RP 18 column (125 × 2 mm; 4 µm, Merck KGaA) was used at 40 °C and a flow rate of 0.45 ml/min with an elution gradient as stated above was applied. For every run between 1 and 5 µl of the extract were injected.

Alpha-viniferin was purchased from ChemFaces (Wuhan ChemFaces Biochemical Co., Ltd., Wuhan, PR China) and stock solutions prepared in DMSO. To detect alpha-viniferin (diluted in medium or as a compound in the extract or a fraction) by HPLC, an Agilent 1200 Series device (Agilent Technologies) was used equipped with an ODS Hypersil C18 analytical column (150 × 4 mm; 5 µm, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany) and a variable wavelength detector (Agilent VWD G1314B, Agilent Technologies) set at 210 nm. To remove serum proteins present in cell culture medium, 50 µl of sample were first injected on a pre-column (10 × 4 mm; 20 µm, PerfectBond CN, MZ Analysentechnik) and washed with 8% acetonitrile (v/v) for 1 min at a flow rate of 1.5 ml/min. Alpha-viniferin was then eluted and separated on the analytical column, which was kept at 30 °C. A flow rate of 1.5 ml/min was applied using an analytical eluent consisting of 16.2% methanol, 12.8% acetonitrile and 71% 0.02 M sodium acetate buffer (pH 4.5, v/v/v, method modified from Shu et al. 2006).

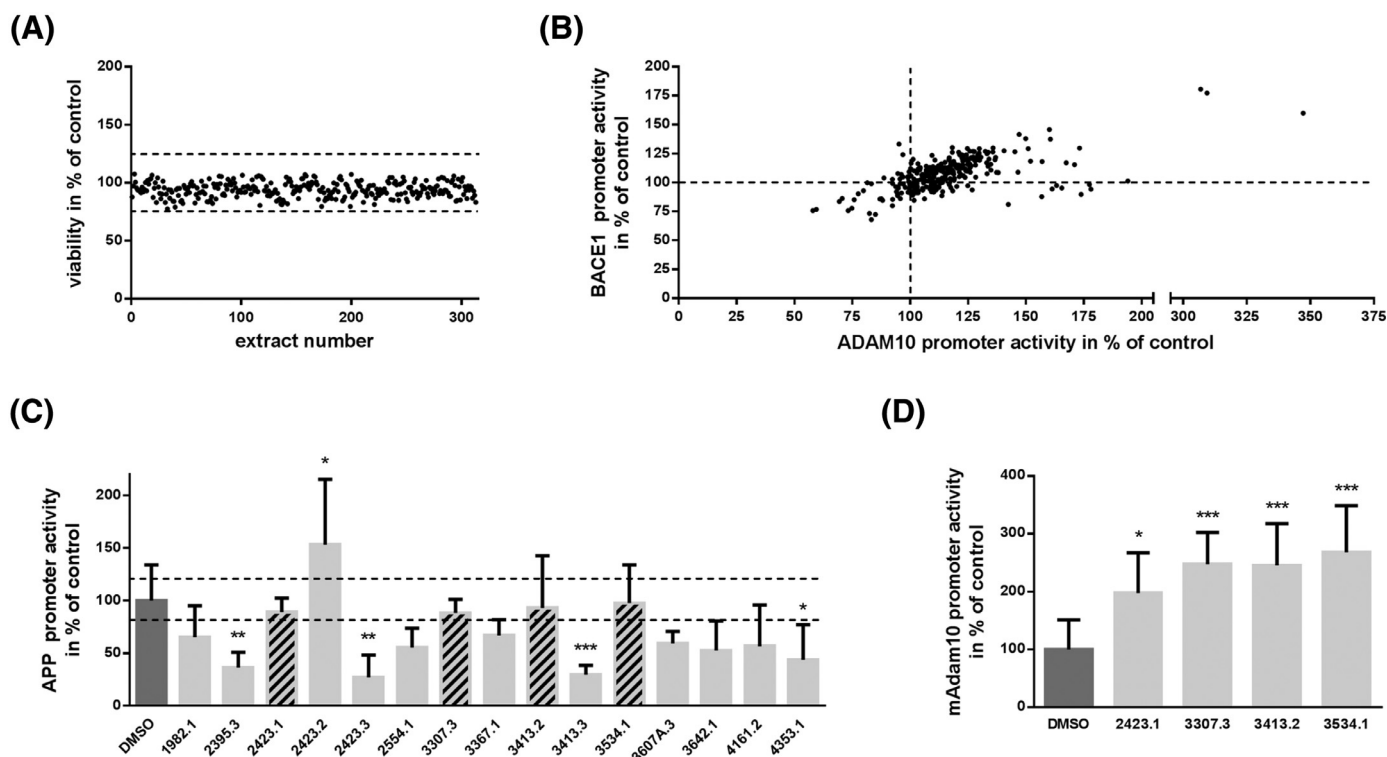


Fig. 1. Screening of medicinal plant extracts indigenous to Korea for selective ADAM10 promoter activation and selection of candidate extracts. (A) Potential cytotoxicity was assessed in SH-SY5Y cells following 48 h of incubation with 0.1% plant extracts or DMSO as solvent control. Four extracts initially showed toxic effects and were further diluted to 0.07% and 0.05% and tested again (for identification see Supplementary Table 1). (B) Screening of 313 medicinal plant extracts for activation of human ADAM10 and BACE-1 promoter was simultaneously performed using a dual reporter plasmid encoding for firefly and *Renilla* luciferase. Data points represent means from at least five independent experiments. (C) Promising extracts selected from the previous screening approach were used in a promoter assay to check for potential influence on APP. SH-SY5Y cells were transfected with *Renilla* luciferase reporter plasmid containing the promoter for human APP and treated with 0.1% extracts for 48 h. Data are given as means from at least four independent measurements with standard deviations. (D) Activity of murine Adam10 promoter was determined by a luciferase assay. SH-SY5Y cells were transfected as described in (A) using a reporter plasmid containing the murine Adam10 promoter. Data are given as means from three assays performed at least in duplicates with standard deviations.

p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001, one-way ANOVA, Bonferroni post-test.

Statistical analysis

Data was tested for statistical significance with Prism 6 (GraphPad Software) by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test or Fisher's LSD test for multiple comparisons or by unpaired Student's *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Screening for modulators of ADAM10 and BACE-1 by a dual luciferase reporter assay

To avoid cytotoxic effects of plant extracts on SH-SY5Y cells during reporter gene assays, a toxicity assay was performed (Fig. 1A). Only four out of 313 extracts exhibited cytotoxic effects (data not shown) and were further diluted (see Supplementary Table 1). Following dilution of said extracts, reassessment of ATP content showed adequate viability of cells treated with extracts.

Subsequently, SH-SY5Y cells were transiently transfected with a dual reporter-plasmid encoding for both, a firefly luciferase under the

control of the promoter of human ADAM10 and a *Renilla* luciferase under the control of the promoter of human BACE-1 (Reinhardt et al. 2014). Extracts that elevated ADAM10 promoter activity to more than 125% and that had no impact or even a lowering effect on BACE-1 were considered potential hits (Fig. 1B). This initial screen yielded 14 out of 313 plant extracts that were deemed suitable for further investigation in respect to application in AD therapy. These 14 extracts are listed and de-blinded in Table 1. A complete list of tested extracts can be found in Supplementary Table 1.

Influence of selected extracts on APP promoter activity

Major alteration in APP gene expression is generally not desired when screening for novel AD therapeutics. Increased amount of APP might lead to heightened levels of Abeta generation, whereas lower levels of APP could also bear certain risks, such as impaired muscular function and spatial working memory (Senechal et al. 2007; Zheng et al. 1995). By using a luciferase-based reporter approach, those extracts that lowered human APP promoter activity to less than 80% or elevated activity to more than 120% were excluded from the candidate list. Four out of the 14 candidate extracts passed this stage of

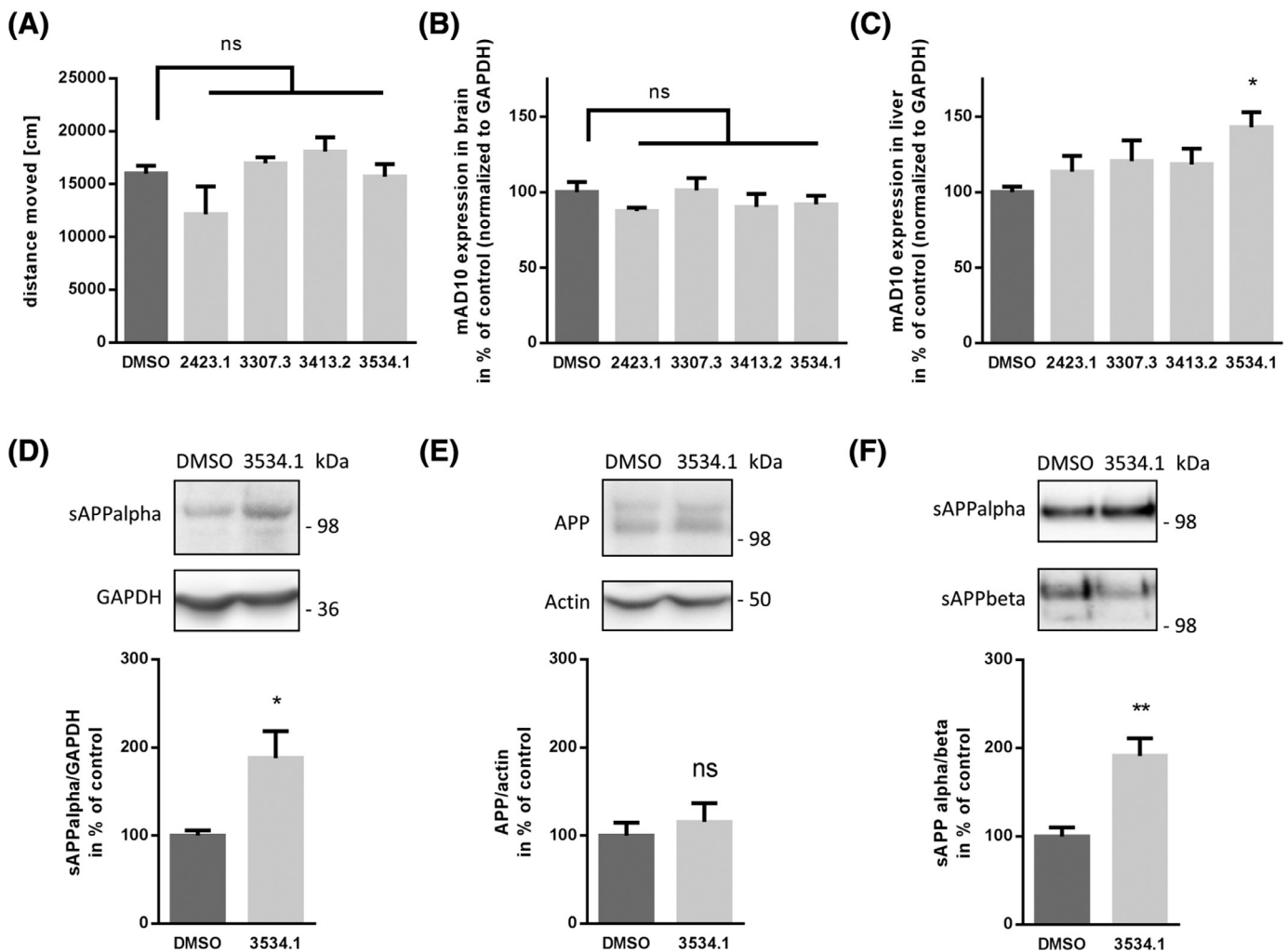


Fig. 2. Effects of acute extract treatment in mice and the influence on ADAM10 expression *in vivo* (A) Total distance moved of four mice per group injected with either solvent (DMSO) or extracts 2423.1, 3307.3, 3413.2 or 3534.1 was recorded in the open field paradigm 20 min after application. Bars represent group means with SEM as error bars. Animals used for behavioral studies were sacrificed and mRNA extracts of tissue homogenates from brain (B) and liver (C) were subjected to quantitative real time PCR for murine Adam10. Gapdh served as a housekeeping gene. (D) Western blot analysis of hepatic sAPPalpha levels in mice treated with extract 3534.1 or solvent. (E) Membrane protein fraction of liver homogenates was subjected to Western blot analysis to detect levels of full length APP in 3534.1-treated and respective control mice (means $\pm$ SEM). (F) APP cleavage products were analyzed by Western blot from conditioned media of N2a_APPsw cells treated with extract 3534.1 or solvent. Ratios of sAPPalpha/sAPPbeta were calculated from at least six measurements (means $\pm$ SD). ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, Bonferroni post-test or Student's *t*-test.

screening for further analysis and first *in vivo* application (Fig. 1C, hatched bars).

Acute treatment of wild type mice with selected extracts

We found that promoter activation seen in the initial screening was reproducible also with the murine promoter (Fig. 1D), e.g. extract 3534.1 (from *Caragana sinica* (Buc'hoz) Rehder) which induced human ADAM10 promoter activity to 134% yielded an induction to about 270% for the murine homologue. Therefore, observed effects seemed to be translatable to the murine model regarding direction of the effect.

To evaluate effects of extract treatment *in vivo*, male FVB/N mice were *i.p.* injected with extracts. A maximum of 1.6 ml DMSO per kg bodyweight was chosen since this concentration was reported to not alter general behavior of mice (Castro et al. 1995). After injection, mice were closely monitored and found to tolerate the procedure well; all mice survived treatment without signs of altered behavior or seizures.

An open field paradigm was used to assess general locomotion in treated mice. Results showed that none of the extracts provoked a significant change in activity (total distance travelled, Fig. 2A). A tendency in shorter distance moved was observed for treatment with extract 2423.1 (12145 cm vs. 15995 cm for DMSO-treated controls) but did not reach significance ($p = 0.352$).

Biochemical analysis of *in vivo* effects of selected extracts

To estimate the effect of extract treatment on ADAM10 gene expression, animals were sacrificed 4h after injection, brain and liver were collected and total RNA was prepared. ADAM10 mRNA quantification in brain showed no significant change in acutely treated mice (Fig. 2B). However, expression levels in liver were elevated for treatment with extract 3534.1 (Fig. 2C, $p = 0.037$).

Western blot analysis of hepatic sAPPalpha confirmed the ADAM10-enhancing effect of extract 3534.1: the cleavage product of APP produced by ADAM10 increased to 188% of DMSO-treated control (Fig. 2D, $p = 0.030$), while levels of full-length APP remained unchanged (Fig. 2E, $p = 0.596$).

The absence of an effect in brain could be due to different reasons such as hindered BBB penetrance or an inability of murine neurons to convey promoter activation to ADAM10 enzymatic function.

To test the latter, we used murine neuronal N2a cells stably over-expressing human Swedish-type mutated APP in a secretion assay. Quantitation of APP shedding products sAPPalpha and sAPPbeta by Western blot revealed a twofold increased ratio of alpha/beta upon treatment with extract 3534.1 (Fig. 2F, 191% of DMSO-treated control, $p = 0.001$). This indicates that a shift towards anti-amyloidogenic processing of APP takes place in murine neuronal cells upon treatment with extract 3534.1.

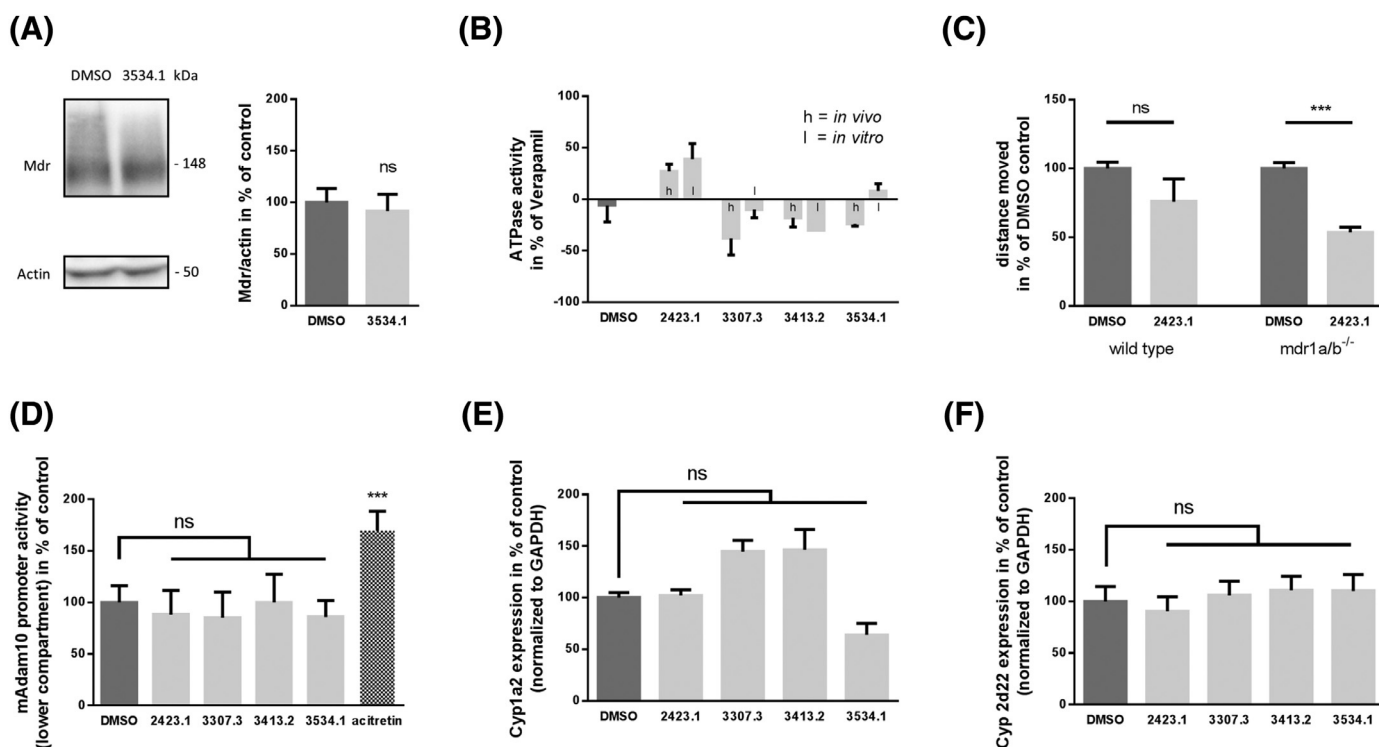


Fig. 3. Evaluation of blood–brain barrier (BBB) penetrance of active extract components and potential influence of metabolism on *in vivo* effects of extract treatment. (A) Western blot analysis of liver tissue of extract 3534.1-treated mice used for behavioral studies (Fig. 2) was done in order to check for MDR protein levels (means $\pm$ SEM of densitometric analysis; normalization to actin). (B) P-gp transport activity was determined by Predeasy ATPase assay. Values are presented as % of verapamil control for two different concentrations: low (l) and high (h) (means $\pm$ SD of two experiments). (C) Total distance moved in the open field paradigm was recorded from *mdr1a/b*^{-/-} mice after acute treatment with extract 2423.1 and compared to measurement of wild type mice. All bars represent means from four individual animals with SEM as error bars. Values from solvent-treated animals were set to 100% for each genotype individually, because it has been shown that knockout mice exhibit altered basal locomotion (Schoenfelder et al. 2012). (D) A co-culture model was used to determine the ability of extracts to penetrate the BBB *in vitro*. SH-SY5Y cells were transiently transfected with murine ADAM10 promoter reporter vector and porcine brain endothelial cells (PBEC) were seeded in a trans-well system on top of the SH-SY5Y cells. Extracts were added to reach a final concentration of 0.1% solvent in the lower compartment assuming 100% penetrance. Acitretin served as a positive control. Bars represent means of three independent experiments with three different PBEC donors with standard deviation. (E) Analysis of murine Cyp1a2 and (F) Cyp2d22 (human orthologs: CYP1A2 and CYP2D6, respectively) by quantitative real time PCR was performed with mRNA extracts of liver tissue homogenates of extract-treated mice. Normalization was achieved by comparison to Gapdh expression, bars represent means $\pm$ SEM. ns: $p > 0.05$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA, Bonferroni post-test or Student's *t*-test.

Treatment with selected plant extracts: consequences at the blood–brain barrier

Since elevated levels of ADAM10 could be observed in liver but not in brain after treatment with extracts and murine neuronal cells in general were able to translate ADAM10 promoter activation to protein function, we hypothesized that extracts and/or their active compounds may be unable to cross the blood–brain barrier (BBB). Prevention of BBB penetrance can be based on different mechanisms, such as induction of ABC transporters (like MDR1) and exhibiting substrate characteristics for these transporters.

Western blot analysis of liver samples of mice treated with extract 3534.1 showed no significant alteration in protein expression concerning MDR proteins (antibody detects murine Mdr-1, -2 and -3, Fig. 3A).

To test if components of the extracts themselves were substrates for MDR1, a major efflux transporter in brain and liver (e.g. Borst and Schinkel 2013), we employed an ATPase activity-dependent assay (Fig. 3B). Two doses of extracts were tested, representing those used for cell culture (low) and for *in vivo* experiments (high). Obtained results showed that only components of extract 2423.1 were potential substrates, since ATPase activity was 27% and 39% of Verapamil standard for the low and the high dose, respectively.

When treating P-gp knockout mice (*mdr1a*^{-/-}/*1b*^{-/-}, Schinkel et al. 1997) with extract 2423.1 we observed a significant decrease in general locomotion as compared to wild type littermates (Fig. 3C, $p < 0.001$). This confirmed our findings from the ATPase assay, indicating

that components of extract 2423.1 were substrates for efflux transporters.

In a recently established BBB model (Freese et al. 2014) no significant activation of murine Adam10 promoter in neuroblastoma cells could be detected for any of the tested extracts (Fig. 3D), indicating that active components of the extracts are not able to cross this model BBB. Reliability of the system was checked by using acitretin as a control substance capable of penetrating the BBB (Holthoewer et al. 2012), which was able to elevate Adam10 promoter activity to 170% of DMSO control as described previously for human ADAM10 promoter (Freese et al. 2014).

Potential role of metabolism in the absence of selected plant extracts effects

Catabolism of the bioactive compounds by cellular detoxification systems such as the cytochrome P450 enzymes might also play a key role in limiting induction of ADAM10 expression in our experiments.

Quantitative real-time PCR data from murine liver samples demonstrated that treatment with extracts 3307.3 and 3413.2 led to slight, non-significantly elevated mRNA levels of Cyp1a2 (Fig. 3E, 150% and 154% of DMSO-treated controls, $p = 0.065$ and $p = 0.051$, respectively). Extract 3534.1 slightly lowered Cyp1a2 expression to 64% of DMSO-treated controls without reaching significance. Cyp2d22, the murine homologue of human CYP2D6, was not affected by extract treatment (Fig. 3F). Taken together, we could detect only mild influences of acute treatment with three extracts on the expression of selected cytochrome P450 enzymes that might contribute to the

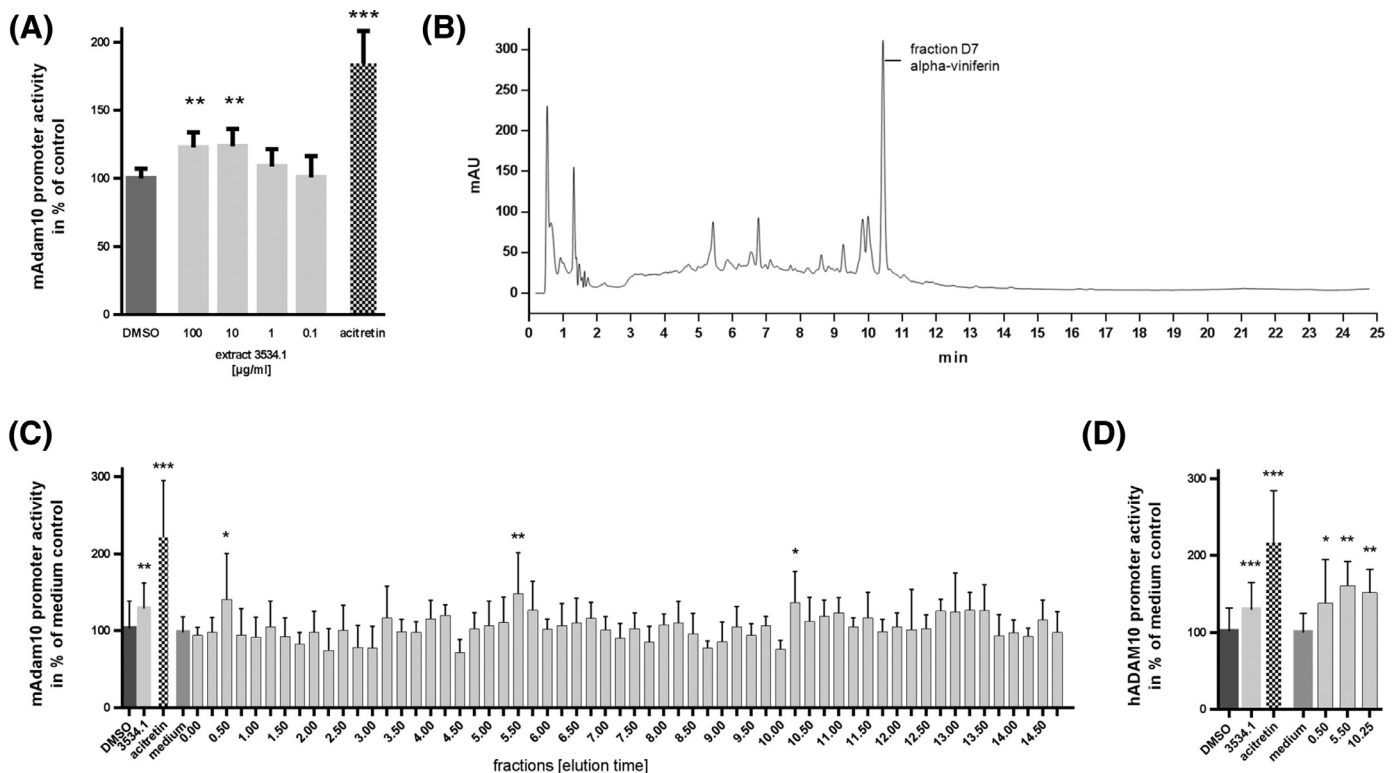


Fig. 4. Dose-effect study of extract 3534.1 and identification of active fractions enhancing ADAM10 promoter activity. (A) Promoter reporter gene assay performed with SH-SY5Y cells transiently transfected with reporter vector containing the murine Adam10 promoter to test dose-dependency of promoter activation by extract 3534.1. Acitretin was used as positive control, negative controls were treated with solvent (0.1% DMSO) only. To reach higher concentrations, the extract was lyophilized and reconstituted in cell culture medium containing 0.1% DMSO. Bars represent means $\pm$ SD of at least 6 replicates from three independent experiments. (B) Chromatogram (300 nm) obtained from fractionation of extract 3534.1 by HPLC using an elution gradient of water and acetonitrile. (C) Promoter reporter gene assay performed with SH-SY5Y cells co-transfected with reporter vectors containing the murine and the human ADAM10 promoter was used to identify promoter-activating potential of different fractions of extract 3534.1. The first 60 fractions representing the polar part of the extract were evaporated and residues reconstituted in cell culture medium. Transfected cells were treated with total extract (3534.1), acitretin or fractions for 48 h and luciferase activity was determined in cell lysates (means $\pm$ SD of light units from *Renilla* (murine promoter) signal, normalized to protein content from four measurements). The x-axis shows the elution times. (D) Values obtained for human ADAM10 promoter were comparable to those from the murine promoter. Shown here are the fractions significantly elevating ADAM10 promoter activity. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA, Fisher's LSD test.

