

**„Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 als neuer  
therapeutischer Ansatz zur Behandlung der  
Alzheimer-Erkrankung“**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

**Frank Tippmann**  
geb. in Frankenberg/Eder

Mainz, 2008

1. Berichtersteller:

2. Berichtersteller

Datum der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 als neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung“ selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass ich noch keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich unternommen habe.

---

Frank Tippmann

---

Datum

**Auszüge aus dieser Arbeit wurden bzw. werden wie folgt veröffentlicht:**

Tippmann, F., Hundt, J., Endres, K. and Fahrenholz, F. (eingereicht: Sept. 2008). Upregulation of the  $\alpha$ -secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. FASEB J.

Kojro, E., Postina, R., Tippmann, F., Wiczczak, E., Dewachter, I., Van Leuven, F. and Fahrenholz, F. (2007). The neuropeptide PACAP acts as  $\alpha$ -secretase activator in vitro and in vivo. In: Kh.Iqbal, B.Winblad, J.Avila, (Eds.), Alzheimer's disease: new advances. 10th International conference on and related disorders (Madrid, 16-20 July 2006). Medimond S.r.l., Bologna, 2007, 335-339.

# Inhaltsverzeichnis

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>1. Einleitung</b>            | <b>1</b>   |
| 1.1.1                           | Allgemeine Merkmale der Alzheimer-Krankheit..... 1                                   |
| 1.1.2                           | Zelluläre Charakteristika der Alzheimer-Erkrankung ..... 1                           |
| 1.1.3                           | Die genetische und die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung..... 3              |
| 1.1.4                           | A $\beta$ -Peptide als Ursache der Demenz ..... 4                                    |
| 1.1.5                           | Die Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins..... 5                             |
| 1.1.6                           | Therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit..... 8                 |
| 1.2.1                           | ADAM-Proteine als $\alpha$ -Sekretasen..... 9  |
| 1.2.2                           | Struktur und Funktion von ADAM10 ..... 10  |
| 1.2.3                           | Regulation der katalytischen ADAM10-Aktivität ..... 11                               |
| 1.2.4                           | Gentherapie durch ADAM10-Überexpression ..... 12                                     |
| 1.2.5                           | Transkriptionelle Regulation des ADAM10-Gens ..... 15                                |
| 1.3.1                           | Die Retinoid-Rezeptoren ..... 16   |
| 1.3.2                           | Retinoid X Rezeptor-Heterodimere..... 18   |
| 1.3.3                           | Der Retinoid-Metabolismus ..... 21   |
| 1.3.4                           | Neuronale Retinoid-Funktion..... 22  |
| 1.3.5                           | Der Zusammenhang zwischen dem Retinoid-Metabolismus und der Alzheimer-Krankheit.. 24 |
| 1.3.6                           | Retinoide in der Medizin- Das synthetische Retinoid Acitretin..... 25                |
| <b>1.4</b>                      | <b>Zielsetzung</b> ..... <b>27</b>   |
| <b>2. Material und Methoden</b> | <b>29</b>  |
| <b>2.1 Material</b>             | <b>29</b>  |
| 2.1.1                           | Geräte..... 29   |
| 2.1.2                           | Verwendete Chemikalien..... 30   |
| 2.1.3                           | Gebrauchsmaterialien..... 33   |
| 2.1.4                           | Kitsysteme ..... 34  |
| 2.1.5                           | Stammlösungen, Puffer und Kulturmedien ..... 35                                      |
| 2.1.6                           | Enzyme..... 38   |
| 2.1.7                           | Antikörper ..... 39  |
| 2.1.7.1                         | Erstantikörper ..... 39  |
| 2.1.7.2                         | Zweitantikörper ..... 40   |
| 2.1.8                           | Oligonukleotide ..... 40   |
| 2.1.8. 1                        | Oligonukleotide für Real Time-RT-PCR..... 42   |
| 2.1.9                           | Größenstandards..... 42  |
| 2.1.9.1                         | DNA-Größenstandards ..... 42   |
| 2.1.9.2                         | Protein-Größenstandards ..... 43   |
| 2.1.10                          | Plasmide, BACmide..... 44  |
| 2.1.11                          | Bakterienstämme, Zelllinien und Mausstämme ..... 48                                  |
| 2.1.11.1                        | Bakterienstämme..... 48  |
| 2.1.11.2                        | Murine Zelllinien ..... 48   |
| 2.1.11.3                        | Humane Zelllinien..... 49  |
| 2.1.11.4                        | Mausstämme ..... 50  |
| 2.1.12                          | Online-Datenbanken und Softwareprogramme ..... 51                                    |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.2 Methoden</b> .....   | <b>52</b> |
| 2.2.1 Molekulargenetische Methoden .....  | 52        |
| 2.2.1.1 Quantifizierung von DNA und RNA .....   | 52        |
| 2.2.1.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung .....                                     | 52        |
| 2.2.1.1.2 Mengenbestimmung im Agarosegel.....   | 52        |
| 2.2.1.2 Reinigung von Nukleinsäuren .....   | 52        |
| 2.2.1.2.1 Schnelle Plasmid-Aufreinigung .....   | 52        |
| 2.2.1.2.2 Plasmid-Aufreinigung durch Silika-Säulen .....                                    | 53        |
| 2.2.1.2.3 Endotoxinfreie Plasmid-Aufreinigung .....   | 53        |
| 2.2.1.2.4 DNA-Aufreinigung aus Säugerzellen.....  | 53        |
| 2.2.1.2.5 RNA-Aufreinigung aus Organen.....   | 54        |
| 2.2.1.3 Sequenzierung.....  | 54        |
| 2.2.1.4 Restriktion von DNA.....  | 54        |
| 2.2.1.5 Modifikation der DNA-Enden.....   | 54        |
| 2.2.1.6 Dephosphorylierung der DNA .....  | 55        |
| 2.2.1.7 Phosphorylierung der DNA .....  | 55        |
| 2.2.1.8 Ligation der DNA.....   | 55        |
| 2.2.1.9 Radioaktive Markierung von DNA .....  | 56        |
| 2.2.1.10 Standard-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....                                     | 56        |
| 2.2.1.11 Gradienten PCR.....  | 56        |
| 2.2.1.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarose-Gel.....                         | 57        |
| 2.2.1.13 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel .....  | 57        |
| 2.2.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen .....   | 58        |
| 2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien .....  | 58        |
| 2.2.2.2 Lagerung von Bakterien .....  | 58        |
| 2.2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> (nach Dagert und Ehrlich, 1979)..... | 58        |
| 2.2.2.4 Transformation.....   | 58        |
| 2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....  | 59        |
| 2.2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen.....  | 59        |
| 2.2.3.2 Kryokonservierung von Säugerzellen.....   | 59        |
| 2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl.....  | 59        |
| 2.2.3.4 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen .....                            | 60        |
| 2.2.3.5 Viabilitätstest.....  | 61        |
| 2.2.3.6 Transfektion von Zellen.....  | 61        |
| 2.2.3.7 Transfektion von pegylierten Immunoliposomen in Zellen .....                        | 62        |
| 2.2.4 Methoden der Proteinaufreinigung und Analyse .....                                    | 62        |
| 2.2.4.1 Gewinnung von Antikörpern aus Hybridoma-Zellkulturen .....                          | 62        |
| 2.2.4.2 Sekretion von Proteinen und Ernte von Zellen.....                                   | 63        |
| 2.2.4.2.1 Aufreinigung sekretorischer Proteine (TCA Fällung).....                           | 63        |
| 2.2.4.2.2 Aufreinigung membranständiger Proteine.....                                       | 64        |
| 2.2.4.3 Aufreinigung membranständiger und löslicher Proteine aus Mausorganen .....          | 64        |
| 2.2.5 Quantifizierungsmethoden der Genexpression .....                                      | 65        |
| 2.2.5.1 Real Time-Reverse Transkriptase-PCR.....  | 65        |
| Auswertung der Real-Time-RT-PCR.....  | 66        |
| 2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....  | 68        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.5.3 Luciferase-Reporter-Nachweis .....  | 69        |
| 2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....   | 70        |
| 2.2.5.5 Western Blot.....   | 71        |
| 2.2.5.6 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....  | 71        |
| 2.2.5.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....  | 72        |
| 2.2.5.8 Immunocytochemie an N2A-Zellen.....   | 73        |
| 2.2.5.9 Mikroskopie von Zellen.....   | 73        |
| 2.2.5.10 Herstellung von Gehirnschnitten für die Mikroskopie.....   | 73        |
| 2.2.5.11 $\beta$ -Amyloid-Färbung der Gehirnschnitte.....   | 74        |
| 2.2.5.12 Mikroskopie der Gehirnschnitte und quantitative Auswertung .....   | 74        |
| 2.2.6 Herstellung pegylierter Immunoliposomen (PIL) nach Pardridge (2003) .....   | 75        |
| 2.2.6.1 Thiolierung der Antikörper .....  | 75        |
| 2.2.6.2 Herstellung der pegylierten Immunoliposomen.....  | 76        |
| 2.2.6.3 Quantifizierung der eingeschlossenen DNA und gekoppelte Antikörper  | mittels   |
| Szintillationsmessung .....   | 77        |
| 2.2.6.4 Größenbestimmung der pegylierten Immunoliposomen .....  | 78        |
| 2.2.7 Tierversuche.....   | 78        |
| 2.2.7.1 Genotypisierung der APP/PS1-Mäuse .....   | 78        |
| 2.2.7.2 Sektion der Mäuse.....  | 79        |
| 2.2.7.3 Orale Acitretin-Applikation .....   | 79        |
| 2.2.7.4 Subcutane Acitretin-Applikation.....  | 79        |
| 2.2.7.5 Intranasale Acitretin-Applikation .....   | 80        |
| 2.2.7.6 Intranasale PACAP-Applikation .....   | 80        |
| 2.2.7.7 Injektion der pegylierten Immunoliposomen in die Schwanzvene der Maus.....  | 80        |
| 2.2.7.8 Hydrodynamische Schwanzvenen-Injektion von DNA.....   | 80        |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>   | <b>81</b> |
| <b>3.1 Intranasale PACAP-Administration in APP/PS1-Mäuse.....</b>   | <b>81</b> |
| <b>3.2 Die Erhöhung der <math>\alpha</math>-Sekretase-Aktivität durch Immunoliposomen- basierte Genterapie .....</b>                          | <b>83</b> |
| 3.2.1 Produktion und Aufreinigung der anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper.....   | 83        |
| 3.2.2 Die Herstellung von Immunoliposomen.....  | 85        |
| 3.2.3 Immunoliposomen-basierte Transfektion von DNA <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....  | 87        |
| <b>3.3 ADAM10-Stimulation durch Retinoid-Rezeptor-vermittelter Transkriptionsaktivierung.....</b>   | <b>89</b> |
| 3.3.1 Vergleich zwischen dem humanen und dem murinen ADAM10-Promotor .....  | 89        |
| 3.3.1.1 Vergleich der konstitutiven und induzierten Aktivität von humanem und murinem ADAM10-Promotor.....                                    | 89        |
| 3.3.1.2 Vergleich der APP-Prozessierung in Zellen mit den APP695wt- und den APP695swe-überexprimierenden Isoformen.....                       | 91        |
| 3.3.1.3 APP-Prozessierung durch atRA-basierte ADAM10-Stimulation in humanen und murinen Neuroblastom-Zellen .....                             | 93        |
| 3.3.2 ADAM10-Stimulation durch RAR- und RXR- selektive Retinoide .....  | 95        |
| 3.3.2.1 Bestimmung der Zellviabilität nach der Inkubation mit Retinoid-Rezeptor-Liganden.....   | 95        |
| 3.3.2.2 Der Einfluss der Retinoid-Rezeptor-Liganden auf die Retinoid-Rezeptor-Bindeelement (RARE)-vermittelte Transkriptionsaktivierung ..... | 96        |
| 3.3.2.3 ADAM10-Promotoraktivierung durch Retinoid-Rezeptor-Liganden .....   | 97        |
| 3.3.2.4 APP-Prozessierung durch TTNPB-basierte ADAM10-Stimulation.....  | 98        |
| 3.3.2.5 Die Wirkung des selektiven RXR-Liganden DHA auf den ADAM10-Promotor .....   | 99        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.2.5.1 Bestimmung der Zellviabilität nach Inkubation mit ungesättigten Fettsäuren.....   | 100        |
| 3.3.2.5.2 RARE-Aktivierung durch Inkubation mit ungesättigten Fettsäuren.....   | 101        |
| 3.3.2.5.3 Die Wirkung von DHA auf den ADAM10-Promotor .....   | 103        |
| 3.3.3 ADAM10-Stimulation durch RXR-Heterodimere .....   | 104        |
| 3.3.3.1 Bestimmung der Zellviabilität nach der Inkubation mit Liganden von RXR-Heterodimerpartnern .....  | 105        |
| 3.3.3.2 ADAM10-Promotorstimulation durch Liganden verschiedener RXR-Rezeptorpartner .....   | 105        |
| 3.3.3.3 Wirkung der VDR- und TR-Liganden auf die ADAM10-basierte APP-Prozessierung .....  | 108        |
| 3.3.3.4 Wirkung des synthetischen LXR-Liganden T0901317 auf die ADAM10-basierte APP-Prozessierung.....  | 109        |
| 3.3.4 Untersuchung einer direkten oder indirekten RXR-vermittelten ADAM10-Promotorstimulation ....  | 110        |
| 3.3.4.1 Nachweis einer direkten ADAM10-Promotorstimulation.....   | 111        |
| 3.3.4.1.1 Untersuchung der Retinoid-basierten Expressionsstimulation an den ADAM10-Promotorsequenzbereichen -203 bp und -302 bp.....                              | 111        |
| 3.3.4.2 Indirekte Einflüsse von atRA auf die ADAM10-Promotoraktivierung.....  | 112        |
| 3.3.4.2.1 Einfluss des Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalwegs auf die ADAM10-Promotoraktivität... ..  | 112        |
| 3.3.4.2.2 ADAM10-Promotorstimulation durch Phospholipase A <sub>2</sub> .....   | 113        |
| 3.3.5 Stimulation der ADAM10-Expression durch synthetische Retinoide .....  | 114        |
| 3.3.5.1 Vergleich der synthetischen Retinoide Acitretin und Etretinat bezüglich der RARE-basierten Transkriptionsaktivierung und ADAM10-Promotorstimulation ..... | 114        |
| 3.3.5.2 Acitretin induzierte ADAM10-Promotorstimulation .....   | 116        |
| 3.3.5.3 APP-Prozessierung durch Acitretin-induzierte ADAM10-Stimulation .....   | 118        |
| 3.3.5.4 Nachweis der Wirkung von Acitretin auf ADAM10 durch den spezifischen Inhibitor GI254023X .....  | 119        |
| 3.3.5.5 Amyloid $\beta$ -Sekretion nach Inkubation mit Acitretin .....  | 120        |
| 3.3.6 APP-Prozessierung durch Acitretin Administration <i>in vivo</i> .....   | 122        |
| 3.3.6.1 Viabilität der Zellen nach Inkubation mit 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin und Acitretin.....   | 122        |
| 3.3.6.2 Bioverfügbarkeit von Acitretin durch Lösung in DMSO, HPBCD oder CMC.....  | 123        |
| 3.3.6.3 Orale Administration von Acitretin .....  | 124        |
| 3.3.6.4 Subcutane Administration von Acitretin.....   | 127        |
| 3.3.6.5 Intranasale Administration von Acitretin .....  | 129        |
| <b>4. Diskussion .....</b>  | <b>131</b> |
| <b>4.1 PACAP-basierte Therapie der Alzheimer-Krankheit.....</b>   | <b>131</b> |
| <b>4.2 ADAM10-Überexpression im Mäuse-Geirn durch nicht-virale Transfektion.....</b>  | <b>133</b> |
| <b>4.3 Retinoid-vermittelte Stimulation von ADAM10.....</b>   | <b>135</b> |
| 4.3.1 Der Vergleich zwischen dem murinen ADAM10-Promotor und dem humanen ADAM10-Promotor .....  | 135        |
| 4.3.2 Identifizierung der ADAM10-stimulierenden RXR-Heterodimere .....  | 136        |
| 4.3.3 Hinweise für eine direkte oder indirekte ADAM10-Promotoraktivierung durch das RAR/RXR-Heterodimer .....   | 143        |
| 4.3.4 Acitretin als Therapeutikum der Alzheimer-Krankheit .....   | 145        |
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>  | <b>150</b> |
| <b>6. Abstract.....</b>   | <b>151</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>152</b> |
| <b>8. Anhang .....</b>  | <b>172</b> |
| <b>8.1 Klonierung des murinen ADAM10-Promotor-Luciferase-Reportervektors.....</b>   | <b>172</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>8.2 Klonierung der putativen Retinoid-Rezeptorbindungsstellen -203 und -302 .....</b> | <b>172</b> |
| <b>8.3 Abkürzungen .....</b>   | <b>173</b> |
| <b>8.4 Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>174</b> |
| <b>8.5 Lebenslauf .....</b>  | <b>177</b> |

# 1. Einleitung

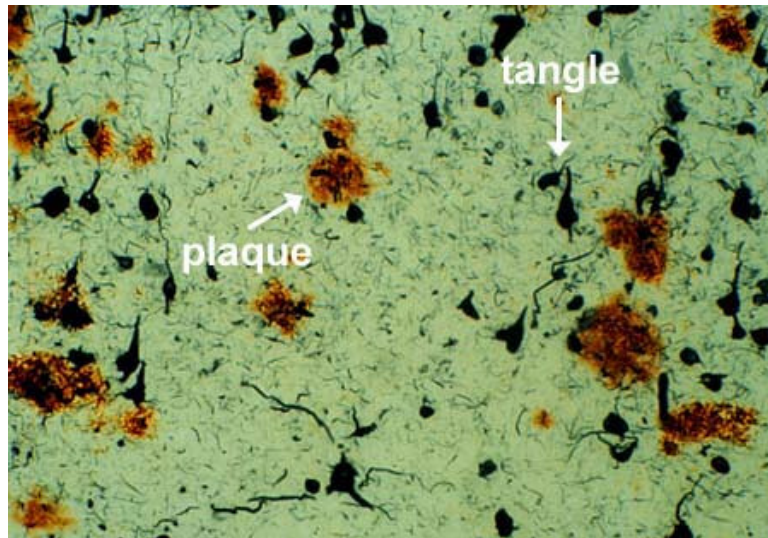
## 1.1.1 Allgemeine Merkmale der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (engl.: Alzheimer's disease, AD) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Krankheiten weltweit. Von den im hohen Alter auftretenden Demenzformen zählen 65% zu der Alzheimer-Krankheit (Jellinger, 2006). Das Krankheitsbild zeichnet sich durch Gedächtnis- und Orientierungsstörungen sowie durch Störungen des Denk- und Urteilsvermögens aus. Dazu kommen Teilnahmslosigkeit, Antriebsarmut, Angst und Depression sowie Sprach- und Erkennungsstörungen. In späteren Stadien der Krankheit treten schwere Verluste des Langzeitgedächtnisses bis zur Amnesie und Störungen der Motorik auf, welche schließlich zum Tod führen (Reisberg et al., 1982).

Schätzungsweise 1,2 Millionen Menschen leiden in Deutschland an der Alzheimer-Krankheit. Die Zahl der Erkrankungen wird sich bis zum Jahr 2025 verdoppeln, da sich aufgrund einer gesteigerten Lebenserwartung und eines erhöhten Altersdurchschnitts ein demographischer Wandel in der Gesellschaft vollzieht. Ungefähr ein Drittel der Bevölkerung wird in 20 Jahren über 65 Jahre sein und ein Viertel über 80 (Jellinger, 2006). Die durchschnittlichen, monatlichen Kosten für die medizinische und soziale Betreuung eines Alzheimer-Patienten betragen in Deutschland im Jahr 2005 ca. 1000 Euro (Jonsson und Berr, 2005). Dies macht aus humaner und ökonomischer Sicht die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes gegen Morbus Alzheimer unabdingbar.

## 1.1.2 Zelluläre Charakteristika der Alzheimer-Erkrankung

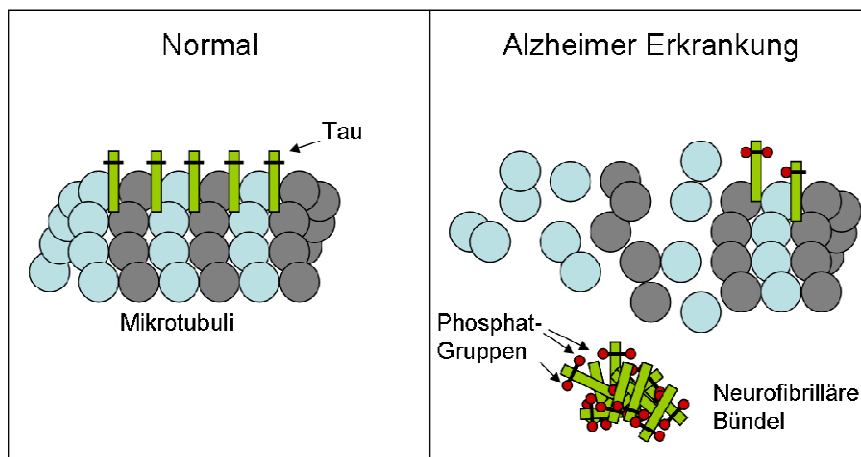
Die klinischen Symptome der Alzheimer-Krankheit werden durch einen progressiven Verlust von Nervenzellen hervorgerufen. Folge hiervon ist die Schrumpfung des Gehirns und eine damit verbundene Vertiefung der Gehirnfurchen sowie eine Erweiterung der Hirnventrikel. Diese Symptome werden durch neuropathologische Veränderungen hervorgerufen, welche erstmals im Jahr 1907 von dem Namensgeber der Krankheit, Alois Alzheimer, beschrieben wurden (Alzheimer, 1907). Die Veränderungen zeichnen sich durch das vermehrte Aufkommen von senilen Plaques und neurofibrillären Bündel (engl.: Neurofibrillary Tangles, NFT) aus (Abb. 1.1). Die senilen Plaques breiten sich zum Beginn der Krankheit vom transentorhinalen Bereich des basalen mediotemporalen Kortex über den Hippocampus und letztlich im gesamten Neocortex aus (Braak und Braak, 1991).



**Abb.1.1: Neuropathologische Merkmale der AD**

Gehirnschnitt eines AD-Patienten mit Färbungen der extrazellulären amyloiden Plaques und der intrazellulären neurofibrillären Bündel (Tangles). (<http://ladulab.anat.uic.edu>)

Die neurofibrillären Bündel sind im Perikaryon der Neuronen lokalisiert und bestehen aus Fasern paariger, helikal aufgewundener Filamente (engl.: Paired Helical Filaments, PHF). Sie werden aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau gebildet, welches sich in einem abnormalen hyperphosphorylierten Zustand befindet (Grundke-Iqbal et al., 1986). Durch die Fibrillenbildung des Tau-Proteins kommt es zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli, wodurch Transport- Prozesse gestört werden und die Apoptose der Zelle eintritt (Abb.1.2).



**Abb.1.2: Die Entstehung von neurofibrillären Bündeln bei der AD**

Das Mikrotubuli-assoziierte Tau-Protein ist ein natürlicher Bestandteil des Zytoskeletts. Bei der AD kommt es zu einer Hyperphosphorylierung des Proteins durch Proteinkinasen. Das Tau-Protein löst sich von den Mikrotubuli ab und aggregiert zu neurofibrillären Bündeln. Die Mikrotubuli werden destabilisiert und es kommt zur Apoptose der Zelle.

Bei den senilen Plaques handelt es sich um extrazelluläre Ablagerungen, welche hauptsächlich aus dem Amyloid  $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ) bestehen und daher auch als Amyloid-Plaques bezeichnet werden. Das 4 kDa große  $A\beta$ -Peptid ist ein Spaltprodukt des amyloiden Vorläuferproteins (engl.: Amyloid Precursor Protein, APP) (Glenner et al., 1984).

Die beiden Kennzeichen der Erkrankung, PHF und Amyloid-Plaques, treten in den meisten dementiellen Krankheitsbildern gemeinsam auf. Die Amyloid  $\beta$ -Ablagerungen alleine, in der Abwesenheit von NFT's, führen selten zu klinischen Symptomen. Dagegen gibt es einige seltene Krankheitsformen wie den Guam-Parkinson'schen Demenz-Komplex, die Dementia Pugilistica, die Frontotemporale Demenz und die progressive supernukleäre Paralyse, in welchen keine Amyloid  $\beta$ -Ablagerungen dafür aber NFT's auftreten (Iqbal und Grundke-Iqbal, 2007).

### 1.1.3 Die genetische und die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung

Ungefähr 10% der Alzheimer-Fälle treten vor dem 60. Lebensjahr auf und sind auf autosomal dominante Mutationen zurückzuführen. Sie werden als familiäre Form der AD (FAD) bezeichnet. Dazu gehören die Mutation im APP-Gen (*APP*) auf Chromosom 21 (Goate et al., 1991), die Mutation im Presenilin 1-Gen (*PSEN1*) auf Chromosom 14 (Sherrington et al., 1995) und die Mutation im Presenilin 2-Gen (*PSEN2*) auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995). Die Mutationen unterscheiden sich zwischen den betroffenen Familien. So wurde in einer Familie aus Schweden eine Doppelmutation in der Sequenz der APP770-Isoform festgestellt (die sogenannte Schwedische Mutation), welche zwei Aminosäure-Austausche in der Aminosäuresequenz des APP-Proteins unmittelbar an der Schnittstelle der  $\beta$ -Sekretase zur Folge hat (s. 1.1.5.) (Mullan et al., 1992).

Unter der sporadischen Form der AD (SAD) versteht man Erkrankungen, die ab dem 65. Lebensjahr auftreten. Der einzige bis Heute bekannte genetische Risikofaktor für die SAD liegt auf dem  $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoprotein E-Gens (*APOE*) auf Chromosom 19, welches in 50% der Alzheimer Patienten vorkommt und damit überrepräsentiert ist wobei ca. 25 % der Gesamtbevölkerung das  $\epsilon 4$ -Allel besitzen (Strittmatter et al., 1993). Es gibt noch eine Reihe weiterer, putativer genetischer Risikoallele, welche eine Rolle in Inflammation, Lipidregulation, Signaltransduktion und Apoptose spielen. Die Assoziation dieser Gene mit der AD konnte bisher jedoch nicht eindeutig bestätigt werden (Übersichtsartikel: Waring und Rosenberg, 2008).

Neben den genetischen Risikofaktoren gibt es ernährungsbedingte Faktoren, die einen Einfluss auf die Entstehung der SAD nehmen können. So begünstigt z.B. ein hoher Cholesterinspiegel die Ausbildung der AD (Simons et al., 1998; Riddell et al., 2001).

Mutationen im Tau-Gen (*MAPT*) konnten im Zusammenhang mit der AD bisher nicht gefunden werden. Eine Parallele zeigt sich aber in dem Krankheitsbild der Frontotemporalen Demenz mit Parkinson-Syndrom, welche mit Chromosom 17 (q21) gekoppelt ist. In diesem Bereich des Chromosoms ist auch das Tau-Gen lokalisiert (Hutton et al., 1998).

### 1.1.4 A $\beta$ -Peptide als Ursache der Demenz

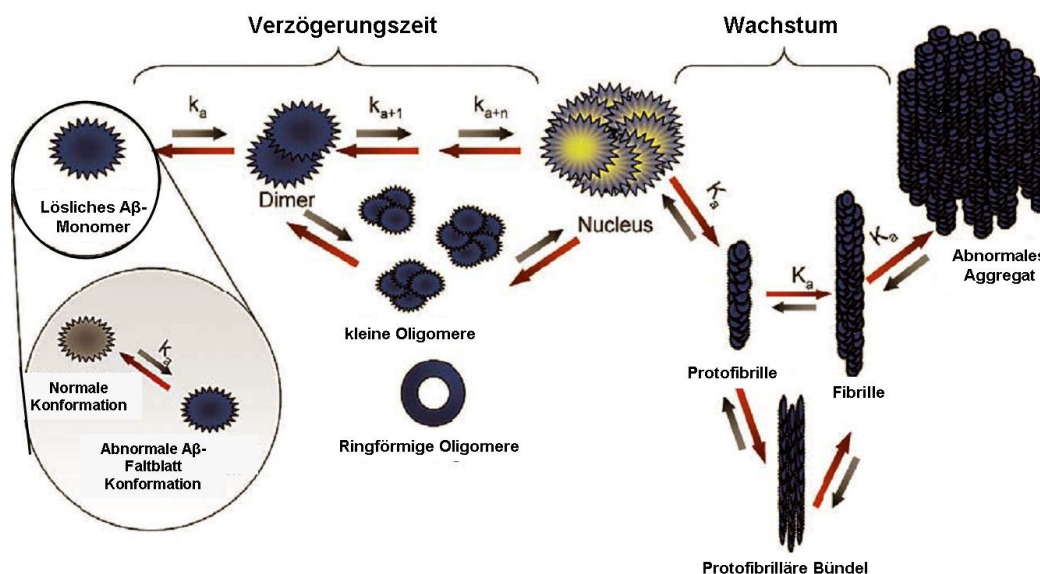
Die Entstehung und Aggregation von Amyloid  $\beta$ -Peptiden, welche aus der proteolytischen Spaltung des APP entstehen, scheint eine zentrale Rolle in der Pathologie der AD zu spielen. Signifikante Hinweise für diese Hypothese sind z.B., dass A $\beta$ -Aggregate mit sterbenden Neuronen kolokalisiert sind, dass bei einigen familiären AD-Formen ein Aminosäureaustausch im A $\beta$ -Peptid vorliegt, die erhöhte Aggregationstendenz der FAD entstammenden A $\beta$ -Varianten *in vitro* und die Entwicklung eines AD-Phänotyps in APP-überexprimierenden, transgenen Mäusen, welche verstärkt A $\beta$ -Peptide produzieren (Übersichtsartikel: FINDER und GLOCKSHUBER, 2007).

Die neurotoxischen Effekte der A $\beta$ -Peptide sind die Auslösung von oxidativem Stress, Membranschädigung und Aktivierung von apoptotischen und inflammatorischen Prozessen (Hardy und Selkoe, 2002; Nakagawa et al., 2000; Soto, 2003).

Dabei spielt der Aggregationszustand der A $\beta$ -Peptide eine wichtige Rolle. Die A $\beta$ -Peptide haben eine Peptidsequenz mit amphipatischem Charakter: Die N-terminalen Aminosäuren sind hydrophil und die 12 bis 14 C-terminalen Aminosäuren hydrophob (Selkoe, 2004). Insbesondere die A $\beta_{42}$ -Isoform mit ihren 14 hydrophoben Aminosäuren aggregiert in physiologischer Umgebung zu einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Die anderen A $\beta$ -Isoformen bilden keine geordneten Strukturen (Zhang et al., 2000; Barrow und Zagorski, 1991). Neben intrazellulären Dimeren können auch extrazelluläre Trimere und Oligomere bestehend aus 3-50 A $\beta$ -Untereinheiten entstehen. Diese globulären Oligomere können sich zu Protofibrillen zusammenlagern, welche Vorläufer der Fibrillen sind. Die mikroskopisch sichtbaren Plaques entstehen aus langen und verzweigten Fibrillen (s. Abb. 1.3).

Es gibt zahlreiche Studien, welche sich mit der A $\beta$ -Neurotoxizität und dessen Aggregationszustand befassen. Die amyloiden Plaques und die Fibrillen selbst scheinen nicht toxisch zu wirken. Sie entstehen eher aus den inaktivierten oder ausgeschleusten, kleineren, neurotoxischen A $\beta$ -Untereinheiten (Lansbury, Jr., 1999). Die Protofibrillen sind in einem flexiblen, dynamischen Zustand mit den Oligomeren und zeigen zumindest *in vitro* Toxizität (Hartley et al., 1999). Deutlichere Hinweise auf Neurotoxizität gibt es bei den

A $\beta$ -Oligomeren (z.B.: Cleary et al., 2005; Dahlgren et al., 2002). Aufgereinigte, 56 kDA große A $\beta$ -Oligomere lösen nach der Injektion in Ratten zytotoxische Vorgänge einhergehend mit Gedächtnisverlusten aus (Lesne et al., 2006). Eine Toxizität der intrazellulären A $\beta$ -Peptid-Dimere kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Experimente an neuronalen Zellen mit mikroinjizierten A $\beta_{42}$ -Peptiden bzw. A $\beta_{42}$ -exprimierender cDNA zeigten einen deutlichen apoptotischen Einfluss des Peptids (Zhang et al., 2002b).



**Abb.1.3: Schematische Darstellung der A $\beta$ -Fibrillogenese**

A $\beta_{42}$ -Peptide können eine  $\beta$ -Faltblatt-Konformation bilden und aggregieren so weiter zu Dimeren, Oligomeren, Protofibrillen und größere Amyloid-Ablagerungen. Dabei entsteht ein Polymerisationskern (Nucleus), welcher durch eine Wachstums-Verzögerung gefolgt von einem schnellen Wachstum charakterisiert ist. Kleine globuläre und ringförmige Oligomere, bei welchen die höchste A $\beta$ -Toxizität vermutet wird, sind auf- und abwandernde Intermediate (modifiziert nach Finder und Glockshuber, 2007).

Bis jetzt hat sich keine der Theorien vollkommen durchsetzen können. Da aber die Plaquebildung erst nach dem Auftreten der ersten AD-Symptome auftritt (Finder und Glockshuber, 2007), scheint eine Rolle der A $\beta$ -Oligomere in der Pathologie der AD am wahrscheinlichsten.

### 1.1.5 Die Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins

Das amyloide Vorläuferprotein (APP) ist ein Typ 1-Transmembranprotein. Es besitzt eine große, N-terminale, extrazelluläre Domäne (~88% der Gesamt-Proteinmasse der neuronalen Isoform), eine einfach Transmembran-Region und einen kleinen cytoplasmatischen Teil (Kang et al., 1987). Es sind mehrere APP-Isoformen bekannt, die

durch alternatives Spleißen entstehen. Das Protein APP695 (aus 695 Aminosäuren) wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, während APP751 und APP770 die Hauptformen im peripheren Gewebe und Gliazellen darstellen (Sandbrink et al., 1997).

Die genaue biologische Funktion des APP ist bisher noch nicht bekannt. Es gibt mehrere Studien, die eine Rolle von APP bei der Zell-Zell-Adhäsion oder in der Verbindung zu extrazellulären Matrix-Komponenten zeigen (Kibbey et al., 1993; Schubert et al., 1989; Soba et al., 2005). APP wird während der Gehirnentwicklung in hohen Konzentrationen in der radialen Glia exprimiert, welche die Neurone an die richtige Position des embryonalen Kortex geleitet (Trapp und Hauer, 1994). Eine weitere wichtige Rolle wird dem APP beim Wachstum der neuronalen Axone zugesagt (Leyssen et al., 2005). Doppel-„knock-out“-Mäuse von APP und dem APP ähnlichen Protein 2 (engl.: Amyloid Precursor like Protein 2; APLP2) zeigen eine verminderte und fehlerhafte neuromuskuläre Synapsenausbildung (Wang et al., 2005) bevor sie postnatal einige Tage später sterben (Heber et al., 2000). Im adulten Gehirn wird APP in hohen Mengen in Regionen exprimiert, in welchen eine permanente Synaptogenese stattfindet (Loffler und Huber, 1992).

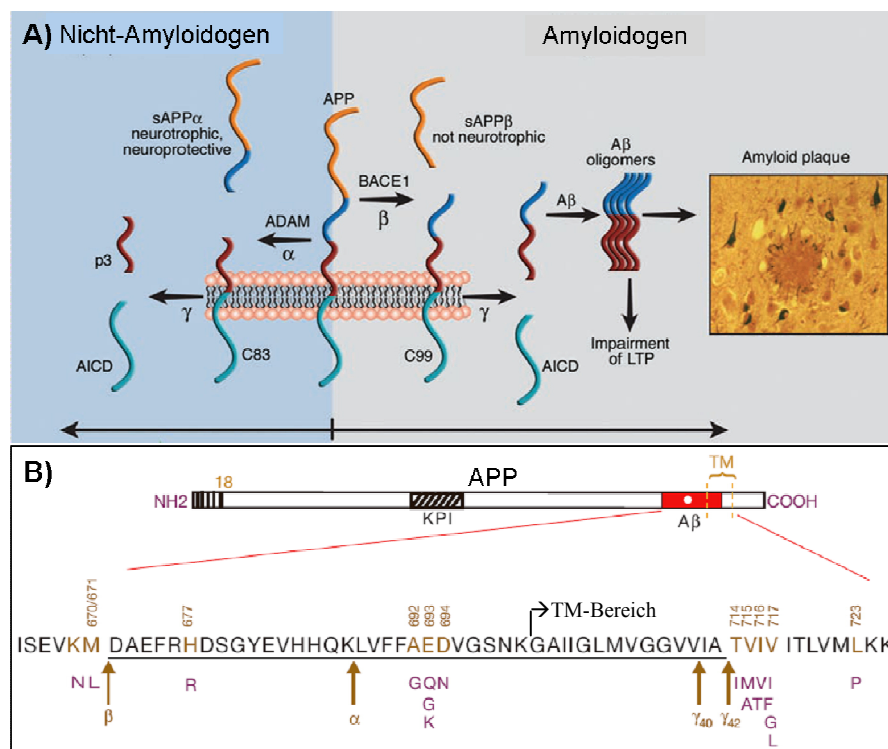
Eine weitere bedeutende Rolle scheinen die APP-Spaltprodukte zu spielen. APP wird vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat transportiert wobei es durch verschiedene postranslationale Modifikationen wie, N- und O- Glykosylierung, und Modifikationen mit Glycosaminoglykanen verändert wird (Lyckman et al., 1998). Auf dem Weg von dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran an der Plasmamembran und im Endosom, wird APP von unterschiedlichen Proteasen prozessiert (Abb. 1.4.):

Die extrazelluläre Domäne von APP kann von der  $\beta$ -Sekretase oder alternativ von der  $\alpha$ -Sekretase geschnitten werden. Bei dem durch die  $\beta$ -Sekretase (Beta-site APP Cleaving Enzyme 1; BACE1) eingeleiteten, sogenannten amyloidogenen Weg wird das APP überwiegend in Endosomen (Haass et al., 1992) an der Aminosäure 28 N-terminal der Transmembrandomäne geschnitten (Seubert et al., 1993; Hussain et al., 1999). Es entsteht ein lösliches APP $\beta$ -Fragment (APP $\beta$ ) und ein 99 Aminosäuren großes C-Terminales Fragment (C99). Das C99-Fragment wird innerhalb der Transmembrandomäne von der  $\gamma$ -Sekretase (Komplex aus der Aspartatprotease Presenilin-1 oder Presenilin-2 sowie Nicastrin, Aph-1 und Pen-1) geschnitten. Dabei wird die intrazelluläre Domäne des APP (AICD) und das A $\beta$ -Peptid freigesetzt (Übersichtsartikel: Selkoe, 2004). Da die  $\gamma$ -Sekretase heterogen schneidet, besteht das A $\beta$ -Peptid überwiegend aus 38-42 Aminosäuren (A $\beta$ <sub>38</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub>), wobei A $\beta$ <sub>42</sub> die potentiell pathogene A $\beta$ -Form darstellt (s. 1.1.4).

Der nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung beginnt mit dem Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase. Dabei wird das APP innerhalb der A $\beta$ -Region an der Aminosäure 12 N-terminal der Transmembrandomäne geschnitten (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Es

entsteht ein lösliches APP $\alpha$ -Fragment (APP $\alpha$ ) und ein 83 Aminosäuren großes C-Terminales Fragment (C83). Das C83-Fragment wird durch die  $\gamma$ -Sekretase in ein 3 kDa großes p3-Fragment und AICD gespalten.

APP $\alpha$  wirkt als proliferativer Faktor (Pietrzik et al., 1998; Saitoh et al., 1989) und verstärkt das Neuriten-Wachstum in neuronalen Zelllinien (Milward et al., 1992). Darüber hinaus wirkt APP $\alpha$  neuroprotektiv gegen ischämische- (Sauerstoffmangel-bedingte) und exzitotoxische- (Glutamat-bedingte) Zell-Schädigungen (Mattson et al., 1993; Morimoto et al., 1998; Smith-Swintosky et al., 1994). Die intracerebrale Injektion von APP $\alpha$  verstärkt die Gedächtnisleistung von adulten Mäusen (Meziane et al., 1998). Bei „knock-in“-Mäusen, in welchen der APP-Genlocus durch eine nur APP $\alpha$  erzeugende APP-Deletionsvariante ersetzt wurde, konnte eine verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung im Vergleich zu APP-„knock-out“-Mäusen festgestellt werden (Ring et al., 2007).



**Abb.1.4: Proteolytische Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins (APP)**

A) Bei der amyloidogenen Prozessierung wird APP zunächst von der  $\beta$ -Sekretase (BACE) in APP $\beta$  und C99, und schließlich von der  $\gamma$ -Sekretase zu A $\beta$  und AICD geschnitten. Das A $\beta$ 42-Peptid aggregiert zu neurotoxischen Oligomeren aus welchen schließlich amyloide Plaques entstehen. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird APP von der  $\alpha$ -Sekretase (z.B. ADAM10) in neuroprotektives APP $\alpha$  und C83, und schließlich von der  $\gamma$ -Sekretase zu p3 und AICD geschnitten. Modifiziert nach (Lichtenthaler und Haass, 2004)

B) Aminosäuresequenz des Sekretase-Spaltbereichs im APP. Die unterstrichenen Aminosäuren beinhalten das A $\beta$ -Peptid. Durch die heterogene katalytische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase können unterschiedliche A $\beta$ -Peptide entstehen (z.B. A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42). Die violetten Buchstaben unter der Wildtyp-Sequenz zeigen einige der bekannten Mutationen der familiären AD. So findet bei der schwedischen Mutation an Position 670/671 ein Aminosäureaustausch von Lysin/Methionin (KM) zu Asparagin/Leucin (NL) statt (TM: Transmembran) (modifiziert nach Selkoe, 2004).

### 1.1.6 Therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit

Es gibt bis Heute zwei Klassen von zugelassenen Medikamenten, welche zur Verbesserung der Gedächtnisleistung von AD-Patienten beitragen. Da bei AD-Patienten überwiegend cholinerge Neuronen durch neurochemische Veränderungen absterben, wurden Medikamente zur Erhöhung der reduzierten Neurotransmitter-Konzentration entwickelt (Davies und Maloney, 1976). Dazu zählen die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Donepezil (Rogers et al., 1998), Rivastagmin (Rosler et al., 1999), Galantamin (Raskind et al., 2000). Der nicht-kompetitive Glutamat-Antagonist Memantin, welcher die dauerhafte (tonische) Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-) Rezeptors unterdrückt, bewirkt ebenfalls eine Verbesserung der Gedächtnisleistung (Reisberg et al., 2003; Mount und Downton, 2006). Diese Wirkstoffe verursachen aber nur eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs.

Ein moderner Therapieansatz beinhaltet die Immunisierung mit pre-aggregierten A $\beta$ -Peptiden, welcher im Tierversuch eine deutliche Reduktion der AD-Neuropathologie bewirkte (Schenk et al., 1999). Dieser Ansatz zeigte jedoch als Nebenwirkung schwere Hirnhautentzündungen beim Menschen und wurde für die weitere Untersuchung gestoppt (Nicoll et al., 2003). Eine Modifikation dieser Methode zeigt die Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern gegen A $\beta$ -Peptide. Der unter dem Namen Bapineuzumab eingesetzte Antikörper (AAB-001) erreichte Ende 2007 die Phase III der Klinischen Studie (Lichtlen und Mohajeri, 2008; Mount und Downton, 2006), wobei in ersten Veröffentlichungen dieser Studie die erwartete anti-dementielle Wirkung des Antikörpers nicht bestätigt werden konnte ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)).

Als weitere Therapiemöglichkeit werden die Inhibierung oder Stimulierung APP-prozessierenden Enzyme in Erwägung gezogen. Ein erfolgversprechender Ansatz wäre zum Beispiel die Inhibierung der  $\beta$ -Sekretase welche neben APP auch den Myelinisierungs-Faktor Typ III Neuregulin 1 prozessiert. Derzeit sind einige für die Therapie-Versuche geeigneten Inhibitoren bekannt (Willem et al., 2006; Ghosh et al., 2008; Rajendran et al., 2008).

Die Inhibierung der  $\gamma$ -Sekretase wäre ein weiterer Ansatzpunkt, wobei zu beachten ist, dass die  $\gamma$ -Sekretase neben APP weitere Substrate wie den Notch-Rezeptor besitzt. Das Spaltprodukt des Notch-Rezeptors, die Notch-Intrazelluläre-Domäne (NICD) übernimmt wichtige Aufgaben bei der Expression Entwicklungs-relevanter Gene, welche zur Differenzierung, Proliferation und Apoptose beitragen (de Strooper et al., 1999).

Die Inhibierung der  $\gamma$ -Sekretase bewirkt darüber hinaus ambivalente Effekte bezüglich der APP-Prozessierung: Bei niedriger Dosierung wird die A $\beta$ -42 Produktion erhöht und erst bei hoher Dosierung erniedrigt (Zhang et al., 2001). In einer Klinischen Studie wurde

Alzheimer-Patienten ein  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor appliziert, wodurch eine Erniedrigung der  $A\beta_{40}$ -Konzentration im Plasma gemessen wurde (Siemers et al., 2006). Eine neuere Wirkstoffklasse die sogenannten  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren (GSM) bewirken eine selektive Reduktion der neurotoxischen  $A\beta_{42}$ -Peptide bei gleichbleibender  $A\beta_{40}$ -Menge. Hierbei wurden einige nicht-steroidale antiinflammatorische Wirkstoffe (NSAID) als GSMs identifiziert (Czirr et al., 2008).

Eine weitere vielversprechende Therapiemöglichkeit ist durch die Stimulation der  $\alpha$ -Sekretase gegeben. Neben der Reduktion der  $\beta$ -Sekretase-Prozessierung mit resultierender  $A\beta$ -Peptid-Produktion, entsteht zusätzlich das neuroprotektive und neurotrophe APP $\alpha$ -Fragment welches positiv auf bereits geschädigte Neurone wirkt (s. 1.1.5). Die Überexpression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 (s. 1.1.2) zeigte im Tiermodell eine deutliche Reduktion der löslichen  $A\beta$ -Peptide und der senilen Plaques. Darüber hinaus wurde eine signifikante Verbesserung der Lern- und Gedächtnisleitung beobachtet (Postina et al., 2004). Demzu wurde kürzlich im Tiermodell gezeigt, dass bedingt durch die neurotrophe Wirkung von APP $\alpha$  eine Erhöhung der kortikalen Synaptogenese (vor allem cholinergischer Synapsen) stattfindet (Bell et al., 2008). Die Hemmung von ADAM10 führte dagegen zu einer erhöhten Sensitivität gegen exzitotoxischen Stress im Tiermodell der Alzheimer Krankheit (Clement et al., 2008). Dies zeigt, dass über die Stimulierung der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität eine erfolgversprechende, therapeutische Ansatzmöglichkeit gegeben ist, um die Entstehung der AD zu verhindern (Übersichtsartikel: Fahrenholz, 2007).

### 1.2.1 ADAM-Proteine als $\alpha$ -Sekretasen

Es konnten drei Mitglieder der Disintegrin- und Metalloproteinase- (engl.: A Disintegrin And Metalloproteinase, ADAM-) Familie mit potentieller  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität identifiziert werden: Dazu zählen ADAM9, ADAM17 und ADAM10 (Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Koike et al., 1999).

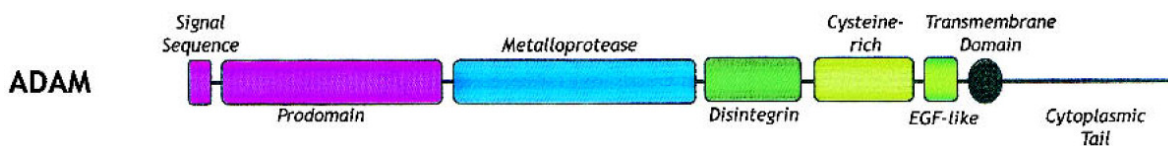
Die Überexpression von ADAM9 (MDC9; Meltrin- $\gamma$ ) und APP führte *in vitro* zu einer erhöhten APP $\alpha$ -Sekretion (Koike et al., 1999). Allerdings schneidet aufgereinigtes ADAM9 nicht an der typischen  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle des APP sondern zwei Aminosäuren weiter N-terminal (Roghani et al., 1999). Zudem scheint ADAM9 keinen bedeutenden  $\alpha$ -sekretorischen Einfluß *in vivo* zu haben, da in ADAM9 Knock-out-Mäusen die APP-Prozessierung unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren stattfindet (Weskamp et al., 2002).

ADAM17 bzw. TACE (engl.: Tumor Necrosis Factor alpha Converting Enzyme) führt bei Überexpression in nicht-neuronalen Zellen zu einer signifikant erhöhten, konstitutiven Freisetzung von APP $\alpha$  (Slack et al., 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Überexpression von ADAM10 gemacht, welches APP an der  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle

schneidet (Lammich et al., 1999). Die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität von ADAM10 wurde zudem am Mausmodell demonstriert (Postina et al., 2004). Embryonische Fibroblasten von TACE-Knock-Out-Mäusen zeigen in der Phorbol-Ester-(PMA-) stimulierten APP $\alpha$ -Sekretion keine Unterschiede zu den Wildtyp-Zellen, wobei die konstitutive Sekretion erhalten bleibt (Buxbaum et al., 1998). Es wird angenommen, dass sich die  $\alpha$ -Sekretasen ADAM10 und TACE funktionell ersetzen können (Hartmann et al., 2002).

### 1.2.2 Struktur und Funktion von ADAM10

ADAM10 gehört wie alle ADAM-Proteine zu der Untergruppe der Metzinkine aus der Zink-Protease-Superfamilie (Stocker et al., 1995; Maskos et al., 1998). Die Proteine besitzen mehrere charakteristische Domänen: eine Prodomäne mit Signalsequenz, eine Metzinkin-Metalloproteinase-typische katalytische Domäne, eine Cystein-reiche Disintegrin-ähnliche Domäne, eine Transmembranregion und eine kurze cytoplasmatische Domäne (Seals und Courtneidge, 2003) (Abb.1.5).



**Abb.1.5: Domänenstruktur eines ADAM-Proteins**

Die ADAM-Proteine haben mehrere gemeinsame Domänen: Prodomäne, Metalloproteinasen-typische katalytische Domäne und Cystein-reiche Disintegrin-ähnliche Domäne (hier getrennt dargestellt). Die Mehrheit der ADAM-Proteine sind Membranproteine mit EGF-ähnlichem Motif, Transmembrandomäne und cytoplasmatischer Domäne (modifiziert nach Seals und Courtneidge, 2003).

Die Prodomäne von ADAM10 wirkt als molekulares Chaperon für die Ausbildung des katalytisch aktiven ADAM10-Proteins (Fahrenholz et al., 2000). Sie ist für die Inaktivierung der Protease-Domäne verantwortlich und wird erst im Golgi-Apparat zur Aktivierung des Enzyms abgespalten (Schlondorff et al., 2000). Die Inaktivierung erfolgt durch die Cysteinreste der Prodomäne, welche mit den Zink-Ionen der katalytischen Domäne einen Komplex bilden. Durch Auflösung dieses Cystein-Zink-Komplexes kann ein aktiver Wasser-Zink-Komplex entstehen (Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990). Zwischen der Pro- und der katalytischen Domäne besitzt ADAM10 eine Furin-Erkennungssequenz (RXXR) welche eine Spaltsequenz für die Furin-ähnliche Pro-Protein Konvertase darstellt (Anders et al., 2001). Die katalytische Domäne besteht aus einer konservierten Zink-

Bindungssequenz mit Histidin-Resten, welche für die proteolytischen Funktion essentiell sind. Ihr folgt eine Cystein-reiche Disintegrin-ähnliche Domäne, welche eine Rolle in der Substraterkennung spielt (Blobel, 1997). Der Transmembranregion folgt die cytoplasmatische Domäne. Diese steht in einem möglichen Zusammenhang mit intrazellulären Signaltransduktions-Prozessen (Stone et al., 1999).

Neben APP (Lammich et al., 1999) und APLP2 (Endres et al., 2005) existieren noch weitere potentielle ADAM10-Substrate. So wird Kollagen Typ IV (Millichip et al., 1998), Kollagen XVII (Franzke et al., 2002), die TNF $\alpha$ -Proform (Rosendahl et al., 1997; Lunn et al., 1997), der Notch-Rezeptor (Pan und Rubin, 1997), der Notch-Ligand Delta (Qi et al., 1999), Ephrin A2 (Hattori et al., 2000), das Chemokin Fraktaline (CX3CL1) (Hundhausen et al., 2003), das Adhäsionsprotein L1 (Mechtersheimer et al., 2001), EGF und Beta-Cellulin (Sahin et al., 2004), der CXC Chemokin-Ligand 16 (Gough et al., 2004), N-cadherin (Reiss et al., 2005), Axl Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Budagian et al., 2005), das Membran-Kofaktor-Protein CD46 (Hakulinen und Keski-Oja, 2006), der Immunglobulin E Rezeptor CD23 (Weskamp et al., 2006), Bri2 ein Typ-2-Transmembran-Protein welches mit Familiären Demenzformen assoziiert ist (Martin et al., 2008), und Klotho - ein Transmembran-Protein welches eine zentrale Rolle in Alterungsprozessen spielt (Chen et al., 2007) von ADAM10 gespalten. Für die meisten dieser potentiellen Substrate steht der Nachweis *in vivo* jedoch noch aus.