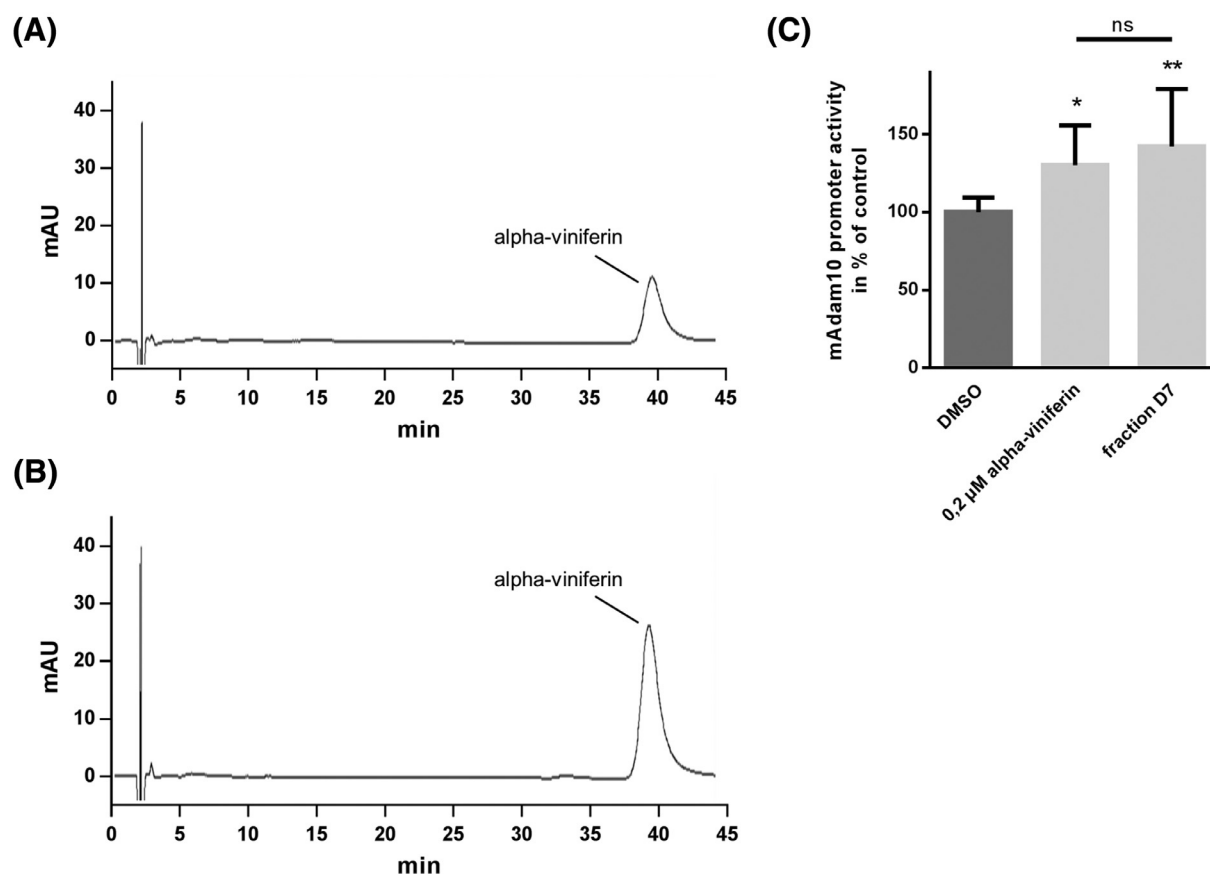


Fig. 5. Verification of alpha-viniferin as one of the bioactive components of *C. sinica* extract. (A) Alpha-viniferin diluted in cell culture medium (50 μ l, 5 μ M final concentration) was analyzed by HPLC using a detection wavelength of 210 nm. (B) Bioactive fraction (50 μ l, designated "D7", eluted after 10.25 min in the fractionation LC, see Fig. 4B) dissolved in cell culture medium was analyzed by the same HPLC method as alpha-viniferin using a detection wavelength of 210 nm. (C) Activity of murine Adam10 promoter was determined in a promoter reporter gene assay using transiently transfected SH-SY5Y cells. Treatment was performed with either solvent (DMSO, 0.1% v/v), 0.2 μ M alpha-viniferin or diluted bioactive fraction (D7, concentration of alpha-viniferin of 0.15 ± 0.03 μ M). Bars represent means $\pm$ SD from three independent experiments (ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, Fisher's LSD test).

absence of significant effects on cerebral ADAM10 *in vivo* after extract passage through hepatic tissue.

Dose-effect study with extract 3534.1 and identification of potential active components

Since extract 3534.1 induced ADAM10 expression *in vivo*, we performed a dose-effect study with that extract in order to determine its range of activity. Promoter activation in neuronal cells was maximal with a dose of 10 μ g/ml (the concentration already used in cell culture experiments) and stayed on a comparable level also with a higher dosage of 100 μ g/ml (Fig. 4A). To decipher the underlying active components of extract 3534.1, we used an LC method to generate fractions of it (Fig. 4B, chromatogram at 300 nm, for the same chromatogram at 210 nm see Supplementary Fig. 1A and for a complete 3D chromatogram see Supplementary Fig. 1B). We tested the first 60 fractions together with the complete extract and acitretin as a positive control in a promoter reporter gene assay using human and murine ADAM10 promoter constructs. Three fractions (at 0.50 min, 5.50 min and 10.25 min) elevated promoter activity of ADAM10 significantly (Fig. 4C, 141%, 148% and 136% of medium-treated controls, $p = 0.027$, $p = 0.010$ and $p = 0.048$, respectively). Results were comparable between human and murine promoter constructs (Fig. 4D).

Promoter-activating fractions were then subjected to LC–MS analysis where masses of the components were recorded. We found a mass of 684u for the first peak at 0.50 min, 482u for the peak at 5.50 min and 678u for the peak at 10.25 min. The latter detected mass could hint at alpha-viniferin ($M = 678.7$ g/mol), given the fact that

extract 3534.1 is a stem extract of *Caragana sinica* and it was previously reported that alpha-viniferin is a constituent of *C. sinica* roots (Kitanaka et al. 1990; Sung et al. 2002).

Analysis of alpha-viniferin by an HPLC method (Fig. 5A) and comparison to the respective fraction (Fig. 5B) and the whole *C. sinica* extract (data not shown) verified this hypothesis. Following a calibration with alpha-viniferin, we were able to determine the concentration within the stem extract of *C. sinica*, representing an effective concentration used in cell culture experiments of 0.15 ± 0.03 μ M. A promoter reporter gene assay using the murine Adam10 promoter construct showed an induction of promoter activity upon treatment with 0.2 μ M alpha-viniferin indistinguishable from treatment with the fraction itself (Fig. 5C), supporting that alpha-viniferin is one of the bioactive components of *C. sinica* stem extract responsible for elevating ADAM10 gene expression.

In summary, the extracts of medicinal plants indigenous to Korea we found to elevate ADAM10 gene expression *in vitro* were not able to exhibit this effect in the brain but in hepatic tissue of treated mice. For stem extract of *Caragana sinica* (extract 3534.1) we succeeded in narrowing down the ADAM10-enhancing effect to sub-fractions of this extract and identified alpha-viniferin as one of its bioactive components.

Discussion

Medicinal extracts from plants have been used for more than 2000 years by indigene populations for treating several diseases, including forms of dementia and memory impairment (as reviewed in

Howes and Houghton 2012), and are still commonly used in countries like China and Korea. Western medicine also shows increasing interest in novel lead compounds isolated from traditionally used medicinal plants (reviewed in Kumar et al. 2012).

A recent example is given by compounds of green tea, such as (-)-epicatechin (Stringer et al. 2015) or epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the main phenol compound of green tea. For the latter, it has previously been shown that following administration of the extract or by drinking the tea, symptoms of amyloidosis of the light chain type (AL-amyloidosis) could be alleviated (Mereles et al. 2010).

Alzheimer's disease, the most common cause of dementia represents another form of amyloidosis with mostly unknown cause. Lately, several studies have been published using traditional medicine approaches for novel AD therapies. Caffeoylquinic acid, a substance found for example in coffee beans and *Centella asiatica*, has been shown to be protective against cytotoxicity caused by Abeta and additionally to reduce beta-sheet formation of Abeta peptides in neuroblastoma cell lines (Gray et al. 2014; Miyamae et al. 2012). Wang et al. (2014) were able to demonstrate that cocoa extracts reduced the oligomerization of Abeta and restored Abeta-induced decline in long-term potentiation in mice.

Although treatment strategies tackling Abeta are viable, another promising approach in AD is presented by enhancing the alpha-secretase ADAM10 (e.g. Endres and Fahrenholz 2012). In the present work we describe a screening approach that identified four out of 313 tested extracts from a library of medicinal plants indigenous to Korea that showed a potential for elevating ADAM10 expression. From these four candidates, the extract of *Caragana sinica* (extract 3534.1) had the most promising potential. *C. sinica* has been used in traditional medicine for treating disorders like neuralgia, migraine and vascular hypertension (as reviewed by Meng et al. 2009). For one compound of the root extract of *C. sinica*, kobophenol A, Lee and colleagues showed neuroprotective effects in a cell culture based model (Lee et al. 2007) associated with reduced oxidative stress. As kobophenol A has a reported mass of 924u we do not assume it to be an ADAM10 enhancer identified in our screening.

More recent work has demonstrated that the chemical composition of *C. sinica* extract is diverse (Jin et al. 2012) and yields several stilbenes that have been shown to exhibit acetylcholine esterase (AChE) inhibitory effects *in vitro* (Pinho et al. 2013; Sung et al. 2002). Furthermore, one of the main components of the root extract of *C. sinica*, alpha-viniferin (Sung et al. 2002) not only inhibits AChE but also acts in an anti-inflammatory manner (Chung et al. 2010). This might be beneficial to AD pathology since chronic inflammation and reduced neurotransmitter levels are hallmark characteristics of the disease. In the work presented here, we demonstrate that the stem extract of *C. sinica* also contains alpha-viniferin in one of the bioactive fractions responsible for ADAM10 promoter activation. Together with the aforementioned anti-inflammatory and AChE-inhibitory properties of alpha-viniferin, its newly identified ADAM10-regulatory potential adds another valuable disease-modifying mechanism regarding a potential AD treatment to this stilbenoid.

We were able to show that in mice acute treatment with *C. sinica* extract had no adverse effect. Combined with the knowledge that *C. sinica* extract has been used in traditional medicine for centuries, it can be postulated that the extract is potentially harmless. The absence of a central effect on ADAM10 in treated mice might mainly be due to a hindered passage across the BBB and maybe also because of metabolic degradation of active components. Elucidating the identity of the two yet unidentified active components and modifying their capability and that of alpha-viniferin to penetrate the BBB resembles a future perspective for a therapeutic use in AD.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank C. Roth for technical assistance with animal procedures and G. Hefner for help with HPLC analysis. Furthermore the help of S. Bohnert with fractionation of the extract is greatly appreciated. We thank Dr. G. Thinakaran for providing the N2a_APP695swe cell line and Dr. C. Haass for antibody 6687. This study was funded by a scholarship from the Focus Program Translational Neuroscience (FTN), University Medical Center Mainz, Germany, issued to F. Schuck and a grant by the Scientific and Medical Research Center (NMFZ), Mainz, Germany.

Supplementary Materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.phymed.2015.08.001.

References

- Appleby, B.S., Cummings, J.L., 2013. Discovering new treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 2306–2327.
- Borst, P., Schinkel, A.H., 2013. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals. *J. Clin. Investig.* 123, 4131–4133.
- Castro, C.A., Hogan, J.B., Benson, K.A., Shehata, C.W., Landauer, M.R., 1995. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 521–526.
- Chung, E.Y., Roh, E., Kwak, J.A., Lee, H.S., Lee, S.H., Lee, C.K., Han, S.B., Kim, Y., 2010. Alpha-Viniferin suppresses the signal transducer and activation of transcription-1 (STAT-1)-inducible inflammatory genes in interferon-gamma-stimulated macrophages. *J. Pharmacol. Sci.* 112, 405–414.
- Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R., 2014. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 311–321.
- Endres, K., Fahrenholz, F., 2012. Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. *Exp. Brain Res.* 217, 343–352.
- Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., Fahrenholz, F., 2005. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J.* 272, 5808–5820.
- Freese, C., Reinhardt, S., Hefner, G., Unger, R.E., Kirkpatrick, C.J., Endres, K., 2014. A novel blood–brain barrier co-culture system for drug targeting of Alzheimer's disease: establishment by using acitretin as a model drug. *PLoS One* 9, e91003.
- Gray, N.E., Morre, J., Kelley, J., Maier, C.S., Stevens, J.F., Quinn, J.F., Soumyanath, A., 2014. Caffeoylquinic acids in *Centella asiatica* protect against amyloid-beta toxicity. *J. Alzheimers. Dis.* 40, 359–373.
- Holthoewer, D., Endres, K., Schuck, F., Hiemke, C., Schmitt, U., Fahrenholz, F., 2012. Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood–brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener. Dis.* 10, 224–228.
- Howes, M.J., Houghton, P.J., 2012. Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 67–85.
- Jin, Q., Han, X.H., Hong, S.S., Lee, C., Choe, S., Lee, D., Kim, Y., Hong, J.T., Lee, M.K., Hwang, B.Y., 2012. Antioxidative oligostilbenes from *Caragana sinica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 973–976.
- Kitanaka, S., Ikezawa, T., Yasukawa, K., Yamanouchi, S., Takido, M., Sung, H.K., Kim, I.H., 1990. (+)-Alpha-viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana cham-lagu* root. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38, 432–435.
- Kumar, H., More, S.V., Han, S.D., Choi, J.Y., Choi, D.K., 2012. Promising therapeutics with natural bioactive compounds for improving learning and memory—a review of randomized trials. *Molecules* 17, 10503–10539.
- Lee, S.R., Kwak, J.H., Kim, H.J., Pyo, S., 2007. Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1879–1882.
- Lopez, O.L., Becker, J.T., Wahed, A.S., Saxton, J., Sweet, R.A., Wolk, D.A., Klunk, W., DeKosky, S.T., 2009. Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 600–607.
- Meng, Q., Niu, Y., Niu, X., Roubin, R.H., Hanrahan, J.R., 2009. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of the genus *Caragana* used in traditional Chinese medicine. *J. Ethnopharmacol.* 124, 350–368.
- Mereles, D., Buss, S.J., Hardt, S.E., Hunstein, W., Katus, H.A., 2010. Effects of the main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on cardiac involvement in patients with AL amyloidosis. *Clin. Res. Cardiol.* 99, 483–490.
- Miyamae, Y., Kirisu, M., Murakami, K., Han, J., Isoda, H., Irie, K., Shigemori, H., 2012. Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid beta-protein. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5844–5849.
- Pinho, B.R., Ferreres, F., Valentao, P., Andrade, P.B., 2013. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1681–1700.

- 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.
- Prinzen, C., Muller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., Postina, R., 2005. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 19, 1522–1524.
- Reinhardt, S., Schuck, F., Grosen, S., Riemenschneider, M., Hartmann, T., Postina, R., Grimm, M., Endres, K., 2014. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 28, 978–997.
- Saftig, P., Reiss, K., 2011. The “A disintegrin and metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 527–535.
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., Borst, P., 1997. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4028–4033.
- Schoenfelder, Y., Hiemke, C., Schmitt, U., 2012. Behavioural consequences of p-glycoprotein deficiency in mice, with special focus on stress-related mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* 24, 809–817.
- Schor, N.F., 2011. What the halted phase III gamma-secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann. Neurol.* 69, 237–239.
- Senechal, Y., Kelly, P.H., Cryan, J.F., Natt, F., Dev, K.K., 2007. Amyloid precursor protein knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J. Neurochem.* 102, 1928–1940.
- Shu, N., Zhou, H., Hu, C., 2006. Simultaneous determination of the contents of three stilbene oligomers in *Caragana sinica* collected in different seasons using an improved HPLC method. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 608–612.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M.L., Baumeister, R., Fechteler, K., Haass, C., 2000. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* 2, 848–851.
- Stringer, T.P., Guerrieri, D., Vivar, C., van Praag, H., 2015. Plant-derived flavanol (-)epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. *Transl. Psychiatry* 5, e493.
- Sung, S.H., Kang, S.Y., Lee, K.Y., Park, M.J., Kim, J.H., Park, J.H., Kim, Y.C., Kim, J., Kim, Y.C., 2002. (+)-Alpha-viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 125–127.
- Tan, C.C., Yu, J.T., Wang, H.F., Tan, M.S., Meng, X.F., Wang, C., Jiang, T., Zhu, X.C., Tan, L., 2014. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimers. Dis.* 41, 615–631.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., Fahrenholz, F., 2009. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* 23, 1643–1654.
- Tyan, S.H., Shih, A.Y., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P.R., Koo, E.H., Dickstein, D.L., 2012. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell Neurosci.* 51, 43–52.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Wang, J., Varghese, M., Ono, K., Yamada, M., Levine, S., Tzavaras, N., Gong, B., Hurst, W.J., Blitzer, R.D., Pasinetti, G.M., 2014. Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid-beta: implications for cognitive improvement in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 41, 643–650.
- Yang, G., Wang, Y., Tian, J., Liu, J.P., 2013. Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One* 8, e74916.
- Yankner, B.A., Dawes, L.R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M.L., Neve, R.L., 1989. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245, 417–420.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisodia, S.S., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., 1995. Beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525–531.



Article

Identification of Phlogacantholide C as a Novel ADAM10 Enhancer from Traditional Chinese Medicinal Plants

Myriam Meineck ¹, Florian Schuck ¹, Sara Abdelfatah ², Thomas Efferth ² and Kristina Endres ^{1,*}

¹ Clinic of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University Mainz, 55131 Mainz, Germany; mmeineck@students.uni-mainz.de (M.M.); florian.schuck@unimedizin-mainz.de (F.S.)

² Institute of Pharmacy, Johannes Gutenberg-University Mainz, 55099 Mainz, Germany; saabdelf@uni-mainz.de (S.A.); efferth@uni-mainz.de (T.E.)

* Correspondence: kristina.endres@unimedizin-mainz.de; Tel.: +49-6131-17-2133

Academic Editor: James D. Adams

Received: 18 October 2016; Accepted: 28 November 2016; Published: 5 December 2016

Abstract: Background: Alzheimer's disease is one of the most prevalent dementias in the elderly population with increasing numbers of patients. One pivotal hallmark of this disorder is the deposition of protein aggregates stemming from neurotoxic amyloid-beta peptides. Synthesis of those peptides has been efficiently prevented in AD model mice by activation of an enzyme called alpha-secretase. Therefore, drugs with the capability to increase the expression of this enzyme, named ADAM10, have been suggested as a valuable therapeutic medication. **Methods:** We investigated 69 substances from a drug library derived from traditional Chinese medicine by luciferase reporter assay in human neuronal cells for their potential to selectively induce alpha-secretase expression. Western blot analysis was used to confirm results on the protein level. **Results:** Ten of the 69 investigated compounds led to induction of ADAM10 transcriptional activity while BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) and APP (amyloid precursor protein) expression were not induced. Two of them—Norkurarinol and Phlogacantholide C—showed substantial elevation of ADAM10 protein levels and Phlogacantholide C also increased secretion of the ADAM10-derived cleavage product APPs-alpha. **Conclusion:** Phlogacantholide C represents a novel ADAM10 gene expression enhancer from traditional Chinese medicinal herbs that may lay the groundwork for evolving potential novel therapeutics in Alzheimer's disease.

Keywords: ADAM10; Amyloid precursor protein; Alzheimer's disease; Norkurarinol; Phlogacantholide C; *Phlogacanthus curviflorus*; *Sophora flavescens*

1. Introduction

As life expectancy in most civilizations has tremendously increased during the last 100 years, diseases of the advanced life period have come into the focus of research. Alzheimer's disease is a slowly progressing neurodegenerative disease which is clinically characterized by cognitive decline and changes of personality [1]. An estimated 40 million people worldwide suffer from dementia, with Alzheimer's disease being the most prevalent, at least in the elderly [2]. The origin of the disease still remains enigmatic despite the few genetically based cases (1%–3% of all cases [3]). This, as a consequence, hampers the development of efficient targeted medication. One molecular hallmark of the disease is the deposition of neurotoxic amyloid-beta peptides that derive from the proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP [4]) by beta-secretase BACE-1 and gamma-secretase [5,6]. However, involvement of these peptides has been controversially discussed in the field, and clinical trials which solely focused on preventing synthesis of the peptides have failed so

far [7]. Targeting the alpha-secretase ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) in this regard represents an attractive alternative: it not only prevents amyloid-beta generation by cutting within the respective peptide stretch but it also liberates the proteolysis fragment APPs-alpha [8]. The latter has been assigned beneficial effects for neuronal cells such as promoting outgrowth of neurites and preventing neuronal death as well as mitigating synaptic and cognitive deficits in AD (Alzheimer's disease) mouse models [9–12].

Plant extracts have been used for more than 2000 years by indigenous populations for treating disorders including forms of dementia and memory impairment (as reviewed in [13]). Huge parts of the world's population still rely on traditional medicine (TM) for their primary health care [14]: for example, in Korea as well as China 15.26% and 12.63% TM doctors practice in hospitals and clinics [15]. Western medicine shows increasing interest in isolating novel lead compounds from such traditionally used medications (reviewed in [16]). A recent example for a potential anti-AD therapeutic drug is given by caffeoylquinic acid, found, for example, in coffee beans, which has been shown to be protective against amyloid-beta-induced cytotoxicity and to reduce beta-sheet formation of amyloid-beta peptides in neuroblastoma cell lines [17,18]. In 2015 we described the identification of alpha-viniferin from the stem bark of *Caragana sinica* as an ADAM10 gene expression enhancer from a bank of traditional Korean medicinal plant extracts [19]. As part of the ongoing search for biologically active compounds from traditional Chinese medicine, we here report the investigation of a 69-compound-containing library which revealed the anti-amyloidogenic activity of Phlogacantholide C from *Phlogacanthus curviflorus* [20].

Phlogacanthus curviflorus (Wall.) Nees (Acanthaceae) is a large branched shrub which grows in Yunnan Province of China as well as, e.g., in Vietnam and India [21], and reaches up to 3 to 4 m. Oppositely arranged elliptic leaves are 8 to 10 in long. The tube-like reddish flowers are borne in upright spikes at the end of the branches. In North India, boiled leaf juice is used to cure cough and fever, and flowers are eaten raw or fried or used as a spice [22]. Moreover, it is used in the postpartum herbal bath of the Mien population in Northern Thailand, probably due to its antioxidant properties [23].

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Medicinal plants were collected or purchased in China [24], mainly from Yunnan province (600 to 700 m above sea level). The botanical identification was done as described before [24] and voucher specimens deposited at the herbarium of the State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, P.R. China. The finely ground plant material was successively extracted with solvents of increasing polarity (petroleum ether (or *n*-hexane), ethyl acetate, and methanol) as described before [24,25] and finally solved in DMSO. For detailed information about the tested substances see [25].

2.2. Cell Culture

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were maintained at humidified air (95%), 5% CO₂ and 37 °C. Cultivation was performed using DMEM/F12 (Gibco, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% Glutamine. Cells were passaged twice a week 1:2–1:4.

2.3. Cytotoxicity Test

Potential cytotoxic effects were assessed by using the Cell Titer Glo-Assay (Promega, Mannheim, Germany) in 96-well formats (white plate with glass bottom). Initial drug concentration was 0.1% vol/vol in 50 µL culture medium and an incubation period of 48 h was tested. After 48 h of incubation, 50 µL of assay reagent were added and the ATP content (as a surrogate parameter for viability) measured using the Fluostar Optima luminometer (BMG Labtech, Cary, NC, USA).

Ten measurements were taken from each well (interval time 0.5 s) and means calculated. Concentrations were adjusted if necessary (toxic or pro-proliferative effects) to obtain non-toxic dosages.

2.4. Transfection and Promoter Assays

A transient retro-cotransfection of two luciferase reporter plasmids (depending on ADAM10 or BACE-1 promoter activity) was conducted in SH-SY5Y cells as described previously [26]. In brief, to each well of a 96-well plate 20 μ L Opti-MEM containing 100 ng of each luciferase encoding vector were added and incubated for 20 min at room temperature. Subsequently, 20 μ L of Opti-MEM containing 0.3 μ L transfection reagent (Lipofectamine 2000, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) were added to each well and incubated for 45 min at room temperature. 1.5×10^5 cells per cm^2 surface area of the dish were seeded. After 5 h of incubation, medium was exchanged to full cultivation medium containing DMSO (control) or the herbal drug in the indicated concentration and transfected cells were cultivated for 48 h. Cells were lysed in 20 μ L passive lysis buffer (Promega), lysis promoted by freezing overnight at -20°C and Renilla and firefly luciferase activity assessed using a reporter assay kit (Dual-Luciferase Reporter Assay, Promega) and the Fluostar Optima luminometer (BMG). The ratio of ADAM10-promoter activity (firefly luciferase) to BACE-1-promoter activity (Renilla luciferase) was calculated and the transcriptional activity of control cells was set to 100%. Hits were considered as follows: values $>$ mean + SD (130%) of control-treated cells.

For the APP-promoter assay the procedure was comparable using a singular reporter vector based on the pGL4.76 plasmid (Promega) which has been describe before [26].

2.5. Western Blotting

For analysis of the drug-induced effect on ADAM10 expression and non-amyloidogenic APP-processing, cells were seeded on 24-well plates (1.3×10^5 cells per cm^2 surface area) and incubated with the indicated drugs or DMSO for 48 h. Secretion medium was collected for the last 5 h following a medium exchange to FCS-free medium containing the respective drug or DMSO as a solvent. Secreted proteins were precipitated by trichloroacetic acid as described before (e.g., [27]). Cell lysates were prepared using Nu-PAGE-buffer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) supplemented with 10 vol % 1 M DTT. Samples were subjected to 8% SDS polyacrylamide gels and proteins separated at 70–120 V. Subsequently, proteins were transferred via tank blot procedure (2 h, 100 V, BioRad apparatus, Hercules, CA, USA) onto nitrocellulose membranes (blocked with 0.2% I-Block solution (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) and incubated with the appropriate primary antibodies followed by secondary horse radish peroxidase-coupled antibodies (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany). Detection of signals was performed by CCD camera (Raytest, Straubenhardt, Germany) and densitometric analysis by Aida 3.5 (Raytest). Actin served as a loading control.

3. Results and Discussions

The collection and botanical identification of medicinal plants mainly from the Yunnan Province, China, have been described [24]. The bioactivity-guided isolation of phytochemicals by chromatographic methods was performed as previously described [28,29]. The chemical structures were elucidated by spectrometric methods and crystal structure analysis [30].

3.1. Results for Toxicity Assay

Starting from 0.1% vol/vol, 90% of the tested TCM (traditional Chinese medicine)-derived substances revealed no toxic effect on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (61 out of 69, Figure 1). Only for a minority the concentration had to be reduced (only results from adjusted concentrations are presented, data from initial measurements with higher concentrations are not shown). For TCM19 (Sophoraflavon G) and TCM22 (Norkurarinol), for example, a further dilution to 0.01% evoked no viability-decreasing results. Sophoraflavanone G (5,7,2',4'-tetrahydroxy-8-lavandulylflavanone), a close relative to Sophoraflavon G, has been referred to as a phytochemical with

an intense antibacterial activity which might be due to its capability to reduce the fluidity of the outer and inner layers of membranes [31]. This was also assumed for Sophoraflavon G and thereby might explain the toxic effect on the human cells used in our study occurring at higher dosage. Norkurarinol, also a flavonoid extracted from *Sophora flavescens*, has been shown to exert cytotoxic effects in cancer cells, probably due to its tyrosinase inhibitor properties [32].

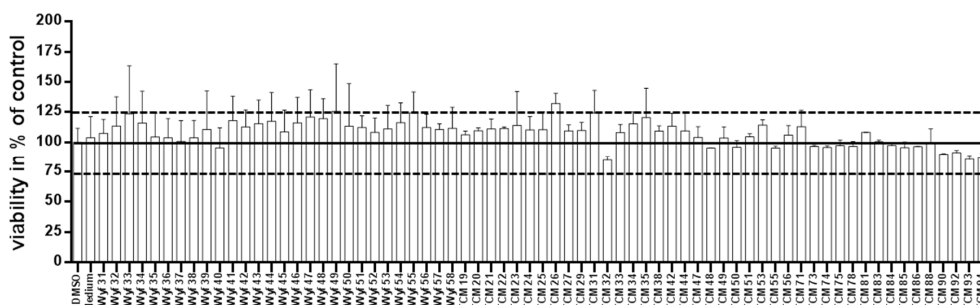


Figure 1. Toxicity assay of tested substances. SH-SY5Y cells were incubated for 48 h with 0.1% vol/vol substance and viability was assessed using the Cell Titer Glo assay. DMSO (solvent) and pure culture medium served as controls. Values $\pm$ SD were collected from at least two independent experiments. Dashed lines indicate the maximum tolerated proliferative or toxic effect. Concentration of the following substances had to be adjusted by dilution with DMSO as indicated to obtain reliable viability measurements: TCM48: 0.05%; TCM19–22, 51, 54, 81: 0.01% (only the viability measurements for the adjusted concentrations are shown in the figure).

3.2. Results for Dual Promoter Assay

TCM-derived substances were administered to the dual promoter assay for assessing the potential anti-amyloidogenic property. Ten out of the 69 tested substances revealed an ADAM10 promoter-inducing effect and none indicated an induction of BACE-1 promoter activity (Figure 2). The effect size was comparable for some substances to already known ADAM10 expression enhancers such as Acitretin or atRA [33,34], Wyf40, TCM22, 26, 47, 48, 49, 50, 88, while others displayed rather high induction rates (TCM19: 250% of control; TCM55: 207% of control). To make sure that none of the observed luciferase measurements was due to a direct effect on the enzymatic reaction, this was tested separately by an in vitro incubation of luciferase-containing cell lysate with the respective substance (data not shown).

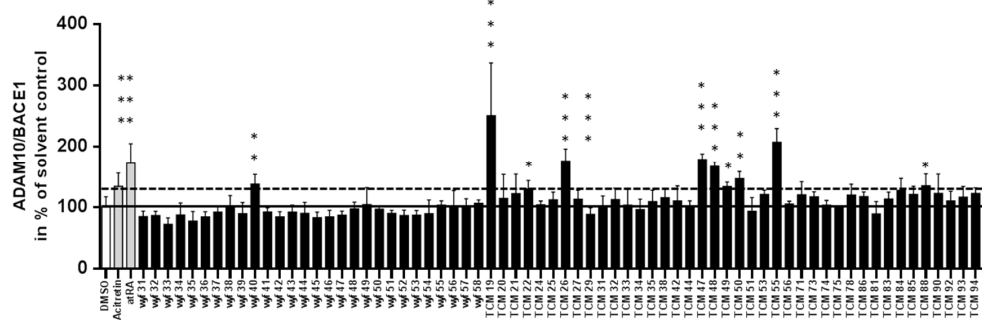
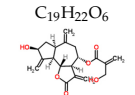
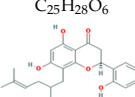
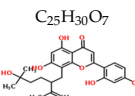
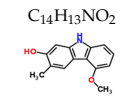
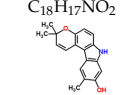
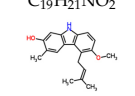
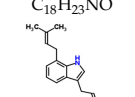
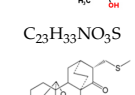
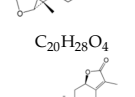


Figure 2. Influence of tested substances on ADAM10/BACE-1 promoter activity ratio. Cells were incubated for 48 h with substances according to results from toxicity assay (see Figure 1). DMSO (solvent) and known activators of ADAM10 promoter activity (Acitretin and all-trans retinoic acid, both 1 μ M, [34]) served as controls. The dashed line indicates the minimal effect size expected for a “hit” (values > mean + SD (130%) of control-treated cells). Values $\pm$ SD were collected from three independent experiments (statistical analysis: one-way ANOVA with Bonferroni’s multiple comparison test; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

An ADAM10-enhancing effect with regard to Alzheimer’s disease should not be paralleled by an increase in the substrate expression itself. For instance, a higher gene dosage of APP alone is sufficient in Trisomy 21 patients to result in Alzheimer-type dementia [35]. Therefore, we tested if the nine candidates identified by the dual promoter assay inherit the inducing potential on the human APP promoter (see Table 1; TCM26 was not included due to lack of sufficient material for further analyses). None of the selected substances displayed a drastic induction or reduction of the APP transcriptional activity. APP promoter activity ranged from 117% to 61% of the control, but effects did not reach statistical relevance in comparison to solvent-treated cells.

Table 1. Candidate substances selected from dual promoter assay.

Substance Code	Substance	Formula	Plant	Concentration (mg/mL)	Effect on APP Promoter (MW $\pm$ SD)
Wyf40	Cynaropicrin	 C ₁₉ H ₂₂ O ₆	<i>Saussurea deltoidea</i>	2	93.13 $\pm$ 24.96
TCM19	Sophoraflavon G	 C ₂₅ H ₂₈ O ₆	<i>Sophora flavescens</i> , <i>Sophora pachycarpa</i> , and <i>Sophora exigua</i>	2	115.3 $\pm$ 58.45
TCM22	Norkurarinol	 C ₂₅ H ₃₀ O ₇	<i>Sophora flavescens</i>	2	84.50 $\pm$ 47.86
TCM47	5-Methoxy-3-methyl-9H-carbazol-2-ol	 C ₁₄ H ₁₃ NO ₂	<i>Glycosmis pentaphylla</i>	12	86.88 $\pm$ 36.46
TCM48	7-methoxyglycomaurin	 C ₁₈ H ₁₇ NO ₂	<i>Glycosmis rupestris</i>	12	61.38 $\pm$ 25.81
TCM49	glybomine B	 C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	<i>Glycosmis arborea</i>	12	68.57 $\pm$ 34.91
TCM50	(2E)-2-Methyl-4-[7-(3-methyl-2-buten-1-yl)-1H-indol-3-yl]-2-buten-1-ol	 C ₁₈ H ₂₃ NO		12	117.8 $\pm$ 53.42
TCM55	(4R,4aS,8aR,10R,10aR,12S,13S,14bS)-4-methyl-12-((methylthio)methyl)decahydro-1H,8aH,10H,11H-4,14b,10-(epiethane[1,1,2]triy)-10a,13-ethanoisochromeno[4,3-g]oxazolo[3,2-a]jzocin-11-one	 C ₂₃ H ₃₃ NO ₃ S	<i>Spiraea japonica</i>	4	96.75 $\pm$ 53.34
TCM88	Phlogacantholide C	 C ₂₀ H ₂₈ O ₄	<i>Phlogacanthus curviflorus</i>	2	80.25 $\pm$ 31.15

3.3. Results for ADAM10 Expression and Enzymatic Activity

Substance characterization based on reporter gene assays bears the problem of investigating an isolated DNA sequence without the genomic environment. Additionally, translation and stability of the protein products are not integrated in those investigations. We therefore analyzed the outcome of cultivating SH-SY5Y cells with the candidates from the dual promoter assay on the endogenous ADAM10 protein level (Figure 3A). For substances TCM22 (Norkurarinol) and 88 (Phlogacantholide C), the effect observed on the promoter construct was substantiated within the protein quantitation while those of the seven other compounds could not be substantiated: for TCM22 the immature proform of the enzyme was elevated to 132%, and the mature form to 137%. For TCM88 an induction to 143% for the proform and to 150% for the mature form was observed. For TCM88, additionally, an increase of APPs-alpha secretion of 200% as compared to solvent-treated cells was observed (Figure 3B). This indicates that not only the amount but also the activity of ADAM10 has been induced by Phlogacantholide C. We can only speculate why TCM22 failed to induce APPs-alpha secretion despite its effect on the ADAM10 amount: although we did not observe an influence on the APP promoter in our reporter gene assay, Norkurarinol might lead to a reduced APP protein amount at the cell surface or the newly built ADAM10 might be dislocated and therefore unable to cleave APP.

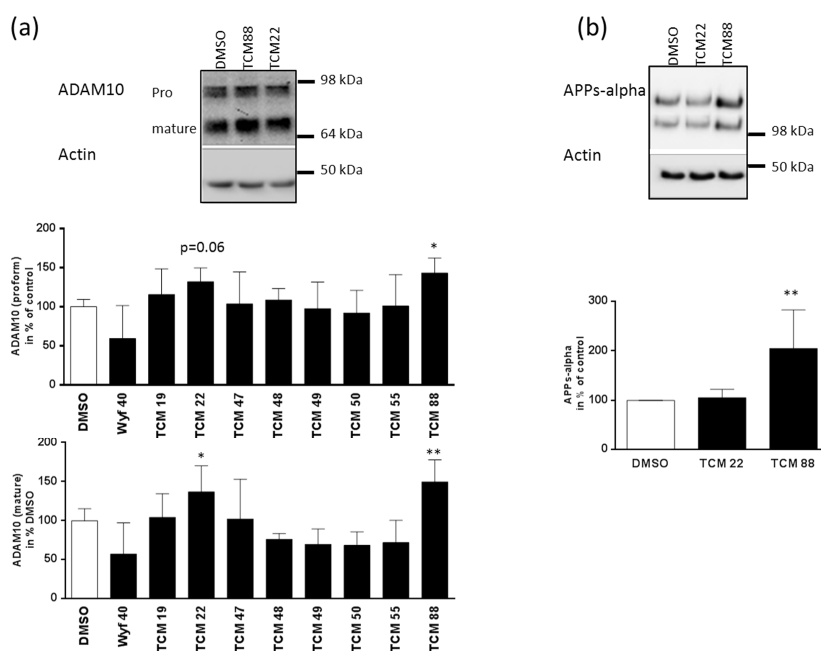


Figure 3. Influence of candidate substances on ADAM10 expression and APPs-alpha secretion. (a) Expression of ADAM10. Cells were incubated for 48 h with substances according to results from toxicity assay in FCS-containing medium (see Figure 1). DMSO (solvent) served as control. Twenty percent of cell lysates were subjected to Western blotting and ADAM10 was detected with Calbiochem antibody (dilution 1:1000). Actin served as a loading control (antibody (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) diluted 1:1000). Pro- and mature forms of the enzyme were measured, normalized to Actin and depicted in % of DMSO control-treated cells. Values $\pm$ SD were collected from three independent experiments. An exemplary blot for analysis of DMSO, TCM22 and 88 is shown. (b) Effect of TCM22 and 88 on APP processing. For secretion experiments, cells were incubated for the last 5 h in FCS-free medium supplemented with the candidate substances. The whole amount of precipitated proteins from cell supernatant was used for detection of APPs-alpha (antibody 6E10 (BioLegend, Fell, Germany)) and 20% of the cell lysate for detection of Actin to ascertain comparable amounts of cells in the experimental setting. Values obtained for APPs-alpha were normalized to Actin measurements and presented in % of solvent control ($n = 6$, four independent experiments). Statistical analysis: one-way ANOVA; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

4. Conclusions

We identified Phlogacantholide C from *Phlogacanthus curviflorus* [20,36] as a new ADAM10 gene expression enhancer from a bank containing 69 substances derived from traditional Chinese medicinal herbs. *Phlogacanthus curviflorus* is used in traditional medicine as an anti-malarian drug [36] or in the context of curing or preventing inflammatory events [22,23]. However, no biological or pharmaceutical investigation regarding the isolated diterpene lactone glucoside has yet been reported to our knowledge.

Acknowledgments: This study was funded by a scholarship from the Focus Program Translational Neuroscience (FTN), University Medical Center Mainz, Germany, issued to F. Schuck.

Author Contributions: Kristina Endres and Florian Schuck conceived and designed the project and wrote the manuscript; Thomas Efferth supervised collection and extraction of plant material and critically read the manuscript; Myriam Meineck performed the toxicity and reporter gene assays as well as the Western blots and analyzed the data; Sara Abdelfatah helped with preparing the table and with the structure description of the chemical compounds.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chung, J.A.; Cummings, J.L. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Characteristics and treatment. *Neurol. Clin.* **2000**, *18*, 829–846. [[CrossRef](#)]
2. Wimo, A.; Jonsson, L.; Bond, J.; Prince, M.; Winblad, B. Alzheimer Disease International. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement.* **2013**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tanzi, R.E. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Citron, M.; Diehl, T.S.; Gordon, G.; Biere, A.L.; Seubert, P.; Selkoe, D.J. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13170–13175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vassar, R.; Bennett, B.D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E.A.; Denis, P.; Teplow, D.B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **1999**, *286*, 735–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Xia, W.; Zhang, J.; Ostaszewski, B.L.; Kimberly, W.T.; Seubert, P.; Koo, E.H.; Shen, J.; Selkoe, D.J. Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* **1998**, *37*, 16465–16471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.X. Alzheimer disease therapeutics: Focus on the disease and not just plaques and tangles. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *88*, 631–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lammich, S.; Kojro, E.; Postina, R.; Gilbert, S.; Pfeiffer, R.; Jasionowski, M.; Haass, C.; Fahrenholz, F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3922–3927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Fol, R.; Braudeau, J.; Ludewig, S.; Abel, T.; Weyer, S.W.; Roederer, J.P.; Brod, F.; Audrain, M.; Bemelmans, A.-P.; Buchholz, C.J.; et al. Viral gene transfer of APPsalpha rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 247–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gakhar-Koppole, N.; Hundeshagen, P.; Mandl, C.; Weyer, S.W.; Allinquant, B.; Muller, U.; Ciccolini, F. Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, *28*, 871–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hasebe, N.; Fujita, Y.; Ueno, M.; Yoshimura, K.; Fujino, Y.; Yamashita, T. Soluble beta-amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hick, M.; Herrmann, U.; Weyer, S.W.; Mallm, J.P.; Tschape, J.A.; Borgers, M.; Mercken, M.; Roth, F.C.; Draguhn, A.; Slomianka, L.; et al. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPsalpha in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 21–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Howes, M.J.; Houghton, P.J. Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 67–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhang, X. *WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005*; WHO: Geneva, Switzerland, 2002.
15. Park, H.L.; Lee, H.S.; Shin, B.C.; Liu, J.P.; Shang, Q.; Yamashita, H.; Lim, B. Traditional medicine in China, Korea, and Japan: A brief introduction and comparison. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 429103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kumar, H.; More, S.V.; Han, S.D.; Choi, J.Y.; Choi, D.K. Promising therapeutics with natural bioactive compounds for improving learning and memory—A review of randomized trials. *Molecules* **2012**, *17*, 10503–10539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gray, N.E.; Morre, J.; Kelley, J.; Maier, C.S.; Stevens, J.F.; Quinn, J.F.; Soumyanath, A. Caffeoylquinic acids in *Centella asiatica* protect against amyloid-beta toxicity. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *40*, 359–373. [[PubMed](#)]
18. Miyamae, Y.; Kurisu, M.; Murakami, K.; Han, J.; Isoda, H.; Irie, K.; Shigemori, H. Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid beta-protein. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5844–5849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schuck, F.; Schmitt, U.; Reinhardt, S.; Freese, C.; Lee, I.S.; Thines, E.; Efferth, T.; Endres, K. Extract of *Caragana sinica* as a potential therapeutic option for increasing alpha-secretase gene expression. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 1027–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Yuan, X.H.; Li, B.G.; Zhang, X.Y.; Qi, H.Y.; Zhou, M.; Zhang, G.L. Two diterpenes and three diterpene glucosides from *Phlogacanthus curviflorus*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 86–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Hu, Q.; Chui, H.B. *Flora Yunnanica*; Science Press: Beijing, China, 2006; Volume 1.
22. Phurailatpam, A.K.; Singh, S.R.; Chanu, T.M.; Ngangbam, P. *Phlogacanthus*—An important medicinal plant of North East India: A review. *Afr. J. Agric. Res.* **2014**, *9*, 2068–2072.
23. Panyaphu, K.; On, T.V.; Sirisa-ard, P.; Srisa-nga, P.; Chansa Kaow, S.; Nathakarnkitkul, S. Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *135*, 226–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Efferth, T.; Kahl, S.; Paulus, K.; Adams, M.; Rauh, R.; Boechzelt, H.; Hao, X.; Kaina, B.; Bauer, R. Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 152–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mahringer, A.; Karamustafa, S.; Klotz, D.; Kahl, S.; Konkimalla, V.B.; Wang, Y.; Wang, J.; Liu, H.Y.; Boechzelt, H.; Hao, X.; et al. Inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by phytochemicals derived from traditional Chinese medicine. *Cancer Genom. Proteom.* **2010**, *7*, 191–205.
26. Reinhardt, S.; Schuck, F.; Grosen, S.; Riemenschneider, M.; Hartmann, T.; Postina, R.; Grimm, M.; Endres, K. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2014**, *28*, 978–997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Endres, K.; Postina, R.; Schroeder, A.; Mueller, U.; Fahrenholz, F. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5808–5820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, J.; Di, Y.; Yang, X.; Li, S.; Wang, Y.; Hao, X. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the stems of *Glycosmis pentaphylla*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 486–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wang, Y.F.; Lai, G.F.; Efferth, T.; Cao, J.X.; Luo, S.D. New glycosides from *Tetracentron sinense* and their cytotoxic activity. *Chem. Biodivers.* **2006**, *3*, 1023–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hu, M.; Chen, J.; Lin, H. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: Mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 314–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Tsuchiya, H.; Iinuma, M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* **2000**, *7*, 161–165. [[CrossRef](#)]
32. Son, J.K.; Park, J.S.; Kim, J.A.; Kim, Y.; Chung, S.R.; Lee, S.H. Prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* with tyrosinase inhibitory activity. *Planta Med.* **2003**, *69*, 559–561. [[PubMed](#)]
33. Prinzen, C.; Muller, U.; Endres, K.; Fahrenholz, F.; Postina, R. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1522–1524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tippmann, F.; Hundt, J.; Schneider, A.; Endres, K.; Fahrenholz, F. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* **2009**, *23*, 1643–1654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Head, E.; Lott, I.T.; Wilcock, D.M.; Lemere, C.A. Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, *13*, 18–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lai, G.-F.; Wang, X.-Y.; Wang, Y.-F.; Cao, J.-X.; Luo, S.-D.; Peng, J. Diterpenes and Diterpene Glucosides from *Phlogacanthus curviflorus*. *Helvetica Chim. Acta* **2009**, *92*, 470–480. [[CrossRef](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease

Sven Reinhardt,* Florian Schuck,* Sven Grösgen,[‡] Matthias Riemenschneider,[§] Tobias Hartmann,^{‡,||} Rolf Postina,[†] Marcus Grimm,^{‡,||} and Kristina Endres^{*,1}

*Clinical Research Group, Department of Psychiatry and Psychotherapy, and [†]Institute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany; and [‡]Department of Neurodegeneration and Neurobiology, Deutsches Institut für DemenzPrävention (DIDP), [§]Clinic of Psychiatry and Psychotherapy, and ^{||}Department of Experimental Neurology, Saarland University, Homburg/Saar, Germany

ABSTRACT In Alzheimer's disease (AD), disturbed homeostasis of the proteases competing for amyloid precursor protein processing has been reported: a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10), the physiological α -secretase, is decreased in favor of the amyloid- β -generating enzyme BACE-1. To identify transcription factors that modulate the expression of either protease, we performed a screening approach: 48 transcription factors significantly interfered with ADAM10/BACE-1-promoter activity. One selective inducer of ADAM10 gene expression is the X-box binding protein-1 (XBP-1). This protein regulates the unfolded protein-response pathway. We demonstrate that particularly the spliced XBP-1 variant dose dependently regulates ADAM10 expression, which can be synergistically enhanced by 100 nM insulin. Analysis of 2 different transgenic mouse models (APP/PS1 and 5xFAD) revealed that at early time points in pathology XBP-1 metabolism is induced. This is accompanied by a 2-fold augmented ADAM10 amount as compared with non-transgenic littermates ($P=0.011$). Along with aging of the mice, the system is counterregulated, and XBP-1 together with ADAM10 expression level decreased to

~50% as compared with control animals. Analyses of expression levels in human AD brains showed that ADAM10 mRNA correlated with active XBP-1 ($r=0.3120$), but expression did not reach levels of healthy age-matched controls, suggesting deregulation of XBP-1 signaling. Our results demonstrate that XBP-1 is a driver of ADAM10 gene expression and that disturbance of this pathway might contribute to development or progression of AD.—Reinhardt, S., Schuck, F., Grösgen, S., Riemenschneider, M., Hartmann, T., Postina, R., Grimm, M., Endres, K. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 28, 978–997 (2014). www.fasebj.org

Key Words: APP processing • insulin signaling • ER stress • stress response • α -secretase

ALZHEIMER'S DISEASE (AD) is the most prevalent type of dementia, with a steadily growing number of patients. Albeit the pathological hallmarks of this disease were described more than 100 yr ago, the pathomechanistically relevant elicitors in sporadic AD have not yet been clearly delineated. Inflammatory events, metabolic disbalance, and altered enzymatic activity have been intensely discussed in this concern. For example, it has been reported that in patients with dementia, insulin resistance develops within the brain, accompanied by reduction of insulin itself and insulin receptor (IR) expression (1). Moreover, amyloid β ($A\beta$) peptides might be able to block the IR, which consequently contributes to a persistent insulin resistance in the brain in patients with dementia and therefore resem-

Abbreviations: $A\beta$, amyloid β ; AD, Alzheimer's disease; ADAM10, a disintegrin and metalloproteinase 10; AP1, activator protein 1; APP, amyloid precursor protein; ATF, activating transcription factor; BACE-1, β -site APP-cleaving enzyme 1; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ER, endoplasmic reticulum; ERSE, endoplasmic reticulum-stress-responsive element; EST, expressed sequence tag; HEK, human embryonic kidney; HRP, horseradish peroxidase; HSF-1, heat-shock factor 1; IR, insulin receptor; IRE1- α , inositol requiring enzyme 1- α ; IRS-1, insulin receptor substrate 1; LPS, lipopolysaccharide; ns, not splicable (vector sequence); PS1, presenilin 1; PSEN1, presenilin 1; s, spliced (vector sequence); SEAP, secreted embryonic alkaline phosphatase; TF, transcription factor; TLR4, toll-like receptor 4; u, unspliced (vector sequence); UPR, unfolded protein response; UPRE, unfolded protein response element; UPRE_{del}, unfolded protein response element deletion mutant; USF, upstream stimulatory factor; UTR, untranslated region; UV, ultraviolet; XBP-1, X box binding protein 1; WT, wild type; YY-1, Yin Yang 1

¹ Correspondence: Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Untere Zahlbacher Strasse 8, 55131 Mainz, Germany. E-mail: kristina.endres@unimedizin-mainz.de
doi: 10.1096/fj.13-234864

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

bles an even more complex picture of the disease (reviewed in ref. 2). There is discordance in the research field about the identity of the toxic A β species: intracellular monomeric peptides, certain kinds of oligomers, or modified A β ; but the central role of A β in development of the disease is generally accepted (3). In accordance with this, a variety of studies reported a misbalance in the expression and/or activity of central proteases that are responsible for production of A β in the human brain. Two main pathways exist in amyloid precursor protein (APP) cleavage: in the amyloidogenic pathway, the β -secretase BACE-1 (β -site APP-cleaving enzyme 1) delivers the prerequisite shedding event for γ -secretase-derived A β generation. Contrarily, the α -secretase prevents formation of A β peptides and leads to secretion of the neurotrophic and neuroprotective APP-processing product APPs- α . Analyses in mouse models have revealed that the major α -secretase within at least the murine brain is the metalloprotease ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10). Overexpression of this enzyme in transgenic mice impressively reduced the A β plaque load and soluble A β and additionally restored learning deficits in double-transgenic Alzheimer model mice (4). RNAi-mediated reduction of ADAM10 in primary hippocampal neurons nearly abolished APP- α generation (5), and animals with a conditional ADAM10 knockdown showed largely reduced α -secretase activity in neurons (6). Overexpression of BACE-1 in animal models, in contrast, increased A β plaque load and led to an exacerbated phenotype (7, 8).