### 1.2.3 Regulation der katalytischen ADAM10-Aktivität

Neben der Inaktivierung durch die Prodomäne wurden weitere inhibitorische Regulationsmechanismen für ADAM10 entdeckt. Die Gewebe-Inhibitoren der Metalloproteinasen (engl.: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMP) 1 und 3 inhibieren die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität von ADAM10 *in vitro* (Amour et al., 2000; Hoe et al., 2007). Ebenfalls inhibitorisch auf die proteolytischen Aktivität von ADAM10 wirkt das „Reversion-inducing-cystein-rich protein with Kazal motifs“ (RECK) im Notch-Signalweg (Muraguchi et al., 2007).

Die Stimulation von ADAM10 bzw. der  $\alpha$ -Sekretaseaktivität kann über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren verlaufen. So führt die Stimulation des Serotonin-5-Hydroxytryptamin-4- (5-HT<sub>4</sub>-) Rezeptors zu einer vermehrten Sekretion von APP<sub>s</sub> *in vitro* (Robert et al., 2001) und *in vivo* (Cachard-Chastel et al., 2007). Die Stimulation der muscarinischen Acetylcholin-Rezeptoren M1 und M3 zeigt ähnliche Effekte *in vitro* (Nitsch et al., 1992; Lin et al., 1999; Nitsch et al., 2000) und *in vivo* wobei, bedingt durch eine vermehrte nicht-amyloidogene APP-Prozessierung eine Verminderung der A $\beta$ - und Tau-Pathologie im Hypocampus und Kortex nachgewiesen wurde (Caccamo et al., 2006).

Selektive M1 Agonisten werden bereits in der ersten klinischen Studie erprobt (Murphy et al., 2007). Die Rezeptoren sind mit der Phospholipase C (PLC) gekoppelt, welche über Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Die direkte Aktivierung der PKC mit Phorbolestern wie z.B. PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) führt ebenfalls zu einer vermehrten APP $\alpha$ -Sekretion (Hung et al., 1993). Auch Bryostatine, eine andere Klasse der PKC-Aktivatoren, führen zu einer vermehrten APP $\alpha$ -Sekretion im Mausmodell (Etcheberrigaray et al., 2004).

Ein weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher eine Rolle in der  $\alpha$ -Sekretase-Stimulation spielt, ist der in neuronalem Gewebe vorkommende PAC1-Rezeptor. PAC1 wird nur durch das Neuropeptid PACAP (engl.: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) aktiviert. PACAP wirkt als neurotropher Faktor, Neurotransmitter und Neuromodulator, welcher eine wichtige Rolle bei der Gehirnentwicklung einnimmt (Reglodi et al., 2000, Vaudry et al., 2000). Die intracerebroventrikuläre Injektion der aus 38 Aminosäuren bestehenden PACAP-38-Isoform in Ratten bewirkt eine Verbesserung der Gedächtnisleistung (Sacchetti et al., 2001). Die Aktivierung der in humanen embryonalen Nierenzellen exprimierten PAC1-Rezeptoren mit PACAP-38 bzw. PACAP-27 führt zu einer verstärkten  $\alpha$ -sekretorischen, ADAM10-abhängigen APP-Prozessierung (Kojro et al., 2006). Die Stimulation erfolgt über PKC-, Mitogen-aktivierter Protein-Kinase- (MAP-Kinase-) und Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3-Kinase-) abhängige Signaltransduktion. Da PACAP über ein bi-direktionales Transportsystem über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird (Dogrukol-Ak et al., 2004), wäre es ein Kandidat für eine therapeutische Behandlung der Alzheimer-Krankheit.

### **1.2.4 Genterapie durch ADAM10-Überexpression**

Die Überexpression von ADAM10 im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist ein weiterer Ansatz zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung. Prinzipiell wäre die Entwicklung einer Genterapie mit einem geeigneten ADAM10 cDNA-Vektor denkbar. Weitere Alternativen sind durch die Erhöhung der ADAM10-Transkription oder -Translation gegeben. Dabei ist zu beachten, dass die Transkription unabhängig von der Translation reguliert werden kann. So wurde gezeigt, dass die Translation der  $\beta$ -Sekrease BACE1 von der 5'-untranslatierten Region (UTR) reprimiert wird (Lammich et al., 2004). Ebenso gibt es Hinweise auf eine ADAM10-Translationsrepression durch die ADAM10-5'-UTR (Lammich, Ludwig Maximilians Universität München und Fahrenholz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, persönliche Mitteilung, 2008).

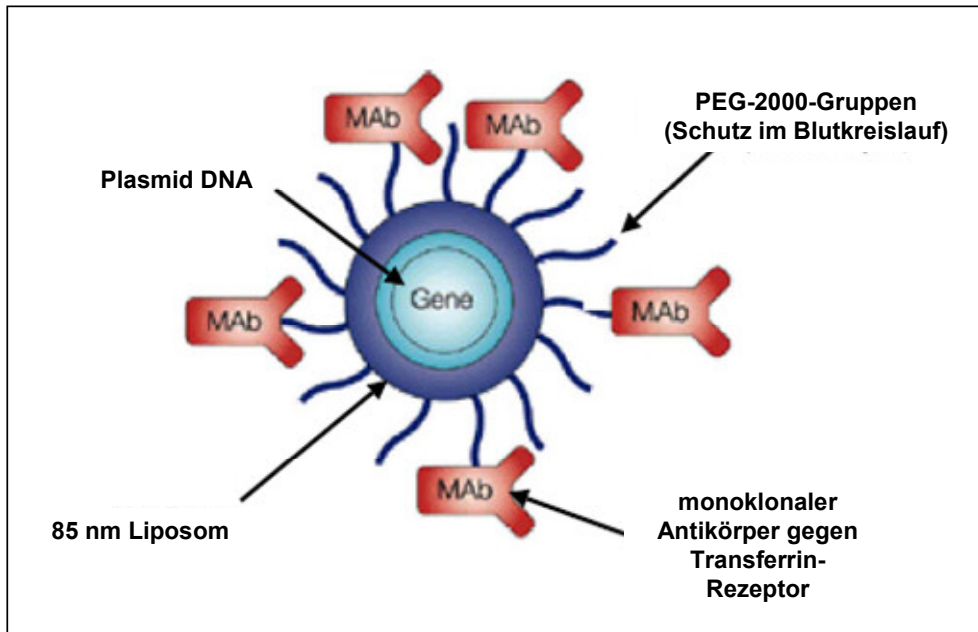
Für die Anwendung einer *in vivo* Transfektion mit cDNA gibt es in der Literatur zahlreiche Ansätze, welche je nach Zielorgan auf unterschiedlichen Technologien basieren: Es besteht die Möglichkeit der DNA-Kopplung an virale Vektoren (z.B. Marr et al., 2003), der Herstellung von kationischen Lipid-DNA-Komplexen (z.B. Brigham et al., 1989; Barron et al., 1999) und Polymer-DNA-Komplexen (Luten et al., 2008) oder des Einschlusses der DNA in Liposomen (z.B. Monnard et al., 1997).

Bei der Herstellung viraler Vektoren werden z.B. Adenoviren, Herpesviren oder Lentiviren genetisch modifiziert. Es werden die Gene für Replikation, Zusammenbau und Infektion deletiert und das therapeutische Gen inseriert. Die administrierten Viren infizieren die Zellen und diese exprimieren das therapeutische Gen mit hoher Effizienz (Übersichtsartikel: Gardlik et al., 2005). Der Körper reagiert jedoch auf Viren mit zum Teil heftigen Immunreaktionen, welche in klinischen Studien zu Todesfällen geführt haben (Reid et al., 2002). Ein weiterer Nachteil dieses Transfektionssystems ist die fehlende Organspezifität.

Die kationischen Lipid-DNA-Komplexe bestehen aus kationischen Lipiden, welche aufgrund ihrer positiv geladenen Kopfgruppen einen Komplex mit der negativ geladenen DNA eingehen (Felgner et al., 1987; Koltover et al., 1998). Diese Komplexe können in physiologischer Lösung zu mehreren Mikrometer großen Strukturen aggregieren, wodurch sie nach intravenöser Injektion hauptsächlich im Lungenkreislauf zirkulieren. Die Lunge ist daher das einzige Organ, welches mit diesem System erreicht werden kann (Brown et al., 2001).

Polymer-DNA-Komplexe können z.B. aus Polyethylenimin (PEI), Polylysinen (PLL) oder Polylactaten (PLA) (Lungwitz et al., 2005; Kwoh et al., 1999; Perez et al., 2001) bestehen. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Formulierungsansätze dieser Polymere, welche durch Kopplung mit organspezifischen Rezeptoragonisten *in vivo* zu einer erfolgreichen Transfektion geführt haben (z.B. Ogris et al., 2003). Bei intravenöser Injektion konnte allerdings bisher keiner dieser Komplexe in neuronales Gewebe eindringen. Dies liegt zum Einen an der zu kurzen Verweildauer der Polymer-DNA-Komplexe im Blutkreislauf und zum Anderen an dem großen Durchmesser der Komplexe, wodurch sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können.

Die Transfektion von Neuronen *in vivo* konnte bislang nur mit in Liposomen eingeschlossener DNA nachgewiesen werden (Shi und Pardridge, 2000; Schnyder und Huwyler, 2005; Zhu et al., 2004) (Abb.1.6.).



**Abb.1.6: Schematische Darstellung eines Immunoliposoms mit integrierter DNA**

Die Plasmid-DNA im Inneren des Liposoms ist vor enzymatischer Degradation geschützt. Die Polyethylenglykol-2000 (PEG-2000) -Gruppen schützen die Liposomen im Blutkreislauf. Die gekoppelten Antikörper binden an den Transferrin Rezeptoren der Blut-Hirn-Schranke. Durch die geringe Größe gelangen die Liposomen durch Transzytose zu den Neuronen (modifiziert nach Pardridge, 2002)

Die Liposomen für den DNA-Transfer bestehen überwiegend aus neutralen Lipiden. Ein Teil dieser Lipide ist mit hydrophilen Polyethylenglykol- (PEG-) Gruppen gekoppelt (s. Abb. 1.6). Die PEG-Gruppen schützen die Liposomen im Blutkreislauf vor der Aggregation mit Oponinen, bestehend aus Komplement-Proteinen, Apolipoproteinen, Fibronektinen und Immunglobulinen, welche die Entfernung der Liposomen durch Phagozytose aus dem Kreislauf fördern können (Allemann et al., 1997; Moghimi et al., 2001; Gref et al., 2000; Papahadjopoulos et al., 1991). Zudem sind die Liposomen mit Antikörpern gekoppelt, welche gegen den Transferrinrezeptor der Gehirn-Endothelzellen gerichtet sind (Lee et al., 2000; Kissel et al., 1998). Diese pegylierten Immunoliposomen (PIL) binden an den Transferrinrezeptoren und können aufgrund ihres Durchmessers von nur 70-90 nm durch Transcytose zu den Neuronen transportiert werden. Dort werden sie durch Endozytose aufgenommen. Mit diesem System konnte Reporter-Gen-DNA in das Gehirn von Mäusen eingebracht und durch die enzymatische Reaktionsfähigkeit des Reporter-Gen-Produkts nachgewiesen werden (Pardridge, 2003). Demnach wäre dieses System für die *in vivo* Transfektion von ADAM10-cDNA in das Gehirn am zuverlässigsten.

### 1.2.5 Transkriptionelle Regulation des ADAM10-Gens

Das ADAM10-Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 15 (15q21.3-q23) und bei der Maus auf dem Chromosom 9 (Yamazaki et al., 1997). Es besteht aus 16 Exons und 15 Introns. Die Exons sind mit 0,09- und 0,8 kb relativ klein im Vergleich zu den Introns mit Größen von 0,5 - 35,3 kb. Der Vergleich der Protein-kodierenden Sequenzen von Mensch und Maus ergibt eine Übereinstimmung von 90% auf mRNA-Ebene.

Die 5'-flankierende Promotorregion stromaufwärts vom Translationsstartpunkt des ADAM10-Gens besitzt keine TATA-Box und zählt somit zu der Gruppe der TATA-losen Promotoren (Prinzen et al., 2005) (Abb.1.7.). Der „GC“-Gehalt der ersten 600 bp vor dem Translationsstartpunkt (+1) beträgt 67%. Der Bereich ist eingebettet in eine große „GC“-reiche Sequenz, die vom Nukleotid -700 über das erste Exon bis zu dem Nukleotid +200 reicht. In diesem Bereich sind 9 CpG-Inseln lokalisiert. Das Vorliegen von CpG-Inseln deutet darauf hin, dass die ADAM10-Expression durch DNA-Methylierung reguliert werden könnte.

Innerhalb der ersten 479 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt sind die Promotorregionen von Mensch und Maus zu 78% ähnlich. In diesem Bereich sind mehrere potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen lokalisiert, welche in beiden Spezies vorkommen. Dazu zählen zwei Bindestellen für SP1 bei -521 bp und -366 bp, eine CAAT-Box bei -479 bp, eine USF- (-317 bp), zwei MZF- (-237 bp und -273 bp) und eine NFκB-Bindestelle bei -198 bp. Zwei RXR-Bindestellen sind bei -302 bp und -203 bp lokalisiert. Durch funktionelle Analyse von Promotor-Deletionskonstrukten konnte gezeigt werden, dass die Region von -508 bp bis -300 bp essentiell für die konstitutive Promotoraktivität ist. Das USF-Bindeelement scheint dabei eine wichtige Funktion bei der Promotoraktivierung zu spielen (Prinzen et al., 2005; Prinzen, 2005). Der Transkriptionsaktivator USF interagiert mit den Transkriptionsfaktoren TFII-I und TFII-D und erleichtert so die Bildung und Stabilisierung des Präinitiationskomplexes der Transkription (Roy et al., 1991; Sawadogo, 1988). Eine ähnliche Funktion hat auch SP1, dessen putative Bindungsstelle ebenso wie die von USF in EMSA-Studien eine DNA/Protein-Interaktion gezeigt hat. In EMSA-Studien wurde weiterhin eine DNA/Protein-Interaktion an der potentiellen RXR-Bindestelle bei -203 bp nachgewiesen. Die RXR-Bindestelle bei -203 bp und -302 bp stromaufwärts des ADAM10-Translationsstartpunktes sind sogenannte „Halbseiten-Bindestellen“ einer VDR/RXR- (Vitamin D-Rezeptor/ Retinoid X Rezeptor) Erkennungssequenz, welche jedoch nicht dem für Retinoid-Rezeptoren charakteristischen DNA-Bindemotiv entspricht (s.1.3.1).



**Abb.1.7: Vergleich der ADAM10-Promotorregionen aus Mensch und Maus**

Die durch das Programm MatInspector (Genomatix) ermittelten, potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind unterstrichen. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit einem durchgezogenen Pfeil markiert; der gestrichelte Pfeil verweist auf einen alternativen Transkriptionsstartpunkt. Der Translationsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. (Prinzen, 2005)

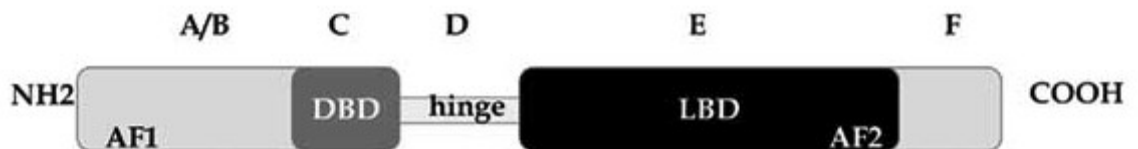
Stimulationsversuche mit Retinsäure zeigten eine deutliche Aktivierung des ADAM10-Promotors (Prinzen et al., 2005; Prinzen, 2005). Darüber hinaus konnte eine erhöhte ADAM10-Expression auf Proteinebene und dementsprechend eine erhöhte APP-Prozessierung nachgewiesen werden (Endres et al., 2005).

### 1.3.1 Die Retinoid-Rezeptoren

Zu den Retinoid-Rezeptoren zählen die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) und die Retinsäure-Rezeptoren (engl.: Retinoic Acid Receptor, RAR) aus der Klasse der nukleären Hormon-Rezeptoren. Jede dieser Rezeptorfamilien besteht aus drei Isotypen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), welche durch verschiedene Gene codiert werden (Leid et al., 1992; Mangelsdorf und Evans, 1995; Chambon, 1996). Für jeden Isotyp gibt es mindestens zwei Isoformen, die durch differentiale Promotoraktivierung und alternatives Spleißen entstehen (z.B. RAR $\beta$ 1 und RAR $\beta$ 2), (Bastien und Rochette-Egly, 2004).

Die Retinoid-Rezeptoren bestehen aus sechs konservierten Regionen (A-F) wie in Abb.1.8 dargestellt. Die N-terminale A/B-Region ist variabel und hat eine Liganden-unabhängige

Aktivierungsfunktion (AF1). Die anschließende C-Region besteht aus einer DNA-Binde-Domäne, welche durch zwei Zink-Finger Motive gekennzeichnet ist (Luisi et al., 1991; Lee et al., 1993; Schwabe et al., 1993). Die Region D dient als Gelenk zwischen der DNA-Binde-Domäne (C) und der Liganden-Binde Domäne (E), wodurch die Domäne E eine Rotationsfähigkeit erhält. Letztere besteht aus einem C-Terminalen Motif (AF2), welches für die Liganden-abhängige Transaktivierung, die Homo- und Heterodimerisierung sowie für die Assoziation mit Koaktivatoren und -Repressoren benötigt wird (Chakravarti et al., 1996; Glass und Rosenfeld, 2000; Wurtz et al., 1996). Die F-Region fehlt bei den RXRs. Ihre Funktion bei den RARs ist noch umstritten. Diese Region besitzt Phosphorylierungsstellen und könnte eine Rolle bei der Aktivierung der AF1 oder AF2-Domänen spielen (Bastien und Rochette-Egly, 2004).



**Abb.1.8: Domänenstruktur eines Retinoid-Rezeptors**

Die Retinoid-Rezeptoren bestehen aus 6 Regionen (A-F). Die Region A/B hat eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (AF1). Die Region C besteht aus der DNA-Binde-Domäne (DBD). Die Region D dient als Gelenk („hinge“) wodurch nach Ligandenbindung eine Konformationsänderung stattfinden kann. Die Region E besteht aus der Liganden-Bindungsdomäne (AF2) und der Homo- bzw. Heterodimerisierungs-Domäne. Die Region F ist ein potentieller Aktivator der AF1- und AF2-Domänen der Retinsäure-Rezeptoren (RAR) (modifiziert nach Rizzo et al., 2005).

Das klassische Retinoid-Rezeptor-Binde-Element der DNA (engl.: Retinoid Response Element; RRE bzw. Retinoic-Acid response Element, RARE)) besteht aus direkten Wiederholungen des Motivs: 5'-PuG(G/T)TCA-3' unterbrochen von 1, 2 oder 5 Basenpaaren (DR1, DR2 und DR5) (Leid et al., 1992; Mangelsdorf und Evans, 1995). An den DR1, DR2- und DR5-Elementen binden bevorzugt RAR/RXR-Heterodimere wohingegen RXR-Homodimere ausschließlichs an DR1-Elementen binden. RAR/RXR-Heterodimere, welche an DR1-Elementen binden, besitzen häufig Repressor-Funktionen (Mangelsdorf et al., 1991; Chambon, 1996; Bastien und Rochette-Egly, 2004).

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt über Ligandenbindung. Zu den RAR-Rezeptorliganden zählen die all-trans-Retinsäure (engl.: All-trans Retinoic Acid, atRA) und deren Isomer 9-cis-Retinsäure (9-cis-RA). Der Retinoid X Rezeptor wird dagegen nur von 9-cis-RA aktiviert (Klaholz et al., 1998), wobei das Vorkommen dieses Liganden *in vivo* noch angezweifelt wird (Desvergne et al., 2006). Als weitere RXR-Liganden werden Fettsäuren in Betracht gezogen. So wurde bei der Kristall-Struktur-Analyse eines RAR/RXR-Heterodimers ein Ölsäuremolekül in der Liganden-Bindungstasche von RXR

entdeckt (Bourguet et al., 2000). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure und Docosahexaensäure (DHA) RXR *in vitro* (Lengqvist et al., 2004) und *in vivo* (de Urquiza et al., 2000) aktivieren können. Einem Wachstumsregulator aus Insekten, dem Methopren und dessen Derivat Methoprensäure, konnte ebenfalls eine RXR-Aktivierung *in vitro* nachgewiesen werden (Harmon et al., 1995). Neben den beschriebenen, natürlichen Liganden gibt es synthetische Liganden wie TNPB ((E)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl]benzoic acid)), welches selektiv alle RAR-Isotypen aktiviert oder den RXR-Aktivator LDG1069 und den pan-RAR/RXR-Aktivator LG100567 (Alvarez et al., 2004) (Abb. 1.9.).

Es gibt mehrere Modelle zur Transkriptionsaktivierung durch Retinoid-Rezeptoren:

Die Retinoid-Rezeptoren sind permanent an der DNA gebunden und wirken so als Transkriptions-Repressoren (Bastien und Rochette-Egly, 2004). Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die als Korepressoren dienenden Histon-Deacetylasen freigesetzt werden und die als Koaktivatoren dienenden Histonacetylasen binden können. Die Histonacetylasen lockern zusammen mit weiteren Histon-modifizierenden Enzymen die Chromatinstruktur wodurch die Anlagerung eines Srb- und Mediator-Protein-Beinhaltenden Komplexes (SMCC) begünstigt wird. Der SMCC fördert durch die Interaktion mit dem RNA-Polymerase-II-Holoenzym die Anlagerung der Transkriptionsmaschinerie an den Promotor (Woychik und Hampsey, 2002).

Eine weitere Möglichkeit der Transkriptionsinitiierung könnte über das Ubiquitin-Proteasom-System verlaufen. So wurde gezeigt, dass nach Retinoidzugabe RAR/RXR-Heterodimere durch Proteasomen degeneriert wurden (Boudjelal et al., 2000; Osburn et al., 2001).

Darüber hinaus könnte die Transkription über Signalwege eingeleitet werden, wodurch die Rezeptoren phosphoryliert und dementsprechend aktiviert werden (Bastien und Rochette-Egly, 2004).

### 1.3.2 Retinoid X Rezeptor-Heterodimere

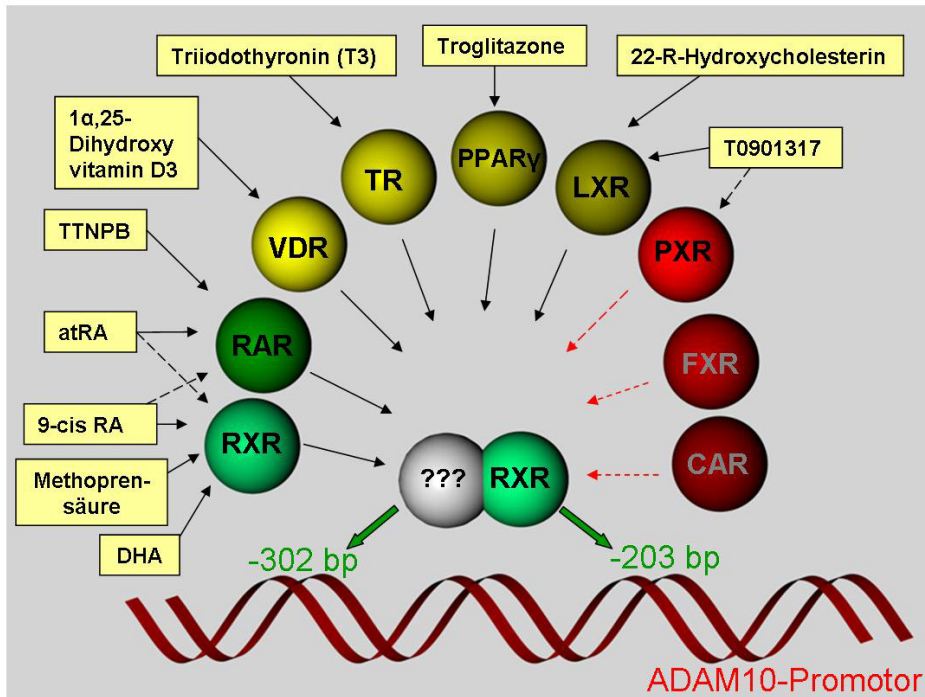
Die RXR-Bindestellen auf dem ADAM10-Promotor entsprechen nicht dem charakteristischen Retinoid-Rezeptor Bindemotiv. RXRs können mit einer Reihe weiterer nukleärer Hormonrezeptoren neben RARs dimerisieren (Aranda und Pascual, 2001; Tirona und Kim, 2005). Es könnten daher neben den RARs noch weitere Rezeptortypen mit RXR ein Heterodimer bilden und so die Expression von ADAM10 verstärken (Abb.1.9.). Die mit dem Programm MatInspector ermittelten Bindestellen auf dem ADAM10-Promotor im Bereich -203 bp und -302 bp sind sogenannte „Halbseiten-Bindestellen“ eines VDR/RXR-Heterodimers. Der Vitamin D-Rezeptor wird von dem

Steroidhormon  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  aktiviert (Norman et al., 2002). Die physiologischen Effekte sind u.a. die Regulation der Kalzium-Homöostase, des Knochen-Metabolismus und antiinflammatorischer Prozesse.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  reguliert die Synthese von neurotrophen Faktoren wie NGF (engl.: Nerve growth factor), Neurotrophin (NT) 3, NT4 und GDNF (engl.: Glial cell-line derived neurotrophic factor) (Jehan et al., 1996; Neveu et al., 1994; Wion et al., 1991), wodurch ein Zusammenhang mit der Aktivierung von ADAM10 mit resultierender Sekretion des neurotrophen APP $\alpha$  bestehen könnte.