Enhanced BACE-1 protein level and activity have been observed in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with mild cognitive impairment and mostly an increased expression as well as enhanced amounts of protein and activity in CNS tissue of humans affected by AD have been reported (*e.g.*, 9; reviewed in ref. 10). ADAM10 amount or activity, in contrast, was mainly found to be decreased in moderate to severe AD (11). Moreover, several publications reported a reduction of APPs- α in the CSF of patients with AD (12–14), which probably is linked to reduced amount and/or activity of the ADAM10 protease itself. Therefore, elucidating endogenous factors that balance expression of either protease (ADAM10 or BACE-1) might lead to a deeper understanding of AD pathogenesis and disclose new therapeutic approaches. Common regulatory networks for AD genes have been identified by a combination of *in silico* promoter and multivariate analysis (15) and outlined 2 significant modules composed of 3 transcription factor (TF) families: CCCTC binding factor (CTCF), GC-box factors SP1/GC (SP1F), and EGR/nerve growth factor-induced protein C and related factors (EGFR)/zinc-binding protein factors (ZBPF; ref. 15). Our approach, on the contrary, aims at differentiation of TFs that specifically regulate either BACE-1 or ADAM10.

Therefore, we established a dual-promoter assay for simultaneous assessment of transcriptional activity of BACE-1 and ADAM10 to identify TFs balancing the

gene expression of these opponent enzymes in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Within our novel reporter gene assay, the signals derived from either promoter emerge from one vector, which makes normalization for transfection efficiency dispensable. We filtered candidate hits regarding to expression in the adult human brain by expressed sequence tag (EST) analysis. One of the newly identified, physiologically relevant selective inducers of *ADAM10* gene expression is the X-box binding protein 1 (XBP-1). XBP-1 is a transcriptional regulator activated by inositol-requiring enzyme 1- α (IRE1- α), one of the 3 endoplasmic reticulum (ER)-stress sensors, and specifically regulates the unfolded protein response (UPR). This transcription factor displayed a strong effect on the ratio of ADAM10- to BACE-1-promoter activity in our screening approach, and UPR has already been correlated to neurodegenerative disease in recently rising numbers of publications (reviewed in ref. 16). We investigated the underlying mechanism of ADAM10 regulation by XBP-1 in cell culture and demonstrate the consistency of our findings by quantitative analysis of mRNA from 2 AD mouse models and cortical tissue of AD postmortem samples.

MATERIALS AND METHODS

Generation of luciferase-reporter and expression vectors

ADAM10-promoter luciferase-reporter vector

The human *ADAM10*-promoter sequence comprising –2179 to +1 bp upstream of the translation initiation codon of the *ADAM10* gene (chromosome 15, NC_000015.9) was obtained by digestion with *NheI* and *BglII* from the previously described plasmid pCP53 AB.1 (17) and subcloned into the *NheI* and *BglII* site of the pGL 4.76 vector (Promega, Madison, WI, USA).

ADAM10-promoter UPR element (UPRE) deletion mutant (UPRE_{del})

The consensus sequence of the UPRE has been described by Wang *et al.* (18). A potential UPRE was identified within the *ADAM10*-promoter sequence at –308 bp. The UPRE_{del} was generated as follows: a UPRE_{del} fragment lacking the 3' part of the UPRE sequence (5' TCACGTGG3'; deleted part is underscored) was amplified from pGL4.76 ADAM10-promoter reporter vector using the primers UPRE_{for} (5'-TGAG-GAAGGAGGCGGAGG-3') and pGL4.76_{rev} (5'-GAGGCCCACT-GATCATGCG-3'). The obtained amplicon was digested with *BglII* and inserted as a replacement for the *PmlI* and *BglII* site flanked sequence of the pGL 4.76 ADAM10-promoter reporter vector.

BACE-1-promoter luciferase-reporter vector

The human *BACE-1*-promoter sequence (–2644 bp to +1 of 5' flanking region of the *BACE-1* gene, described by ref. 19) was amplified from chromosomal DNA of U373 cells and subsequently cloned in the *EcoICRI* and *BglII* site of the pGL 4.76 vector (Promega).

To determine the ADAM10- and BACE-1-promoter activity simultaneously and to circumvent differences in transfection efficiency, we established a dual-promoter construct with a *Renilla reniformis* luciferase cDNA dependent on the activity of the human *BACE-1* promoter and a firefly (*Photinus pyralis*) luciferase cDNA under the control of the human *ADAM10* promoter. The *ADAM10* promoter and firefly luciferase cDNA sequences were obtained by cleaving the pGL3 ADAM10-promoter construct CP53 AB.1 (17) with *NheI* and *SaII* and inserted into the *Bam*HI and *SaII* restriction sites of the pGL4.76 vector (Promega). The *BACE-1*-promoter sequence was obtained by digestion of the *BACE-1*-promoter luciferase-reporter vector (described above) with *KpnI* and *Bgl*II and subsequently integrated upstream of the *Renilla* luciferase coding sequence into the *KpnI* and *Bgl*II sites of the pGL 4.76 ADAM10-promoter construct.

APP-promoter luciferase-reporter vector

A reporter vector expressing a *Renilla* luciferase under the control of the human *APP* promoter (−2980 bp to +1 bp of translation initiation site; ref. 20) was generated by amplification of the promoter sequence from chromosomal DNA of SKNMC cells. The amplicon was ligated into the restriction sites *NheI* and *Bgl*II of the luciferase expression vector pGL4.76 (Promega).

Spliced XBP-1 expression vector

To generate an expression vector for the active spliced (s) form of XBP-1, the 26-bp intron in the sequence of the unspliced (u) XBP-1 expression vector (Origene, Rockville, MD, USA) was removed. PCRs were performed using the following primers: PCR1: XBP1s_for1, 5'-TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG-3', XBP1s_rev1, 5'-GTGACAACTGGGCCTGCACCTGCTGCG-GACTCAGCAGACC-3'; and PCR2: XBP1s_for 2, 5'-GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGGTGCAGGCCAGTTGTCAC-3', XBP1s_rev2, 5'-GGTCTTCTGGGTAGACCTGTG-3'.

Amplicons from PCR1 and PCR2 with overlapping sequences (underscored) were fused *via* a second PCR with primers XBP1s_for1 und XBP1s_rev2, resulting in an 817-bp fragment, which was digested with *SacI* and subsequently inserted instead of the 26-nt-containing sequence of the cDNA encoding the u form of *XBP-1* into the *SacI* site of XBP-1 expression vector.

Not splicable XBP-1 expression vector

The u XBP-1 mRNA forms 2 distinct hairpin loops (previously described in ref. 21), which contain splice donor and splice acceptor sites for the unconventional splicing by IRE1- α . We inserted 6 silent mutations to weaken base pairing in the second loop, which results in inhibition of the splicing process (see Fig. 2A); initially, the u XBP-1 expression vector was digested with *SacI*, and the XBP-1 sequence containing cDNA-fragment was subcloned into the pUC19 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA). The wild-type (WT) sequence of the second loop was replaced by an oligonucleotide adapter, which was inserted into the *Bsa*AI/*Nco*I site of the WT cDNA. The mutated sequence [not splicable (ns) XBP-1] was inserted into the pCMV6-XL5 vector (Origene) by *SacI* digestion. The following oligonucleotides were used to generate the oligonucleotide adapter: ns_XBP1_for, 5'-GCGCACCCCTCCAACAAGTACAGGCCAGTTGTACCCCTC-CAGAACATCTCCC-3', and ns_XBP1_rev, 5'-CATGGG-

GAGATGTTCTGGAGGGGTGACAACTGGGCCTGTACTTGT-TGGAGGGGTGCCG-3'.

All PCR-derived sequences were verified by restriction analysis and sequencing (SRD, Bad Homburg, Germany).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

For EMSA, the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used as recommended by the manufacturer. Oligonucleotides were biotinylated using the Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo Scientific). The sequences of oligonucleotides including potential UPRE and ER-stress-responsive element (ERSE)-like within the human ADAM10 promoter are as follows: UPRE, 5'-AACCTCTGTTACTTGTGACGTTAAGAAGTCGA-3' and 5'-TCGACTTCTTAACGTCACAAGTAACAGAGGTT-3'; and ERSE-like, 5'-GCCTCCCAAGCCCAATCCCAGCTCTCCGCCG-3' and 5'-CGGCGGAGAGCTGGGATTGGGCTTGGGAGGC-3' (potential binding sites are underscored). Nuclear protein extracts from s XBP-1-overexpressing human embryonic kidney (HEK) 293 cells were obtained using the NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Scientific). Protein-DNA complexes were separated on native 6% polyacrylamide gels containing 0.5× TBE buffer (50 mM Tris, 45 mM boric acid, and 0.5 mM Na₂-EDTA, pH 8.3). As gel running buffer, 0.5× TBE was used. After electrophoresis, nucleic acids and proteins were blotted onto Bio-dyne precut nylon membranes (Thermo Scientific) and fixed by ultraviolet (UV) irradiation using a Stratelinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Chemiluminescent signals of biotinylated molecules were captured using a CCD camera imaging system (Raytest, Straubenhardt, Germany).

Cell culture

Cell lines were maintained at humidified air (95%), 5% CO₂, and 37°C. The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was cultured in DMEM/F12 (Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% FCS and 1% glutamine (both GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). THP-1 Blue cells [human monocyte-progenitor cells stably transfected with an NFkB-dependent secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter; Invivogen, San Diego, CA, USA] were cultivated in RPMI medium (GE Healthcare) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 1% glutamine, 1% pen/strep, and 1% sodium pyruvate (GE Healthcare). Zeocin (300 µg/ml; Invivogen) was applied for THP-1 passage. The human astrogloma cell line U373, the HEK 293 cells, and the human neuroblastoma cell line IMR-32 were cultured in DMEM (GE Healthcare) supplemented with 10% FCS, 1% glutamine, and 1% sodium pyruvate. SH-SY5Y and U373 cells were passaged 2×/wk, 1:2–1:4; IMR-32 and HEK 293 cells were passaged 1:10–1:12; and THP-1 Blue cells were cultivated at a density of 2.4×10^5 cells/ml.

Screening of the transcription factor library

To identify potential modulators of ADAM10 and BACE-1 gene expression, we realized a screening approach including 704 expression vectors for human TFs (TF GFC transfection array; Origene). We performed a transient retrotransfection of dual luciferase reporter plasmid in combination with one of the 704 expression vectors or the empty vector pCMV6-XL5, respectively, in SH-SY5Y cells. Briefly, to each well of a 96-well plate containing 100 ng of TF expression vector, 20 µl Opti-MEM containing 75 ng of the dual luciferase vector was added. The DNA mixture was incubated for 20 min at room temperature. Opti-MEM (20 µl) containing 0.3 µl transfection reagent (Lipofectamine2000; Life Technologies, Darm-

stadt, Germany) was added to each well and incubated for 45 min at room temperature. Then, 1.5×10^5 cells/cm² surface area of the dish were seeded, and transfected cells were cultivated for 48 h. Cells were lysed in 20 μ l passive lysis buffer (Promega) per well, and lysis was promoted by freezing overnight at -20°C . *Renilla* and firefly luciferase activity was assessed using a reporter assay kit (Dual-Luciferase Reporter Assay; Promega) and the Fluostar Optima luminometer (BMG Labtech, Cary, NC, USA). The ratio of ADAM10-promoter activity (firefly luciferase) to BACE-1-promoter activity (*Renilla* luciferase) was calculated, and the transcriptional activity of empty vector (pCMV6-XL5; Origene)-transfected cells was set to 100%. Hits were considered as follows: values $>$ mean + SD (130%) or $<$ mean – SD (70%) of control transfected cells.

Transfection and luciferase assay

Cotransfections of XBP-1 expression plasmids (u XBP-1, s XBP-1, or ns XBP-1) together with respective reporter constructs were performed as described above. Luciferase activity was measured with *Renilla* or firefly luciferase assay kit (Promega) following the manufacturer's protocol. Relative light unit (RLU) values were normalized to protein content in the cell lysate, quantified by Bradford Nanoquant reagent (Roth, Karlsruhe, Germany) and a BSA standard curve. For time-resolved measurements of promoter activities, either ADAM10- or BACE-1-promoter reporter plasmid together with XBP-1 expression vector was transfected in SH-SY5Y cells. After 5 h, cell supernatant was replaced by medium containing 30 μ M EnduRen live cell substrate (Promega). Luminescence was measured at indicated time points within the living cells.

sRNAi transfection

SH-SY5Y cells were transfected with 50 ng XBP-1 expression plasmid or empty vector together with 50 ng luciferase reporter vector or a promoterless control construct. This was combined with 1 pmol XBP-1-specific sRNAi (HSS111392; Life Technologies) or scrambled control RNAi with medium GC content (Life Technologies). Cells were transfected using 0.5 μ l Lipofectamine2000 (Life Technologies) per well. Cells were harvested 48 h post-transfection and subsequently analyzed *via* luciferase-based assay as described above.

Stimulation and cell treatment

To induce ER stress, SH-SY5Y cells were treated with 10 μ M tunicamycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) or 1 μ M thapsigargin (Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany) for the indicated time points. To inhibit proteasomal activity, cells were incubated with 5 μ M MG132 (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) for 5 h. Splicing of u XBP-1 by IRE1- α was inhibited using 100 μ M STF083010 (Axon Medchem, Groningen, The Netherlands) for 6 h. For stimulation of THP-1 Blue cells with lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich), a concentration of 1 μ g/ml was used for indicated intervals. Additive effects of insulin on s XBP-1-evoked regulation of the ADAM10 promoter were analyzed by incubation of cells with 0.1 or 1 μ M human insulin (Sigma-Aldrich) for 48 h. Corresponding solvents were used for control treatment.

RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR

Total RNA from SH-SY5Y cells grown on 6-well plates was extracted using the RNA II Kit (Macherey&Nagel, Düren,

Germany) following the manufacturer's protocol. Samples were stored at -80°C and freshly diluted for application. RNA (100 ng) was subjected to real-time RT-PCR analysis, performed with the StepOne Plus thermocycler (Life Technologies) and QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). QuantiTect primer assays (Qiagen) were used for detection of the following genes: *ADAM10* (Hs_ADAM10_1_SG), *ADAM17* (Hs_ADAM17_1_SG), *BACE-1* (Hs_BACE1_1_SG), *APP* (Hs_APP2_SG), *Tubulin* (Hs_TUBB1_1_SG), and *18S rRNA* (Hs_RRN18S_1_SG). Obtained mRNA quantities of each reaction were calculated from calibration curve and normalized to those of the respective housekeeping gene (Tubulin, 18S rRNA). Normalized data were set in relation to control (empty vector-transfected cells or solvent treated control).

Preparation of whole-cell lysates and immunoblotting

SH-SY5Y cells were transiently transfected with the respective XBP-1 expression plasmid as described above. Cells were seeded on 12-well plates at a density of 5×10^5 cells/well. After the respective incubation time, cells were lysed in LDS sample buffer (Life Technologies) containing 10% DTT (1 M) and 1 $\times$ protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Samples were incubated for 10 min at 95°C and stored at -20°C . Lysates were assayed for protein content using the Nanoquant reagent (Roth, Karlsruhe, Germany). Protein of whole-cell lysate (20 μ g), protein of mouse tissue homogenate (whole brain or pancreas; 50 μ g), or nuclear hippocampal extract (5 μ g; BioCat, Heidelberg, Germany) was separated on 10–14% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membrane at 100 V for 2 h. Immunodetection was carried out by blocking the membranes for 1 h in blocking solution and incubating overnight at 4°C with the appropriate primary antibody at a dilution of 1:1000. Antibodies were as follows: XBP-1 rabbit polyclonal antibody (ab37152; Abcam, Cambridge, UK), histone deacetylase 1 (HDAC1) rabbit polyclonal antibody (PA1-860; Thermo Scientific), β -actin rabbit polyclonal antibody (A2066; Sigma-Aldrich), ADAM10 rabbit polyclonal antibody (Merck, Darmstadt, Germany), ADAM17 rabbit polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA), phospho-IRE1- α (pSer724) rabbit polyclonal antibody (PA1-16927; Thermo Scientific), and APP N-terminal mouse monoclonal antibody (6E10; Covance, Madison, WI, USA) or APP C-terminal antibody (described previously; ref. 22). Blots were incubated with respective secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (HRP; Thermo Scientific), and signals were obtained by applying SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) were captured using a CCD camera imaging system (Raytest). Quantitative analysis was carried out with AIDA image analyzer 4.26 software (Raytest).

ELISA measurements

SH-SY5Y cells were transfected with s XBP-1 expression plasmid or empty vector as described above. After 32 h, transfection medium was exchanged, followed by a secretion period of 16 h. Conditioned medium was collected and centrifuged for 5 min at 1500 rpm. For the detection of human A β peptides, an ELISA kit was used as recommended by the manufacturer [human A β 1–x Assay Kit (L); IBL, Hamburg, Germany]. The concentration of A β peptides was determined using 100 μ l of cell supernatant, and obtained values were normalized to protein content of respective whole-cell lysates.

α -Secretase activity assay

Pelleted SH-SY5Y cells were resuspended in 1 ml HEPES buffer (pH 7.5). For solubilization, samples were passed

through needles (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with decreasing diameters. Samples were dispensed in triplicate onto a black 96-well plate using 100 μ l/well, corresponding to 100 μ g protein content. After addition of 3 μ M α -secretase substrate (Calbiochem, Darmstadt, Germany), fluorescence was detected with excitation wavelength at 340 nm and emission wavelength at 490 nm using a Safire2 fluorometer (Tecan, Männedorf, Switzerland) as described previously (23).

PhosTag gels for detection of phosphorylated IRE1- α

To examine the induction of ER stress due to incubation of SH-SY5Y cells with tunicamycin, we applied the Phos-tag gel system as previously described (24). For detection of IRE1- α (phosphorylated and unphosphorylated), we used a specific rabbit polyclonal antibody (14C10; Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

SEAP assay

In THP-1 Blue cells, LPS-mediated signaling *via* Toll-like receptor 4 (TLR4) can be detected by measuring the activity of a SEAP, the secretion of which is controlled by a NF- κ B- and AP1-dependent promoter reporter vector. Cells were incubated with LPS as described above. Quanti Blue substrate (Invivogen) was used for detection of SEAP production according to the manufacturer's protocol, using 20 μ l cell supernatant and 180 μ l Quanti Blue substrate incubated for 16 h at 37°C and 300 rpm. Absorbance was measured at 620 nm, and values of control (water)-treated cells were set to 100%.

Detection of XBP-1 splicing forms

Total RNA (1 μ g) extracted from SH-SY5Y cells was reverse transcribed using the MMLV kit (Epicenter, Madison, WI, USA). The resulting cDNA was digested with either *Bgl*II or *Pst*II overnight and precipitated by ethanol and 3 M sodium acetate (pH 4.8). Dried DNA was dissolved in water, and 100 ng cDNA was subjected to PCR using the SYBR Green kit (Qiagen). Primers for detection of total *XBP-1* were 5'-CCTTGAGTTGAGAACAGG-3' and 5'-CCACATATATACCAAGCCCC-3'. *Pst*II cleaves the u *XBP-1* sequence within the 26-bp intron. Therefore, in *Pst*II-treated samples, the s form of *XBP-1* (416 bp) will mainly be detected. *Bgl*II cleaves within the *XBP-1* sequence outside of the primer binding sites. Consequently, *Bgl*II digestion allows the detection of both u and s *XBP-1* (amplicons of 442 and 416 bp). The respective PCR sample (2 μ l) was separated on 8% acrylamide gels. Gels were stained with ethidium bromide and detected with UV light using the Bio Doc-It imaging system (UVP, Upland, CA, USA).

Evaluation of the XBP-1 metabolism in AD mode mice

Brains of APP/presenilin 1 (PS1) mice (2, 6, or 9 mo of age) or 5xFAD mice (1, 2, or 9 mo of age) and those of respective nontransgenic littermates were stored in RNA-later (Qiagen) at -80°C, and total RNA from brain tissue was isolated using the RNeasy Lipid Tissue Minikit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Samples were freshly diluted for application, and 100 ng of RNA was subsequently subjected to real-time RT-PCR analysis using the StepOne Plus thermocycler (Life Technologies) and QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen). The following primers were used for analysis: QuantiTect primer assay (Qiagen) *Adam10* (Mm_Adam10_1_SG), *18S rRNA* (Mm_Rrn18s_1_SG), *Adam17* (Mm_Adam17_1_SG); u *Xbp-1*: 5'-GCACTCAGACTATGTGCACCT-3' and 5'-GCCTCTTCAGATTCTGAGTCTG-3'; s *Xbp-1*: 5'-

TCTGCTGAGTCCGCAGCAGG-3' and 5'-GCCTCTTCA-GATTCTGAGTCTG-3'; *Ire1- α* : 5'-CCTGCAACCTTGACT-GTTTCC-3' and 5'-GCTATGGATCCCCAGCAGC-3'. Obtained mRNA quantities of each reaction were calculated from calibration curve and normalized to those of 18 S rRNA. Normalized data were set in relation to controls (nontransgenic littermates).

Evaluation of the XBP-1 metabolism in AD postmortem brains

Total RNA of frozen cortex tissue (BrainNet, Munich, Germany) was extracted using Trizol (Life Technologies) following the manufacturer's protocol. RNA (2 μ g) was reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) and subsequently subjected to PCR analysis performed with the thermocycler 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies) and Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies). Primers were used as follows: β -actin: previously described (25); *ADAM10*: 5'-GCAACTGAAACCTG GGAAA-3' and 5'-TTCCTTCCCTTGCA-CAGTCT-3'; *ADAM17*: 5'-ACCTGAAGAGCTTGTTTCATCG-3' and 5'-CCCTCTGCCCATGTATCTGT-3'; total *XBP-1*: 5'-GGGTTCCGCACAGAATTGAG-3' and 5'-TACCTAAGACCGC-CATAACT-3'; u *XBP-1*: 5'-GACGTCTCCACGTGCATCAGA-3' and 5'-TCTAAGTCTCAGACTATAGG-3'; s *XBP-1*: 5'-GGACGTGGAC-GACGCTGAG-3' and 5'-TCTAAGTCTCAGACTATAGG-3'; *IRE1- α* : 5'-ACCGACGGGAGTCTCTAATG-3' and 5'-TGGGTCTCTTCGTGCTTCTG-3'. The mRNA level for the respective gene was quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (26); data were normalized to β -actin mRNA levels, and the mean value of healthy controls was set to 100%.

In silico analysis

For further evaluation, candidate TFs identified with the dual-promoter assay were classified according to their expression levels in the CNS of adults by using databank information on EST profiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>). TFs were ranked by relative expression in the human brain compared with other tissues and, additionally, in adults in contrast to other developmental stages.

Conservation of UPRE binding element in the ADAM10 promoter

Promoter regions of human and murine *ADAM10* were extracted from the Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgibin/TRED/tred.cgi?process=home>) as follows: *ADAM10*: chr15: 56621111 [-700.299] (-) [human, *Homo sapiens*], and *Adam10*: chr9: 70908083 [-700.299] (+) [mouse, *Mus musculus*]. Sequence alignment was performed using ClustalX2 software (UCD, Dublin, Ireland).

Secondary structure prediction of u and ns XBP-1 mRNA

Prediction of mRNA secondary structure was performed with the online-tool GeneBee (http://www.genebee.msu.su/services/ma2_reduced.html).

Statistical analysis

Testing of statistical significance was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest or by unpaired Student's *t* test. For correlation analysis, the Pearson's correlation coefficient (*r*) was used. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Identification of transcriptional regulators of human ADAM10 and BACE-1 by a dual-reporter screening approach

To identify potential modifiers of the AD-relevant proteases ADAM10 and BACE-1 on the transcriptional level, a library containing 704 expression plasmids encoding for human TFs was analyzed. SH-SY5Y cells were cotransfected with respective TF plasmids and a novel vector, which allows simultaneous measurement of both promoter activities. Factors that influenced both ADAM10 and BACE-1 expression activity due to their general mode of action, such as GTF2I (general transcription factor 2 I) or the RNA-modulating enzyme PARN [poly(A)-specific ribonuclease] were excluded from ensuing analyses. The screening revealed 48 TFs, which display a specific modulation of ADAM10- to BACE-1-promoter activity relation (Fig. 1A). For a further classification, the identified TFs were ranked according to their relative expression levels in the adult human brain (Fig. 1B): 23 of the 48 TFs show a relatively high expression in the adult (>50 transcripts/ 10^6) as compared with embryonic state and also in brain tissue (>20 transcripts/ 10^6). Therefore, they represent the most probable factors potentially being involved in pathogenesis of AD (see Supplemental Table S1).

Within these 23 transcription factors, 4 are closely related to cellular stress responses: p53, which becomes activated by DNA damage; heat-shock factor 1 (HSF1) which transduces heat shock; activating transcription factor 4 (ATF4); and XBP-1. The latter 2 TFs are components of the signaling network of the UPR, which is activated on ER stress (27). All stress-related factors, except XBP-1, decreased the ratio of ADAM10- to BACE-1-promoter activity by their influence on one (HSF1) or both promoters (ATF4, p53). On the contrary, XBP-1 strongly enhanced ADAM10 transcriptional activity while not affecting the BACE-1 promoter (Fig. 1C).

Spliced XBP-1 isoform is responsible for the increase of ADAM10 gene expression in neuronal cells

The mRNA of XBP-1 is unconventionally spliced by the endonuclease IRE1- α due to ER stress signals, such as unfolded proteins (see Fig. 10 and refs. 28, 29). Loss of the 26-nt intron (Fig. 2A) leads to a shift in the open reading frame and subsequently leads to the synthesis of a protein with a higher molecular mass (54 kDa, s XBP-1). The weight gain is the result of the insertion of a transcriptional activation domain and the loss of a nuclear exclusion signal (30). The u mRNA gives rise to a smaller protein of ~ 33 kDa (u XBP-1) under nonstress conditions. While u XBP-1 revealed only a comparably slight

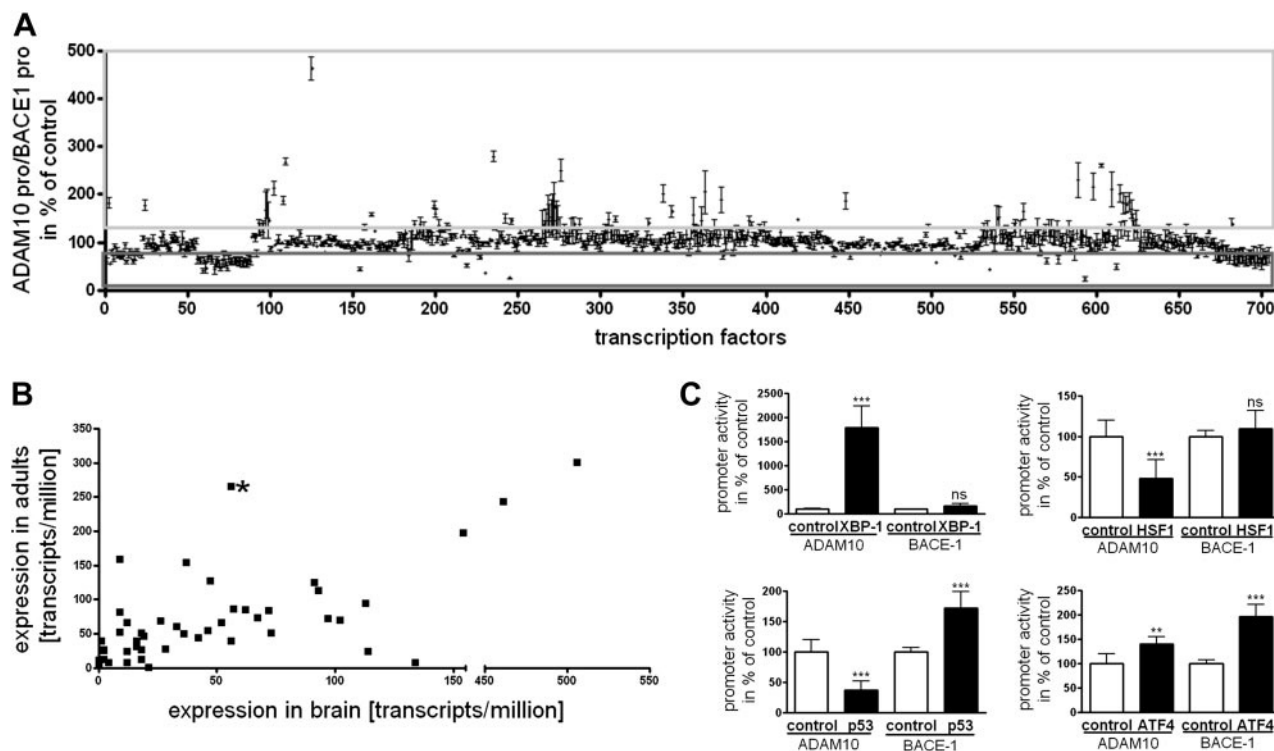


Figure 1. Identification of TFs modulating the ratio of ADAM10- to BACE-1-promoter activity in SH-SY5Y cells. A) Screening of the TF cDNA library analyzed with a dual-luciferase assay. Hits were considered as follows: calculated quotient $> 130\%$ (light gray box); or $< 70\%$ (dark gray box). B) EST profile analysis of selected TFs. Candidate TFs were ranked according to relative expression level in the adult brain, indicated in transcripts/ 10^6 . Asterisk indicates XBP-1, a central constituent of the UPR. C) Influence of selected stress-related TFs on ADAM10- or BACE-1-promoter activity: XBP-1, p53, HSF1, and ATF4. Ratios of ADAM10- to BACE-1-promoter activities were as follows: XBP-1, 899 ± 177 ($P < 0.001$); p53, 33 ± 11 ($P < 0.001$); HSF1, 76 ± 6 ($P < 0.001$); ATF4, 72 ± 8 ($P < 0.01$). Bars represent means $\pm$ SD from 3 independent experiments. ns, not significant ($P > 0.05$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Bonferroni posttest.

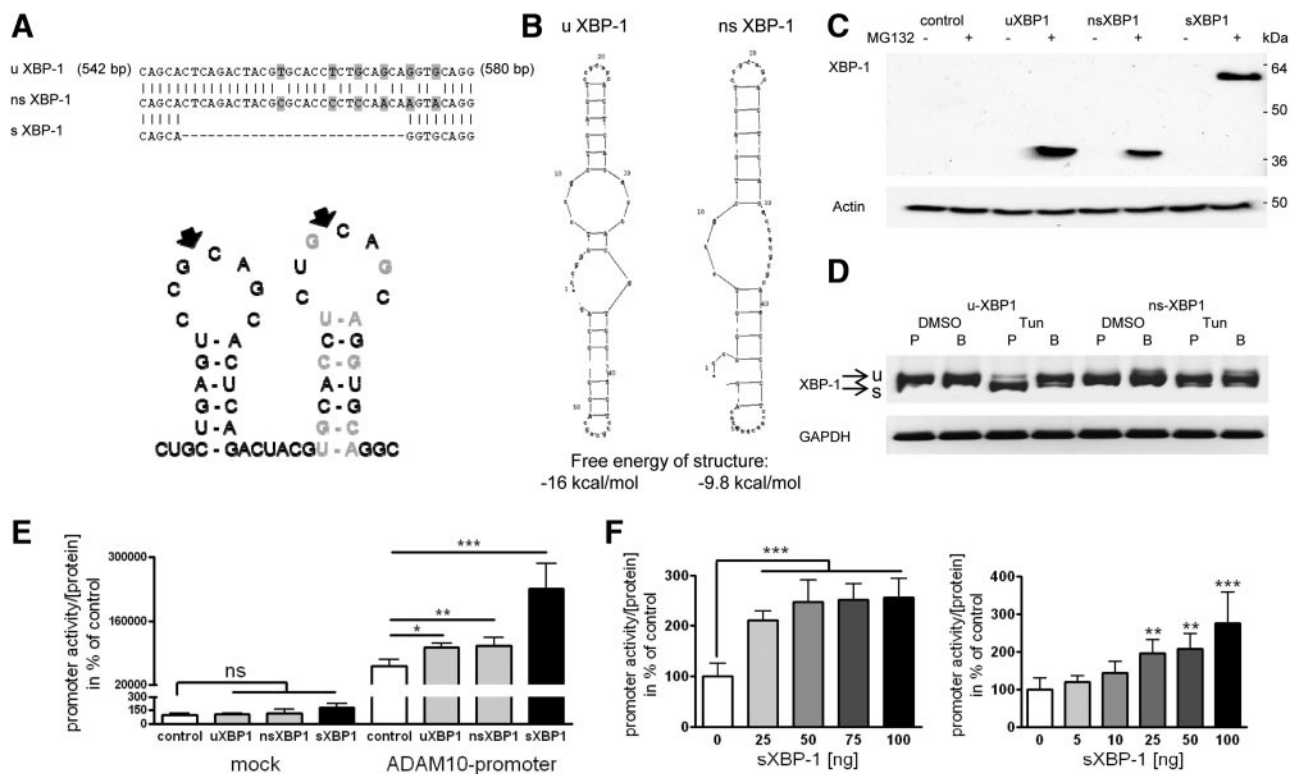


Figure 2. Characterization of XBP-1 variants and experimental validation regarding ADAM10-promoter activity. **A)** Sequence comparison of spliced and mutated XBP-1 mRNA with WT sequence of u XBP-1. s XBP-1 lacks the 26-nt intron. uXBP-1 mRNA forms 2 distinct hairpin loops, which contain splice donor and splice acceptor sites (indicated by arrowheads). Gray highlighted nucleotides indicate silent mutations in the ns XBP-1 sequence. **B)** Predicted mRNA secondary structures of u and ns XBP-1. **C)** Immunodetection of XBP-1 protein forms in transiently transfected SH-SY5Y cells. **D)** Demonstration of splice defect of ns XBP-1. SH-SY5Y cells (transfected with u and ns XBP-1 expression vectors) were treated with 10 μ M tunicamycin to induce ER stress. Samples were analyzed *via* splice-variant-specific RT-PCR (P, *Pst*I cleavage; B, *Bgl*II cleavage; see also Materials and Methods). **E)** Effect of the XBP-1 variants on ADAM10-promoter activity. Transcriptional activity was assessed in cells transfected with either the ADAM10-promoter reporter vector or a promoterless control (mock) vector together with respective XBP-1 expression plasmid or empty vector. **F)** Dose-dependent effect of s XBP-1 on the human ADAM10 promoter. s XBP-1 was reverse titrated with the u XBP-1 variant (left panel) or empty vector (right panel) up to a total amount of 100 ng DNA in the transfection experiment, and ADAM10-promoter activity was measured (respective amount of s XBP-1 plasmid is indicated). **E, F)** Experiments were performed 3 times independently in triplicate. Bars represent means $\pm$ SD. ns, not significant ($P > 0.05$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Bonferroni posttest.

effect of $\sim 65\%$ on ADAM10-promoter activity, s XBP1 strongly enhanced reporter expression up to 376% of mock-transfected cells after 48 h (Fig. 2E). Both u and s XBP-1 are rapidly degraded by proteolysis (see Fig. 2C, overexpressed proteins are only visible on inhibition of the proteasome by MG132 preincubation). Therefore, we cannot exclude the possibility that a small proportion of u XBP-1 might have been converted to s XBP-1 due to experimental conditions, such as stress evoked by the transfection procedure. However, cotransfection of an unsplicable XBP-1 variant (ns XBP-1) derived by silent mutations in the XBP-1 cDNA (Fig. 2A) led to comparable values as measured for u XBP-1-transfected cells (Fig. 2E). Splice deficiency of ns XBP-1 was verified by variant-specific RT-PCR on tunicamycin-induced ER stress (Fig. 2D). The lack of splicing is probably due to the loss of the second hairpin loop in the mutated mRNA structure, which contains the splice acceptor site, as predicted by *in silico* analysis (Fig. 2B).

Dose dependency of s XBP-1-mediated ADAM10-promoter activation was demonstrated by titration with empty

vector (Fig. 2F, right panel): 25 ng s XBP-1 coding plasmid was sufficient to result in a significant enhancement of the ADAM10-reporter activity. As u XBP-1 has been suggested as a counterbalance for s XBP-1-evoked transcriptional function (30), we also measured ADAM10-promoter activity in cells transfected with reverse gradients of u and s XBP-1. None of the applied amounts of u XBP-1 expression plasmid was able to impair the s XBP-1-induced ADAM10-promoter activity (Fig. 2F, left panel). This is in accordance with our finding that u XBP-1 and ns XBP-1 both slightly enhance the ADAM10 promoter despite having a functional transcriptional activation domain.

Validation of the gene expression enhancement of the APP-shedase ADAM10 by XBP-1

For further examination of XBP-1-induced ADAM10-promoter activity, we performed a time-resolved measurement of both promoter activities, ADAM10 and BACE-1, by a single reporter assay using a life cell substrate (Fig. 3A). For all investigated time points, we

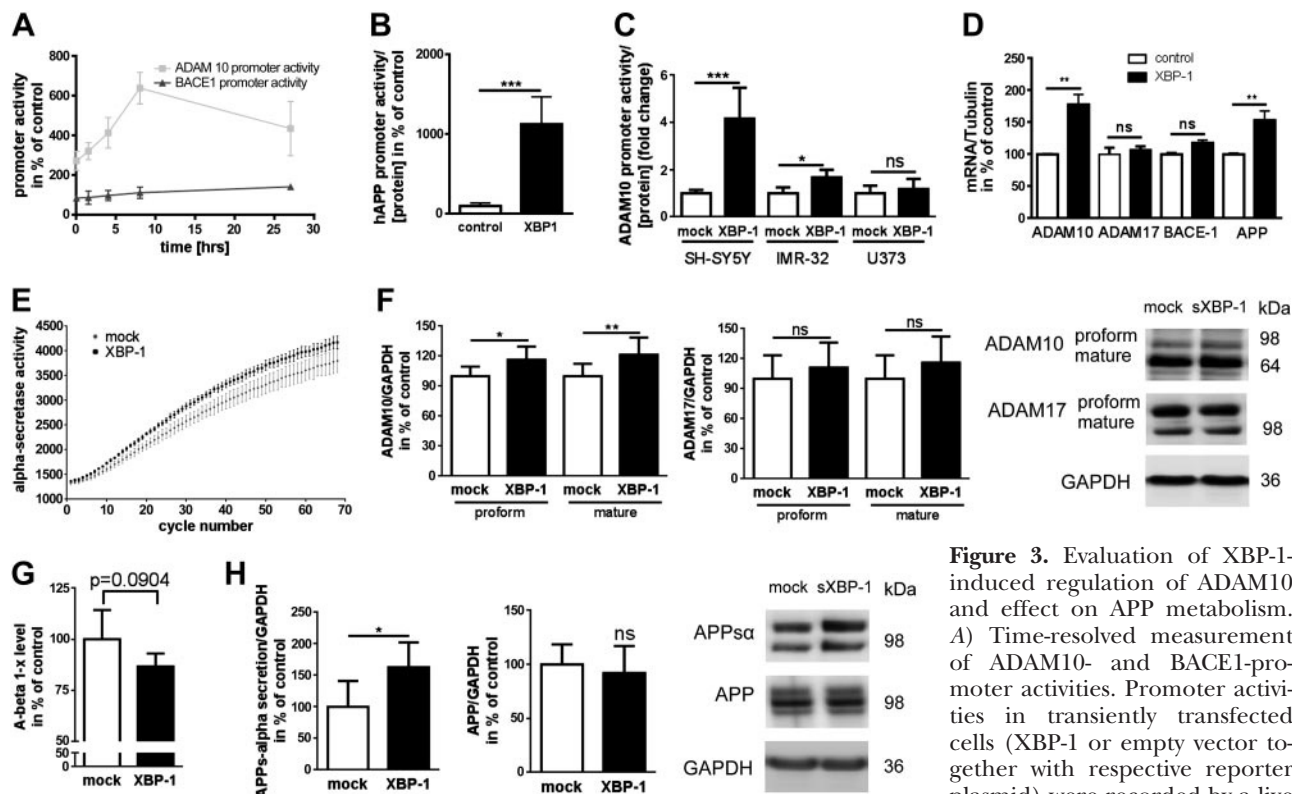


Figure 3. Evaluation of XBP-1-induced regulation of ADAM10 and effect on APP metabolism. *A)* Time-resolved measurement of ADAM10- and BACE1-promoter activities. Promoter activities in transiently transfected cells (XBP-1 or empty vector together with respective reporter plasmid) were recorded by a live

cell substrate. The experiment was performed 3 times independently; values denote means $\pm$ sd. *B)* Luciferase assay for human APP-promoter activity in XBP-1-overexpressing SH-SY5Y cells. Bars represent values of 3 independent experiments performed in triplicate. *C)* Evaluation of the XBP-1-mediated effect on ADAM10 transcriptional activity in different cell lines. Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y, IMR-32) or astrogloma cells (U373) were transiently transfected with s XBP-1 expression plasmid or empty vector together with luciferase-based reporter plasmid for the human ADAM10 promoter. Bars represent mean values of 2 independent experiments performed in triplicate. *D)* Evaluation of the effect of XBP-1 on ADAM10, ADAM17, BACE-1, and APP mRNA levels in SH-SY5Y cells using real time RT-PCR. Values represent means $\pm$ sd from 2 independent experiments performed in duplicate. *E)* Assessment of α -secretase activity on s XBP-1 overexpression in SH-SY5Y cells *via* fluorescent *in vitro* assay. *F)* Analysis of the effect of s XBP-1 overexpression on ADAM10 and ADAM17 protein levels. Cells were transfected with XBP-1 expression vector or empty vector, and samples were subjected to Western blot method using specific antibodies for human ADAM10 and ADAM17. GAPDH was used for loading control. *G)* Determination of A β levels. Conditioned medium from s XBP-1-overexpressing cells was subjected to ELISA measurement; protein content of cell lysates served as normalization. *H)* Evaluation of s XBP-1 overexpression on APP protein level and secretion of APPs- α in SH-SY5Y cells. Samples for analysis of APP protein level were the same as described in *F*. For detection, a specific APP C-terminal antibody was used. For determination of secreted APPs- α , supernatants of s XBP-1 or empty vector-transfected cells were collected, and samples of secreted proteins were subjected to Western blot using an APP N-terminal antibody. *F–H)* Bars represent means $\pm$ sd of 3 independent experiments conducted in triplicates. ns, not significant ($P > 0.05$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Bonferroni posttest.

obtained enhanced ADAM10-promoter-driven luciferase expression in XBP-1-cotransfected cells as compared with mock-transfected cells, peaking at 8 h after transfection. The BACE-1 promoter did not respond to the overexpressed TF during the whole observation period.

Retinoic acid, an enhancer of ADAM10 expression (17), led to a combined up-regulation of ADAM10 and its substrate APP (31). To identify such a potential common regulation for the UPR mediator XBP-1, a luciferase assay with an APP-promoter-driven reporter was conducted: XBP-1 overexpression resulted in strongly enhanced APP-promoter activity of 1127% as compared with mock-transfected cells (Fig. 3*B*). Moreover, s XBP-1-overexpressing SH-SY5Y cells showed a significant increase of APP mRNA levels of 154% as compared with empty vector-transfected cells (Fig. 3*D*). However, the effect could not be confirmed on the

protein level (Fig. 3*H*). This might indicate that while APP gene transcription is influenced by s XBP-1, a post-translational regulatory mechanism counterbalances the induction.

To further analyze the specificity of the XBP-1-mediated effect on ADAM10 transcriptional activity, we performed luciferase reporter experiments in different cell types. Both neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y and IMR-32) responded to XBP-1 overexpression by an increase of ADAM10-promoter activity to 4.2- and 1.7-fold, respectively. On the contrary, ADAM10 transcriptional activity was not elevated in the astrogloma cell line U373 (Fig. 3*C*).

Results obtained by reporter gene assays were verified by quantitative real-time RT-PCR of SH-SY5Y cells transiently transfected with XBP-1: ADAM10 mRNA levels significantly increased to 178% as compared with

mock-transfected cells (Fig. 3D). Regarding protein level, both the proform and the mature ADAM10 reached statistically significance at 117 and 122%, respectively, compared with mock-transfected cells (Fig. 3F). In addition, we analyzed ADAM17 protein level; overexpression of s XBP-1 showed no significant effect on both the proform and the mature ADAM17 (Fig. 3F). The increase of ADAM10 expression was substantiated by detection of the α -secretase-dependent APP proteolysis product APPs- α ; its secretion was increased to 163% in XBP-1-overexpressing cells compared with empty vector-transfected cells (Fig. 3H). s XBP-1 overexpression in SH-SY5Y cells resulted in a slight reduction of secreted A β peptides, which did not reach statistical significance (Fig. 3G). However, when α -secretase activity was measured by a fluorescent *in vitro* assay, signals were significantly enhanced using membrane fractions derived from XBP-1-transfected cells as compared with mock-transfected cells (Fig. 3E).

Contribution of UPR and ERS elements in s XBP-1-induced ADAM10 up-regulation

In silico analysis of the human ADAM10-promoter sequence revealed 4 TF binding sites (Table 1) potentially being involved in UPR-related activation of ADAM10 gene expression; we identified 2 potential UPREs (18, 32) located at -308 and -626 bp upstream of the translation initiation start site. XBP-1 binds to the TGACGTGG/A sequence of the UPRE as a homodimer without the involvement of the cofactor nuclear transcription factor-Y (NF-Y; ref. 29). Both identified binding sites are conserved, with only 1 nt deviating from the described consensus sequence. Furthermore, one ERSE-like sequence (33, 34) at -464 bp and an ERSE II-like sequence (35) at -591 bp were identified within the ADAM10-promoter sequence. Theoretically, the ERSE site has the conserved sequence CCAAT-N₉-CCACG. The 9-nt spacing between both consensus motifs has been demonstrated to be quite important for their functionality. Therefore, the identified binding site within the ADAM10 promoter is not well conserved by having only 1 nt located between both binding motifs. The ER-stress-related TF ATF6 specifically binds to the CCACG sequence of the ERSE motif, if the general TF NF-Y has bound to the CCAAT part of the

sequence (36). However, XBP-1 is also able to bind to this sequence instead of ATF6 (29, 33). The ERSE II has been shown to be occupied NF-Y dependently by ATF6 (35) or NF-Y independently by XBP-1 (37). The half site of the motif ATTGG is not well conserved within the human ADAM10-promoter sequence, while the CCACG is fully conserved.

As a first step to identify DNA sequences relevant for s XBP-1 binding to the human ADAM10 promoter, we deleted the 3' half site of the well-conserved UPRE, positioned within the core promoter region (-308 bp, Fig. 4A). We chose especially this specific UPRE site for deletion, because the majority of XBP-1 recognition motifs are located within the 500 bp 5' to the transcription start site of the target genes, with the greatest enrichment within the first 200 bp (38). The luciferase-based promoter assay revealed that this mutated ADAM10 promoter still was inducible by s XBP-1 (UPRE_{del}; Fig. 4B). Basal and induced activity of the mutated ADAM10-promoter sequence compared with the vector with the WT-promoter sequence was generally lowered. This might be due to the functional upstream stimulatory factor (USF) binding site in proximity to the mutated sequence (-317 bp; ref. 17), which probably has been affected by deletion of the respective nucleotides. Subsequently, we analyzed the contribution of both ERSE-like sequences and the remaining UPRE by cotransfection of reporter plasmids with truncated versions of the ADAM10 promoter (previously described in ref. 17) with s XBP-1 expression vector; the reporter vector comprising the complete promoter sequence (-2179 to +1 bp) was generally less active than the constructs starting at -433 bp correlating to the translational repressor identified in the 5' untranslated region (UTR; ref. 39). The XBP-1-evoked ADAM10-promoter activity was significantly decreased in the promoter constructs lacking the UPRE at -626 bp revealed by fold-induction analysis (Fig. 4C). Nevertheless, the effect of the overexpressed TF was still present if the ERSE-like sequence at -464 bp was included in the promoter sequence. Thus, the UPRE at position -626 bp and also the ERSE-like element at position -464 bp might be involved in transduction of XBP-1 transcriptional activation of the ADAM10 gene. To further analyze the contribution of either binding

TABLE 1. Characterization of potential XBP-1 binding sites within the human ADAM10-promoter sequence

Binding site	Theoretical sequence	ADAM10 promoter		Present in reporter plasmid
		Sequence	Position	
UPRE	TGACGTGG/A	TCACGTGG	-308 to -316	CP53 AB.1
ERSE	CCAAT-N ₉ -CCACG	CCAATCCCAGC	-464 to -475	CP53 AB.1, CP 30.1, CP 31.3, CP 34.1
ERSE II	ATTGG-N-CCACG	ATCTTCCACG	-591 to -601	CP53 AB.1, CP 30.1, CP 31.3
UPRE	TGACGTGG/A	TGACGTTA	-626 to -634	CP53 AB.1, CP 30.1

Four potential binding sites for XBP-1 were identified within the human ADAM10-promoter sequence. Two UPREs and 2 ERSE-like sites are located in the range from -634 to -308 bp upstream of the translation initiation site. However, since the spacing between the ERSE sites is important for their activity, the ERS-like element is not well conserved within the ADAM10-promoter sequence, and the ERS II-like element lacks conservation in the consensus motif ATTGG. Table displays the theoretical sequences compared with the sequences identified within the human promoter. In addition, the respective reporter vectors harboring one or more potential binding sites are denoted (see Fig. 4).

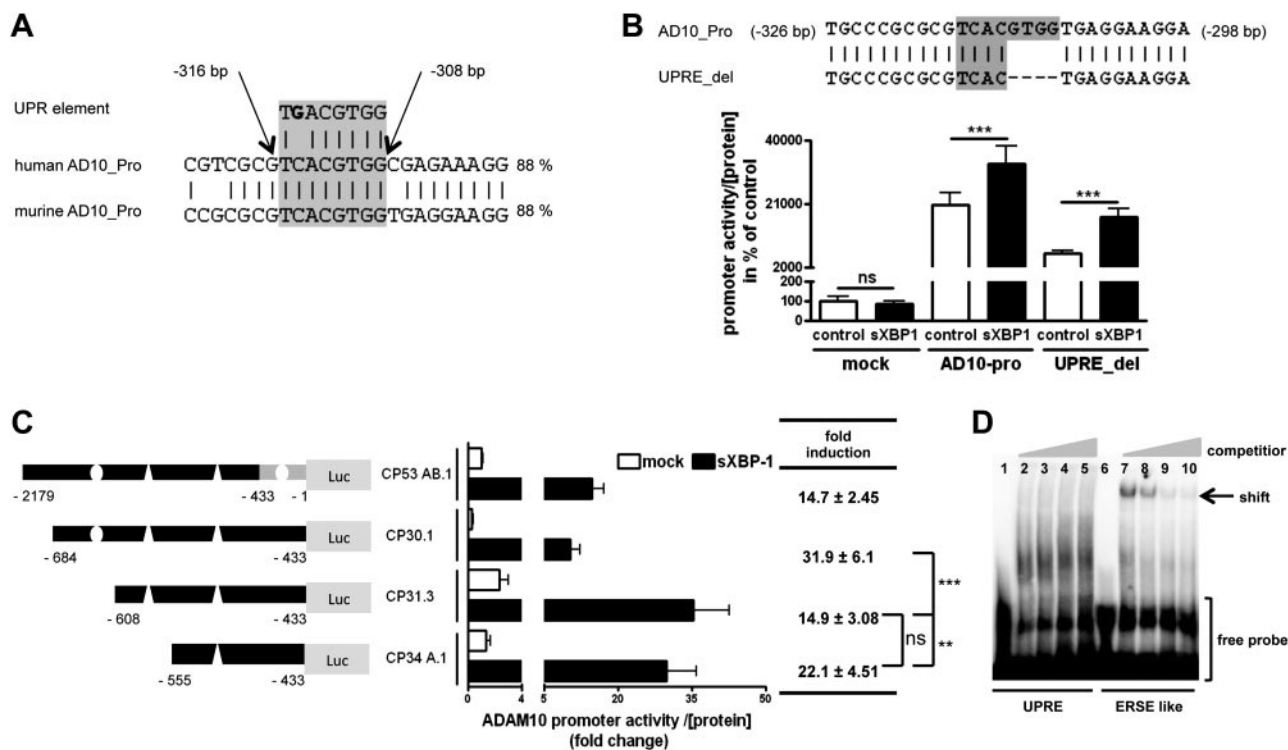


Figure 4. Identification and characterization of putative XBP-1 binding sites within the human *ADAM10*-promoter sequence. **A)** A putative UPRE is conserved in the range of the human and murine *ADAM10* core-promoter sequence (−308 bp upstream of the translation initiation site). **B)** Contribution of the conserved UPRE to the s XBP-1-mediated effect on the *ADAM10* promoter. The reporter vector with the mutated UPRE, lacking the 3' part of the UPRE (UPRE_del), together with s XBP-1 plasmid or empty vector, was transiently transfected in SH-SY5Y cells. Samples were assayed for luminescence *via* luciferase-reporter assay. **C)** Luciferase-reporter assay for truncated *ADAM10*-promoter reporter plasmids. Four potential binding sites for XBP-1 or related UPRE-mediating transcription factors were identified (see Table 1; blank oval, UPRE; blank wedge, ERSE- or ERSE II-like). **B, C)** Values represent means ± SD of 2 independent experiments performed in triplicate. ns, not significant ($P > 0.05$). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; Bonferroni posttest. **D)** EMSA for the potential XBP-1 binding sites UPRE and ERSE-like within the human *ADAM10*-promoter sequence. Respective biotinylated double-stranded oligonucleotides were incubated with nuclear fraction of s XBP-1-overexpressing HEK 293 cells in the absence (lanes 1 and 6) or presence of increasing amounts of respective unlabeled oligonucleotides as competitor (20-, 200-, and 400-fold molar ratio; UPRE, lanes 2–5; ERSE-like, lanes 7–10). Protein-DNA complexes were separated from the free DNA probe by electrophoresis in a native polyacrylamide gel, and chemiluminescent signals were visualized by HRP-coupled streptavidin conjugate.

site, we performed EMSA. Incubation of biotinylated oligonucleotides including the potential UPRE or ERSE-like sequence together with nuclear extracts of s XBP-1-overexpressing cells revealed a shift due to DNA-protein binding for the ERSE-like sequence. This binding was dose-dependently attenuated with increasing amounts of respective unlabeled oligonucleotide (Fig. 4D).