Der Thyroidhormon Rezeptor könnte ein weiterer potentieller RXR-Heterodimer-Partner für die Stimulation von ADAM10 sein. Thyroidhormone, insbesondere Triiodothyronin (T3), sind für die Hirnentwicklung und -Funktion essentiell. Die neurologischen Symptome einer Thyroidhormon-Defizienz ähneln denen von Alzheimer-Patienten. Im Zell- und Mausmodell wurde gezeigt, dass T3 zu einer verminderten APP-Expression führt (Belandia et al., 1998; O'Barr et al., 2006).

Der Heterodimer-Partner PPAR $\gamma$  (engl.: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) könnte, nach Aktivierung durch den synthetischen Liganden Troglitazone die Expression von ADAM10 ebenfalls stimulieren. PPARs spielen im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus, bei der neuronalen Zelldifferenzierung und bei inflammatorischen Prozessen (Heneka und Landreth, 2007). Versuche mit antiinflammatorischen PPAR $\gamma$ -Aktivatoren führten *in vitro* zu einer vermehrten Entfernung von A $\beta$  aus dem Medium (Camacho et al., 2004) und *in vivo* zu einer verminderten BACE-Expression und A $\beta$ -Konzentration in den Zellen (Sastre et al., 2006).

Das RXR/LXR (engl.: Liver X Receptor)-Heterodimer besitzt eine funktionelle Aufgabe im Lipid- und Glukose-Metabolismus. Die Rezeptoren spielen eine Rolle bei der ABC- (engl.: ATP-binding-cassette-) Transporter geförderten Exkretion (Efflux) von Cholesterin aus Makrophagen (Laffitte et al., 2001). Hohe Cholesterin-Konzentrationen in neuronalen Membranen fördern die Prozessierung von APP zu A $\beta$  (Simons et al., 1998; Eehalt et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass ein niedriger Cholesteringehalt die ADAM10 vermittelte APP-Prozessierung erhöht (Kojro et al., 2001). Die natürlichen Liganden für LXRs sind 24(S),25-Epoxycholesterin, 25-Hydroxycholesterin und 22-R-Hydroxycholesterin (Tranheim et al., 2006). LXRs können auch durch den synthetischen nicht-steroidalen Liganden T0901317 aktiviert werden (Schultz et al., 2000). Die orale Behandlung von APP-überexpimierenden Mäusen mit T0901317 führte zu einer erhöhten APP $\alpha$ - und eine erniedrigte A $\beta$ -Proteinmenge (Koldamova et al., 2005).



**Abb.1.9: Die potentiellen RXR-Dimere und deren Agonisten für die Aktivierung des ADAM10-Promotors**

Die Bereiche -203 bp und -302 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt des ADAM10-Promotors weisen potentielle RXR-Dimer-Bindesequenzen auf. Gezeigt sind die potentiellen Heterodimer-Partner von RXR und deren Liganden (Bezeichnung s. Text). Grün dargestellt sind die Dimer-Partner RAR und RXR, welche nach Aktivierung mit den Agonisten atRA und 9-cis RA bereits eine Stimulation des Promotors gezeigt haben. Die Gelb dargestellten Heterodimer-Partner VDR, TR, PPAR $\gamma$  und LXR spielen eine Rolle bei der AD-Pathologie. Bei den Rot dargestellten Heterodimeren konnte bisher kein Zusammenhang zur AD bzw. kein Vorkommen im Gehirn festgestellt werden

T0901317 stimuliert neben LXR ebenfalls den Pregnan X Rezeptor (PXR) (Mitro et al., 2007). PXR wird als Heterodimer mit RXR von einer großen Zahl unterschiedlicher Liganden wie Gallensäuren, Statinen, HIV-Protease-Inhibitoren, Kalzium-Kanal-Modulatoren, Steroiden, und einer Großzahl unterschiedlicher Xenobiotika aktiviert (Ekins et al., 2002). PXR stimuliert hauptsächlich in der Leber die Expression einer Reihe von Genen, welche der Detoxifikation dienen (Rosenfeld et al., 2003). Er spielt aber auch eine Rolle im Gehirn: So konnte gezeigt werden, dass T0901317 den PXR im Mausmodell der Niemann-Pick C Krankheit aktiviert, woraus neuroprotektive Auswirkungen durch Detoxifikation von Cholesterin-Oxidationsprodukten resultieren (Langmade et al., 2006). Ein Zusammenhang zwischen dem PXR und der Alzheimer-Pathologie konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

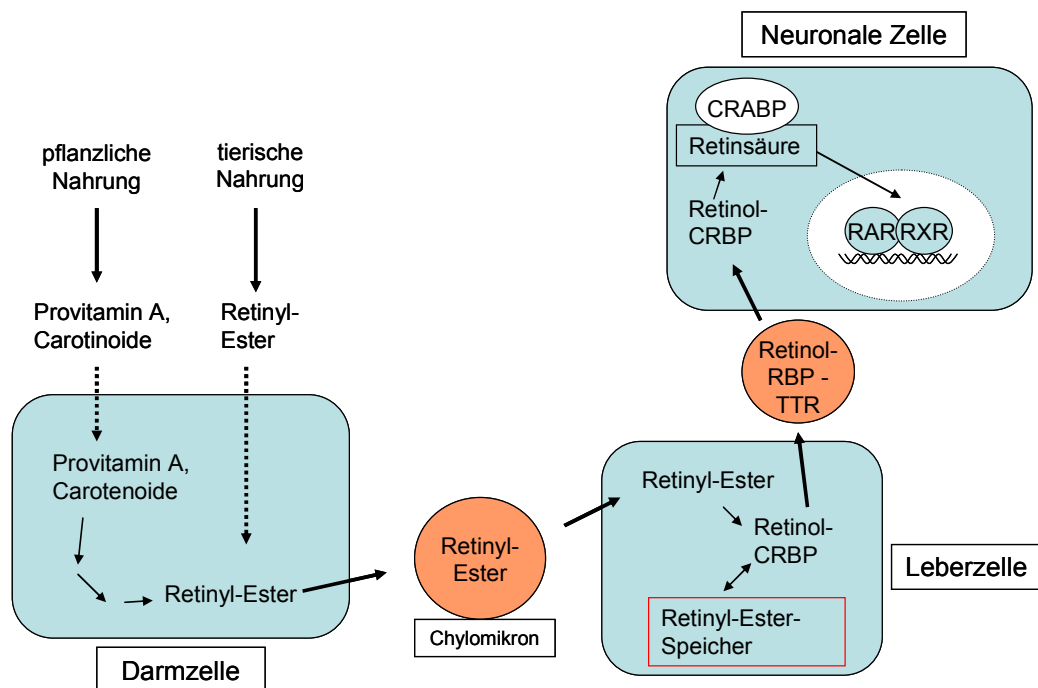
Weitere potentielle Heterodimerpartner von RXR sind der Farnesoid X Rezeptor (FXR) und der konstitutive Androstan Rezeptor (engl.: Constitutive Androstane Receptor, CAR). FXR wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und spielt eine Rolle in der Gallensäure-Synthese und Transport. CAR wird ebenfalls hauptsächlich in der Leber exprimiert und

aktiviert dort die Expression von Cytochromen und Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen (Rizzo et al., 2005; Ekins et al., 2002).

### 1.3.3 Der Retinoid-Metabolismus

Die Retinoide sind Derivate von Vitamin A (all-trans Retinol), welches nicht von Tieren *de novo* synthetisiert werden kann. Es wird mit der Nahrung in Form von Carotinoiden aus Pflanzen und einigen Mikroorganismen oder in Form von Retinyl-Estern aus tierischer Nahrung aufgenommen (Blomhoff und Blomhoff, 2006) (Abb.1.10).

Die Carotinoide werden im Dünndarm über passive Diffusion aufgenommen und in Vitamin A-Derivate verestert (Retinyl-Ester). Ein Großteil der Ester gelangt über den Transport mit Chylomikronen in die Leber (z.B. in Hepatozyten). In der Leber werden die Retinyl-Ester zu Retinol hydrolysiert. Ein Teil des Retinols (ca. 50-80% des Gesamt-Körper-Retinols) wird in perisinusodiale Sternzellen gelagert, so dass eine dauerhafte Blut-Plasma-Retinol-Konzentration von 1-2  $\mu\text{M}$  gewährleistet werden kann (Blomhoff et al., 1982; Blomhoff et al., 1990).



**Abb.1.10: Der Vitamin A-Metabolismus**

Die Vitamin A-Aufnahme erfolgt mit der pflanzlichen Nahrung in Form von Carotinoiden oder mit der tierischen Nahrung in Form von Retinyl-Estern. Die Retinyl-Ester werden vom Darm mittels Chylomikronen zur Leber, dem Haupt-Retinyl-Ester-Speicher, transportiert. Bei Bedarf wird Retinol, gebunden an das Retinol-Bindeprotein (RBP) und Transthyretin (TTR), zu den Zellen transportiert. Dort werden die Retinole mittels Dehydrogenasen zu Retinsäure oxidiert, welche an das zellulären Retinsäure-Bindeprotein gebunden in den

Zellkern transportiert wird. Im Zellkern aktiviert die Retinsäure die Retinoid-Rezeptoren und leitet so die Transkription der Gene ein.

Bei Bedarf wird Retinol gebunden an das Retinol-Binde-Protein 4 (RBP4) in das Plasma sekretiert (Ronne et al., 1983), wobei ca. 95% von dem RBP4 mit Transthyretin (TTR) in einem Verhältnis von 1:1 assoziiert ist (Peterson, 1971). Über die Blut-Hirn-Schranke der Hirnkapillaren gelangt so das Retinol u. A. in neuronale Zellen, wo es mit zellulären Retinol-Binde-Proteinen (engl.: Cellular Retinol Binding Protein, CRBP) mit hoher Affinität assoziiert wird. Mittels Dehydrogenasen (Retinaldehyd-Dehydrogenasen, RALDH) wird das Retinol zu Retinal und schließlich zu Retinsäure (bzw. all-trans Retinsäure) oxidiert. Die atRA liegt in der Zelle an die zellulären Retinsäure-Binde-Proteine (CRABP) I und II gebunden vor. Das CRABP dient als Transporter von atRA in den Zellkern, wo es schließlich an die Retinoid-Rezeptoren binden und diesen aktivieren kann (Lane und Bailey, 2005). Der Abbau der atRA kann durch die Cytochrom P450 Enzyme 26 A1, B1, C1 (CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1) und durch CRABPI gefördert werden (White et al., 1997; White et al., 2000; Taimi et al., 2004; Boylan und Gudas, 1992).

### 1.3.4 Neuronale Retinoid-Funktion

Die Retinsäure (atRA) spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des ZNS z.B. bei der Hirnstrukturierung, der neuronalen Differenzierung und beim Wachstum der Axone. So ist atRA auf der anteroposterioren Achse der Neuralplatte für die Organisation des Rautencephalons und des Rückenmarks verantwortlich. Abweichende Retinoidmengen führen zu schweren Missbildungen in diesen Bereichen (Liu et al., 2001; Wilson et al., 2007). Retinsäure induziert die Differenzierung von verschiedenen neuronalen und glialen Zelltypen. Dabei werden Gene aktiviert, welche in der Expression von Transkriptionsfaktoren, Zell-Signalmolekülen, Strukturproteinen, Enzymen und Oberflächenrezeptoren involviert sind. Zu den aktivierten Transkriptionsfaktoren zählen z.B. BRN2, Nukleärer Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und Neurogenin1. Weitere Beispiele für atRA aktivierte Gene während der Entwicklung sind die Protein Kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), Mikrotubuli-Assoziiertes Protein 2 (MAP2) und Presenilin 1 (PSEN1) (Übersichtsartikel: Maden, 2007).

Auch im adulten Gehirn haben Retinoide eine wichtige Bedeutung. So wirkt das 11-cis-Retinal als Chromophor bei visuellen Prozessen. Die all-trans Retinsäure besitzt dagegen eine wichtige Funktion bei der neuronalen Plastizität, bei Lern- und Erinnerungsprozessen und bei der adulten Neurogenese: Die neuronale Plastizität insbesondere die synaptische Plastizität bei Lern- und Erinnerungsprozessen ist über die Langzeitpotentierung (engl.: Long-term potentiation, LTP) messbar. So wurde bei RAR $\beta$ - sowie RAR $\beta$ / $\gamma$ -

defizienten Mäusen eine Verminderung in der hippocampalen LTP gemessen (Chiang et al., 1998). Die Bedeutung der Retinsäure in der synaptischen Plastizität wurde durch die Beobachtungen an Vitamin A-defizienten Mäusen untermauert: Der Entzug von Vitamin A über einen Zeitraum von 12 Wochen zeigte bei Mäusen eine deutliche Reduktion der LTP (Misner et al., 2001) und bei Ratten einen Abfall der im radialen Wasserlabyrinth gemessenen Lernfähigkeit (Cocco et al., 2002). Diese Defizite waren nach Zugabe von Vitamin A-haltigem Futter reversibel. Die zellulären Mechanismen für diese Lern- und Erinnerungsprozesse sind noch umstritten. So könnten beispielsweise Calcium-abhängige Signalprozesse damit zusammenhängen: Calbindin D28K, ein Kalzium-pufferndes Protein, und Neurogranin, ein Kalzium-sensitives Calmodulin-Binde-Protein werden durch Retinsäure reguliert (Iniguez et al., 1994; Wang und Christakos, 1995). Vitamin A-defiziente Mäuse haben eine erniedrigte Menge Neurogranin im Gehirn (Etchamendy et al., 2003). Ein weiterer potentieller Mechanismus für eine veränderte neuronale Prozessierung könnte über Somatostatin verlaufen. Somatostatin, welches eine Rolle bei kognitiven Funktionen spielt, wird bei Vitamin A-Defizienz in Hippocampus der Ratte deutlich reduziert (Hernandez-Pinto et al., 2006). Auch das Acetylcholin (ACh)-System könnte von Retinoiden beeinflusst werden: Die Scopolamin-induzierte Ausschüttung von ACh wird bei Vitamin A-Defizienz verringert (Cocco et al., 2002). Ebenso ist die Menge an Cholin-Acetyltransferase (ChAT), ein ACh synthetisierendes Enzym, reduziert (Corcoran et al., 2004; Maden, 2007).

Retinoide spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Dopamin-Signalgebung in mesolimbischen und mesostriatalen Neuronen und in dem Fortbestand nigrostriataler dopaminergener Neuronen (McCaffery und Drager, 1994; Krezel et al., 1998).

Sie besitzen weiterhin einen starken Einfluss auf die Proliferation neuronaler Stammzellen. Die Produktion von neuronalen Stammzellen aus dem adulten Hippocampus wird *in vitro* durch Zugabe von Retinoiden verdreifacht (Takahashi et al., 1999). Im Rattenmodell konnte eine Verdopplung der neuronalen, subventrikularen Vorläuferzellen nach Fütterung mit Retinol-Palmitat festgestellt werden (Giardino et al., 2000). Dagegen zeigte die Administration von 13-cis Retinsäure zunächst nur in der ersten Woche einen Anstieg aber nach drei Wochen einen Abfall der Zellproliferation und auch der Lernfähigkeit (Crandall et al., 2004).

Diese Befunde zeigen die wesentliche Bedeutung der Retinoide bei neuronalen Prozessen. Daher stehen sie auch im engem Zusammenhang mit verschiedenen neuronalen Erkrankungen wie der Depression (O'Reilly et al., 2006), der Amyotrophen Lateralsklerose (Corcoran et al., 2002), der Schizophrenie (Goodman, 1998), Parkinson (Eichele, 1997) und Morbus Alzheimer (Goodman und Pardee, 2003).

### 1.3.5 Der Zusammenhang zwischen dem Retinoid-Metabolismus und der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit zeichnet sich durch einen progressiven Gedächtnisverlust aus (s. 1.1.1). Die molekularen Prozesse dieser neuronalen Krankheit stehen im engen Zusammenhang mit dem Retinoid-Signalweg, welcher unter physiologischen Konditionen für die Aufrechterhaltung bzw. Funktion der Gedächtnisleistung mitverantwortlich ist.

So wurde bereits vor 20 Jahren ein Zusammenhang zwischen dem Carotingehalt im Blut und der AD festgestellt (Singh et al., 1988). Nachfolgende Untersuchungen, in welchen ein erniedrigter Vitamin A-Gehalt im Blutplasma von Alzheimer-Patienten gemessen wurde, bestätigten diese Beobachtungen (Zaman et al., 1992; Jimenez-Jimenez et al., 1999). Weiterhin konnte im Hippocampus und parietalen Kortex von Alzheimer-Patienten eine bis zu zweimal höhere RALDH-Aktivität festgestellt werden (Connor und Sidell, 1997). Retinoide und Carotine inhibieren die A $\beta$ -Fibrillenbildung und destabilisieren bereits geformte Fibrillen *in vitro* (Ono et al., 2004). In hippocampalen Neuronen aus der Ratte führen die natürlichen Retinsäure-Isomere zur Reduktion einer durch A $\beta$  ausgelösten Neurodegeneration (Sahin et al., 2005).

Auf molekularer Ebene gibt es weitere eindeutige Zusammenhänge zwischen Retinoiden und der AD. So konnte *in vitro* eine erhöhte Presenilin-2-, aber konstante Presenilin-1-Expression nach atRA-Behandlung beobachtet werden (Culvenor et al., 2000). Ebenfalls konnte eine erhöhte mRNA-Expression von APP und BACE durch atRA gemessen werden (Lahiri, 1995; Yang et al., 1998; Satoh und Kuroda, 2000). Auf mRNA- und Proteinebene wurde eine eindeutige ADAM 10-Stimulation durch atRA nachgewiesen (Prinzen et al., 2005; Endres et al., 2005). Durch die  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung entsteht u.a. A $\beta$ <sub>40</sub> und AICD<sub>59</sub> sowie A $\beta$ <sub>42</sub> und AICD<sub>57</sub>. Es wurde anhand von RARE-Expressionskonstrukten gezeigt, dass AICD<sub>59</sub> signifikant die RA gesteuerte Genexpression hemmt wogegen AICD<sub>57</sub> keine Effekte auf die Expression hat (Gao und Pimplikar, 2001).

Es gibt eine Reihe weiterer Retinoid-gesteuerter Gene, die im Zusammenhang mit der AD-Pathologie stehen. Dazu gehören die Cholin-Acetyltransferase (ChAT) (Kobayashi et al., 1994), das Insulin degradierende Enzym (IDE) (Melino et al., 1996) und Apolipoprotein E (APOE) (Cedazo-Minguez et al., 2001). Die ChAT ist in der cholinergen Neurotransmitter-Synthese involviert. Bei der AD kommt es zu einer Störung dieses Transmittersystems, welches durch einen veränderten Retinoid-Metabolismus beeinflusst werden könnte. Das IDE ist ein lösliches Enzym, welches neben Insulin auch das A $\beta$ -Peptid abbaut (Kurochkin und Goto, 1994). Bei AD-Patienten wurde eine verminderte IDE-Expression und -Aktivität im Hippocampus festgestellt (Cook et al., 2003). Der genetische Risikofaktor für die sporadische Alzheimer Erkrankung, das ApoE, ist ein Transportprotein der Chylomikronen, mit welchen u.a. die Retinyl-Ester im Blutkreislauf transportiert werden und so für die

Zellen verfügbar wird (Blomhoff, 1994). Ein weiteres Transportprotein, das TTR, ist zusammen mit dem RBP für den Transport von Retinol zu den Neuronen verantwortlich. Das TTR steht ebenfalls in Assoziation mit der AD. TTR bildet Komplexe mit A $\beta$  und verhindert so die Fibrillenbildung *in vitro* (Schwarzman und Goldgaber, 1996). Diese Beobachtung konnte kürzlich auch in APP- und TTR-überexpimierenden Mäusen bestätigt werden (Buxbaum et al., 2008).

Genetische Kopplungsanalysen verschiedener Chromosomenabschnitte (z.B. 12q13, 10q23, 2p13) zeigen einen engen Zusammenhang zwischen dem Retinoid-Metabolismus und der AD (Goodman und Pardee, 2003). Auf diesen Abschnitten sind die Gene für einige Retinoid-Rezeptoren, Retinol-Dehydrogenasen, das atRA-abbauende CYP26A, die zellulären Retinsäure- und Retinol-Bindeproteine.

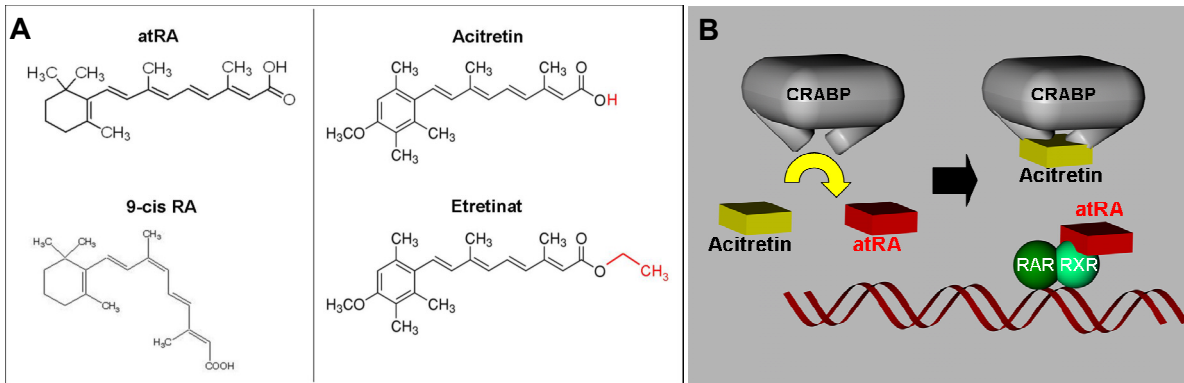
Diese Befunde zeigen, dass eine Modulation der Enzyme und Transporter des Retinoid-Metabolismus eine Auswirkung auf die Ätiologie der AD haben. Daher könnte durch die pharmakologische Aktivierung der Retinoid-Rezeptoren die Degeneration der Neurone bzw. die A $\beta$ -Toxizität während der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit vermindert werden.

### **1.3.6 Retinoide in der Medizin- Das synthetische Retinoid Acitretin**

Vitamin A wird seit mehr als 50 Jahren bei der Behandlung zahlreicher Hautkrankheiten wie der Schuppenflechte und Akne eingesetzt. Aufgrund seiner sehr starken Nebenwirkungen wie Leberschädigungen, Kopfschmerz, Übelkeit und Bluthochdruck (Geubel et al., 1991; Kowalski et al., 1994) wurde es durch die all-trans Retinsäure ersetzt, welche aber nur bei der äußerlichen Anwendung die gewünschten therapeutischen Effekte zeigt (Zouboulis, 2001). Die Entwicklung von synthetischen Retinoiden wie Etretinat und Acitretin führte im Jahr 1972 zu einem Durchbruch in der systemischen Behandlung von Hautkrankheiten mit relativ geringen Nebenwirkungen (Bollag, 1974; Bollag, 1975; Larsen et al., 1993). Etretinat ist stark lipophil und wird in Fettgeweben gespeichert, wo es eine Halbwertszeit von 100 Tagen hat und erst nach ca. 2 Jahren vollständig abgebaut ist (DiGiovanna et al., 1989). Da es wie alle Retinoide in hohen Dosen teratogene Nebenwirkungen besitzt, wurde es daher 1997 wieder vom Markt genommen. Acitretin ist um den Faktor 50 weniger lipophil und wird nicht in Fettgeweben gelagert. Es besitzt eine Halbwertszeit von 50 Stunden und hat sich aufgrund dessen auf dem Markt als zugelassenes systemisches Medikament gegen diverse Hautkrankheiten etabliert (Yamauchi et al., 2003).

Acitretin wirkt sich indirekt auf die Retinoid-Rezeptor Stimulation aus. Es bindet mit hoher Affinität an CRABP I und II und verdrängt atRA von dieser Bindestelle, so dass die intrazelluläre atRA Konzentration erhöht wird und eine vermehrte Retinoid-Rezeptor-

Aktivierung daraus resultiert (Abb.1.11) (Tian et al., 1997; Saurat, 1999; Armstrong et al., 2005). Pharmakokinetische Studien haben gezeigt, dass Acitretin nach intravenöser Injektion schon nach wenigen Minuten im Gehirn nachweisbar ist (Eisenhardt und Bickel, 1994).



**Abb.1.11: Die Verdrängung von atRA aus dem zellulären Retinsäure-Bindeprotein (CRABP) durch Acitretin**

A) Die Strukturformeln der natürlichen Retinoide atRA und 9-cis RA und der synthetischen Retinoide Acitretin und Etretinat. B) Acitretin bindet mit hoher Affinität an dem CRABP und verdrängt atRA aus dieser Bindung. Durch die Freisetzung von atRA kommt es zu einer verstärkten Retinoid-Rezeptor-Aktivierung

Diese pharmakologischen Eigenschaften und die Tatsache, dass ADAM10 und die  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung durch Retinoide stimuliert wird, machen Acitretin zu einem potentiellen Therapeutikum zur Prävention der AD, welches durch Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* geprüft werden muss.

### 1.4 Zielsetzung

Die Überexpression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 führte im Mausmodell zu einer vermehrten nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP. Dies wirkte sich auf eine verminderte A $\beta$ -Ablagerung in Form von senilen Plaques und einer verbesserten Lern- und Gedächtnisleistung aus (Postina et al., 2004).

Das Ziel dieser Arbeit war, einen therapeutischen Ansatz gegen die Alzheimer-Krankheit am Mausmodell zu entwickeln, in welchem durch medikamentöse Behandlung eine Stimulierung bzw. erhöhte Expression der  $\alpha$ -Sekretase hervorgerufen wird. Dafür wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt: Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAC1 durch PACAP, die Gentherapie mit ADAM10-cDNA und die ADAM10-Promotorstimulation durch Retinoid-Rezeptor-Aktivierung.

Für die Aktivierung von PAC1 durch PACAP-38 wurde das PACAP-Peptid intranasal bei Mäusen appliziert. Durch diese Applikationsmethode sollte das Peptid über die Blut-Hirn-Schranke zu den Neuronen gelangen. Die Veränderung der ADAM10-abhängigen APP-Prozessierung sollte anschließend durch mikroskopische Untersuchung an Gehirnschnitten gezeigt werden.

Zusätzlich war eine Gentherapie mit ADAM10-cDNA mittels Immunoliposomen nach Pardridge (2003) geplant. Für die Herstellung des DNA-Transportsystems galt es zunächst die Einzelschritte wie DNA-Einschluss, Konjugation der Antikörper und Größe der Liposomen zu erproben und zu optimieren. Anschließend sollte die Transfektionseffizienz *in vitro* an Mauszellen und *in vivo* durch Injektion in die Schwanzvene der Maus untersucht werden. Die Transfektion der Neuronen sollte durch die enzymatische Reaktionsfähigkeit eines Reporter-gen-Produktes nachgewiesen werden.