Effect of ER stress on ADAM10 mRNA level

ER stress can be provoked in cells by different approaches. Tunicamycin, for example, inhibits N-glycosylation and leads to accumulation of proteins in the ER. Thapsigargin interferes with the calcium ion release from the ER and leads subsequently to ER-stress response. Both pharmacologically induced ER-stress conditions led to a transient generation of s XBP-1 in SH-SY5Y cells as demonstrated by RT-PCR (see Fig. 5A). The active form of XBP-1 occurs on incubation with thapsigargin or tunicamycin after 1 and 2 h, respec-

tively. Both ER-stress inducers significantly enhanced the ADAM10 mRNA level 1.5- or 1.4-fold at early time points (2 h for tunicamycin, 6 h for thapsigargin). The effect was reversible, and mRNA amounts returned to unstimulated levels within 18 h after beginning of treatment. This coincides with the loss of detectable levels of s XBP-1 mRNA amounts after prolonged incubation with tunicamycin (Fig. 5A). In thapsigargin-treated cells, s XBP-1 was still detectable after 18 h; nevertheless, ADAM10 mRNA was comparable to control-treated cells at this time point. When STF083010, a specific IRE1- α inhibitor, was added to cells in which ER stress was evoked by thapsigargin, the maturation of u XBP-1 mRNA into its active form was blocked (Fig. 5B). Under these conditions, the effect of XBP-1 on *ADAM10* gene expression was completely inhibited.

The effect of ER-stress induction on ADAM10 transcriptional level was also confirmed on the protein level. The determination of the active, phosphorylated enzyme IRE1- α (Fig. 5D) verified the successful activation of the ER-stress pathway by Tunicamycin. Under

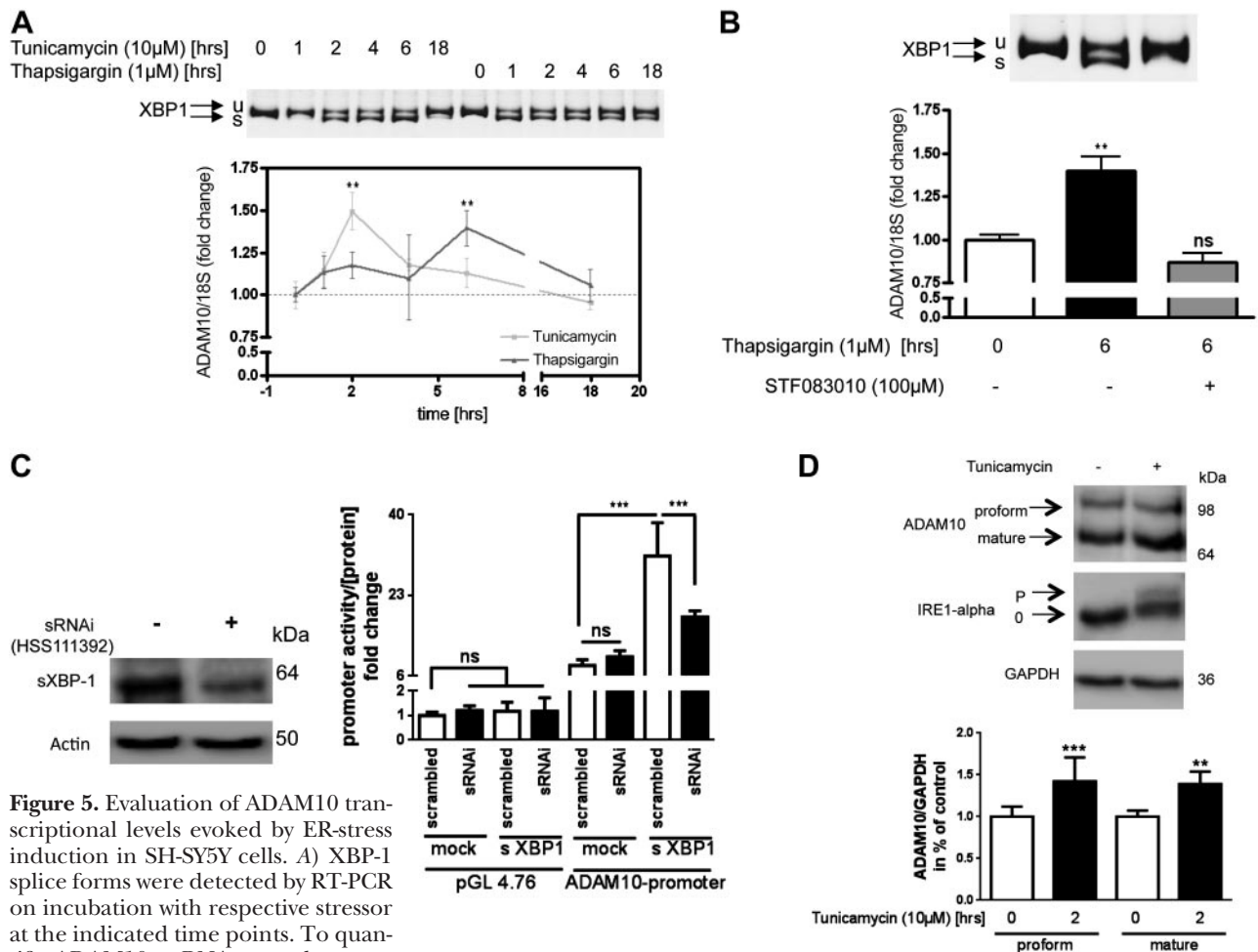


Figure 5. Evaluation of ADAM10 transcriptional levels evoked by ER-stress induction in SH-SY5Y cells. *A*) XBP-1 splice forms were detected by RT-PCR on incubation with respective stressor at the indicated time points. To quantify ADAM10 mRNA, samples were subjected to real-time RT-PCR analysis. *B*) Effect of the IRE1- α inhibitor STF083010 on ADAM10 mRNA level in ER-stressed SH-SY5Y cells. u and s XBP-1 mRNAs were detected as described above. *A*, *B*) Bars represent means $\pm$ SE of 2 independent experiments performed in duplicate. *C*) Effect of sRNAi-mediated knockdown of XBP-1 on ADAM10-promoter activity. Knockdown was verified by Western blot using a specific XBP-1 antibody. Detection of actin served as loading control. s XBP-1 expression plasmid or empty vector was transfected together with ADAM10-promoter reporter construct or respective promoterless plasmid in combination with sRNAi (HSS111392; Invitrogen) or scrambled control sRNAi. Samples were analyzed *via* luciferase-based measurement. *D*) Evaluation of the effect of ER-stress induction on ADAM10 protein level. SH-SY5Y cell were incubated with tunicamycin or solvent control for 2 h. ADAM10 protein level was assessed by immunoblot method using a specific antibody for human ADAM10. For verification of successful ER-stress induction, active, phosphorylated IRE1- α was detected using Phos-tag gel system (P, phosphorylated; 0, unphosphorylated). *C*, *D*) Bars represent values of 2 independent experiments performed in triplicate. ns, not significant ($P > 0.05$). $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; Bonferroni posttest.

these conditions, the proform and mature ADAM10 level were increased to 142 and 139% as compared with solvent-treated cells. To further substantiate these findings, we performed XBP-1-knockdown experiments: ADAM10-promoter activity was induced $\sim$ 4-fold on s XBP-1 overexpression, while the effect was significantly diminished $\sim$ 0.6-fold when active XBP-1 was knocked down with specific siRNA (Fig. 5C).

Synergistic regulation of ADAM10-promoter activity by insulin signaling and s XBP-1

Besides unfolded proteins themselves, different signal transduction pathways, such as LPS-TLR4 or insulin signaling, have been described to contribute to the

UPR. LPS-derived stimulation of TLR4 was reported to interfere with components of the ER-stress signal transduction: LPS activates IRE1- α and consequently the splicing of XBP-1 in J774 cells (ref. 40; see Fig. 9). This effect is based on the successive recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), NADH-oxidase 2 (NOX2), and reactive oxygen species (ROS) to TLR4, as demonstrated in MyD88-knockout mice (40). To investigate a potential implication of TLR4 signaling in XBP-1-regulated ADAM10 gene expression, we treated the monocyte precursor cell line THP-1 with LPS for 4 and 24 h, respectively. LPS-induced signal transduction was confirmed by a NF- κ B-dependent SEAP reporter assay (Fig. 6A). Instead of elevated ADAM10 mRNA amounts, we rather observed

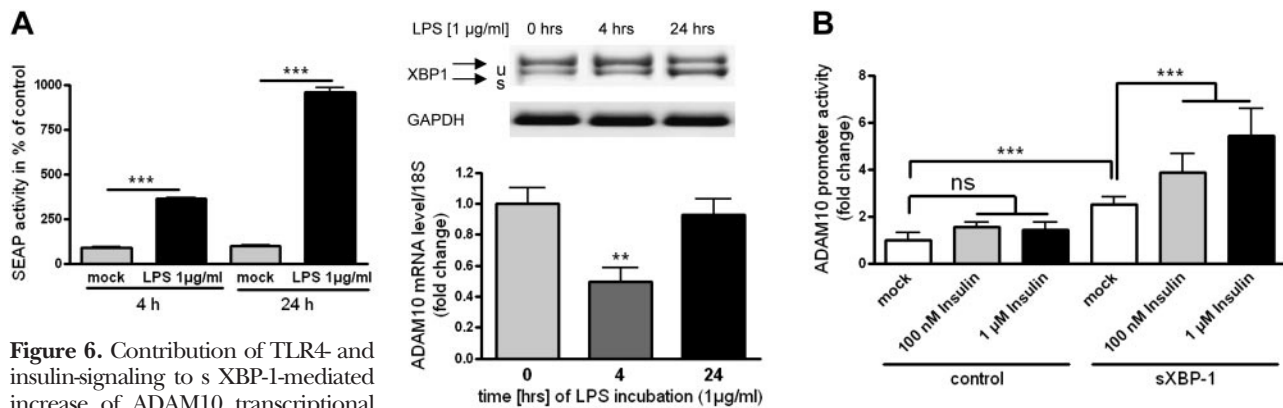


Figure 6. Contribution of TLR4- and insulin-signaling to s XBP-1-mediated increase of ADAM10 transcriptional activity. *A*) TLR 4 activation *via* LPS was verified by a SEAP assay in THP-1 cells. ADAM10 mRNA levels were detected in cells treated with 1 µg/ml LPS for indicated time points using real-time RT-PCR analysis. *B*) Influence of insulin treatment on s XBP-1-induced ADAM10-promoter stimulation. SH-SY5Y cells were transfected with ADAM10-promoter reporter and s XBP-1 or empty vector (mock) and subsequently treated with insulin for 48 h. To circumvent a saturation-effect on ADAM10-promoter activity 25 ng s XBP-1 expression vector were used in these experiments. Results are represented as means $\pm$ SD. ns, not significant ($P > 0.05$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Bonferroni posttest.

a decrease on 4 h incubation with LPS, which returned to levels of solvent-treated controls on prolonged incubation of 24 h. When analyzing s XBP-1-specific RT-PCR amplicates in LPS-treated cells, it became obvious that THP1 cells contain detectable amounts of the active XBP-1 splice form already at $i = 0$ h (Fig. 6A). In addition, LPS activates several TFs that might mask the s XBP-1 effect on the ADAM10 promoter, for example NF κ B and activator protein 1 (AP1), as shown by the activation of the NF- κ B- and AP1-dependent SEAP reporter in THP-1 cells (Fig. 6A).

Insulin is another physiological coregulator of s XBP-1-evoked gene transcription; on binding of insulin to its receptor, p85 becomes activated and heterodimerizes with s XBP-1 (ref. 41; see Fig. 9). This drives translocation of s XBP-1 to the nucleus and therefore enhances its transcriptional potency. Incubation of cells expressing the ADAM10-promoter reporter solely with insulin did not result in enhanced promoter activity (Fig. 6B). On the contrary, combined cotransfection with s XBP-1 expression plasmid and insulin treatment of cells strongly enhanced transcription of the reporter. Insulin contributed synergistically to the s XBP-1-mediated increase of the ADAM10-promoter activity in a dose-dependent manner; induction analysis revealed a 1.5- and 2.2-fold increase of the ADAM10 transcriptional activity for incubation with 100 nM or 1 µM insulin, respectively, compared with solvent-treated cells (Fig. 6B).

Analysis of XBP-1 metabolism in AD model mice

To further validate the physiological effect of the cell culture-based data regarding XBP-1-mediated regulation of ADAM10, brain tissue from 2 different AD mouse models (5xFAD, ref. 42; APP/PS1, ref. 43) were analyzed. Due to mutated *APP* and *PS1* genes, mice develop first pathological changes at ~ 1 mo (5xFAD) and 6 mo (APP/PS1), respectively (42, 44). We ana-

lyzed XBP-1 metabolism and ADAM10 as well as ADAM17 expression in brain samples from mice. For our analysis, we chose different ages: 2, 6, and 9 mo for APP/PS1 mice and 1, 2, and 9 mo for 5xFAD mice. Nontransgenic littermates served as controls for appropriate time points. mRNA levels of s and u XBP-1, as well as IRE1- α , were significantly increased as compared with nontransgenic mice at 6 mo of age for APP/PS1 mice (Fig. 7A, D, E). Analysis of s XBP-1 level in 5xFAD mice at 1 mo of age confirmed an early induction of UPR (Fig. 7F). At this time point, the amount of ADAM10 mRNA was also significantly enhanced ~ 2 -fold (APP/PS1) and 3-fold (5xFAD) as compared with nontransgenic littermates (Fig. 7D, G). Elevation of ADAM17 expression level did not reach statistical significance in 6-mo-old APP/PS1 mice, but was strongly induced (5-fold) in 5xFAD mice at 1 mo of age. Analysis of brain samples derived from 2-mo-old APP/PS1 mice revealed that ADAM10, ADAM17, and XBP-1 metabolism was unaffected at this early stage (Fig. 7A–E). s XBP-1, ADAM10, and ADAM17 mRNA levels in 5xFAD mice at 2 mo of age were comparable to WT (Fig. 7F–H); analysis of older 5xFAD mice (9 mo of age) showed a significant reduction of s XBP-1 and ADAM10 mRNA level. The ADAM17 expression level in the transgenic mice reached basal levels of WT littermates (Fig. 7F–H). A significant reduction of s and u XBP-1 in 9-mo-old APP/PS1 mice occurred as compared with control animals. ADAM10, ADAM17 and IRE1- α levels were revised to WT levels at this age (Fig. 7A–E). In accordance with early increase in s XBP-1, we also observed an increase of phosphorylated IRE1- α in 5xFAD transgenic mice as compared with WT at the age of 1 mo (1.7-fold, Fig. 7I). This enhanced activation was clearly attenuated at an advanced age (0.7-fold, 9 mo).

Our results indicate that XBP-1 metabolism, together with ADAM10 mRNA amount, is elevated in brain tissue from transgenic mice compared with nontransgenic littermates at early time points of pathological changes.

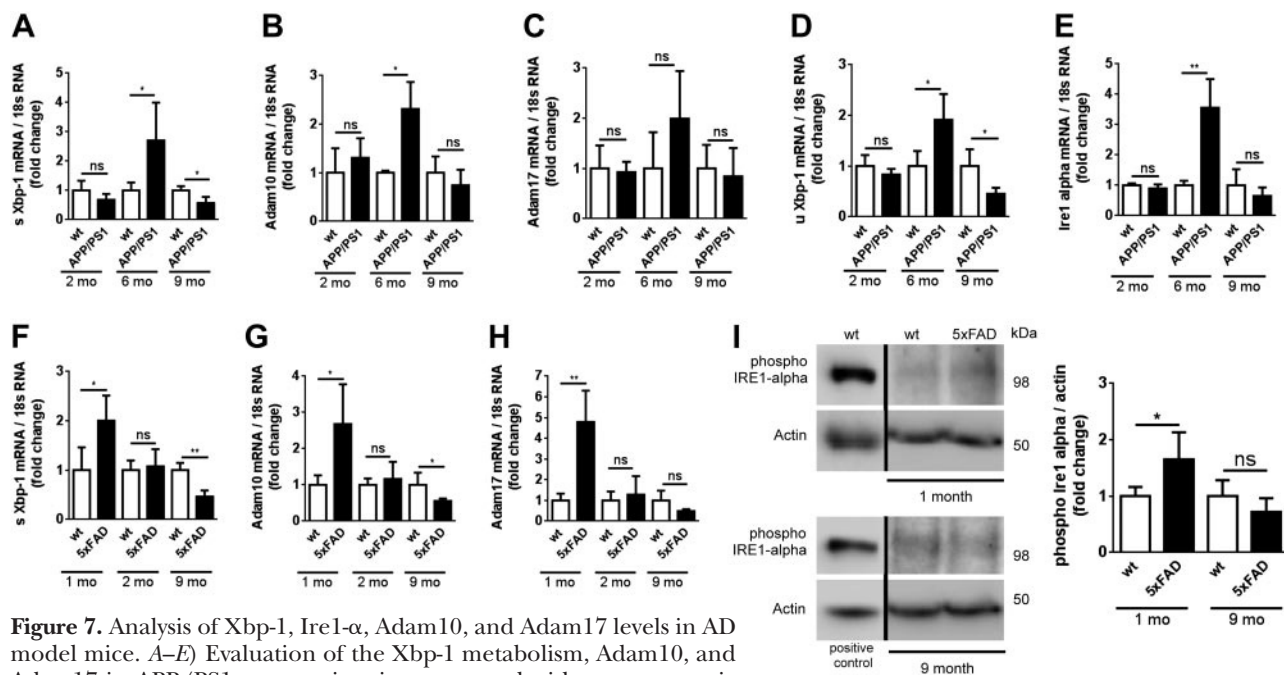


Figure 7. Analysis of Xbp-1, Ire1- α , Adam10, and Adam17 levels in AD model mice. *A–E*) Evaluation of the Xbp-1 metabolism, Adam10, and Adam17 in APP/PS1 transgenic mice compared with nontransgenic littermates. mRNA levels of s Xbp-1 (*A*), Adam10 (*B*), Adam17 (*C*), u Xbp-1 (*D*), and Ire1- α (*E*) were detected using real-time RT-PCR. Obtained values were normalized to those of 18 S rRNA and set in relation to nontransgenic littermates. *F–H*) Analysis of s Xbp-1 (*F*), Adam10 (*G*), and Adam17 (*H*) mRNA levels in 5x FAD mice. *I*) Determination of active IRE1- α in 5x FAD mice. Brain samples were subjected to immunoblot analysis using phospho-IRE1- α antibody. Pancreatic tissue served as a positive control for antibody specificity (24); the respective signal was visualized using shorter exposure time than for brain. Age of the respective animals is indicated. Transgenity was confirmed by PCR. Values are given as means $\pm$ SD with $n = 4$ for each group of animals. ns, not significant ($P > 0.05$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Bonferroni posttest.

During prolonged AD-like pathology, the system is counterregulated; consequently, mRNA levels of s XBP-1 and ADAM10 decreased in mice at 9 mo of age in both models.

XBP-1 correlates with ADAM10 expression, and its metabolism is affected in AD postmortem brain tissue

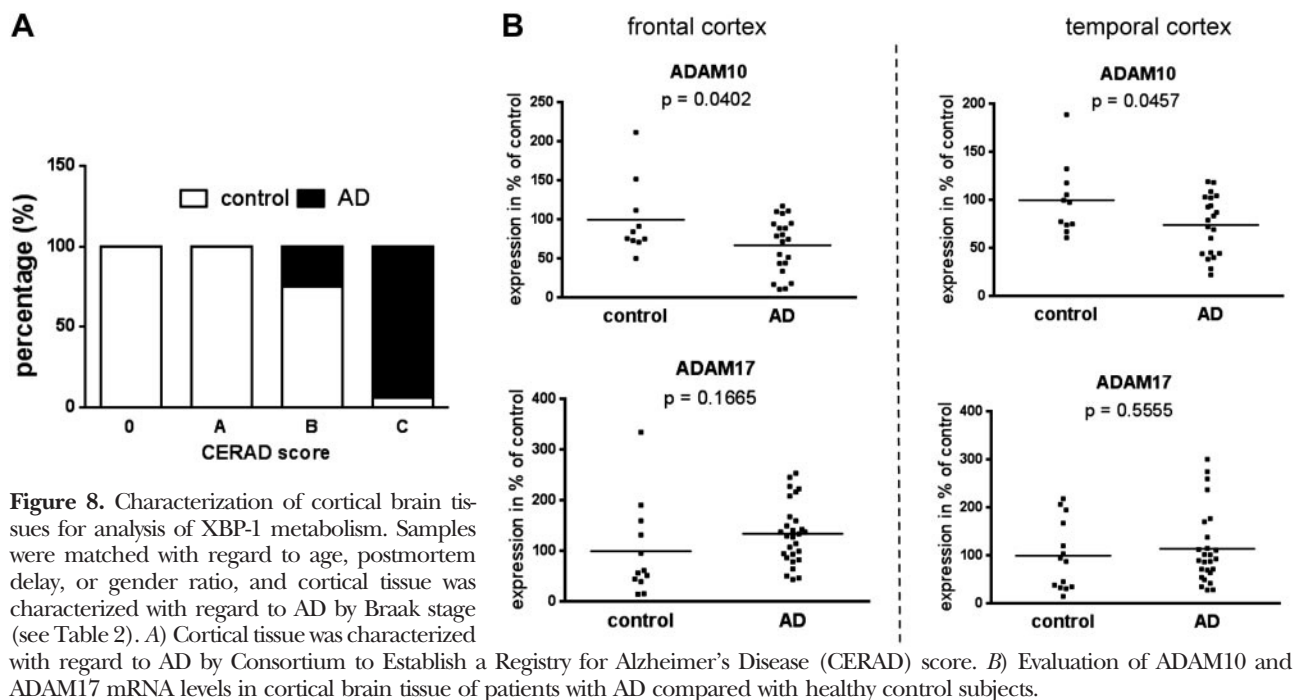
Active XBP-1-induced ADAM10-promoter activity in neuronal cell lines and parallel enhancement of ADAM10 and XBP-1 signaling was obtained in AD model mice at early disease stages. We therefore compared expression levels of active XBP-1 and ADAM10 in samples derived from postmortem cortical tissue of patients with AD and healthy control subjects. Both sample groups were matched according to age and gender; the postmortem delay period revealed no statistically significant differences (**Table 2**). In addition, cortical samples were characterized regarding AD pathology by Braak stages (control group: 71% stage 0–II; AD group: 93% stage V–VI; **Table 2**) and Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) scores (control group: 64% scores 0 or A; AD group: 100% scores B or C; **Fig. 8A**). In frontal as well as temporal cortex tissue of patients with AD, a significant decrease of ADAM10 mRNA level, as compared with controls, was observed, which is in accordance with previous reports (11, 45), whereas ADAM17 level was unaffected in both tissues (**Fig. 8B**). In the control group, we found no correlation of ADAM10 mRNA and

s XBP1 expression (**Fig. 9B**, Pearson's coefficient of $r = 0.0932$), but in AD samples, a moderate but significant correlation was observed (Pearson's coefficient of $r = 0.3120$). Regarding IRE1- α , which splices XBP-1, in both groups, healthy control subjects and patients with AD, a significant correlation with ADAM10 amount was found (**Fig. 9B**). This coincides with an up-regulation of IRE1- α in temporal as well as frontal cortical tissue samples from patients with AD patients in comparison to control samples (**Fig. 9A**). Interestingly, albeit IRE1- α -coding mRNA was induced 3- to 4-fold, s XBP-1 mRNA, as measured by splice-variant-specific RT-PCR, was reduced in both tissue types in patients with AD patients. In the temporal cortex, a reduction of $\sim 28\%$, which did not reach statistical significance, was obtained. In the frontal cortex, s XBP-1 was reduced significantly to 75% as compared with controls (**Fig.**

TABLE 2. Characterization of cortical brain tissues

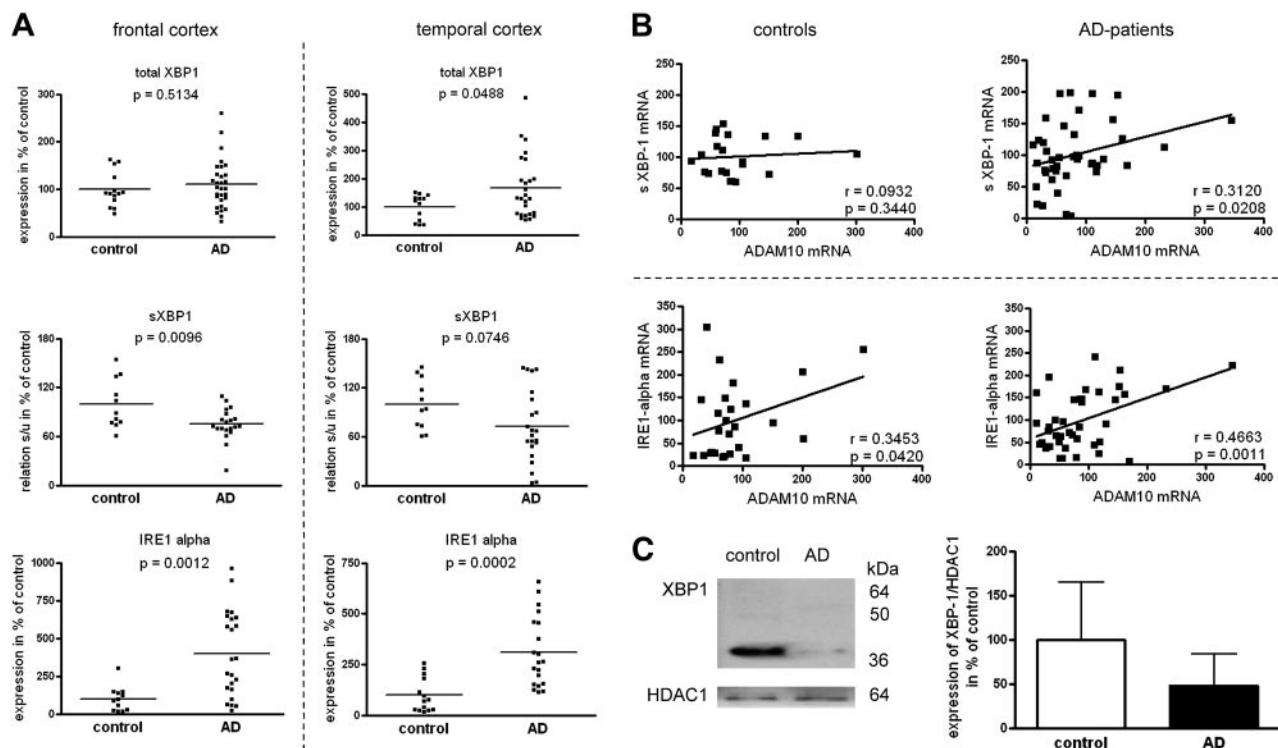
Parameter	Control	AD	<i>P</i>
<i>n</i>	14	30	
Age (yr)	77 $\pm$ 8.27	78 $\pm$ 6.90	0.68
Postmortem delay (h)	25.2 $\pm$ 8.05	27.5 $\pm$ 14.62	0.68
Male:female ratio	0.75	0.76	—
Braak stage			
0–II	10	0	—
III–IV	4	2	—
V–VI	0	28	—

See **Fig. 8A**.