Schließlich wurde die ADAM10-Promotorstimulation durch Aktivierung der Retinoid-Rezeptoren im Mausmodell untersucht. Hierfür galt es zunächst die Stimulierbarkeit des murinen ADAM10-Promotors mit dem humanen ADAM10-Promotor zu vergleichen. Weiterhin sollten die beiden potentiellen RXR-Bindestellen auf den ADAM10-Promotoren im Bereich -203 bp und -302 bp stromaufwärts von Translationsstartpunkt auf die Aktivierbarkeit durch verschiedene Agonisten von RXR-Heterodimerpartnern *in vitro* untersucht werden.

Der Medikamenten-Wirkstoff Acitretin wurde als potentielles Therapeutikum für die Prävention der AD getestet. Das Potential des synthetischen Retinoids die Genexpression von ADAM10 zu stimulieren sollte zunächst mittels Reverse-Transkriptase-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion *in vivo* nach oraler Applikation im Gehirn der Mäuse überprüft werden. Weiterhin sollte die Wirkung von Acitretin anhand der Proteinmenge von ADAM10 und von APP-Prozessierungsprodukten im Zell- und Mausmodell nachgewiesen werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

| Gerät   | Hersteller                 | Ort                   |
|---|----------------------------|-----------------------|
| ABIPrism 7000 Cycler  | Applied Biosystems         | Bedford, MA (USA)     |
| Äkta FPLC   | GE Healthcare              | München               |
| Bakterien-Sterilwerkbank Hera Safe 12                       | Heraeus                    | Hanau                 |
| Digitales Kamerasystem SIS F-View XS                        | Olympus                    | Hamburg               |
| ELISA Reader Powerwave XS                                   | Biotek                     | Bad Friedrichshall    |
| Flüssigkeits-Szintillationszähler Tri-carb 2100 TR          | Canberra-Packard           | Dreieich              |
| Glasplatten für SDS-Polyacrylamidgele                       | Eigenanfertigung           | Universitätswerkstatt |
| Luminometer FluoStarOptima                                  | BMG Labtechnologies        | Bedford, MA (USA)     |
| Handextruder  | Avanti Polar Lipids        | Alabaster, AL (USA)   |
| Heizblock   | Fisher Bioblock Scientific | Illkirch Cedex (F)    |
| Inkubationsschüttler MULTITRON                              | Infors GmbH                | Einsbach              |
| Kühlzentrifuge J2-21  | Beckmann                   | München               |
| MicroMax CCD-Kamera   | Princeton Instruments      | Trenton, NJ (USA)     |
| Mini Perm Drehvorrichtung RA40                              | Hereaus                    | Hanau                 |
| Mikroskop   | Hund                       | Wetzlar               |
| Mikrospritze (50 µl)  | Roth                       | Karlsruhe             |
| Neubauer-Zählkammer   | Roth                       | Karlsruhe             |
| NuPAGE Gelkammer  | Invitrogen                 | Karlsruhe             |
| Photometer Hitachi U-2000                                   | Colora Messtechnik GmbH    | Lorch                 |
| Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 100 + MicroMax CCD Kamera | Zeiss                      | Oberkochen            |

## Material und Methoden

| Gerät   | Hersteller           | Ort                   |
|---|----------------------|-----------------------|
| Rotationsverdampfer                                 | Büchi                | Essen                 |
| Sterilwerkbank für Zellkultur<br>HeraGuard          | Heraeus              | Hanau                 |
| Thermocycler T-Gradient                             | Biometra             | Göttingen             |
| Tischkühlzentrifuge 5415R                           | Eppendorf            | Hamburg               |
| Tischzentrifuge 5415C                               | Eppendorf            | Hamburg               |
| Tissue-Lyser  | Qiagen               | Hilden                |
| Ultraschallbad Sonorex RK100                        | Bandelin             | Berlin                |
| Ultraschallgerät Branson<br>Sonifier                | Heinemann            | Schwäbisch-Gmünd      |
| Ultrazentrifuge L7-65                               | Beckmann             | München               |
| VersaDoc Imaging System<br>Model 3000 (CCD-Kamera)  | Bio-Rad Laboratories | München               |
| Vertikale<br>Elektrophoresekammer                   | Eigenanfertigung     | Universitätswerkstatt |
| Vortexgerät   | Bender & Hobein      | Zürich (Schweiz)      |
| Wasserbad   | B. Braun             | Melsungen             |
| Zellkultur-CO <sub>2</sub> -Brutschrank<br>CB150LE2 | Binder               | Tuttlingen            |
| Zellkultur-Zentrifuge Rotana<br>460                 | Hettich Zentrifugen  | Tuttlingen            |
| Dynamische Lichtstreuung<br>Zetasizer Nano-S-Size   | Malvern Instruments  | Herrenberg            |

### 2.1.2 Verwendete Chemikalien

| Chemikalie                          | Hersteller                     | Ort                                 |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Allgemeine Laborchemikalien         | Sigma-Aldrich<br>Roth<br>Merck | Steinheim<br>Karlsruhe<br>Darmstadt |
| 1- $\alpha$ -25 Dihydroxyvitamin D3 | Sigma-Aldrich                  | Steinheim                           |
| 2-Iminoethanol                      | Sigma-Aldrich                  | Steinheim                           |
| 22-R-Hydroxycholesterin             | Sigma-Aldrich                  | Steinheim                           |
| 9-cis RA (9-cis Retinsäure)         | Sigma Aldrich                  | Steinheim                           |

## Material und Methoden

| Chemikalie  | Hersteller          | Ort                 |
|---|---------------------|---------------------|
| [ $\alpha$ 32]P-dCTP  | Hartmann Analytik   | Braunschweig        |
| Acitretin   | LGC Promochem       | Wesel               |
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)<br>Rotiphorese  | Roth                | Karlsruhe           |
| Agarose   | Axon                | Kaiserslautern      |
| Agarose (Präparatives Gel)  | FMC                 | Rockland, ME (USA)  |
| APS (Ammoniumpersulfat)   | Sigma Aldrich       | Steinheim           |
| Arachidonsäure  | Sigma Aldrich       | Steinheim           |
| Arachinsäure  | Sigma Aldrich       | Steinheim           |
| atRA (All-Trans-Retinsäure)   | Alexis Axxorra      | Grünberg            |
| Aquatex   | Merck               | Darmstadt           |
| BSA (Rinderserumalbumin)  | Roth                | Karlsruhe           |
| CDP-Star-Reagenz  | Tropix              | Bedford, MA (USA)   |
| CMC (Carboxymethylcellulose<br>Natriumsalz)   | Roth                | Karlsruhe           |
| DDAB<br>(Dimethyldioctadecylammoniumbromid)   | Avanti Polar Lipids | Alabaster, AL (USA) |
| Deferrioxamin (Aus Tf-PEI<br>Transferrinfection Kit)  | Bender Med Systems  | Wien (A)            |
| DHA (Docosahexaensäure)   | Sigma Aldrich       | Steinheim           |
| DTT (Dithiotreitol)   | Sigma Aldrich       | Steinheim           |
| DMEM (Dulbeccos' Modified Eagle<br>Medium)  | PAA                 | Cölbe               |
| DMEM/F12  | PAA                 | Cölbe               |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)   | Applichem           | Darmstadt           |
| DSPE-PEG <sub>2000</sub> (1,2-Diastearoyl- <i>sn</i> -<br>Glycero-3-Phosphoethanolamin- <i>N</i> -<br>[Methoxy(Polyethylenglykol)-2000])<br>Ammoniumsalz              | Avanti Polar Lipids | Alabaster, AL (USA) |
| DSPE-PEG <sub>2000</sub> - Maleimid<br>(1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-<br>Phosphoethanolamin- <i>N</i> -<br>[Maleimid(Polyethylenglykol)2000])<br>Ammoniumsalz | Avanti Polar Lipids | Alabaster, AL (USA) |

## Material und Methoden

| Chemikalie  | Hersteller          | Ort                        |
|---|---------------------|----------------------------|
| ECL-Reagenz (Super Signal Sensitivity Substrate)                  | Pierce              | Rockford, IL (USA)         |
| Etretinat   | LKT Laboratories    | St. Paul, MN (USA)         |
| FCS (Fötale Kälberserum)  | PAA                 | Cölbe                      |
| GI 254023x  | Glaxo               | Harlow (UK)                |
| Glutamin  | PAA                 | Cölbe                      |
| HPBCD (2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin)                    | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| Insulin   | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| I-Block   | Tropix              | Bedford, MA (USA)          |
| IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)                 | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| Lipofectamine 2000  | Invitrogen          | Karlsruhe                  |
| LY 294002   | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| Manoalid  | Alexis Axxorra      | Grünberg                   |
| MEM (Minimum Essential Medium)                                    | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| MES/SDS-Laufpuffer für Nu-PAGE (20x)                              | Invitrogen          | Karlsruhe                  |
| Methoprensäure  | Biomol              | Hamburg                    |
| Mowiol  | Calbiochem          | Bad Soden                  |
| MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| Nu-Page Puffer (4x)   | Invitrogen          | Karlsruhe                  |
| Opti-MEM  | Invitrogen          | Karlsruhe                  |
| PACAP-38 (Acetyliert)   | Prof. Z. Grzonka    | Universität Gdansk (Polen) |
| Passive-Lysis-Buffer  | Promega             | Madison, WI (USA)          |
| Panserin 401  | Pan Biotech         | Aidenbach                  |
| Penicillin/Streptomycin   | PAA                 | Cölbe                      |
| Poly-L-Lysin  | Sigma-Aldrich       | Steinheim                  |
| POPC  | Avanti Polar Lipids | Alabaster (USA)            |
| Proteinfärbelösung - Roti-Quant                                   | Roth                | Karlsruhe                  |
| Proteaseinhibitormischung Complete Mini                           | Roche               | Mannheim                   |

| Chemikalie   | Hersteller    | Ort        |
|--|---------------|------------|
| Recombinantes humanes Erythropoietin $\alpha$  | Merck         | Darmstadt  |
| RNA Later RNA Stabilization Puffer   | Qiagen        | Hilden     |
| Sepharose-CL-4B  | Fluka         | Buchs (CH) |
| Szintillationslösung Rotiszint Eco Plus  | Roth          | Karlsruhe  |
| T0901317   | Alexis Axxora | Grünberg   |
| TEMED (Tetramethylethyldiamin)   | Sigma-Aldrich | Steinheim  |
| TCA (Trichloressigsäure)   | Applichem     | Darmstadt  |
| T3 (Triiodothyronin)   | Sigma-Aldrich | Steinheim  |
| Troglitazone   | Alexis Axxora | Grünberg   |
| Tocopherol (Vitamin E)   | Sigma-Aldrich | Steinheim  |
| TTNPB ((E)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl]benzoic acid) | Biomol        | Hamburg    |
| Tween20  | Applichem     | Darmstadt  |
| Trypsin/EDTA-Lösung (100x)   | PAA           | Cölbe      |
| X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyronosid)                                    | Sigma-Aldrich | Steinheim  |

### 2.1.3 Gebrauchsmaterialien

| Gebrauchsmaterialien   | Hersteller                     | Ort                  |
|--|--------------------------------|----------------------|
| 10 cm – , 6-Loch-, 24-Lochplatten                                    | Sarstedt                       | Nürnbergrecht        |
| 5 ml- / 50ml – Zellkulturflaschen                                    | Sarstedt                       | Nürnbergrecht        |
| 1,5 ml/ 2 ml- Reaktionsgefäße<br>15 ml / 50 ml Schraubdeckelröhrchen | Sarstedt                       | Nürnbergrecht        |
| Amicon Ultra-10kDA-/30kDA-Röhrchen                                   | Millipore                      | Schwalbach           |
| Chroma Spin-TE-30-Säule  | Clontech                       | Palo Alto, CA (USA)  |
| Schlundsonde für Mäuse   | FMI – Föhr Medical Instruments | Seeheim/OberBeerbach |

## Material und Methoden

| Gebrauchsmaterialien  | Hersteller    | Ort               |
|---|---------------|-------------------|
| HiTrap ProteinG-HP<br>Sepharose 5 ml-Säule                                    | GE Healthcare | München           |
| Injektionsspritze Omnifix-F<br>Luer 1ml Tuberkulin<br>0,01ml/1ml Duo 25Gx5/8" | BBraun        | Melsungen         |
| Kryoröhrchen  | Greiner       | Frickenhausen     |
| Lumitrac 96-Loch-Platte   | Greiner       | Frickenhausen     |
| Mini Perm   | Viva Science  | Aubagne Cedex (F) |
| Nucleopore Track-Etch<br>Polycarbonat-Membran 50nm/<br>400 nm                 | Whatman       | Dassel            |
| Nu-Page Gel   | Invitrogen    | Karlsruhe         |
| Objektträger (Histo Bond)   | Marienfeld    | Lauda-Königshofen |
| PCR-Reaktionsgefäße   | PeqLab        | Erlangen          |
| PVDF-Membran  | GE Healthcare | München           |
| Stahlkugeln - Stainless steel<br>beads (5mm)                                  | Quiagen       | Hilden            |
| ThermoFast Detection Plate<br>96-Loch   | Abgene        | Surrey (UK)       |
| Ultrazentrifugen 1,5 ml Gefäße  | Beckmann      | München           |

### 2.1.4 Kitsysteme

| Kitsysteme  | Hersteller           | Ort               |
|---|----------------------|-------------------|
| DNeasy Tissue Kit   | Qiagen               | Hilden            |
| Dual Luciferase Reporter<br>Assay Kit                       | Promega              | Madison, WI (USA) |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit                                   | Qiagen               | Hilden            |
| Human Amyloid $\beta$ (1-x)- und<br>A $\beta$ 42- Assay Kit | IBL                  | Hamburg           |
| Luciferase Reporter Assay Kit                               | Promega              | Madison, WI (USA) |
| Nick Translation Kit N500                                   | Amersham Biosciences | Braunschweig      |
| NucleoSpin Plasmid-Kit                                      | Macherey und Nagel   | Düren             |
| NukleoSpin RNA/Protein Kit                                  | Macherey und Nagel   | Düren             |

| <b>Kitsysteme</b>                         | <b>Hersteller</b>  | <b>Ort</b>        |
|---|--------------------|-------------------|
| NucleoBond PC500 EF                       | Macherey und Nagel | Düren             |
| QuantiTect-SYBR-Green One-Step-RT PCR-Kit | Qiagen             | Hilden            |
| RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix          | Sigma Aldrich      | Steinheim         |
| RNeasy Lipid Tissue Midi Kit              | Qiagen             | Hilden            |
| SuperPicTure Polymer Detection Kit        | Zymed Laboratories | Berlin            |
| TransIT in vivo Gene Delivery System      | Mirus              | Madison, WI (USA) |

### 2.1.5 Stammlösungen, Puffer und Kulturmedien

| <b>Lösungen und Puffer</b>                   | <b>Zusammensetzung</b>   |
|--|--|
| Administrationslösung (PACAP)                | 7,5 g NaCl<br>1,7 g Zitronensäure-Monohydrat<br>3 g Dinatriumphosphat-Monohydrat<br>0,2 g Benzalkoniumchlorid (50%v/v)<br>→ auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen |
| Antibiotika-Stammlösungen (100x)             | 100 mg/ml Ampicillin<br>50 mg/ml Chloramphenicol   |
| Assaypuffer für Alkalische Phosphatase (10x) | 200 mM TRIS/HCl (pH9,8)<br>10 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O  |
| DNA-Auftragspuffer                           | 50% (v/v) Glycerin<br>0,2% (v/v) SDS<br>0,05% (w/v) Xylencyanol<br>10 mM EDTA<br>0,05% (w/v) Bromphenolblau  |
| DNA-Auftragspuffer (farblos)                 | 50% (v/v) Glycerin<br>0,2% (v/v) SDS<br>0,05% (w/v) Xylencyanol<br>10mM EDTA   |
| Entwicklerlösung (Silbergel)                 | 50 µl Formaldehyd<br>500 µl Citronensäure (1%)<br>→ auf 100 ml H <sub>2</sub> O auffüllen  |

## Material und Methoden

| Lösungen und Puffer                         | Zusammensetzung  |
|---|--|
| Homogenisierungspuffer für Gewebe           | 20 mM TRIS/HCl, pH 8,5 mit Inhibitor mini Roche (2 Tabletten in 15 ml)   |
| Hypotonischer Lysispuffer für Zellen        | 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4<br>5 mM EDTA + Protease-Inhibitoren  |
| I-Block/Tween 20-Lösung                     | PBS (1x)<br>0,02% I-Block (w/v)<br>0,05% Tween 20 (w/v)  |
| IPTG  | 60 mg/l LB-Agar  |
| Laufpuffer für SDS-PAGE                     | 25 mM TRIS<br>192 mM Glycin<br>0,1% SDS (w/v)  |
| LB-Medium                                   | 10 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>10 g NaCl<br>→ auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren   |
| LB-Agar                                     | 10 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>10 g NaCl<br>15 g Agar<br>→ auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren                                |
| Lysispuffer (für MTT)                       | 10% TritonX100<br>0,1 N HCl in Isopropanol   |
| PBND-Puffer für Genotypisierung             | 50 mM KCl<br>10 mM Tris-HCl (pH 8.3)<br>2.5 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O<br>0.45% (v/v) Nonidet P40 (NP40)<br>0.45% (v/v) Tween 20      |
| PBS (1x)                                    | 8 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>→ auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen |
| Proteinauftragungspuffer (nach Lämmli) (4x) | 125 mM TRIS/HCl, pH 6,8<br>40% (w/v) Glycerin<br>6% (w/v) SDS<br>0,02% (w/v) Bromphenolblau<br>100 mM DTT  |

## Material und Methoden

| Lösungen und Puffer               | Zusammensetzung   |
|-----------------------------------|---|
| SDS-PAGE Sammelgel (5%)           | 1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid(37,5:1)<br>1,25 ml Sammelgelpuffer<br>0,1 ml 10% (v/v) SDS<br>6,8 ml Wasser<br>5 µl TEMED<br>100 µl APS |
| SDS-PAGE Sammelgelpuffer          | 0,5M TRIS/HCl, pH 6,8   |
| SDS-PAGE Trenngel (8%)            | 3,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid(37,5:1)<br>1,25 ml Trenngelpuffer<br>0,1 ml 10% SDS<br>5,9 ml Wasser<br>5 µl TEMED<br>100 µl APS        |
| SDS-PAGE Trenngelpuffer           | 3 M TRIS/HCl, pH 8,9  |
| Silbernitratlösung (Silbergel)    | 2,1 ml 3,6% (v/v) NaOH<br>1,2 ml 29,7% (v/v) NH <sub>3</sub><br>0,4 g Silbernitrat<br>→ auf 100 ml H <sub>2</sub> O auffüllen         |
| STET-Puffer (Plasmidaufreinigung) | 8% (w/v) Saccharose<br>5% (w/v) Triton X 100<br>50 mM EDTA<br>50 mM TRIS/HCl, pH 8,0  |
| TAE-Puffer (50x)                  | 2 M TRIS<br>1 M Essigsäure<br>50 mM EDTA x 2 H <sub>2</sub> O   |
| Tank-Blot-Puffer (1x)             | 125 ml Tankblotpuffer (8x Stammlösung)<br>200 ml Methanol<br>675 ml H <sub>2</sub> O  |
| Tank-Blot-Puffer (8x Stammlösung) | 14 g TRIS<br>115,2 g Glycin<br>→ auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen   |
| TBS (10x)                         | 1,5 M NaCl<br>0,5 M TRIS/HCl, pH 7,4  |
| Wachstumsmedium                   | DMEM (bzw. DMEM/F12)<br>10% FCS<br>1% Glutamin<br>100 U/ml Penicillin<br>100 mg/ml Streptomycin                                       |

| Lösungen und Puffer | Zusammensetzung   |
|---------------------|---|
| Sekretionsmedium    | DMEM (bzw. DMEM/F12)<br>1% Glutamin                     |
| X-Gal               | 1:100 (aus 30 mg/ml in 2-5-Dimethylfuran)<br>in LB-Agar |

### 2.1.6 Enzyme

| Enzyme                                     | Hersteller           | Ort                               |
|--|----------------------|-----------------------------------|
| CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) | NEB                  | Frankfurt am Main                 |
| DNA-Ligase                                 | Fermentas            | St. Leon-Rot                      |
| DNaseI                                     | Fermentas            | St. Leon-Rot                      |
| ExonukleaseIII                             | Fermentas            | St. Leon-Rot                      |
| <i>Pfu</i> - und <i>Taq</i> - Polymerasen  | Promega<br>Fermentas | Madison, WI (USA)<br>St. Leon-Rot |
| Restriktionsenzyme                         | Fermentas<br>NEB     | St. Leon-Rot<br>Frankfurt am Main |
| T4-Polynukleotid-Kinase                    | Fermentas            | St. Leon-Rot                      |
| T4-Ligase                                  | Fermentas            | St. Leon-Rot                      |
| Proteinase K                               | Roth                 | Karlsruhe                         |

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Erstantikörper

| Erstantikörper                      | Epitop   | Verdünnung                     | Hersteller/Ort  |
|-------------------------------------|--|--------------------------------|---|
| 8D3                                 | Maus-<br>Transferrinrezeptor<br>Extrazelluläre Domäne<br>(Ratte-monoclonal)                          | Zellkultur-<br>Überstand       | Eigenproduktion aus<br>Hybridoma Zelllinie<br>von Prof. Engelhardt<br>Uni Bern (CH) |
| 6FD3 (A $\beta$ )                   | Human-Amyloid $\beta$ N-<br>Terminal 9-14 AS<br>(Maus-monoclonal)                                    | 1:400 für<br>Immunohistochemie | Dako, Hamburg   |
| 6E10                                | APP $\alpha$ (human) bzw.<br>AS1-17 von A $\beta$<br>(Maus-monoclonal)                               | 1:1000 in I-Block              | Senetek, St. Louis,<br>MO(USA)  |
| Anti-Maus-APP $\alpha$              | APP $\alpha$ (Maus)<br>(Kaninchen-polyclonal)  | 1:1000 in I-Block              | U.Müller, IPMB<br>Heidelberg  |
| 6687                                | APP-C-Terminus,<br>C-Terminale AS 1-20<br>(Kaninchen-polyclonal)                                     | 1:500 in I-Block               | C. Haass, LMU<br>München  |
| Anti-ADAM10                         | C-Terminus von<br>ADAM10<br>Verwendet an N2A-<br>Zellmembran-Proteinen<br>(Kaninchen-polyclonal)     | 1:1000 in I-Block              | Chemicon, Temecula,<br>CA (USA)   |
| Anti-ADAM10                         | C-Terminus von<br>ADAM10<br>Verwendet an SH-SY5Y-<br>Zellmembran-Proteinen<br>(Kaninchen-polyclonal) | 1:1000 in I-Block              | Calbiochem, San<br>Diego, CA (USA)  |
| Anti-Aktin                          | Aktin<br>(Kaninchen-polyclonal)  | 1:1000 in I-Block              | Sigma-Aldrich,<br>Steinheim   |
| Anti-Maus Transferrin<br>Rezeptor 1 | Maus Transferrin<br>Rezeptor 1 –<br>Cytoplasmatische<br>Domäne<br>(Ratte-monoclonal)                 | 1:200 in I-Block               | Alpha Diagnostik,<br>San Antonio, CA<br>(USA)                                       |
| Anti-APP $\beta$                    | C-Terminus der $\beta$ -<br>Secretase-Spaltstelle<br>von APP<br>(Kaninchen-polyclonal)               | 1:250 in I-Block               | Convance, Princeton,<br>NJ (USA)  |

## Material und Methoden

| Erstantikörper           | Epitop  | Verdünnung           | Hersteller/Ort   |
|--------------------------|---|----------------------|--|
| R17-217                  | Maus-Transferrinrezeptor<br>Extrazelluläre Domäne<br>(Ratte-monoclonal) | Zellkultur-Überstand | Eigenproduktion aus Hybridoma Zelllinie von Salk Institute San Diego, CA (USA) |
| Anti-RBP                 | Retinol-Binde-Protein<br>(Maus-monoclonal)                              | 1:200 in I-Block     | BD Biosciences, Erembodegem (B)  |
| Anti- <sub>pan</sub> RAR | RAR $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$<br>(Maus-monoclonal)                | 1:200 in I-Block     | Santa Cruz, Heidelberg   |

### 2.1.7.2 Zweitantikörper

| Zweitantikörper  | Epitop               | Verdünnung         | Hersteller/Ort             |
|--|----------------------|--------------------|----------------------------|
| Alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege | Kaninchen-Antikörper | 1:10000 in I-Block | Tropix, Karlsruhe          |
| Alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege      | Maus-Antikörper      | 1:10000 in I-Block | Tropix, Karlsruhe          |
| Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG                      | Kaninchen-Antikörper | 1:3000 in I-Block  | Pierce, Rockford, IL (USA) |
| Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Ratte IgG                          | Maus-Antikörper      | 1:3000 in I-Block  | Pierce, Rockford, IL (USA) |

### 2.1.8 Oligonukleotide

| Oligonukleotide | Sequenz  | Anwendung  | Schmelztemperatur in °C |
|-----------------|--|--|-------------------------|
| 2x203_for       | 5' GCTAGCAGGATCCAACGAACGAGGGGGAG<br>GGAGGTCCCTGTTTTGGAGGAGCCAACGAAC<br>GAGGGGGAGGGAGGTCCCTGTTTTGGAGGA<br>GCAGATCT 3' | -203 bp Region aus ADAM10-Promotor – Klonierung in pTAL-Vektor | 95                      |

**Material und Methoden**

| <b>Oligo-nukleotide</b> | <b>Sequenz</b>  | <b>Anwendung</b>  | <b>Schmelztemperatur in °C</b> |
|-------------------------|---|---|--------------------------------|
| 2x203_rev               | 5' AGATCTGCTCCTCCAAAACAGGGACCTCCC<br>TCCCCCTCGTTCGTTGCTCCTCCAAAACAGGG<br>ACCTCCCTCCCCCTCGTTCGTTGGATCCTGCT<br>AGC 3'   | s.o.  | 95                             |
| 2x302_for               | 5' GCTAGCAGGATCCGTGGTGAGGAAGGAGG<br>CGGAGGTCTGAGTTTCGAAGGAGGGTGGTGA<br>GGAAGGAGGCCGAGGTCTGAGTTTCGAAGGA<br>GGAGATCT 3' | -302 bp Region<br>aus ADAM10-<br>Promotor<br>Klonierung in<br>pTAL-Vektor   | 94                             |
| 2x302_rev               | 5' AGATCTCCTCCTTCGAAACTCAGACCTCCG<br>CCTCCTTCCTCACCACCCTCCTTCGAAACTCA<br>GACCTCCGCCTCCTTCCTCACCACGGATCCT<br>GCTAGC 3' | s.o.  | 94                             |
| Luc_rev                 | 5' AGCGGTTCCATCTTCCAGC 3'   | Sequenzierprimer<br>Bindestelle in der<br>Glühwürmchen-<br>Luciferase-<br>Kodierenden-<br>Sequenz                         | 59                             |
| GL_for                  | 5' CTAGCAAATAGGCTGTCCC 3'   | Sequenzierprimer  | 56                             |
| mAD10p_for              | 5' AATTATTATCTGCTAAGCACTTGT 3'  | Klonierung<br>mADAM10-<br>Promotor in<br>pGL3-basic-<br>Vektor  | 55                             |
| mAD10p_rev              | 5' TCTAAGCTTCCCCGGCCGC 3'   | s.o.  | 55                             |
| APP_for                 | 5' GAATCCGACATGACTCAGG 3'   | Genotypisierung<br>APP/PSI-Mäuse  | 56                             |
| APP_rev                 | 5' GTTCTGCTGCATCTTGGACA 3'  | s.o.  | 55                             |
| PS1_for                 | 5' CAGGTGCTATAAGGTCATCC 3'  | Genotypisierung<br>APP/PSI-Mäuse  | 57                             |
| PS1_rev                 | 5' ATCACAGCCAAGATGAGCCA 3'  | s.o.  | 55                             |
| N2A_APP_<br>Myc_for     | 5' GGAGATTCAGGATGAAGTTGATG 3'   | Oligonukleotid<br>zur Amplifikation<br>eines<br>Teilbereichs des<br>humanen APP<br>aus stabil<br>transfizierten<br>Zellen | 59                             |
| N2A_APP_<br>Myc_rev     | 5' CAAGTCCTCTTCAGAAATGAGC 3'  | s.o.  | 58                             |

| Oligonukleotide     | Sequenz                       | Anwendung  | Schmelztemperatur in °C |
|---------------------|-------------------------------|--|-------------------------|
| SH-SY5Y_APP_Myc_for | 5' GGAGATTCAGGATGAAGTTGATG 3' | Oligonukleotid zur Amplifikation eines Teilbereichs des humanen APP aus stabil transfizierten Zellen | 59                      |
| SH-SY5Y_APP_rev     | 5' GGCGTCAACCTCCACCACA 3'     | s.o.   | 61                      |

### 2.1.8. 1 Oligonukleotide für Real Time-RT-PCR

Für die Quantifizierung der Gentranskripte von ADAM10, RAR $\beta$  und GAPDH wurden die dementsprechenden QuantiTect Primer Assays von Qiagen (Hilden) verwendet. Diese Primer-Sequenzen sind speziell für die RT-PCR Anwendung entwickelt.

| Name             | Bezeichnung des Herstellers            | Nr.        |
|------------------|--|------------|
| Maus-GAPDH       | Mm_Gapd_2_SG QuantiTect Primer Assay   | QT00309099 |
| Maus-ADAM10      | Mm_Adam10_1_SG QuantiTect Primer Assay | QT00106351 |
| Maus-RAR $\beta$ | Mm_Rarb_1_SG QuantiTect Primer Assay   | QT00151956 |

### 2.1.9 Größenstandards

#### 2.1.9.1 DNA-Größenstandards

Die verwendeten DNA-Größenstandards, GeneRuler 1kb DNA Ladder und GeneRuler 100bp DNA Ladder stammen von Fermentas (St-Leon-Rot) und wurden in einem Volumen von 3  $\mu$ l eingesetzt.

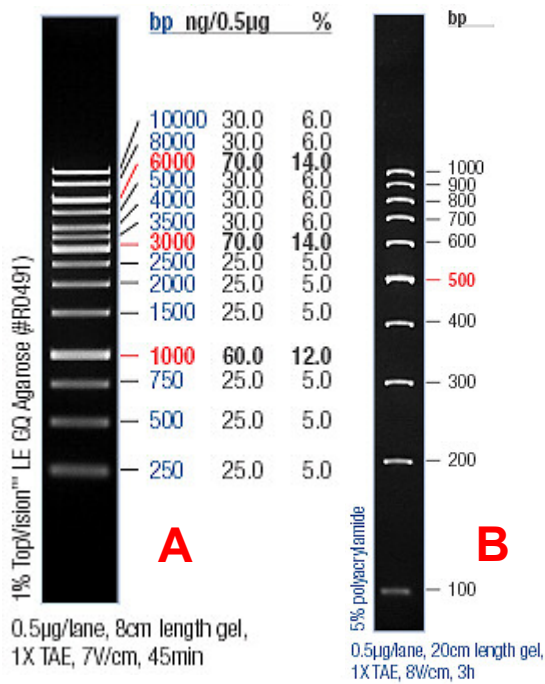


Abb. 2.1: DNA-Größenstandards von Fermentas

Als Orientierungshilfe dienen beim 1kb Marker (A) die 1000, 3000 und 6000 Basenpaar-Bande. Beim 100bp – Marker (B) enthält die 500bp-Bande mehr DNA und dient so der besseren Orientierung (www.fermentas.com)

### 2.1.9.2 Protein-Größenstandards

Bei allen Proteinauftrennenden Gelen wurde als Größenstandard der Marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen (Paisley (UK)) verwendet.

Dabei war darauf zu achten, dass bei unterschiedlichen Puffersystemen die farbigen Größenstandards unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen. Bei allen Gelen wurde ein Volumen von 3 µl eingesetzt.

| Protein                | Approximate Molecular Weights (kDa) |         |             |              |                      |
|------------------------|-------------------------------------|---------|-------------|--------------|----------------------|
|                        | Tris-Glycine                        | Tricine | NuPAGE® MES | NuPAGE® MOPS | NuPAGE® Tris-Acetate |
| Myosin                 | 250                                 | 210     | 188         | 191          | 210                  |
| Phosphorylase          | 148                                 | 105     | 98          | 97           | 111                  |
| BSA                    | 98                                  | 78      | 62          | 64           | 71                   |
| Glutamic Dehydrogenase | 64                                  | 55      | 49          | 51           | 55                   |
| Alcohol Dehydrogenase  | 50                                  | 45      | 38          | 39           | 41                   |
| Carbonic Anhydrase     | 36                                  | 34      | 28          | 28           | n/a                  |
| Myoglobin Red          | 22                                  | 17      | 17          | 19           | n/a                  |
| Lysozyme               | 16                                  | 16      | 14          | 14           | n/a                  |
| Aprotinin              | 6                                   | 7       | 6           | n/a          | n/a                  |
| Insulin, B Chain       | 4                                   | 4       | 3           | n/a          | n/a                  |

NuPAGE® Novex  
Bis-Tris 4-12% Gel

Abb.2.2: Protein-Größenstandard SeeBlue Plus2

Für die SDS-PAGE wurde ein Tris-Glycine-Puffer-System und für die Nu-PAGE ein MES-Puffer System verwendet. (www.invitrogen.com)

## 2.1.10 Plasmide, BACmide

### 2.1.10.1 BAC- Klon RPCI-23.C

Der BAC- Klon RPCI-23.C (Bacterial Artificial Chromosome) stammt von Invitrogen (Paisley (UK)). Er beinhaltet die Sequenz des Maus-ADAM10-Promotors, welche für die Klonierung in den pGL3-Basic-Vektor verwendet wurde.

### 2.1.10.2 pGL3-Basic/ pGL3-Control

Der 4818 bp große pGL3-Basic-Vektor von Promega (Madison, WI (USA)) beinhaltet die cDNA für die Glühwürmchen-Luciferase und als Selektionsmarker die cDNA für eine Ampicillin-Resistenz. Vor der Luciferase-cDNA liegt eine mehrfache Klonierungsstelle (Engl.: Multiple Cloning Site, MCS), in welche der murine ADAM10-Promotor kloniert wurde. Der pGL3-Control Vektor (5268 bp) steht zusätzlich unter der Kontrolle des SV-40 Promotors, welcher für eine konstitutive Expression der Renilla-Luciferase in Eukaryontenzellen sorgt.

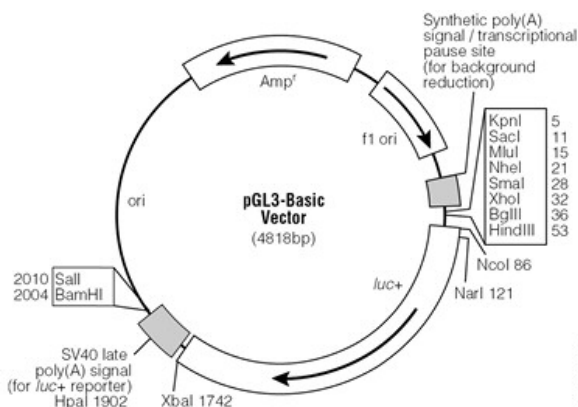


Abb.2.3: Vektorkarte von pGL3-Basic (Promega)

### 2.1.10.3 CP53 AB.1 (hADAM10p)

Dieser 6980 bp große Vektor wurde von Dr. Claudia Prinzen (ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) hergestellt. Als Basisvektor diente der pGL3-Basic-Vektor (s. 2.1.10.2). Das CP53 AB1.-Plasmid wurde so konstruiert, dass die 5' Promotor-Region von -2179 bp bis -1 bp des humanen ADAM10-Gens stromaufwärts von der Luciferase-Reporter-cDNA eingebaut wurde, wodurch dessen Expression von dem Promotor reguliert wird.

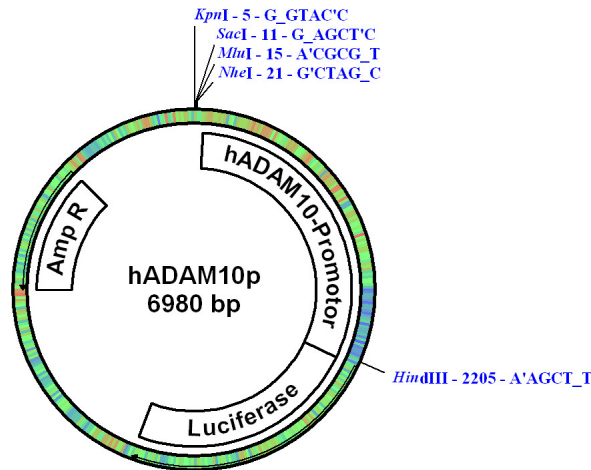


Abb.2.4: Vektorkarte von CP53 AB.1 (hADAM10p)

#### 2.1.10.4 mADAM10p

Als Basisvektor, für das 6970 bp große Plasmid, diente der pGL3-Basic-Vektor (s. 2.1.10.2). Die 5' Promotor-Region von -2179 bp bis -1 bp des Maus ADAM10-Gens wurde aus dem BACmid (RPCI-23.C, s.o.) stromaufwärts von der Luciferase-Reporter-cDNA einkloniert (s. 8.1).

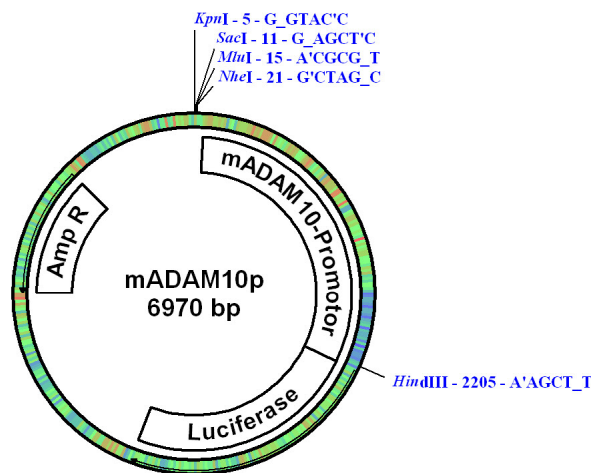


Abb.2.5: Vektorkarte von mADAM10p

#### 2.1.10.5 phRL-SV40

Dieser 3705 bp grosse Vektor von Promega (Madison, WI (USA)) beinhaltet das Gen für die Renilla-Luciferase. Die cDNA steht unter der Kontrolle eines SV-40 Promotors, welcher für eine konstitutive Expression der Renilla-Luciferase in Eukaryontenzellen sorgt. Der Vektor wurde als Transfektionskontrolle verwendet.

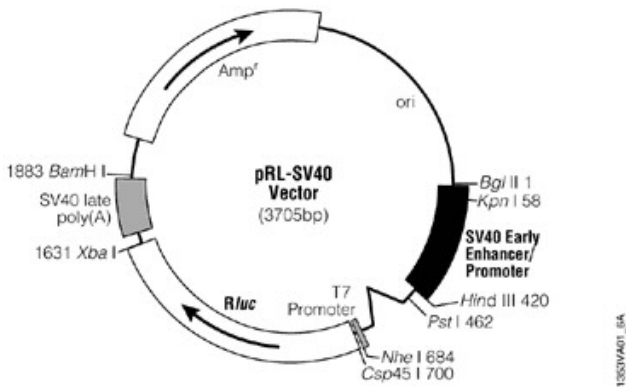


Abb.2.6: Vektorkarte von pRL-SV40 (Promega)

### 2.1.10.6 pUC19mod

Dieser 2686 pb grosse Vektor von Fermentas (St.Leon-Rot) ist durch eine zusätzliche EcoRV-Schnittstelle in der MCS von Dr. Postina (Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) modifiziert worden. Er besitzt neben dem Ampicillin-Resistenzgen das Gen für die Beta-Galactosidase und kann daher für eine Blau/Weiß-Selektion verwendet werden. Er wurde für die Klonierung der 2x203- und 2x302-Fragmente in den pTal-Vektor als Hilfsvektor verwendet.

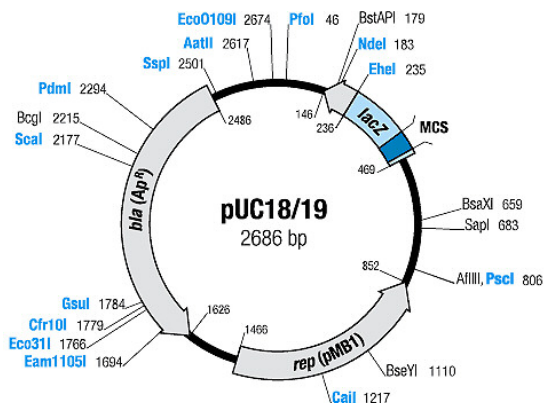


Abb.2.7: Vektorkarte von pUC19 (Fermentas)

### 2.1.10.7 pTAL-Luc

Der 5 kb grosse pTAL-Luc-Vektor von Clontech (Saint-Germain-en-Laye (F)) besitzt die Sequenz für die Glühwürmchen-Luciferase. Vor dieser cDNA liegt die MCS der eine TATA-Box-ähnliche Region, aus dem Thymidin-Kinase-Promotor zur Expressionsinitiation nachgeschaltet ist. Dieser Vektor eignet sich um Promotor-Enhancer-Sequenzen zu untersuchen. Er wurde für die Untersuchung der -203 bp- und -302 bp-Region des ADAM10-Promotors verwendet.

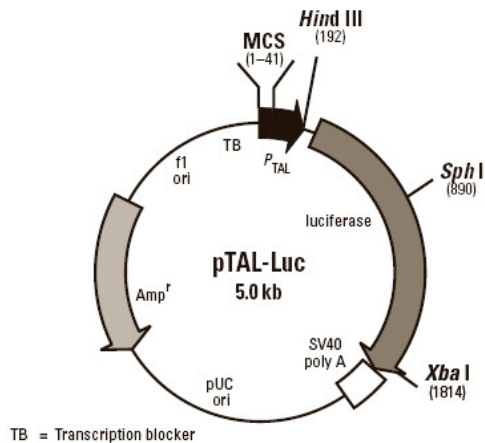


Abb.2.8: Vektorkarte von pTAL-Luc (Clontech)

### 2.1.10.8 RARE-Luc

Dieser 5,1 kb große Vektor, wurde von Dr. Claudia Prinzen (ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) hergestellt. Als Basisvektor diente der pTAL-Luc-Vektor (s. 2.1.10.7). Die Sequenz des Retinoidrezeptor-Bindeelements (RARE) enthält in zweifacher Form das klassische DR5-Element (Abb. 2.9).

```
5' CTAGCAGG AGGTCACCAGGAGGTCA ACCAGG AGGTCACCAGGAGGTCA CCA 3'
   3' GTCC TCCAGTGGTCCCTCCAGT GGTCC TCCAGTGGTCCCTCCAGT GGTCTAG 5'
```

Abb.2.9: Sequenz des Retinoidrezeptor-Bindeelements im Vektor RARE-Luc

Die DR5-Bindeelemente sind farblich hervorgehoben, die Bindestellen sind unterstrichen

### 2.1.10.9 2x203-Luc und 3x302-Luc

Für die Herstellung der 5,1 kb großen 2x203/2x302-Luc-Vektoren diente der pTAL-Luc-Vektor als Basis (s. 2.1.10.7). Die Sequenzen der putativen Retinoidrezeptor-Bindeelemente im Bereich -203 bp und -302 bp des humanen ADAM10-Promotors wurde in zweifacher Form in die MCS kloniert (Abb. 2.10; s. 8.2).

2x203-Luc:

```
5` GCTAGCAGGATCC AACGAACGAGGGGGAGGGAGGTC CCTGTTTTGGAGGAGCAACGAACGAGGGGGAGGGA
3` CGATCGTCCTAGG TTGCTTGCTCCCCCTCCCTCCAGG GACAAAACCTCCTCGTTGCTTGCTCCCCCTCCCT
GGTCCCTGTTTTGGAGGAGC AGATCT 3`
CCAGGGACAAAACCTCCTCGT CTAGA 5`
```

2x302-Luc:

```
5`GCTAGCAGGATCCGTGGTGAGGAAGGAGGCGGAGGTCTGAGTTTCGAAGGAGGGTGGTGAGGAAGGAGGCG
3`CGATCGTCCTAGGCACCACTCCTTCCTCCGCCTCCAGACTCAAAGCTTCCTCCACCACCTCCTCCTCCGC
```

```
GAGGTCTGAGTTTCGAAGGAGGAGATCT 3`
CTCCAGACTCAAAGCTTCCTCCCTCTAGA 5`
```

### Abb.2.10: Sequenzen der putativen Retinoidrezeptor-Bindeelemente auf dem humanen ADAM10-Promotor

Die ADAM10-Promotorfragmente sind farblich (gelb) hervorgehoben, die putativen Retinoidrezeptor-Bindestellen sind rot markiert. Die unterstrichenen Nukleotide unterscheiden sich von der Sequenz des Maus-ADAM10-Promotors.

## 2.1.11 Bakterienstämme, Zelllinien und Mausstämmen

### 2.1.11.1 Bakterienstämme

#### 2.1.11.1.1 *E.coli* DH5 $\alpha$

Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  besitzt den Genotyp F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*. Er wurde von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen.

### 2.1.11.2 Murine Zelllinien

#### 2.1.11.2.1. Neuro-2a (N2A)

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC CCL-131

Die Neuroblastomazellen Neuro-2a wurden ursprünglich aus dem Hirn einer Albinomaus Stamm A isoliert (R.J.Klebe und F.H. Ruddle, 1969). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrothaltigem DMEM-Wachstumsmedium. Für die Inkubation mit Testsubstanzen wurde phenolrot-freies DMEM-Wachstumsmedium verwendet.

#### 2.1.11.2.2 Neuro-2a (N2A) APP695wt

Die N2A APP695wt- Zellen sind Neuroblastomzellen mit stabil transfizierter APP695wt-cDNA. Die cDNA codiert für die APP-Isoform (Amyloid Precursor Protein) 695 mit C-Terminalen Myc-Tag. Die Selektion erfolgt über 0,4 mg/ml G418. Die Zellen wurden von G.Thinakaran hergestellt (Thinakaran et al., 1996) und von der AG Simons (MPI für Zellkultur und Genetik, Dresden) zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.11.2.3 Neuro-2a (N2A) APP695swe**

Die N2A APP695wt- Zellen sind Neuroblastomzellen mit stabil transfizierte APP695swe cDNA. Die cDNA codiert für die APP-Isoform 695 mit Schwedischer Mutation und C-Terminalen Myc-Tag. Die Selektion erfolgt über 0,4 mg/ml G418. Die Zellen wurden von G.Thinakaran hergestellt und von der AG Simons (MPI für Zellkultur und Genetik, Dresden) zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.11.2.4 bEnd5**

bEnd5 ist eine Endothelzelllinie aus der Maus. Sie wurde von Frau Prof. B. Engelhardt (Uni Bern (CH)) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrothaltigem DMEM-Wachstumsmedium.

#### **2.1.11.2.5 8D3**

8D3 ist eine Hybridomazelllinie, welche den Antikörper (8D3) gegen den Maus-Transferrinrezeptor (Extrazelluläre Domäne) produziert. Die Zellen wurden von Frau Prof. B. Engelhardt (Uni Bern (CH)) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrothaltigem DMEM-Wachstumsmedium.

#### **2.1.11.2.6 R17-217**

R17-217 ist eine Hybridomazelllinie, welche den Antikörper (R17-217) gegen den Maus-Transferrinrezeptor (Extrazelluläre Domäne) produziert. Die Zellen wurden vom Salk Institute (San Diego, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrothaltigem DMEM-Wachstumsmedium.

### **2.1.11.3 Humane Zelllinien**

#### **2.1.11.3.1 HEK-293-TFR1**

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC CRL-1573 modifiziert

Humane embryonale Nierenzellen - stabil mit dem Transferrinrezeptor 1 transfiziert. Die Zellen wurden von J.Haas (Diplomarbeit, ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) hergestellt. Der Transferrinrezeptor-codierende Bereich IRAKp961O08114Q wurde über pIRESneo2 stabil in die Zellen transfiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrothaltigem DMEM-Wachstumsmedium.

### 2.1.11.3.2 HEP-G2

Amerikanische Zellsammlung, Nr. ATCC 59194

Humane Zelllinie ursprünglich aus dem Leber-Karzinom G2. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrothaltigem DMEM-Wachstumsmedium. Für die Inkubation mit Testsubstanzen wurde phenolrot-freies DMEM-Wachstumsmedium verwendet.

### 2.1.11.3.3 SH-SY5Y

Amerikanische Zellsammlung, Nr, ATCC CRL-2266

Humane epitheliale Neuroblastomazelllinie, die über dreifache Subklonierung aus der Zelllinie SK-N-SH (metastatischer Knochentumor, weiblich, 4 Jahre) etabliert wurde.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in phenolrotfreiem DMEM/F12-Wachstumsmedium.

### 2.1.11.3.4 SH-SY5Y APP695wt

Neuroblastomzellen mit stabil transfizierten pCB6-APP695wt. Das APP ist die Isoform 695.

Die Zellen wurden von Dr. I. Hussain (Glaxo Smith Kline, Harlow (UK)) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte wie für die untransfizierten Zellen beschreiben (s. 2.1.11.3.3)

### 2.1.11.3.5 SH-SY5Y APP695swe

Neuroblastomzellen mit stabil transfizierten pCB6-APP695swe. Das APP ist die Isoform 695 mit der Schwedischen Mutation. Die Zellen wurden von Dr. I. Hussain (Glaxo Smith Kline, Harlow (UK)) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte wie für die untransfizierten Zellen beschreiben (s. 2.1.11.3.3)

## 2.1.11.4 Mausstämme

### 2.1.11.4.1 FVB/N

Dieser von Taketo gezüchtete Inzucht-Mausstamm zeichnet sich durch seine hohe Reproduktivität aus (Taketo et al., 1991). Die Tiere sind relativ groß und liefern mit durchschnittlich 9,5 Mäusen pro Wurf überdurchschnittlich viele Nachkommen. Der Albino-farbene FVB/N-Stamm wurde ursprünglich aus einem Swiss-Stock entwickelt und aufgrund seiner Histamin-Sensitivität selektioniert. Der Name der Maus-Linie sagt aus, dass sie das Fv-1b Allel trägt, welches die Sensitivität für den B-Stamm des *Friend leukemia Virus* kontrolliert.

#### 2.1.11.4.2 FVB/N APP-London

Die APP–London Mäuse sind transgene FVB/N-Mäuse, welche das humane APP (London Mutation) überexprimieren. Die Mauslinie stammt von Fred van Leuven (KU Leuven (B)).

#### 2.1.11.4.3 APP/PS1-Mäuse

Die APP/PS1-Mäuse zeigen eine Überexpression des humanen APP und Presenilin 1 (PS1) (Radde et al., 2006). Dadurch kommt es zu einem Anstieg des A $\beta$ 42-Levels und zur Ausbildung von senilen Plaques im frühen Lebensalter.

Die Mauslinie stammt von M.Jucker (Universität Tübingen, Zentrum für Neurologie, Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung).

#### 2.1.12 Online-Datenbanken und Softwareprogramme

| Online Datenbanken/Software Programme | URL/Hersteller  | Ort                    |
|---------------------------------------|---|------------------------|
| ABI Prism 7000 System Software        | Applied Biosystems  | Bedford, MA (USA)      |
| Aida 3.50                             | Raytest Isotopenmeßgeräte   | Straubenhardt          |
| Blast 2 Sequences                     | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi</a> |                        |
| Diana v.1.6                           | Raytest   | Straubenhardt          |
| Excel                                 | Microsoft   | Unterschleißheim       |
| Graphpad Prism5                       | <a href="http://www.graphpad.com">www.graphpad.com</a>  |                        |
| Image J Vers.1.26                     | <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a>   |                        |
| Meta View Imaging System              | Universal Imaging Corporation   | West Chester, PA (USA) |
| NEBcutter                             | <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a>                       |                        |
| pDraw32                               | <a href="http://cellbiol.com/acaclone/download/install.htm">http://cellbiol.com/acaclone/download/install.htm</a>       |                        |
| Quantity One                          | Biorad  | München                |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekulargenetische Methoden

#### 2.2.1.1 Quantifizierung von DNA und RNA

##### 2.2.1.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wird die optische Dichte (OD) bei 260 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Für doppelsträngige DNA entspricht eine  $OD_{260}$  von 1, einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Einzelsträngige RNA hat bei einem  $OD_{260}$ -Wert von 1 eine Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Proteinverunreinigungen werden bei einer OD von 280 nm bestimmt. Durch den Quotienten von  $OD_{260}/OD_{280}$  kann die Reinheit der DNA bestimmt werden. Für proteinfreie DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 und für RNA-Lösungen bei 2.

Für die Berechnung der doppelsträngigen DNA-Konzentration gilt:

$OD_{260} \times \text{reziproker Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} = X \text{ ng}/\mu\text{l DNA}$ .