9A). The amount of total XBP-1 (u and s) was unaffected in the frontal cortex area of patients with AD as compared with healthy controls; for temporal tissue, an increase to 165% was observed.

In samples of hippocampal nuclear extracts, we analyzed the XBP-1 protein amount; the XBP-1 antibody, which binds to an epitope included in both splice forms of XBP-1, detected a protein of ~36 kDa (Fig.



9C). This protein band was reduced in both AD samples analyzed in comparison to the age-matched controls even if not reaching statistical significance ($P=0.424$) due to the lack of further samples. s XBP-1 has a theoretical molecular mass of 54 kDa and u XBP-1 of 33 kDa (Fig. 3C). Both protein species are degraded on ubiquitinylation, but s XBP-1 reveals a higher half-life time (28). However, the detected protein displays a similar molecular mass as observed for the overexpressed u XBP-1 (Fig. 3D) and therefore probably represents the unspliced protein. Nevertheless, these results in addition indicate a deregulation of XBP-1-mediated UPR in AD brains and its potential contribution to failure in ADAM10 up-regulation under pathological conditions.

DISCUSSION

In patients with prodromal or manifested AD, a decrease in the amount or catalytic activity of ADAM10 has repeatedly been reported (reviewed in ref. 10). As BACE-1 activity or protein amount seems to increase, this potentially leads to a misbalance within the proteolytical processing of APP and augmented release of A β peptides. In our study, we unraveled 48 TFs by screening a library of 704 expression vectors that significantly modulate the ratio of ADAM10- to BACE-1-promoter activity (see Results).

Single regulatory effectors for gene expression of both enzymes have been investigated before; for example, miRNAs that regulate the translational level of BACE-1 (46, 47) and ADAM10 (48, 49) were identified, and sequences interfering with translational capacity have additionally been characterized within the respective 5'-UTR sequences (39, 50). Previously, we investigated binding of retinoic acid receptor heterodimers within the ADAM10 promoter (31, 51), and several other TFs, such as USF-1 and SP1, were determined to function as expression enhancers (17). For BACE-1, Yin Yang 1 (YY-1) and SP1 have been shown to induce its transcription (19, 52). In addition, the ER-stress-related factor eukaryotic translation initiation factor 2 α (*eIF-2 α*), which activates ATF4 signaling, revealed enhancing properties in regard to the BACE-1 promoter (53). Sp1 and YY-1, as well as ATF4, were reidentified in our screening approach as BACE-1-promoter stimuli (2.5-fold induction by YY-1; 3.4 fold induction for SP1, data not shown explicitly), verifying the approach we used.

While other stress mediators, such as p53, HSF1, or ATF4, resulted in shifting the ratio in favor of BACE-1, we identified XBP-1 as a selective inducer of ADAM10 transcriptional activity. This effect was reproducible in another neuronal cell line (IMR-32), whereas the XBP-1-mediated increase in ADAM10-promoter activity was not present in the human astrogloma cell line U373. The difference in the observed effect size between both neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y: 4.2-fold; IMR-32: 1.7-fold) might be caused by using different neuronal cell types (SH-SY5Y: neuronal-type; SKNMC: intermedi-

ate type). These findings might indicate a neuron-specific regulation of ADAM10 by active XBP-1 but have to be elucidated further.

A genome-wide approach to identify targets of XBP-1 in myotubular, plasma, and pancreatic cells revealed that XBP-1 is able to bind the promoters of several genes involved in APP trafficking and processing, such as *nicastrin* or *presenilin 1* (*PSEN1*) (38). XBP-1 has a relatively high expression in the human adult brain, as shown by EST analysis. Moreover, it has been demonstrated in mice of all developmental stages to be expressed prominently in the hippocampus (54), a region with high vulnerability in AD progression in humans. In addition, synthesis of active s XBP-1 has been shown to be induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neurons and to contribute to neurite outgrowth (54), albeit the molecular downstream targets of neuronal XBP-1 signaling have not been investigated in detail. We show here that ADAM10-promoter activity and mRNA synthesis are induced by active s XBP-1 in a time-dependent manner. These results were consolidated by significant increase of both the proform and mature form of ADAM10 protein on s XBP-1 overexpression, whereas ADAM17 protein levels remained unaffected. As a consequence, the secretion of the ADAM10-dependent APP proteolysis product APPs- α together with enzyme activity was significantly increased in XBP-1-overexpressing cells. However, measurement of secreted A β levels showed only a slight tendency of decrease, which did not reach statistical significance ($P=0.09$). This might be caused by a regulating effect of active XBP-1 on components of γ -secretase complex, such as PSEN1 (38). Nevertheless, analysis of APP protein levels in s XBP-1 overexpressing cells revealed that increased APPs- α release is not due to elevated APP protein expression but rather is derived from regulation of α -secretase. Chemically evoked ER stress mimicked the effect of s XBP-1 on the transcription of the α -secretase ADAM10. The up-regulation of *ADAM10* gene expression was specifically blocked by an IRE1- α inhibitor, as well as an XBP-1-targeting siRNA.

Interestingly, u XBP-1 and an unsplicable mutant had a weak but statistically significant enhancing effect on the ADAM10-promoter activity, too. u XBP-1 signal transduction has been suggested as a negative regulator of UPR signaling (30, 55, 56). When we titrated s with u XBP-1, we observed a similar result as obtained for titration with empty vector, meaning that u XBP-1 has no negative effect on transcriptional activity of ADAM10. Tirosh *et al.* (57) reported that the expression of a specific target of XBP-1, ER-localized DnaJ (Erdj4), was fully restored by reconstitution of XBP-1-knockout mouse embryonic fibroblasts with WT XBP-1, and stabilized u XBP-1 accounts for the transcription of most of the 324 constitutive UPR targets (58). This indicates that u XBP-1 might contribute to target gene expression under certain circumstances. u XBP-1 protein and, in particular, its hydrophobic region are involved in the anchoring of its own mRNA to the ER membrane (59). As a result, the pre-mRNA can be

spliced considerably more easily, leading to a higher amount of transcriptionally active XBP-1, which might be a very rapid response to ER stress. This could explain the slight increase of ADAM10 transcriptional activity by overexpressing the u XBP-1 and even the unspliable construct in our experiments.

Four potential XBP-1 binding sites were identified within the human ADAM10-promoter sequence (2 UPREs, 1 ERSE II-like, and 1 ERSE-like; see Table 1). By deletion of the half site of the UPRE located at -308 bp in the core promoter sequence of *ADAM10*, we were able to exclude a possible contribution of this binding site. Furthermore, we were able to identify 2 potential responsive elements (UPRE at -626 bp and ERSE-like at -464 bp) potentially playing a role in mediating the XBP-1-specific effect on ADAM10 transcriptional activation by analyzing reporter constructs with truncated forms of the *ADAM10*-promoter sequence. EMSA confirmed that the ERSE-like sequence within the human *ADAM10* promoter is occasionally involved in binding a protein derived from s XBP-1-overexpressing HEK 293 nuclear fractions. The ERSE site has the conserved consensus sequence CCAAT-N₉-CCACG, and the spacing of 9 nt has been reported to be mandatory for activation by ATF6 and NF-Y (29). Recently, a novel ERSE sequence has been reported, which is regulated by XBP-1 and comprises a spacing of 26 nt between binding responsive elements CCAAT and CCACG (60). Therefore, although the ERSE-like sequence within the ADAM10 promoter is lacking 8 bp from the usual spacer, it might be responsible for the s XBP-1-specific effect on *ADAM10* gene expression.

Our finding that ADAM10 is targeted by s XBP-1 signaling is consistent with the reported decrease in production of A β peptides under ER stress (61) and the enhanced amounts of α -secretase-derived C83 membrane stub of APP (62). It has been shown that binding of LPS to TLR4 triggers XBP-1 splicing (40); however, this does not lead to typical target gene activation within ER-stress signaling but induces cytokine production in macrophages (63). In this concern, it is of note that LPS did not lead to enhanced *ADAM10* gene expression in monocyte precursors, although we were able to detect s XBP-1. These results are consistent with the finding that overnight incubation of primary human keratinocytes with LPS also resulted in unchanged ADAM10 mRNA levels (64).

Another pathway that interferes with the transcriptional enhancer function of s XBP-1 is the insulin signaling cascade; binding of insulin to its receptor leads to the formation of a XBP-1/p85 complex, which facilitates entry into the nuclear compartment and therefore increases the transcription of XBP-1 target genes (65, 66). In addition, insulin enhances XBP-1 expression by induction of transient ER stress (65). By a combinatory treatment of neuronal cells with insulin and s XBP-1 overexpression, we identified a synergistic effect of both on *ADAM10* gene expression. This is of special interest, because type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been defined as a risk factor for develop-

ing AD (2, 67). Insulin as well as insulin-like growth factor 1 (IGF-1) resistance and insulin receptor substrate 1 (IRS-1) deregulation were demonstrated in AD brains (1). A β itself was recently shown to inhibit the physiological phosphorylation of IRS-1 and therefore to impair insulin signaling (68). The up-regulation of ADAM10 by XBP-1 in the context of insulin signaling might therefore represent a physiological response to transient stress situations integrated into induction of ER capacity enlargement (reviewed in ref. 41).

It has been reported that the neurotoxic A β peptides activate ER-stress response *via* active s XBP-1, which facilitates neuroprotective effects in transgenic flies and cultured neurons (69). The protective nature of s XBP-1 in these models is due to the prevention of calcium accumulation in the cytosol. In general, the ER-stress response is activated to protect the neuron from damage by a disturbed cellular homeostasis (70). Our results indicate that at early points of pathological changes, s XBP-1 levels were significantly increased in the brain of 2 different transgenic mouse lines (APP/PS1 and 5xFAD) in comparison to WT mice. This, in consequence, was accompanied by increased ADAM10 mRNA and might indicate a functional interplay of XBP-1-mediated signaling with the α -secretase at an early stage of the disease. In contrast, we observed in a prolonged stage of AD-like pathology (mice at 9 mo of age), that s XBP-1 level was significantly decreased as compared with nontransgenic littermates. This consequently led to a return of ADAM10 expression to basal levels in APP/PS1 mice, whereas ADAM10 amounts were even decreased in the 5xFAD mouse line. These findings are consistent with an activation of the UPR as an early event regarding neurodegenerative processes, as depicted in human postmortem brain tissue (reviewed in ref. 71). In addition, we analyzed ADAM17 mRNA amounts in mouse brain; ADAM17 expression partially mimicked the expression of ADAM10, at least in 5xFAD mice at 1 mo of age. This might be caused by other regulatory factors within this mouse model, which influence the amount of ADAM17. For example, it has been previously reported that induction of ADAM17 is regulated by the ATF4, which belongs to one of the 3 ER-stress pathways but different from XBP-1 pathway (72). Data obtained from cell culture experiments indicate that ADAM17 is at least not regulated by s XBP-1. The changes obtained for s XBP-1 levels were paralleled by changes in IRE1- α mRNA levels in total mouse brain. It is noteworthy that examination of IRE1- α mRNA level is no direct indicator for enzyme activity even if a feedback mechanism exists whereby IRE1- α cleaves its own mRNA (73). Nevertheless, in 5xFAD mice, quantitation of phospho-IRE1- α directly mirrored the amount of its target s XBP-1.

Pronounced and sustained activation of stress signals in the brain in patients with AD has been reported. Concerning ER stress, it has been noted that intraneuronal A β oligomers cause cell death *via* ER-stress induction (74) and that ER-stress-induced apoptosis is potentiated by the intracellular soluble domain of APP (75).

Moreover, it has been reported that the ER-stress-related enzyme protein disulfide isomerase (PDI) is upregulated in patients with patients (76). It has been previously reported that the α -secretase ADAM10 is decreased in its expression and activity in patients with AD (11, 45). Coincident with this, we obtained a decreased amount of ADAM10 mRNA in human temporal and frontal cortex tissue from patients with AD, while ADAM17 expression was not affected. To investigate the role of XBP-1 signaling in the brain in dementia, we analyzed cortical mRNA samples of patients with AD in comparison to healthy control subjects; the effect of s XBP-1 on the human *ADAM10* promoter revealed from cell culture experiments was consolidated by a moderate correlation of s XBP-1 and IRE1- α mRNA with ADAM10 mRNA in the AD samples. For healthy controls, only a weak correlation of IRE1- α and ADAM10 mRNA was observed. We suggest that in dementia, ER stress in the brain is pathologically increased and the correlation is strengthened.

This coincides with the strong up-regulation of IRE1- α expression we obtained in frontal and temporal

cortex for AD samples as compared with age-matched healthy control samples. Nevertheless, the relative amount of active XBP-1 is rather decreased in both tissue types in patients with AD in comparison to healthy subjects. This result obtained from human brain samples is in accordance with our results obtained from samples of old mice with prolonged disease-like pathology. Obviously, despite up-regulation of IRE1- α expression, the pathologically disturbed brain is no more able to respond appropriately to ER stress. It has been reported that prolonged ER stress leads to a counterregulation of XBP-1 splicing (77), resulting in a diminution of s XBP-1 production and a decrease in target gene expression. This consequently leads to induction of apoptotic cell death (reviewed in ref. 78) instead of protection from stress-mediated triggers such as A β peptides.

It is of great interest that recently a C/G polymorphism at position -116 of the *XBP-1* promoter has been identified, which shifts the consensus motif ACGT to AGGT. This consequently results in an aberrant transcriptional activity and in reduced XBP-1 expres-

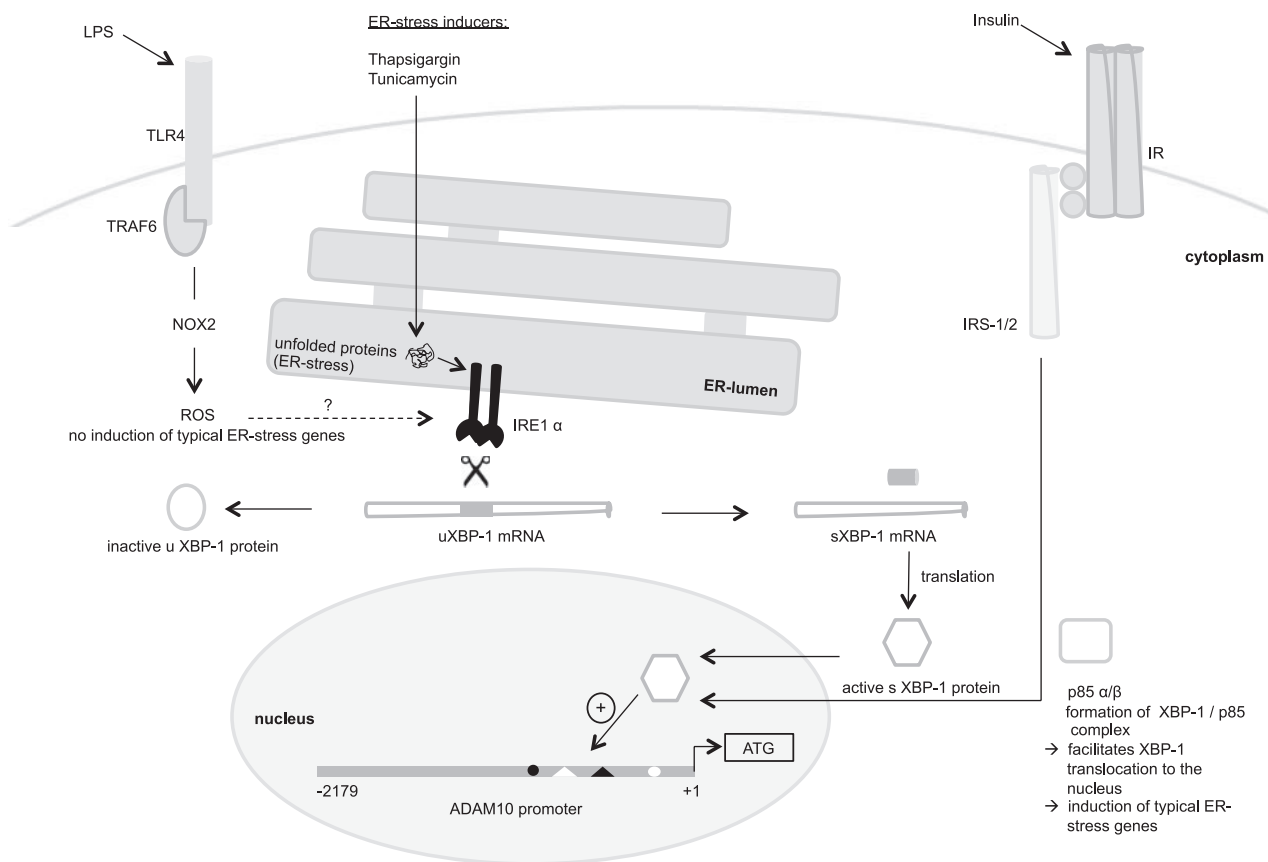


Figure 10. Schematic view of ADAM10-promoter activation by XBP-1. During ER stress, the occurrence of unfolded proteins in the ER lumen activates IRE1- α , thus catalyzing the unconventional splicing of u XBP-1 by removing a 26-nt intron. The resulting mRNA is translated into the active protein, which possesses transcriptional activity. Besides known target genes coding for ERAD proteins, we here report a yet unidentified target, ADAM10, which has a protective capability with regard to AD. We identified 2 potential binding sites (marked in black) probably playing a role in promoter activation by s XBP-1. LPS can mediate the formation of active XBP-1 *via* TLR4, TRAF6, NOX2, and ROS, which finally activate IRE1- α . However, the LPS-dependent pathway does not lead to the up-regulation of ADAM10 gene expression within the typical XBP-1 pathway. Insulin-dependent signaling promotes the formation of an s XBP-1/p85 complex, which facilitates nucleus import of s XBP-1. Consistent with this, insulin-triggered signaling is able to augment the effect of s XBP-1 on the human ADAM10 promoter.

sion (79). A recent publication by Liu *et al.* (80) reported an increased susceptibility for development of AD for carriers of the -116 C/G polymorphism in a Chinese population cohort. Cellular and animal models of other diseases evoked by amyloidogenic processes, such as Huntington's disease or Parkinson's disease (PD) have also been associated with activation of XBP-1 signaling (81–83). Sado *et al.* (84) demonstrated a protective effect of XBP-1 activation against PD-related insults.

In summary, our data demonstrate reliability of our newly applied dual-promoter reporter assay by recapitulation of already known regulators. In addition, we were able to identify XBP-1 as a physiological relevant TF by insulin-driven synergistic coregulation of the ADAM10-promoter activity *in vitro* (see Fig. 10) and by correlation of ADAM10 mRNA with components of XBP-1 signaling in human cortical tissue. We suggest that ER-stress-induced generation of s XBP-1, probably at early pathological stages, results in a short-term up-regulation of ADAM10. This might be interpreted as an attempt to counterbalance deregulation of APP processing, as A β peptides are one trigger of the UPR (74, 85). In future studies, it might be interesting to analyze patients with mild cognitive impairment for XBP-1 metabolism with regard to regulation of ADAM10. At this early stage of cognitive deficits and potential conversion to AD, an up-regulation of s XBP-1 and, consequently, ADAM10 would represent a possible protective mechanism that might delay disease. Integration of data obtained by our dual-promoter assay with bioinformatics resources and further evaluation of single identified TFs will help to understand what might lead to loss of proteolytic homeostasis in AD. Whether our findings open up a novel therapeutic strategy in AD needs further investigation due to concerted up-regulation of APP or other components of APP processing and trafficking. **FJ**

This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) in the framework of the National Genome Research Network (NGFN) and FKZ01GS08130, 01GS08125, and 01GS08129-5. The authors kindly thank C. Haass (Ludwig Maximilian University, Munich, Germany) for providing APP antibody 6687 and C. Pietrzik (Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany) for putting 5xFAD brain samples at their disposal. Author contributions: K.E. conceived the project and wrote the manuscript; S.R. performed cell culture experiments and analysis of mouse tissue and *in vitro* studies, analyzed the data, wrote the manuscript, and prepared the figures; M.G., T.H., and M.R. coordinated and designed the experiments with human samples; S.G. performed experiments with human samples and the fluorescent enzyme assay; S.G. and M.G. analyzed the respective data; F.S. and R.P. provided a critical evaluation of the experimental design and of the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., and Arnold, S. E. (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* **122**, 1316–1338
2. De la Monte, S. M. (2012) Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **9**, 35–66
3. Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012) The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **15**, 349–357
4. 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., and 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
5. Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S. F. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032
6. Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C. P., Glatzel, M., De Strooper, B., and Saffitz, P. (2010) The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J. Neurosci.* **30**, 4833–4844
7. Ozmen, L., Woolley, M., Albientz, A., Miss, M. T., Nelboeck, P., Malherbe, P., Czech, C., Gruninger-Leitch, F., Brockhaus, M., Ballard, T., and Jacobsen, H. (2005) BACE/APPV717F double-transgenic mice develop cerebral amyloidosis and inflammation. *Neurodegener. Dis.* **2**, 284–298
8. Mohajeri, M. H., Saini, K. D., and Nitsch, R. M. (2004) Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology. *J. Neural. Transm.* **111**, 413–425
9. Li, R., Lindholm, K., Yang, L. B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., and Shen, Y. (2004) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3632–3637
10. Endres, K., and Fahrenholz, F. (2012) Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. *Exp. Brain Res.* **217**, 343–352
11. Bernstein, H. G., Bukowska, A., Krell, D., Bogerts, B., Ansorge, S., and Lendeckel, U. (2003) Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J. Neurocytol.* **32**, 153–160
12. Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A., and Di Luca, M. (2002) α -Secretase ADAM10 as well as α APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol. Med.* **8**, 67–74
13. Olsson, A., Höglund, K., Sjögren, M., Andreasen, N., Minthon, L., Lannfelt, L., Buerger, K., Möller, H. J., Hampel, H., Davidsson, P., and Blennow, K. (2003) Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Exp. Neurol.* **183**, 74–80
14. Fellgiebel, A., Kojro, E., Müller, M. J., Scheurich, A., Schmidt, L. G., and Fahrenholz, F. (2009) CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **22**, 3–9
15. Augustin, R., Lichtenthaler, S. F., Greeff, M., Hansen, J., Wurst, W., and Trümbach, D. (2011) Bioinformatics identification of modules of transcription factor binding sites in Alzheimer's disease-related genes by in silico promoter analysis and microarrays. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 154325
16. Bernales, S., Soto, M. M., and McCullagh, E. (2012) Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **4**, 5
17. Prinzen, C., Müller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2005) Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* **19**, 1522–1524
18. Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R. J., and Prywes, R. (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275**, 27013–27020