Analog gilt für RNA:

$OD_{260} \times \text{reziproker Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{l} = X \text{ ng}/\mu\text{l RNA}$ .

##### 2.2.1.1.2 Mengenbestimmung im Agarosegel

Für eine Abschätzung der DNA-Konzentration wurde eine Mengenbestimmung im Agarosegel gemacht. Zum Vergleich dient ein DNA-Mengenstandard mit einer Konzentration von 100ng/ $\mu\text{l}$ . Es wurden unterschiedliche Volumina des Standards (meist entsprechend 100 ng, 250 ng und 500 ng) mit Wasser zu einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  ergänzt und mit 2  $\mu\text{l}$  DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Mengenstandard-Proben wurden zusammen mit der zu bestimmenden DNA-Probe (ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer versetzt) auf einem 1% Ethidiumbromid-haltigen-Agarosegel aufgetragen und bei 100 V 20-30 Minuten aufgetrennt. Die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte bei UV-Bestrahlung im Vergleich zu der Bandenintensität des Standards.

#### 2.2.1.2 Reinigung von Nukleinsäuren

##### 2.2.1.2.1 Schnelle Plasmid-Aufreinigung

Die schnelle Plasmid-DNA-Aufreinigung (Holmes und Quigley, 1981) eignet sich, um aus vielen Bakterienklonen kostengünstig Plasmid-DNA zu isolieren.

Hierfür wurde mit einer Impföse eine Stecknadelkopf-große Menge an Bakterien von der Agar-Platte oder die pelletierten Bakterien aus 3 ml LB-Flüssigkultur in 400 µl STET-Puffer durch Vortexen suspendiert. Anschließend wurden 25 µl Lysozym (20mg/ml) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte daraufhin durch Inkubation für 60 sec im kochenden Wasserbad. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 14000 U/min (Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Zelldebris mit einem Zahnstocher entfernt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 40 µl 3 M NaOAc pH 4,8 und 420 µl Isopropanol und anschließende Zentrifugation für 15 min bei 14000 U/min. Der Überstand wurde verworfen und zu dem DNA-Präzipitat 500 µl 70% Ethanol (v/v) zugegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 U/min. Der Überstand wurde vollständig abgezogen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl RNase (1mg/ml) gelöst und zum Verdau der RNA für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Für die analytische Restriktion wurde 0,5 µl der isolierten Plasmid-DNA eingesetzt.

### **2.2.1.2.2 Plasmid-Aufreinigung durch Silika-Säulen**

Die Plasmid- und BACmid-DNA-Aufreinigung mit Silika-Säulen wurde angewendet, wenn sehr saubere Plasmid-DNA ohne Rückstände (z.B. für eine Sequenzierung) benötigt wurde. Hierfür wurde das Kitsystem Nucleo Spin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit 50µl H<sub>2</sub>O.

### **2.2.1.2.3 Endotoxinfreie Plasmid-Aufreinigung**

Die endotoxinfreie Plasmid-DNA-Aufreinigung wurde für die Gewinnung von Plasmid-DNA, z.B. für die Transfektion in Zellkulturen angewendet.

Hierfür wurden 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit dem plasmidtragenden Bakterienstamm angeimpft und bei 37°C für 4 Stunden bei 130 U/min im Inkubationsschüttler (Infors, Einsbach) inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend in 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und 18 Stunden im Schüttler bei 37°C inkubiert.

Die Bakterien wurden für 10 min bei 4°C in der Kühlzentrifuge (Beckmann, München) bei 5000 U/min pelletiert. Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) oder mit dem NucleBond PC500 EF Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte mit 400 µl H<sub>2</sub>O.

### **2.2.1.2.4 DNA-Aufreinigung aus Säugerzellen**

Für die Aufreinigung chromosomaler DNA aus Säugerzellen wurden die Zellen von konfluent-gewachsenen 10 cm-Zellkulturschalen mit 5 ml PBS abgespült und

anschließend bei 1000 U/min für 5 min in der Zellkultur-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut bei 800 U/min für 5 min in der Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Die DNA-Aufreinigung erfolgte anschließend mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll. Die Elution der DNA erfolgte in 400 µl H<sub>2</sub>O.

### **2.2.1.2.5 RNA-Aufreinigung aus Organen**

Für die RNA-Aufreinigung aus Mausorganen wurden die Hälfte des Gehirns und ein Teil der Leber direkt nach der Entnahme in einem RNA-stabilisierenden Puffer (RNAlater, Qiagen, Hilden) gelagert. Die Homogenisation der Organe erfolgte im Tissue Lyser (Qiagen, Hilden) für 2 min bei 30 Hz. Die folgenden RNA-Aufreinigungsschritte wurden nach den Herstellerangaben des RNeasy Lipid Tissue Midi Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die RNA wurde in 250 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, die Konzentration photometrisch ermittelt (s. 2.2.1.1.1) und für die RT-PCR in einer Konzentration von 20 ng/µl bei -80°C gelagert.

### **2.2.1.3 Sequenzierung**

Die Sequenzierung wurde von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt. Hierfür wurden mindestens 500 ng DNA in einer Konzentration von 50-500 ng/µl und ein Sequenzieroligonukleotid in einer Konzentration von 10 pmol/µl benötigt. Die Auswertung der Sequenzierung beziehungsweise der Vergleich der Sequenzierung mit der Zielsequenz erfolgte mit dem Programm Blast 2 Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

### **2.2.1.4 Restriktion von DNA**

Die Restriktion der DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen der Firmen Fermentas (St.Leon-Rot) oder NEB (Frankfurt) durchgeführt. Die dafür empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen wurden für jede Restriktionsspaltung eingehalten. Für analytische Restriktionen wurden 200-500 ng DNA verwendet. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte mit dem Programm NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

### **2.2.1.5 Modifikation der DNA-Enden**

Für die Klonierung eines DNA-Fragments in einen geeigneten Vektor sollten die Fragment-DNA und die Vektor-DNA sogenannte „klebrige Enden“ (engl.: sticky ends) besitzen. Das bedeutet, dass die DNA am Ende einen Basenüberhang besitzt, der zum Basenüberhang des Vektors komplementär ist und dementsprechend die Verknüpfung der Fragmente mit

einer hohen Effizienz erfolgt. Die meisten Restriktionsenzyme schneiden die DNA so, dass ein solcher Überhang entsteht. Für einige Klonierungsstrategien muss man jedoch Restriktionsenzyme verwenden, die „stumpfe Enden“ (engl.: blunt ends) hervorrufen, also Enden ohne 3' oder 5'-Überhänge. Hier kann die Verknüpfungseffizienz der DNA-Fragmente sehr niedrig sein.

Durch Modifikation der DNA können jedoch Überhänge an stumpfen Enden geschaffen werden. Hierfür wurde in einem 50 µl Ansatz die gewünschte DNA-Menge mit 5 µl 10-fach Taq-Puffer, 1 µl dNTP (10 mM pro Nukleotid), 0,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase und der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O vermischt. Der Ansatz wurde 30 min bei 72°C inkubiert.

### 2.2.1.6 Dephosphorylierung der DNA

Unter Dephosphorylierung der DNA versteht man das Abspalten von 5' Phosphat-Gruppen an den Enden der DNA. Das dazu eingesetzte Enzym ist die alkalische Phosphatase. Ziel einer solchen Modifikation ist es zu verhindern, dass freie Vektorenden ohne Überhang während eines Ligationsvorgangs mit sich selbst ligieren.

Hierfür wurde in einem 50 µl Ansatz, ca. 1 µg DNA mit 1 µl CIAP (1u) (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (Fermentas, St-Leon-Rot) und dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer vermischt und im Thermocycler (Biometra, Göttingen) 30 min bei 37°C, 15 min bei 56°C und 20 min bei 85°C inkubiert.

### 2.2.1.7 Phosphorylierung der DNA

Die Phosphorylierung an 5'-DNA-Enden wird unter ATP-Hydrolyse von dem Enzym T4-Polynukleotidkinase katalysiert. Die Anheftung von 5'-Phosphatgruppen ist für eine Ligation mit dephosphorylierten DNA-Fragmenten notwendig. Ein 20 µl Phosphorylierungsansatz für 500ng DNA setzte sich aus 2 µl 10x T4-DNA-Ligase Puffer (Fermentas, St-Leon-Rot), 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10u/µl) (Fermentas, St-Leon-Rot) und der entsprechenden Menge Wasser zusammen.

### 2.2.1.8 Ligation der DNA

Bei der Ligation wird die 3'-Hydroxy-Gruppe eines DNA-Fragments mit dem 5'-Phosphatende eines zweiten DNA-Fragments mithilfe der T4-DNA-Ligase verbunden. Hierfür ist der Zusatz von ATP als Cofaktor notwendig. Für eine Ligation von DNA-Fragmenten mit „klebrigen Enden“ wurde 1 µl T4-DNA-Ligase mit 5 Weiss-Einheiten/µl (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Für die Ligation von DNA mit „stumpfen Enden“ wurde 1 µl T4-DNA-Ligase mit 30 Weiss-Einheiten/µl (Fermentas, St.Leon-Rot) jeweils in Kombination mit dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer, verwendet. Bei der Ligation

eines DNA-Fragments oder PCR-Produkts in einen Vektor wurde ein Mengenverhältnis unter Berücksichtigung der Fragmentgrößen von 5:1 (Fragment:Vektor) eingehalten.

### **2.2.1.9 Radioaktive Markierung von DNA**

Für die Immunoliposomen-Herstellung (s.2.2.6.2) wurde der Vektor pHRL-SV40 mit [ $\alpha^{32}$ ]P-dCTP radioaktiv markiert. Hierfür wurde das Nick Translation Kit N500 von Amersham Biosciences (Braunschweig) verwendet. Zunächst wurden je 8  $\mu$ l dATP, dGTP und dTTP zusammengefügt. Anschließend wurden von dieser Nukleotid-Lösung 20  $\mu$ l mit 1  $\mu$ l (1 $\mu$ g) Plasmid-DNA vermischt. Danach wurden 75  $\mu$ l Wasser und 10  $\mu$ l Enzymlösung aus dem Kit zugegeben und gemischt. Für die radioaktive Markierung wurde 4  $\mu$ l [ $\alpha^{32}$ ]P-dCTP (Hartmann Analytik, Braunschweig) zugesetzt und die Mischung für 2 Stunden bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l 0,5M EDTA-Lösung gestoppt. Um die nicht in die DNA eingebauten Nukleotide von der markierten DNA abzutrennen, wurde das Reaktionsgemisch über eine Chroma Spin-TE-30-Säule (Clontech, Palo Alto, CA (USA)) nach den Herstellerangaben gereinigt. Die markierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.2.1.10 Standard-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)**

Die PCR ist eine Methode, um DNA selektiv zu amplifizieren. Für die Amplifikation eines DNA-Bereichs benötigt man die Information der flankierenden Sequenz. Für diese Sequenzen werden Oligonukleotide synthetisiert, so dass sie in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA Strang binden können und so die Ziel DNA einrahmen. Nach einer Hitze-Denaturierung werden die Oligonukleotide angelagert (engl.: Annealing) und von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Vorgang (Denaturierung, Anlagerung, Elongation) wird bis zu 35mal wiederholt. Es findet eine exponentielle Amplifikation statt.

Generell wurden ca. 10-50 ng DNA als Matritze verwendet. Von den Oligonukleotiden wurden 100 pmol zugegeben. Die verwendete Polymerase wurde ebenso wie der entsprechende Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt. Mit Wasser wurde auf ein Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt.

Die PCR-Schritte, wie z.B. Denaturierung, Anlagerung, Elongation und Zyklenzahl wurde je nach Länge des Amplifikats variiert. Die PCR erfolgte in dem Thermocycler T-Gradient der Firma Biometra (Göttingen).

### **2.2.1.11 Gradienten PCR**

Zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur eines neuen Oligonukleotidpaares wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein Standard-PCR-Mastermix wie

oben beschrieben angesetzt. Der fertige Reaktionsansatz wurde aliquotiert und die PCR-Reaktion in einem Thermocycler T-Gradient der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt, der parallel zwölf verschiedene Anlagerungstemperaturen ermöglicht. Von der errechneten Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide wurde ein Gradient von +/- 7°C eingestellt. Es wurde das gleiche PCR-Programm wie bei der Standard-PCR verwendet.

### **2.2.1.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarose-Gel**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen und um ihre Größe durch Vergleich mit DNA-Molekülen bekannter Größe zu bestimmen. Zum Nachweis der PCR-Produkte im analytischen Gel wurde 1% Agarose (Axon, Kaiserslautern) in TAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit 1 µg/µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Für präparative Gele zur Isolierung von DNA wurden 1-3% Agarose (FMC, Rockland, MA (USA)) in TAE-Puffer ohne Ethidiumbromid gelöst.

Die Agarose wurde nach dem Abkühlen in einen Gelträger gegossen und ein Kamm zur Ausbildung von Taschen zum Probenauftrag eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet und die Proben in die Taschen gegeben. Zu der DNA (200-1500ng) wurde ein entsprechendes Volumen 6 x Elektrophorese-Puffer gegeben und Volumen von 10-20 µl auf das Gel aufgetragen. Als Marker für die Fragmentgröße wurde der DNA-Marker 1kb-Leiter oder 100 bp-Leiter (MBI Fermentas) verwendet (s. 2.1.9.1). Der Gel-Lauf erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Die DNA-Banden wurden durch das Ethidiumbromid visualisiert, welches sich in die DNA-Doppelhelix einlagert und bei UV-Anregung bei 312 nm fluoresziert. Das Ergebnis wurde mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und das Gel zur Auswertung mit der Software DianaV1.6 (Raytest Isotopenmessgerät, Straubenhardt) fotografiert.

### **2.2.1.13 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel**

Für die Extraktion von DNA wurden 5-10 µg DNA mit farblosem Probenpuffer versetzt und in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin Extrakt Kit (Macherey und Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

## 2.2.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

### 2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der *E.coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium. Zur Selektion der gewünschten Transformanten wurde je nach Antibiotikaresistenzgen des verwendeten Vektors das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

Für Anreicherung, Transformationskontrolle und Einzelkolonieausstrich wurden LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotika verwendet. Für die Blau/Weiß-Selektion von Transformanten mit pUC-19-basierenden Vektorkonstrukten wurde der LB-Agar zusätzlich mit IPTG (60 mg/l) und X-Gal (30 mg/l) versetzt.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C. Die Anzucht in flüssigem LB-Medium erfolgte im Inkubationsschüttler (Infors, Einsbach) bei 130 U/min.

### 2.2.2.2 Lagerung von Bakterien

Die Lagerung der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 20% (v/v) Glycerin zunächst für 24 h bei -20°C und anschließend bei -80°C. Flüssigkulturen und Kulturen auf LB-Agarplatten wurden bei zeitnaher Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* (nach Dagert und Ehrlich, 1979)

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden zunächst 400 ml LB-Medium mit 1 ml einer Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C und 130 U/min im Inkubationsschüttler (Infors, Einsbach) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Dann wurde das Wachstum durch Lagerung auf Eis gestoppt. Die Bakterien wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 6000 U/min und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 100 ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung (50 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und für 15 min auf Eis gelagert. Nach einem erneutem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 6000 U/min und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Calciumchloridlösung versetzt mit Glycerin (10% (v/v)) resuspendiert. Die Bakterien wurden 4 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend in 200-600µl Aliquots abgefüllt. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und sofort bei -80°C gelagert. Für eine Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut.

### 2.2.2.4 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in Bakterien. Hierfür wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien (s. 2.2.2.3) auf Eis aufgetaut, anschließend mit 10 µl Ligationsansatz (~5 pmol DNA) vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach für 90 sec in ein 42°C Wasserbad gegeben und

danach sofort für 3 min wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 130 U/min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde je 800 µl und 100 µl von dem Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

#### **2.2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen**

Die Kultivierung der Säugerzellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Zur Passage der Zellen wurde der Kulturüberstand unter der sterilen Zellbank abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde 2 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit zusätzlichen 5 ml Medium von der Kulturschale abgespült und bei 1000 U/min 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung in eine neue Zellkulturschale mit frischem Medium gegeben. Die Kultivierung von N2A-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Dulbecco's modified Eagle medium High Glucose (PAA, Cölbe) und die von SH-SY5Y-Zellen in Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (PAA, Cölbe) jeweils versetzt mit 10% FCS (Fötale Kälberserum, PAA, Cölbe), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA, Cölbe).

#### **2.2.3.2 Kryokonservierung von Säugerzellen**

Die Kryokonservierung dient der Erhaltung von Zelllinien über einen längeren Zeitraum. Konfluent gewachsene Zellen wurden je nach Zelllinie trypsinisiert oder direkt mit Medium von einer 10 cm-Kulturschale gespült und bei 1000 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1,5 ml Medium mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt. Die Zellen wurden zunächst auf Eis für 24 Stunden bei -20°C und dann weitere 24 Stunden bei -80°C gelagert. Für die dauerhafte Lagerung wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum erneuten Kultivierung der kryokonservierten Zellen wurden diese durch Zugabe von 1,5 ml vorgewärmten Medium und mehrfachen Auf- und Abpipettieren zügig aufgetaut und in eine 10 cm-Zellkulturschale mit Medium gegeben.

#### **2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Für die Bestimmung der Gesamtzellmenge einer Zellkulturschale wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren (s. 2.2.3.1) mit Medium resuspendiert und je 10 µl auf

die beiden Zählfelder einer Neubauer-Zählkammer (vol: 0,1 µl, Roth, Karlsruhe) gegeben. Der Mittelwert der gezählten Zellen wurde mit 10 multipliziert, um die Zellzahl pro µl zu erhalten.

#### 2.2.3.4 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen

Für die Behandlung der eukaryotischen Zellen mit verschiedenen Substanzen wie z.B. Liganden nuklearer Rezeptoren, wurden die Zellen zunächst in 10-cm-, 6-Loch- oder 24-Loch-Platten bis zu einer ~ 80%-igen Konfluenz kultiviert und für die ADAM10-Promotoruntersuchungen transfiziert. Anschließend wurde frisches Wachstumsmedium mit den jeweiligen Substanzen vermischt und zu den Zellen gegeben. Die Substanzen wurden in den jeweiligen Lösungsmitteln (z.B. Ethanol oder DMSO) so konzentriert, dass die Endkonzentration des Lösungsmittels im Wachstumsmedium bei 0,1% (v/v) lag. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit.

Es wurden folgende Agonisten bzw. Inhibitoren verwendet:

| Rezeptor-Agonisten/Inhibitoren | (A) Agonist von:<br>(I) Inhibitor von:                  | Lösungsmittel<br>(Konzentration der Stammlösung) | Eingesetzte Konzentration [µM] |
|--------------------------------|---|--|--------------------------------|
| 1-α-25 Dihydroxyvitamin D3     | (A) VDR   | Ethanol (25 µM)                                  | 0,01-0,025                     |
| 9-cis RA                       | (A) RXR (RAR)   | Ethanol (10 mM)                                  | 2-4                            |
| 22-Hydroxycholesterin          | (A) LXR   | Ethanol (10 mM)                                  | 0,1-10                         |
| atRA                           | (A) RXR RAR   | Ethanol (10 mM)                                  | 1-2                            |
| Acitretin                      | (A) CRABP /<br>RXR RAR                                  | DMSO (10 mM)                                     | 0,1-8                          |
| Arachidonsäure                 | (A) RXR   | DMSO (1 M)                                       | 20                             |
| Arachinsäure                   | -   | Ethanol (1 M)                                    | 20                             |
| Etretinat                      | (A) CRABP /<br>RXR RAR                                  | DMSO (10 mM)                                     | 4                              |
| DHA                            | (A) RXR   | DMSO (1 M)                                       | 20-100                         |
| GI254023X                      | (I) ADAM10<br>(Metallo-<br>proteinasen)                 | DMSO (10 mM)                                     | 10                             |
| LY 294002                      | (I) Phosphatidyl-<br>Inositol-3-Kinase<br>(PI3-K)       | DMSO (10 mM)                                     | 10                             |
| Manoalid                       | (I) Phospholipase<br>A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) | DMSO (10 mM)                                     | 2                              |
| Methoprensäure                 | (A) RXR   | DMSO (10 mM)                                     | 10                             |

| Rezeptor-Agonisten/Inhibitoren | (A) Agonist von:<br>(I) Inhibitor von: | Lösungsmittel<br>(Konzentration der Stammlösung) | Eingesetzte Konzentration [ $\mu$ M] |
|--------------------------------|--|--|--------------------------------------|
| T0901317                       | (A) LXR (FXR)                          | Ethanol (100 mM)                                 | 20-50                                |
| Triiodothyronin                | (A) TR                                 | DMSO (2,5 mM)                                    | 1-10                                 |
| Troglitazone                   | (A) PPAR $\gamma$                      | DMSO (10 mM)                                     | 0,1-10                               |
| TTNPB                          | (A) RAR                                | Ethanol (50 mM)                                  | 2                                    |

### 2.2.3.5 Viabilitätstest

Die Untersuchung einer möglichen Zelltoxizität durch die verwendeten Rezeptorliganden wurde mithilfe des MTT-Tests untersucht. Dafür wurden Zellen in einer 24-Lochplatte bis zu einer Konfluenz von ca. 80%, im Wachstumsmedium kultiviert. Anschließend wurde frisches Medium mit den zu untersuchenden Substanzen zu den Zellen gegeben. Nach maximal 48 h Inkubation wurde das alte Medium abgesaugt und Medium mit 10% MTT (Sigma-Aldrich, Steinheim) zu den Zellen gegeben. Nach 1-4 Stunden bildeten sich aus dem membranpermeablen Farbstoff durch die mitochondrialen Dehydrogenasen im Inneren der Zellen dunkelblaue, wasserunlösliche Formazan-Kristalle. Diese Kristalle wurden durch Zugabe von 400  $\mu$ l Lysispuffer (10% TritonX100, 0,1N HCl in Isopropanol) und mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Extinktion der Lösung wurde bei 565 nm im Photometer gemessen. Von diesem Wert wurde die Hintergrundextinktion (650 nm) und die Extinktion der Mediumkontrolle (565 nm-650 nm) subtrahiert: (E<sub>565 nm</sub> - E<sub>650 nm</sub>) Zellen - (E<sub>565 nm</sub> - E<sub>650 nm</sub>) Medium. Der Leerwert bestand aus MTT-Reagenz mit den zu untersuchenden Substanzen und Lysispuffer in zellfreier Umgebung.

Da der Umsatz von MTT zu Formazankristallen von der Zahl der Zellen und ihrer Stoffwechselaktivität abhängig ist, konnte so die Toxizität bzw. wachstumshemmende oder -stimulierende Wirkung der untersuchten Substanzen anhand der Extinktionswerte bestimmt werden.

### 2.2.3.6 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion verschiedener Zelllinien mit Plasmiden wurde das Lipofectamine2000-Reagenz von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Das Reagenz besteht aus kationischen Lipiden, welche mit der anionischen DNA einen Komplex bilden. Durch Verschmelzung mit der Zellmembran wird die DNA in das Cytoplasma aufgenommen.

Die Transfektion wurde an Zellen, die in 24-Lochplatten zu ~ 80% konfluent gewachsen waren, durchgeführt. Dafür wurde pro Loch 2  $\mu$ l Lipofectamine2000 zu 100  $\mu$ l OptiMEM oder MEM (ohne Zusätze) pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden pro Loch 0,4  $\mu$ g endotoxinfreie Vektor-DNA und gegebenenfalls zusätzlich 0,1  $\mu$ g

endotoxinfreie DNA eines Normierungsvektors zu 100 µl OptiMEM oder MEM (ohne Zusätze) pipettiert. Der Lipofectamine2000-Ansatz wurde zu dem DNA-Ansatz pipettiert, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl pro Loch zu den Zellen gegeben. Nach 5 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches Wachstumsmedium ersetzt. Nach 24 Stunden wurde der Mediumwechsel wiederholt.

### **2.2.3.7 Transfektion von pegylierten Immunliposomen in Zellen**

Die Transfektion der pegylierten Immunliposomen (PIL) (s.2.2.6) wurde an den Maus-Zelllinien bEnd5, N2A und humanen, Maus-Transferrinrezeptor-überexprimierenden HEK-Zellen getestet. Dafür wurden die Zellen in 10 cm-Kulturschalen bis zu einer ~80%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde zweimal mit serumfreien Medium gewaschen. Je nach Versuchsanordnung wurde bis zu 10 µg in Immunliposomen eingeschlossene DNA (pHRL-SV40) in serumfreien Medium auf die Zellen gegeben und diese 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und frisches Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde die Renilla-Luciferasemenge in den Zellen bestimmt um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen.

## **2.2.4 Methoden der Proteinaufreinigung und Analyse**

### **2.2.4.1 Gewinnung von Antikörpern aus Hybridoma-Zellkulturen**

Die Antikörper für die Immunliposomenherstellung (s.2.2.6.1) wurden aus den Überständen von Hybridoma-Zelllinien isoliert. Hierfür wurden Zelllinien kultiviert, die Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor der Maus produzieren. Dabei wurde die Hybridoma-Zelllinie 8D3 von Prof. Engelhardt (Uni Bern, CH) und die Zelllinie R17-217 (Salk Institute, San Diego (USA)) verwendet. Die Zellen wurden in 50 ml-Kulturflaschen in serumfreien Medium (Panserin401, Pan Biotech, Aidenbach) kultiviert. Nach dem Wachstum bis zu einer ~ 90%-igen Konfluenz wurde das Medium abgezogen und  $\frac{1}{4}$  der Zellen neu kultiviert. Das abgezogene Medium wurde 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Alternativ zu den 50 ml-Kulturflaschen wurden die Hybridoma-Zellen in einem MiniPerm Zellkultursystem (Viva Science, Aubagne Cedex (F)) kultiviert. Bei diesem System wurden die Zellen in einer ca. 50 ml-fassenden Kulturkammer inkubiert. Diese Kammer ist durch eine für sekretorische Proteine durchlässige Membran mit der Hauptkammer verbunden. In diese Hauptkammer wurden 500 ml DMEM-Wachstumsmedium gegeben. Nach ca. 1 Woche Wachstum durch Rollen

(1U/min) im Brutschrank wurde dieses mit sekretierten Antikörpern angereichertes Medium gegen frisches Wachstumsmedium ausgetauscht.

Die Antikörper aus den Überständen wurden über eine ProteinG–Sepharose-Säule (GE-Healthcare, München) unter Zuhilfenahme eines FPLC-Systems (Äkta, GE Healthcare, München) aufgereinigt. Hierfür wurde die Säule mit 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH7) äquilibriert. Anschließend wurde der Zellkultur-Überstand auf die Säule gegeben. Nach einem Waschschrift von 30 min bei 0,5 ml/min mit 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH7) wurden innerhalb von 80 min bei 0,5 ml/min mit 100 mM Glycin-Puffer (pH2,7) die Antikörper von der Säule gewaschen. Die isolierten Antikörper wurden mit einem Amicon Ultra-10kDA-Röhrchen (Millipore, Schwalbach) und Zentrifugation bei 5000 U/min ankonzentriert und der Proteingehalt (s.2.2.5.2) bestimmt. Die Reinheit der Antikörperisolate wurde mit der Auftrennung in einer SDS-PAGE (s. 2.2.5.4) und anschließender Silberfärbung (s. 2.2.5.6) überprüft. Bis zur Thiolierung der Antikörper wurden diese bei -20°C gelagert.

### **2.2.4.2 Sekretion von Proteinen und Ernte von Zellen**

Die Untersuchung der sekretorischen Proteine (z.B. APP $\alpha$ , APP $\beta$ , A $\beta$ ) erforderte das Wachstum der Zellen in serumfreien Medium, da im Serum Fremdproteine enthalten sind, welche analytische Untersuchungen verfälschen können. Hierfür wurden die Zellen in Wachstumsmedium auf 6-Loch-Platten (ggf. mit Substanzen versetzt, s. 2.2.3.4), bis zu einer ~ 95%-igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden vorsichtig 5 ml Wachstumsmedium ohne Serum auf die Zellen gegeben und sofort wieder abgesaugt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden 1,5 ml (für die ELISA-Untersuchungen 800  $\mu$ l) Wachstumsmedium ohne Serum aber mit 10  $\mu$ g/ml fettsäurefreiem BSA (Roth, Karlsruhe) ggf. mit den zu untersuchenden Substanzen versetzt auf die Zellen gegeben und 5 Stunden inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 U/min in der Zellkultur-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde für die anschließende Proteinfällung auf Eis gelagert (s. 2.2.4.2.1).

Die Zellen wurden nach dem Abnehmen des Sekretionsmediums einmal mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für die Aufreinigung membranständiger Proteine (s. 2.2.4.2.2) mit 1, 5 ml PBS abgespült und auf Eis gelagert.

#### **2.2.4.2.1 Aufreinigung sekretorischer Proteine (TCA Fällung)**

Für die Ankonzentrierung sekretorischer Proteine wurde eine TCA (Trichloressigsäure, engl.: trichloroacetic acid)-Fällung durchgeführt. Hierfür wurde zu 1500  $\mu$ l Sekretionsmedium 170  $\mu$ l eiskalte TCA gegeben und durch Vortexen vermischt.

Anschließend wurde für 4 min bei 14000 U/min und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und danach 500 µl -20°C kaltes Aceton zugegeben. Die Proben wurden erneut für 4 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, erneut Aceton zugegeben und zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde an der Luft getrocknet und anschließend, für die spätere Auftragung auf ein Polyacrylamidgel, mit 40 µl Proteinauftrags-Puffer gelöst und bei -20°C eingefroren. Zur Normierung der Auftragsmenge der sekretierten Proteine wurde eine Proteinbestimmung des Zellpellets durchgeführt (s. 2.2.5.2). Hierfür wurde 1/5 des Zellpellets in 100 µl 100% Ameisensäure aufgenommen und für die Proteinbestimmung bei -20°C gelagert.

### **2.2.4.2.2 Aufreinigung membranständiger Proteine**

Die Aufreinigung membranständiger Proteine wurde mit den geernteten Zellen nach der Proteinsekretion (s. 2.2.4.2) durchgeführt. Hierfür wurden die in 1,5 ml PBS suspendierten Zellen für 3 min bei 7000 U/min und 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Von der Suspension wurden 200 µl für die Proteinbestimmung abgenommen (s. 2.2.5.2) und mit den verbleibenden 800 µl für 3 min bei 7000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet der 800 µl-Fraktion wurde in 500 µl hypotonischen Lysispuffer aufgenommen und Ü/N bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die Zelllösung auf Eis aufgetaut. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschallbehandlung mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier, Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) bei folgender Einstellung: Output Control 3, 30% und 10 Impulse. Das Zelllysate wurde daraufhin für 30 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in 60 µl hypotonischem Lysispuffer gelöst und für die Proteinbestimmung auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Membranproteine in Nu-Page Proteinauftragspuffer (mit 0,1M DTT) in einer Konzentration von idealerweise 0,8 µg/µl verdünnt und bei -20°C bis zur Auftragung auf ein Polyacrylamidgel gelagert.

### **2.2.4.3 Aufreinigung membranständiger und löslicher Proteine aus Mausorganen**

Die nach der Sektion bei -80°C eingefrorenen Mausorgane (s. 2.2.6.2) wurden mit 3 Volumenanteilen eiskaltem Homogenisierungspuffer (450 µl/Gehirnhälfte) inkl. Proteaseinhibitormischung (Inhibitor complete mini, Roche, Mannheim, 1 Tab./7ml) überschichtet und nach Zugabe einer vorgekühlten Stahlkugel (Qiagen, Hilden) im TissueLyser (Qiagen, Hilden) für 2 min bei 20 Hz homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in Ultrazentrifugen-Gefäße (UZ-Gefäße, Eppendorf, Hamburg) überführt. Die verbleibenden Homogenatreste wurden mit 3,5 Volumenanteilen Homogenisierungspuffer (525 µl) ausgespült und ebenfalls in die UZ-Gefäße gegeben. Die Homogenate wurden bei

34000 U/min für 1,75 Stunden bei 4°C in der Ultrazentrifuge (Beckmann Zentrifuge L7-65, Rotor 54 TI) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das Membranpellet wurde mit 500 µl eiskaltem TBS-Puffer (versetzt mit Proteaseinhibitormischung, 1Tab./7ml), mittels Auf- und Abziehen der Lösung durch eine Injektionskanüle homogenisiert. Die Proben wurden bis zur Proteinbestimmung auf Eis gelagert und anschließend in Proteinauftragspuffer (Lämmli für Überstand und Nu-Page für Membranfraktion) mit 0,1M DTT in einer Konzentration von 2,4 µg/µl verdünnt. Die Proben wurden daraufhin bei -80°C eingefroren.

### 2.2.5 Quantifizierungsmethoden der Genexpression

#### 2.2.5.1 Real Time-Reverse Transkriptase-PCR

Zur quantitativen Analyse von Expressionsunterschieden auf mRNA-Ebene in Zellen und Geweben wurde der QuantiTect-SYBR-Green One-Step-RT PCR-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Messung erfolgte mit dem ABIPrism 7000 Cycler (Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)). Bei der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) kann die Menge der der amplifizierten DNA nach jedem Reaktionszyklus gemessen werden. Die Quantifizierung der entstandenen Amplifikate erfolgt während der exponentiellen Phase der PCR. In dieser Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen, d.h. es liegt noch keine Substratlimitierung und Produkthemmung vor.

Für eine RT-PCR und folgender Quantifizierung der Genexpression muß zunächst die mRNA mittels spezifischer Oligonukleotide in cDNA umgeschrieben werden. Die dafür erforderliche Reverse Transkriptase (RT), ist in dem verwendeten Kit enthalten. Die cDNA-Amplifikate können durch den fluoreszierenden Farbstoff SYBR-Green, der in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet, in jedem PCR-Zyklus quantifiziert werden. Das bedeutet je stärker ein Gen exprimiert wird desto mehr mRNA (bzw. nach RT: cDNA) ist in der Probe enthalten. Daher ist ein über den Hintergrund hinausragendes Fluoreszenzsignal des PCR-Amplifikates, nach wenigeren Amplifikationszyklen messbar. Dieser PCR-Zyklus, bei dem sich das Signal von dem Hintergrundrauschen abhebt, wird als „threshold cycle“ (Ct) bezeichnet. Je niedriger die Zyklenzahl Ct desto mehr mRNA ist in der Probe enthalten.

Die verwendeten intronüberspannenden Oligonukleotide dürfen keine Sekundärstrukturen ausbilden, welche unspezifische Nebenprodukte bzw. Nebensignale hervorrufen. Die speziellen-RT-PCR-Oligonukleotide (Quanti-Tect-Primer Assays) für die zu untersuchenden Genexpressionen, wurden bei Qiagen (Hilden) bezogen.

Der Reaktionsansatz (bestehend aus Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, Qiagen One Step RT-PCR Enzym-Mix und Wasser) wurde nach dem Herstellerprotokoll angesetzt. Zu dem Reaktionsansatz wurde der jeweilige Quanti-Tect-Primer Assay (in 1-facher Endkonzentration) gegeben. Pro Ansatz wurden 100 ng RNA hinzugefügt. Jede RNA-Probe wurde in Triplikaten gemessen.

Zur Bestimmung der tatsächlichen Expression eines Gens wurde die Expression eines Haushaltsgens (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) quantitativ bestimmt.

Für jede zu untersuchende mRNA wurde zusätzlich eine RNA-Konzentrationsreihe in Triplikaten (1µg-0,001µg RNA in 4 Verdünnungsstufen) hergestellt. Als Negativkontrolle wurden 5 µl Wasser zu dem Reaktionsansatz gegeben. Die Proben wurden in 96-Lochplatten (Abgene, Surrey (UK)) pipettiert und mit dem ABIPrism 7000 Cyclyer (Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)) gemessen.

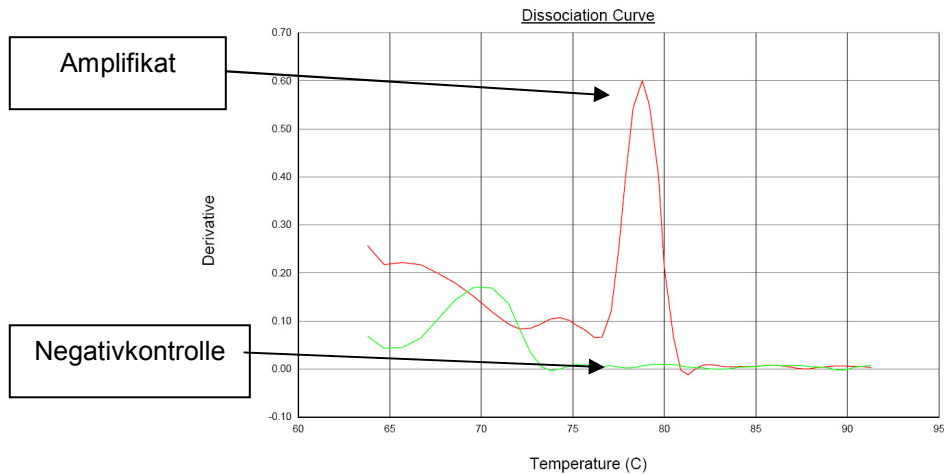
Das Real Time-RT-PCR-Programm wurde wie folgt gewählt:

1. 50°C 30 min (cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase)
2. 95°C 15 min (Aktivierung der Hot-Start-Polymerase)
3. 94°C 15 sec (Denaturierung)
4. 55°C 30 sec (Oligonukleotid Anlagerung)
5. 72°C 30 sec (Elongation)

Die Schritte 3-5 wurden 40 mal wiederholt. Die Fluoreszenzemission wurde in Schritt 5 gemessen.

### **Auswertung der Real-Time-RT-PCR**

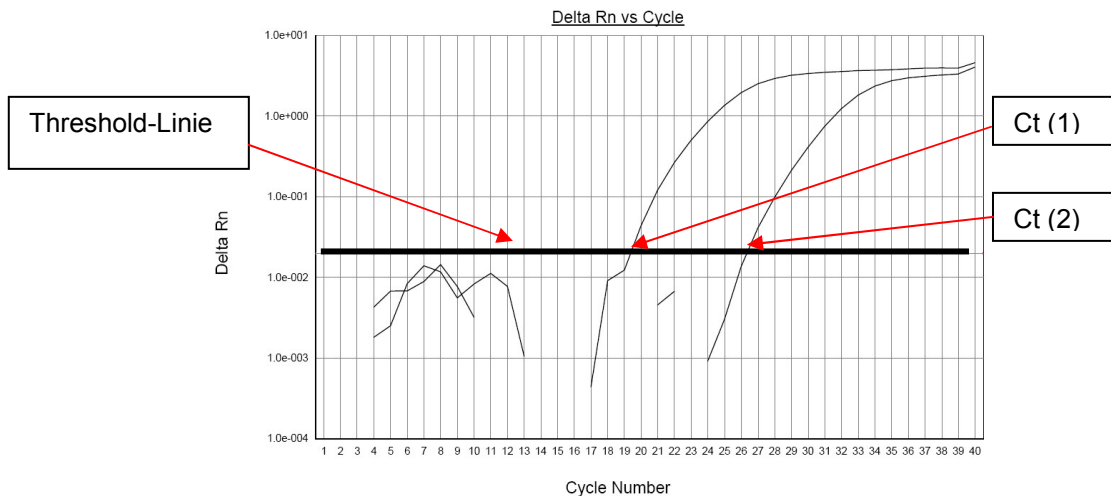
Zunächst wurde mit der ABIPrism 7000 Cyclyer SDS-Software v.1.2 (Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)) ermittelt, ob die Oligonukleotide spezifische PCR-Amplifikate hervorrufen oder sich z.B. zusammenlagern und unspezifische Nebenprodukte bilden. Hierfür wurde die Dissoziationskurve der Amplifikate mit der Negativkontrolle ohne RNA verglichen (Abb. 2.11). Die Dissoziationskurve zeigt an, bei welcher Temperatur die Amplifikate aufgeschmolzen sind. Durch das Schmelzen der DNA wird der SYBR-Green-Farbstoff freigesetzt, dessen Fluoreszenzemission sprunghaft ansteigt wodurch ein starker Anstieg der Kurve zu erkennen ist. Die Negativkontrolle ohne RNA zeigt in diesem Bereich keinen Anstieg, da hier keine Amplifikation stattgefunden hat.



**Abb. 2.11: Beispiel zweier Dissoziationskurven von mRNA-Proben**

Rot dargestellt die Dissoziationskurve einer mRNA-Probe, welche durch die Primer amplifiziert wurde.  
Grün dargestellt die Dissoziationskurve einer Probe ohne mRNA.

Zur Festlegung der „Threshold“-Linie wurden die Ergebnisse der Standardreihe betrachtet. Die „Threshold“-Linie sollte bei logarithmischer Darstellung den linearen Bereich aller Intensitätskurven der Standardkonzentrationsreihe abdecken. Der Kreuzungspunkt der Linie mit den Intensitätskurven zeigt den Ct-Wert („threshold cycle“), der ein Maß für die in der Probe enthaltenen mRNA ist (Abb.2.12).



**Abb.2.12: Beispiel einer RT-PCR von zwei unterschiedlichen Proben**

Durch die Festlegung der Threshold-Linie können die Ct-Werte bestimmt werden. Je niedriger der CT-Wert (hier CT(1)) desto mehr RNA war in der Probe enthalten

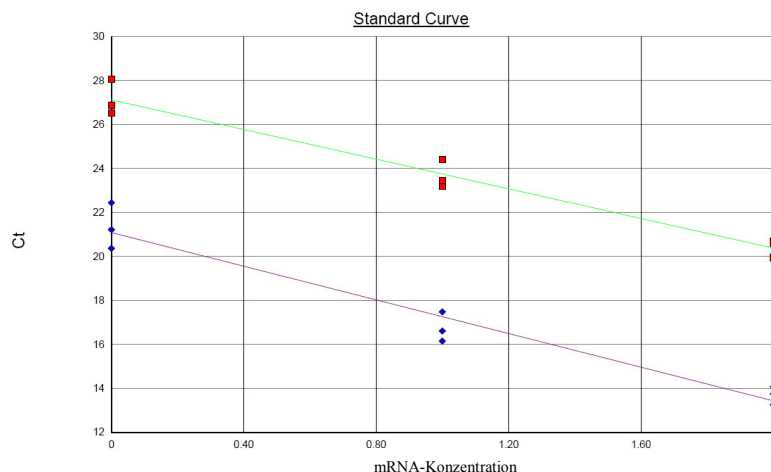
Anhand der Standardreihen von verdünnter mRNA für die einzelnen Transkripte konnte nun eine Korrelation zwischen den Ct-Werten und der RNA-Konzentration hergestellt werden. Dabei ist es wichtig die Effizienz der RT-PCR mit den eingesetzten Oligonukleotiden zu ermitteln. Hierfür wurde eine Standardkurve gebildet (Abb. 2.13).

Bei der Annahme einer Verdopplung der Amplifikate pro PCR-Zyklus ergibt sich aus dem Faktor 10 zwischen den Verdünnungsstufen:  $10 = 2^{(-x)}$ , wobei x die Anzahl der Zyklen

angibt. Bei einer optimalen (100%igen) Effizienz, muss eine solche Standardkurve eine Steigung von -3,1 bis -3,2 aufweisen, da  $10 \approx 2^{(3,2)}$

Da die Effizienz der Oligonukleotid-Paare für die zu untersuchende mRNA und für das Kontrollgen unterschiedlich ausfallen kann, musste die relative Ausgangsmenge an spezifischer mRNA (Qt-Wert) in jeder Probe separat anhand der zugehörigen Standardreihe berechnet werden.

Zur weiteren Berechnung wurden die Mittelwerte (MW) der Qt-Werte des Normierungsgens (GAPDH) zu der jeweiligen Probe gebildet und im Verhältnis zu den einzelnen Quantitäten der zu Untersuchenden mRNA (z.B. ADAM10) betrachtet (z.B.: Qt-1-ADAM10 / Qt-MW-GAPDH). Die so berechneten Qt-Werte des Testgens wurden gemittelt und im Verhältnis untereinander betrachtet. Der Qt-Mittelwert der mit dem Lösungsmittel behandelten Probe wurde auf 100% gesetzt und im Verhältnis zu den Proben z.B. mit Rezeptorligandenbehandlung betrachtet ( $(\text{Qt-MW-ADAM10-Kontrolle}/\text{Qt-MW-ADAM10-Acitrein}) \times 100$ ).



**Abb.2.13: Beispiel für 2 Standardkurven unterschiedlicher Gen-Amplifikate**

Durch die Standardkurven kann eine Korrelation zwischen RNA-Konzentration und den CT-Werten für spezifische mRNA hergestellt werden.

### 2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 reagiert mit basischen Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 464 nm auf eine Wellenlänge von 595 nm. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wird die Extinktionsänderung bei 595 nm gemessen.

Hierfür ist es notwendig mit Hilfe verschiedener bekannten Proteinmengen eine Kalibrationskurve zu erstellen. Aus dieser Kalibrationskurve können dann die Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Für die Festlegung der Kalibrationskurve wurden BSA-Stammlösungen in Konzentrationen von 0, 2, 4, 6, 8 und 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verwendet. Dabei

wurde die jeweilige BSA-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 mit 100% Ameisensäure auf ein Volumen von 100 µl angesetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls 1:1 mit 100% Ameisensäure auf ein Endvolumen von 100 µl ergänzt. Die BSA-Proben der Kalibrationskurve wurden in Duplikaten und die zu untersuchenden Proben in Triplikaten angesetzt. Die Proben wurden 20 min bei Raumtemperatur zur vollständigen Denaturierung durch die Ameisensäure inkubiert. Danach wurden 900 µl einer 1/5-Verdünnung der Färbelösung (Roti-Quant, Roth, Karlsruhe) zu den Proben und Standards gegeben und mindestens 20 min inkubiert. Schließlich wurde die Absorption bei 595 nm am Photometer gemessen und die Proteinkonzentrationen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der eingesetzten Probenmenge anhand der Kalibrationskurve ermittelt.

### **2.2.5.3 Luciferase-Reporter-Nachweis**

Die Untersuchungen des ADAM10- Promotors, der Promotorkonstrukte und des RAR-Elements wurden mittels der Luciferase als Reporterprodukt durchgeführt. Hierfür wurden Vektorkonstrukte verwendet, in welchen die o.g. Promotorelemente das Luciferasegen regulieren, so dass eine direkte Korrelation zwischen Promotorstimulation und Luciferaseexpression besteht.

Die Glühwürmchen-Luciferase ist ein monomeres 61 kDA Protein, welches zusammen mit ATP und  $Mg^{2+}$  als Kosubstrat die Oxidation von Luciferin katalysiert. Dabei entsteht eine für mindestens eine Minute anhaltende, konstante Lichtemission. Das bedeutet, dass die Luciferase-Menge in Zellen anhand der Lichtemission gemessen werden kann.

Die Luciferasemessung wurde je nach Vektorkonstrukt entweder mit dem Luciferase-Assay-System (Promega, Madison, WI (USA)) oder mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System (Promega, Madison, WI (USA)) durchgeführt.

Das Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System wurde für die Untersuchungen des RARE-Elements verwendet. Hierfür wurde neben dem RARE-Luciferasevektor zusätzlich ein Renilla-Luciferase Kontrollvektor (pHRL) in die Zellen transfiziert. Die Renilla-Luciferase ist ein 36 kDA Protein, welches unter Lichtemission Coelenterazin in Coelenteramid umwandelt. Die Renilla-Luciferase-Substratlösung enthält EDTA und stoppt somit durch Chelatierung der  $Mg^{2+}$ -Ionen die Glühwürmchen-Luciferase-Reaktion. Da der Renilla-Luciferase-Kontrollvektor konstitutiv Renilla-Luciferase exprimiert, kann die daraus resultierende Lichtemission als Kontrolle für die allgemeine Transkriptionseffizienz der Zellen verwendet und so in ein Verhältnis zu der von dem RAR-Element regulierten Lichtemission gesetzt werden.

Wurde dennoch eine pHRL-Stimulation durch eine Substanz detektiert, wurde die Glühwürmchen-Luciferase-Lichtemission, wie bei allen anderen Experimenten, im Verhältnis zu der Gesamtzellproteinmenge betrachtet.

Für die Untersuchungen mussten zunächst die Vektorkonstrukte in die Eukaryontenzellen transfiziert werden (s. 2.2.3.6). Nach 5 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches Wachstumsmedium mit den jeweiligen zu untersuchenden Substanzen und den entsprechenden Kontrollen ersetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Nach insgesamt 48 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 100 µl PLB (passive lysis buffer, Promega, Madison, WI (USA)) lysiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat homogenisiert und Ü/N bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 14000 U/min in der Tischzentrifuge für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Proteinbestimmung und die Luciferasemessung weiterverwendet. Hierfür wurden 10 µl der Proben in Duplikaten in eine weiße Lumitrac 96-Loch-Platte (Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Die Messung erfolgte in dem Luminometer FluoStar Optima (BMG, Bedford, MA (USA)). Das Messprogramm wurde so eingestellt, dass zunächst 40 µl Glühwürmchen-Luciferase-Substrat zu den Proben gegeben wurde. Nach erfolgter Messung wurde im Falle des Dualen-Luciferase-Systems noch zusätzlich 40 µl Renilla-Luciferase zugegeben. Aus den gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU, engl.: relative light units) wurde für jede Probe der Mittelwert gebildet und im Verhältnis zu den RLU der Renilla-Luciferase oder der Gesamtproteinmenge (in µg) betrachtet.

### **2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. Hierfür wurden die Proben durch vertikale Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen, also mit DTT, aufgetrennt. Als Größenstandard wurden jeweils 3 µl SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Zunächst wurden die in Proteinauftragspuffer (Lämmli oder Nu-Page) gelösten Proben für 15 min bei 95°C zur vollständigen Denaturierung erhitzt. Anschließend wurde 10 sec bei 7000 U/min zentrifugiert und die abgekühlten Proben in die vorbereiteten Taschen des Gels pipettiert. Beim Auftrennen der Proben im Sammelgel wurde eine Stromstärke von 10 mA eingestellt. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Bei den Nu-Page Gelen (Invitrogen, Karlsruhe) wurde eine Stromspannung von 100 V eingestellt. Für die Auftrennung in Nu-Page Gelen wurde MES/SDS-Laufpuffer verwendet. Nach der Auftrennung der Proben wurde das Gel für den Western Blot oder für die Silberfärbung weiterverwendet.

### 2.2.5.5 Western Blot

Bei dem Western Blot werden die Proteine von dem SDS-PAGE-Gel auf eine Membran übertragen (engl.: blotting). Hierfür wurden PVDF-Membranen (GE-Healthcare, München) verwendet. Die Übertragung fand in einer Tank-Blot-Apparatur mittels Tank-Blot-Puffer und einer Stromstärke von 100 V für 2 Stunden statt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit I-Block (0,5 g/l) und 0,1% Tween20 geblockt, um unspezifische Bindungen des Erst- und Zweit-Antikörpers an der Membran zu vermeiden. Anschließend wurde die Blocklösung entfernt und der Erstantikörper, in entsprechender Verdünnung in I-Block (0,5 g/l) und 0,1% Tween20 gelöst (s. 2.1.7.1), auf die Membran gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Antikörperlösung abgenommen und der Blot dreimal 5 min und zweimal 10 min mit PBS und 0,1% Tween20 gewaschen. Anschließend wurde der Zweitantikörper (verdünnt in frischer Blocklösung, (s. 2.1.7.2)) zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgenommen und der Blot dreimal 5 min und zweimal 10 min mit PBS und 0,1% Tween20 gewaschen. Anschließend konnte der Blot je nach verwendeten Zweitantikörper entwickelt werden:

Bei Verwendung des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers wurde die Membran 5 min mit ECL-Reagenz (Pierce, Rockford, MA (USA)) inkubiert. Die Verwendung des alkalische-Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpers erforderte zunächst die Inkubation für zweimal 2 min in Assaypuffer mit anschließender 5 min Inkubation mit CDPStar-Reagenz (Tropix, Bedford, MA (USA)). Die emittierte Chemilumineszenz wurde mit einer CCD-Kamera (Biorad, München) fotografisch dokumentiert. Dafür wurde mit dem Programm QuantityOne (Model 3000, Biorad, München) unter Verwendung des VersaDoc Imaging Systems und der Einstellung Chemilumineszenz (oder Chemi-High – je nach Antikörper) gearbeitet. Die Blots wurden dafür maximal 20 Minuten belichtet. Dabei wurden insgesamt 12 Fotos bei den verschiedenen Belichtungszeiten gemacht. Die Fotos mit den geeigneten Intensitäten wurden für die spätere Quantifizierung gespeichert. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Markerbild bei weißem Auflicht gemacht.

Die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden wurde mit dem Programm Aida 3.50 (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt. Dafür wurde ein Western Blot-Foto verwendet, auf dem die Banden deutlich zu sehen waren. Mit diesem Programm wurde die Hintergrundfärbung von der Färbung der Banden subtrahiert und die relativen Werte in eine Excel Tabelle (Microsoft, Unterschleißheim) zur weiteren Auswertung übertragen.

### 2.2.5.6 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Mit Hilfe der