19. Christensen, M. A., Zhou, W., Qing, H., Lehman, A., Philipsen, S., and Song, W. (2004) Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 865–874
20. Lahiri, D. K., and Ge, Y. W. (2004) Role of the APP promoter in Alzheimer's disease: cell type-specific expression of the beta-amyloid precursor protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1030**, 310–316
21. Nagashima, Y., Mishiba, K., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., and Koizumi, N. (2011) Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Sci. Rep.* **1**, 29
22. Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K., and Haass, C. (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
23. Grimm, M. O., Haupenthal, V. J., Rothhaar, T. L., Zimmer, V. C., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Lehmann, J., Grimm, H. S., and Hartmann, T. (2013) Effect of different phospholipids on alpha-secretase activity in the non-amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5879–5898
24. Qi, L., Yang, L., and Chen, H. (2011) Detecting and quantitating physiological endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol.* **490**, 137–146
25. Grimm, M. O., Grösgen, S., Rothhaar, T. L., Burg, V. K., Hundsdörfer, B., Haupenthal, V. J., Friess, P., Müller, U., Fassbender, K., Riemenschneider, M., Grimm, H. S., and Hartmann, T. (2011) Intracellular APP domain regulates serine-palmitoyl-CoA transferase expression and is affected in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 695413
26. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[Delta Delta C(T)] method. *Methods* **25**, 402–408
27. Schröder, M., and Kaufman, R. J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 739–789
28. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92–96
29. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881–891
30. Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006) pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* **172**, 565–575
31. Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., and Fahrenholz, F. (2005) Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J.* **272**, 5808–5820
32. Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* **4**, 265–271
33. Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741–33749
34. Roy, B., and Lee, A. S. (1999) The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1437–1443
35. Kokame, K., Kato, H., and Miyata, T. (2001) Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **276**, 9199–9205
36. Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6755–6767
37. Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J., and Mori, K. (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* **136**, 343–350
38. Acosta-Alvarez, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., and Dynlacht, B. D. (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell* **27**, 53–66
39. Lammich, S., Buell, D., Zilow, S., Ludwig, A. K., Nuscher, B., Lichtenthaler, S. F., Prinzen, C., Fahrenholz, F., and Haass, C. (2010) Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **285**, 15753–15760
40. Martinon, F., Chen, X., Lee, A. H., and Glimcher, L. H. (2010) TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* **11**, 411–418
41. Ueki, K., and Kadowaki, T. (2011) The other sweet face of XBP-1. *Nat. Med.* **17**, 246–248
42. Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., and Vassar, R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* **26**, 10129–10140
43. Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M. E., Jäggli, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P. M., and Jucker, M. (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* **7**, 940–946
44. Duyckaerts, C., Potier, M. C., and Delatour, B. (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* **115**, 5–38
45. Marcinkiewicz, M., and Seidah, N. G. (2000) Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.* **75**, 2133–2143
46. Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silaharoglu, A. N., Kauppinen, S., Delacourte, A., and De Strooper, B. (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6415–6420
47. Boissoneault, V., Plante, I., Rivest, S., and Provost, P. (2009) MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J. Biol. Chem.* **284**, 1971–1981
48. Augustin, R., Endres, K., Reinhardt, S., Kuhn, P. H., Lichtenthaler, S. F., Hansen, J., Wurst, W., and Trümbach, D. (2012) Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the Alzheimer-related gene ADAM10. *BMC Med. Genet.* **13**, 35
49. Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., Hsu, S. H., Datta, J., Kutay, H., Yadav, A., Nuovo, G., Kumar, P., and Ghoshal, K. (2009) MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J. Biol. Chem.* **284**, 32015–32027
50. Mihailovich, M., Thermann, R., Grohovaz, F., Hentze, M. W., and Zacchetti, D. (2007) Complex translational regulation of BACE1 involves upstream AUGs and stimulatory elements within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2975–2985
51. Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., and Fahrenholz, F. (2009) Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* **23**, 1643–1654
52. Nowak, K., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., Günther, A., Lüscher, B., Robitzki, A., Perez-Polo, R., and Rossner, S. (2006) The transcription factor Yin Yang 1 is an activator of BACE1 expression. *J. Neurochem.* **96**, 1696–1707
53. O'Connor, T., Sadleir, K. R., Maus, E., Velliquette, R. A., Zhao, J., Cole, S. L., Eimer, W. A., Hitt, B., Bembins, L. A., Lammich, S., Lichtenthaler, S. F., Hébert, S. S., De Strooper, B., Haass, C., Bennett, D. A., and Vassar, R. (2008) Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **60**, 988–1009
54. Hayashi, A., Kasahara, T., Iwamoto, K., Ishiwata, M., Kametani, M., Kakiuchi, C., Furuichi, T., and Kato, T. (2007) The role of

- brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. *J. Biol. Chem.* **282**, 34525–34534
55. Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., and Glimcher, L. H. (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7448–7459
56. Guo, F., Lin, E. A., Liu, P., Lin, J., and Liu, C. (2010) XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stress response. *Cell. Signal.* **22**, 1818–1828
57. Tirosch, B., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H., and Ploegh, H. L. (2006) Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **281**, 5852–5860
58. Shen, X., Ellis, R. E., Sakaki, K., and Kaufman, R. J. (2005) Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **1**, e37
59. Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwakaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009) Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol. Cell* **34**, 191–200
60. Misiewicz, M., Dery, M. A., Foveau, B., Jodoin, J., Ruths, D., and Leblanc, A. C. (2013) Identification of a novel endoplasmic reticulum stress response element regulated by XBP1. *J. Biol. Chem.* **288**, 20378–20391
61. Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y., and Nomura, Y. (2010) Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J. Neurosci.* **30**, 3924–3932
62. Takahashi, K., Niidome, T., Akaike, A., Kihara, T., and Sugimoto, H. (2009) Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via C/EBP homologous protein-mediated pathway. *J. Neurochem.* **109**, 1324–1337
63. Zeng, L., Liu, Y. P., Sha, H., Chen, H., Qi, L., and Smith, J. A. (2010) XBP-1 couples endoplasmic reticulum stress to augmented IFN-beta induction via a cis-acting enhancer in macrophages. *J. Immunol.* **185**, 2324–2330
64. Maretzky, T., Scholz, F., Köten, B., Proksch, E., Saftig, P., and Reiss, K. (2008) ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1737–1746
65. Park, S. W., Zhou, Y., Lee, J., Lu, A., Sun, C., Chung, J., Ueki, K., and Ozcan, U. (2010) The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nat. Med.* **16**, 429–437
66. Winnay, J. N., Boucher, J., Mori, M. A., Ueki, K., and Kahn, C. R. (2010) A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response. *Nat. Med.* **16**, 438–445
67. Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., and Scheltens, P. (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* **5**, 64–74
68. Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., Silverman, M. A., Kazi, H., Melo, H. M., McClean, P. L., Holscher, C., Arnold, S. E., Talbot, K., Klein, W. L., Munoz, D. P., Ferreira, S. T., and De Felice, F. G. (2012) An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated Abeta oligomers. *J. Clin. Invest.* **122**, 1339–1353
69. Casas-Tinto, S., Zhang, Y., Sanchez-Garcia, J., Gomez-Velazquez, M., Rincon-Limas, D. E., and Fernandez-Funez, P. (2011) The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2144–2160
70. Castillo-Carranza, D. L., Zhang, Y., Guerrero-Muñoz, M. J., Kaye, R., Rincon-Limas, D. E., and Fernandez-Funez, P. (2012) Differential activation of the ER stress factor XBP1 by oligomeric assemblies. *Neurochem. Res.* **37**, 1707–1717
71. Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Nijholt, D. A., Rozemuller, A. J., and Scheper, W. (2012) Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener. Dis.* **10**, 212–215
72. Rzymiski, T., Petry, A., Kracun, D., Riess, F., Pike, L., Harris, A. L., and Grolach, A. (2012) The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene* **31**, 3621–3634
73. Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., and Kaufman, R. J. (2000) The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* **14**, 2725–2736
74. Umeda, T., Tomiyama, T., Sakama, N., Tanaka, S., Lambert, M. P., Klein, W. L., and Mori, H. (2011) Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J. Neurosci. Res.* **89**, 1031–1042
75. Kögel, D., Concannon, C. G., Müller, T., König, H., Bonner, C., Poeschel, S., Chang, S., Egensperger, R., and Prehn, J. H. (2012) The APP intracellular domain (AICD) potentiates ER stress-induced apoptosis. *Neurobiol. Aging* **33**, 2200–2209
76. Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z. Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., and Lipton, S. A. (2006) S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* **441**, 513–517
77. Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., Lavail, M. M., and Walter, P. (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944–949
78. Viana, R. J., Nunes, A. F., and Rodrigues, C. M. (2012) Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **46**, 522–534
79. Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Ishiwata, M., Bundo, M., Kasahara, T., Kusumi, I., Tsujita, T., Okazaki, Y., Nanko, S., Kunugi, H., Sasaki, T., and Kato, T. (2003) Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat. Genet.* **35**, 171–175
80. Liu, S. Y., Wang, W., Cai, Z. Y., Yao, L. F., Chen, Z. W., Wang, C. Y., Zhao, B., and Li, K. S. (2013) Polymorphism –116C/G of human X-box-binding protein 1 promoter is associated with risk of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* **19**, 229–234
81. Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**, 1345–1355
82. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* **22**, 1451–1464
83. Holtz, W. A., and O'Malley, K. L. (2003) Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* **278**, 19367–19377
84. Sado, M., Yamasaki, Y., Iwanaga, T., Onaka, Y., Ibuki, T., Nishihara, S., Mizuguchi, H., Momota, H., Kishibuchi, R., Hashimoto, T., Wada, D., Kitagawa, H., and Watanabe, T. K. (2009) Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res.* **1257**, 16–24
85. Kim, H. J., Cho, H. K., and Kwon, Y. H. (2008) Synergistic induction of ER stress by homocysteine and beta-amyloid in SH-SY5Y cells. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 754–761

Received for publication May 21, 2013.

Accepted for publication October 15, 2013.

Acitretin, an Enhancer of Alpha-Secretase Expression, Crosses the Blood-Brain Barrier and Is Not Eliminated by P-Glycoprotein

David Holthoewer Kristina Endres Florian Schuck Christoph Hiemke
Ulrich Schmitt Falk Fahrenholz

Department of Psychiatry and Psychotherapy, Medical Center of the Johannes Gutenberg University,
Mainz, Germany

Key Words

Alzheimer's disease • A disintegrin and metalloproteinase 10 • Retinoids • Blood-brain barrier • P-glycoprotein • Clinical trial

Abstract

Background: ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) has been demonstrated to act as the main physiological α -secretase. Enzymatic activity of the α -secretase on the one hand prevents the formation of toxic A β peptides and on the other hand promotes the secretion of a neurotrophic and neuroprotective amyloid precursor protein fragment (APPs- α) by cleaving the amyloid precursor protein within its A β sequence. Enhancement of ADAM10's gene expression may therefore present a valuable therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease (AD), where A β peptides are severely involved in the pathogenesis. **Objective:** In cell culture and in a transgenic mouse model of AD, retinoids led to increased ADAM10 expression and activity. We therefore endeavor to develop a clinical application of synthetic retinoids such as acitretin in AD. **Methods:** The ef-

fect of synthetic retinoids on ADAM10 gene expression was analyzed by reporter gene assays in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Penetration of acitretin into the murine brain was analyzed by high-performance liquid chromatography. P-glycoprotein (P-gp) double-knockout mice with a deficiency in both isoforms, *mdr1a* and *1b*, were used to analyze a possible role of P-gp-dependent efflux on acitretin distribution. **Results:** Acitretin and tamibarotene are both potent activators of ADAM10 promoter activity. Acitretin crosses the murine blood-brain barrier and its level in the mouse brain is not reduced by P-gp. **Conclusion:** Synthetic retinoids and especially acitretin seem to be ideal candidates to establish an ADAM10-based AD treatment, and therefore have already entered first clinical trials.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

D.H. and K.E. contributed equally to this work.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
1660–2854/12/0104–0224\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ndd

Falk Fahrenholz
University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz
Department of Psychiatry and Psychotherapy
Untere Zahlbacher Strasse 8, DE-55131 Mainz (Germany)
Tel. +49 6131 172 133, E-Mail fahrenho@uni-mainz.de

Introduction

There is genetic, biochemical and dietary evidence for a role of retinoid signaling in Alzheimer's disease (AD) [1, 2]. Retinoids have been demonstrated to attenuate the immune response mediated by microglia (reviewed in Shudo et al. [3]) and have also been shown to destabilize A β peptide fibrils [4] – at least in vitro. In addition, retinoic acid has been identified as an enhancer of ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) gene expression in neuronal cells by binding to a nonpermissive RAR- α/β -RXR heterodimer [5, 6]. This in consequence leads to increased processing of the amyloid precursor protein in favor of the nonamyloidogenic pathway and thereby lowers A β production. Since retinoic acid itself is not of therapeutic value in humans because of its toxicity, synthetic retinoids already applied in other diseases such as psoriasis or leukemia came into focus of innovative AD therapy strategies (discussed e.g. in Endres and Fahrenholz [7]). Examples of such approved drugs are tamibarotene (Am80) [8], which is a specific RAR- α/β ligand [9], and acitretin, which does not directly bind to retinoic acid receptors but liberates the natural ligand from intracellular retinoic acid-binding proteins [10]. Both drugs lower A β production in AD mouse models: for example, a single hippocampal injection of acitretin resulted in a 40–50% decrease of A β peptides in the murine brain [6].

Previous studies with rats demonstrated that acitretin reaches the brain in higher concentrations than several other peripheral tissues [11]. Nevertheless, efficacy of drugs for treatment of central nervous system disorders such as AD is often lowered by elimination of these compounds via ATP-binding cassette transporters such as P-glycoprotein (P-gp). To investigate the therapeutic potential of acitretin, we therefore determined whether the disposition of acitretin is affected by P-gp, and performed studies of acitretin distribution in the brain and serum of wild-type and P-gp-deficient mice [12].

Materials and Methods

Reporter Gene Assays

SH-SY5Y cells were transiently transfected with a luciferase-based reporter for analysis of ADAM10 promoter activity [6]. The synthetic retinoids were applied for 48 h (2 μ M acitretin or 50 nM tamibarotene). Luciferase activity was measured in cell lysates (Renilla luciferase assay, Promega, Mannheim, Germany) and normalized to the protein content of the cells.

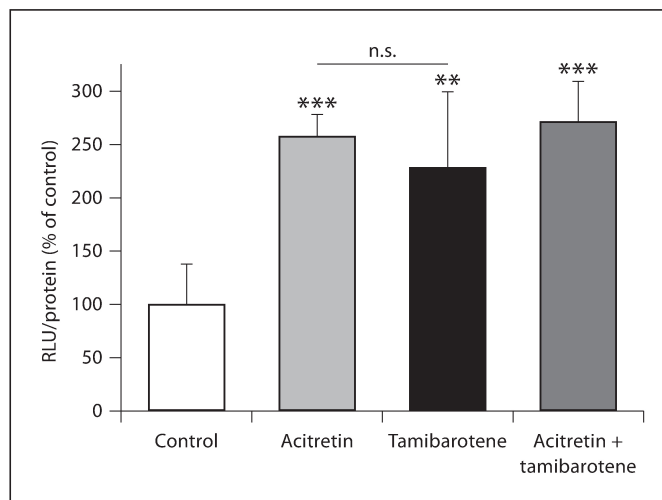


Fig. 1. Induction of ADAM10 gene expression by synthetic retinoids. SH-SY5Y cells were transiently transfected with an ADAM10 promoter reporter plasmid and treated with acitretin, tamibarotene or a combination of both for 48 h. Luciferase enzymatic activity was determined in the cell lysates (RLU, relative light units) and normalized to protein content of the cells. Solvent-treated cells (control) were set to 100%, values represent mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments ($n \geq 5$; one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.005$; n.s. = $p > 0.05$).

In vivo Experiments

Male FVB/N mice (wild-type) and *mdr1a*^{-/-}/*1b*^{-/-} double-knockout mice (Taconic, Germantown, N.Y., USA) were treated with 5 mg/kg acitretin by peritoneal injection. 1, 3 and 6 h after drug administration, animals were sacrificed ($n \geq 4$ each), brain homogenates were prepared as described by Doran et al. [13] and Kirschbaum et al. [14] and serum samples were collected from trunkal blood. Tissue homogenates and sera were analyzed using a high-performance liquid chromatography method modified from Decker and Zimmerman [15] with spectrometric detection. All experiments were conducted in accordance to the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) as well as the 'Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research' (National Research Council, 2003) and were approved by local authorities.

Results

Induction of ADAM10 Gene Expression by Synthetic Retinoids

We have previously shown that acitretin is able to induce nonamyloidogenic processing of the amyloid precursor protein and that this effect is mediated by enhanced transcriptional activity of the ADAM10 gene via

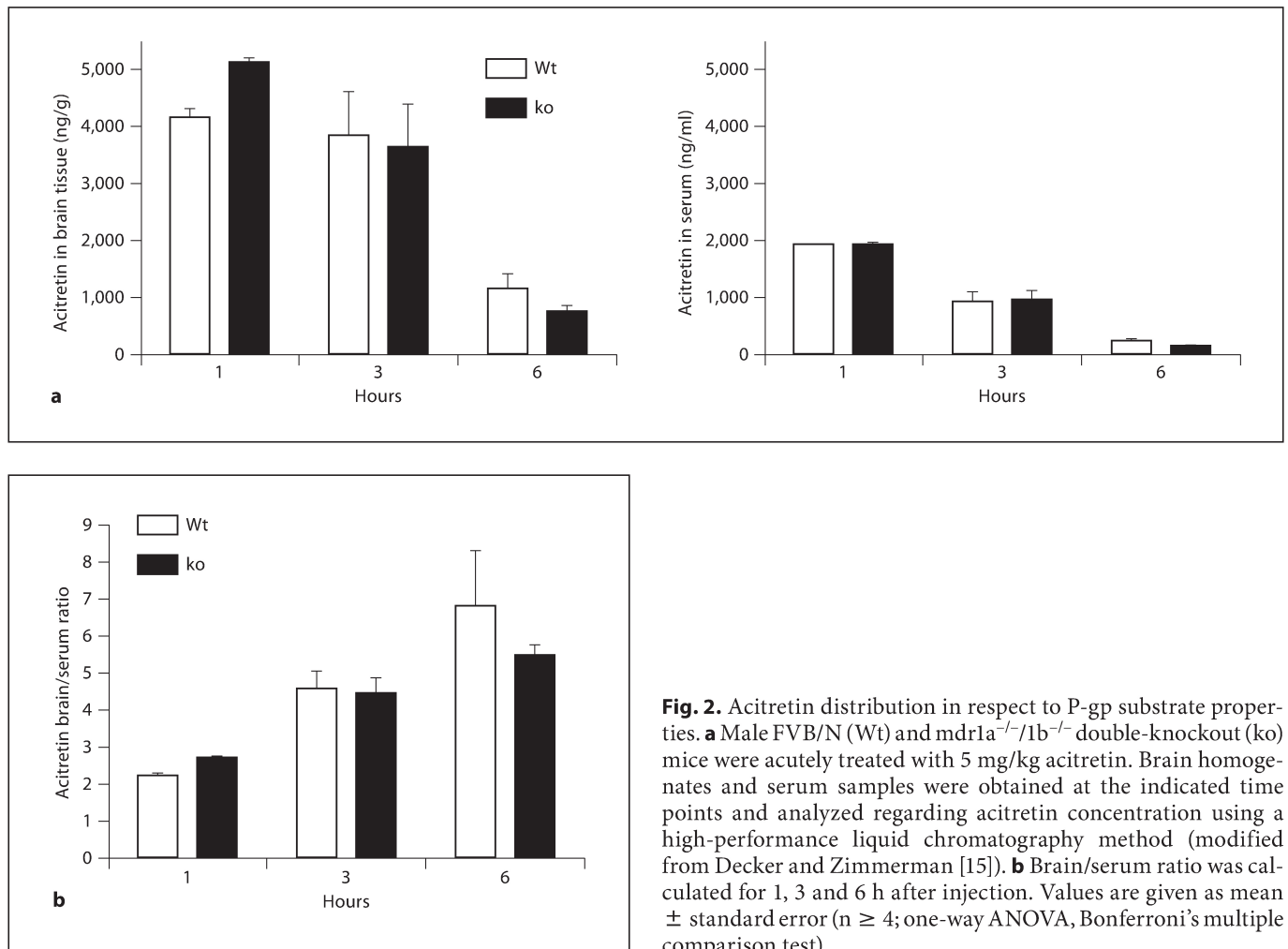


Fig. 2. Acitretin distribution in respect to P-gp substrate properties. **a** Male FVB/N (Wt) and *mdr1a*^{-/-}/*1b*^{-/-} double-knockout (ko) mice were acutely treated with 5 mg/kg acitretin. Brain homogenates and serum samples were obtained at the indicated time points and analyzed regarding acitretin concentration using a high-performance liquid chromatography method (modified from Decker and Zimmerman [15]). **b** Brain/serum ratio was calculated for 1, 3 and 6 h after injection. Values are given as mean $\pm$ standard error ($n \geq 4$; one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test).

RAR- α/β receptors [6]. Tamibarotene is a specific ligand for these receptor subtypes and therefore we investigated its effect on the ADAM10 promoter. Treatment of SH-SY5Y cells for 48 h with tamibarotene in a concentration of 50 nM evoked a comparable induction of the ADAM10 promoter activity as observed for 2 μ M acitretin (fig. 1). A combination of both retinoids did not lead to a synergistic effect, indicating that the limiting factor is not the ligand itself but probably the interaction of nuclear receptors with their DNA target.

Disposition of Acitretin in Brain Tissue and Serum after Acute Treatment

Acitretin concentrations in the brain and serum showed a fast elimination after acute intraperitoneal injection (fig. 2a) and displayed only slight differences in brain tissue and serum between genotypes: for example,

1 h after injection, approximately 4,124 ng/g tissue were detected in wild-type mouse brain while in knockout mice 5,079 ng/g were found. Nevertheless, using one-way ANOVA, there was no evidence of a significant genotype-dependent distribution pattern of acitretin.

Brain/serum ratios were calculated to illustrate the penetration of acitretin into the brain after systemic application of the retinoid (fig. 2b). Concentrations of acitretin were 2- to 5-fold higher in brain tissue than in serum for both genotypes. The ratio of brain to serum concentrations of acitretin increased over time which might indicate that drug elimination from the brain is slower than from blood. Thus, chronic application of acitretin might lead to accumulation of the retinoid in brain tissue but has to be investigated further.

Discussion

Acitretin and tamibarotene offer a new therapeutic strategy in the treatment of AD via inducing transcription of ADAM10 gene. Both compounds are efficient in enhancing activity of the human ADAM10 promoter; while acitretin has an EC₅₀ of about 1.5 μ M [6], lower concentrations of tamibarotene are already sufficient to induce maximal promoter activity of about 200% of solvent-treated cells. This might be due to the different biological activity of both drugs: acitretin displaces all-trans retinoic acid from its cellular binding protein (CRABP) [10], while tamibarotene is a selective RAR- α/β ligand [9] and therefore might contribute to promoter activation with a higher selectivity.

In accordance to a previously published study performed in rats [11], our data demonstrate that acitretin is able to cross the blood-brain barrier of mice, indicated by detectable acitretin concentrations in brain tissue. Also the findings of higher acitretin concentrations in brain tissue as compared to serum is consistent with Eisenhardt and Bickel [11] who reported a brain to plasma concentration of 2.2 in rats. Serum and brain concentrations of acitretin in mice showed a fast elimination phase after acitretin injection: concentrations of acitretin were 5-fold higher 1 h after injection as compared to 6 h after injection.

In silico approaches suggested a possible role of P-gp-dependent transport on acitretin distribution [16] but our in vivo data could not confirm these findings: only slight and statistically nonsignificant differences were obtained for acitretin concentrations in the brain and serum in wild-type compared to P-gp-deficient mice. The most noticeable difference in both genotypes was observed 1 h after drug administration but revealed only a 1.2-fold higher brain/serum ratio in knockout mice as compared to wild-type mice (brain/serum level wild-type: 2.170;

brain/serum level knockout: 2.670; $p > 0.05$). Brain concentrations of for example the antipsychotic drug risperidone and its metabolite 9-hydroxyrisperidone were found to be 10-fold higher in knockout than in wild-type animals [14]. For aripiprazole, which represents a more moderate P-gp substrate, brain concentrations in P-gp knock-out mice were about 2- to 4-fold higher compared to wild-type animals [17]. Doran et al. [13] stated that even a 2- to 3-fold difference of brain/serum ratio between wild-type and P-gp knockout mice does not inevitably have much impact on the success of drugs as central nervous system-active compounds. We cannot exclude that within 1 h after application or upon chronic application acitretin might interact with P-gp, but a physiologically relevant pharmacokinetic or pharmacodynamic interaction at the blood-brain barrier seems unlikely in the context of our investigation.

Together, our findings are encouraging regarding the applicability of acitretin as an enhancer of ADAM10 gene expression in the central nervous system. Two clinical trials with either acitretin or tamibarotene are being performed presently with AD patients (<http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01078168> and <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01120002>), and these should show whether the ADAM10-based therapeutic strategy by retinoids has a beneficial outcome in humans.

Acknowledgements

This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) in the framework of the National Genome Research Network (NGFN), Förderkennzeichen FKZ01GS08130 and by a PhD scholarship of Cusanuswerk – Bischöfliche Studienförderung Bonn (Germany) to D. Holthoewer.

References

- 1 Goodman AB, Pardee AB: Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2901–2905.
- 2 Goodman AB: Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J Cell Physiol* 2006;209:598–603.
- 3 Shudo K, Fukasawa H, Nakagomi M, Yamagata N: Towards retinoid therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2009;6:302–311.
- 4 Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M: Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp Neurol* 2004;189:380–392.
- 5 Prinzen C, Muller U, Endres K, Fahrenholz F, Postina R: Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J* 2005;19:1522–1524.
- 6 Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F: Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* 2009;23:1643–1654.
- 7 Endres K, Fahrenholz F: Upregulation of the alpha-secretase ADAM10 – Risk or reason for hope? *FEBS J* 2010;277:1585–1596.
- 8 Kagechika H, Kawachi E, Hashimoto Y, Shudo K: New type inducers of differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells. Terephthalic anilides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1984;32:4209–4212.

- 9 Umemiya H, Fukasawa H, Ebisawa M, Eyrolles L, Kawachi E, Eisenmann G, Grone-meyer H, Hashimoto Y, Shudo K, Kagechika H: Regulation of retinoidal actions by diaz-epinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers. *J Med Chem* 1997;40:4222–4234.
- 10 Armstrong JL, Ruiz M, Boddy AV, Redfern CP, Pearson AD, Veal GJ: Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 2005;92:696–704.
- 11 Eisenhardt EU, Bickel MH: Kinetics of tissue distribution and elimination of retinoid drugs in the rat. 1I. Acitretin. *Drug Metab Dispos* 1994;22:26–30.
- 12 Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P: Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4028–4033.
- 13 Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E, Chen C, Chen X, Choo E, Cianfrogna J, Cox LM, Gibbs JP, Gibbs MA, Hatch H, Hop CE, Kasman IN, Laperle J, Liu J, Liu X, Logman M, Maclin D, Nedza FM, Nelson F, Olson E, Rahematpura S, Raunig D, Rogers S, Schmidt K, Spracklin DK, Szewc M, Troutman M, Tseng E, Tu M, Van Deusen JW, Venkatakrishnan K, Walens G, Wang EQ, Wong D, Yasgar AS, Zhang C: The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab Dispos* 2005;33:165–174.
- 14 Kirschbaum KM, Henken S, Hiemke C, Schmitt U: Pharmacodynamic consequences of P-glycoprotein-dependent pharmacokinetics of risperidone and haloperidol in mice. *Behav Brain Res* 2008;188:298–303.
- 15 Decker MA, Zimmerman CL: Simultaneous determination of etretinate, acitretin and their metabolites in perfusate, perfusate plasma, bile or hepatic tissue with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 667:105–113.
- 16 Chang C, Bahadduri PM, Polli JE, Swaan PW, Ekins S: Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1976–1984.
- 17 Kirschbaum KM, Uhr M, Holthoewer D, Namendorf C, Pietrzik C, Hiemke C, Schmitt U: Pharmacokinetics of acute and sub-chronic aripiprazole in P-glycoprotein deficient mice. *Neuropharmacology* 2010;59: 474–479.

7.2 Curriculum Vitae

Entfällt in der elektronischen Version.

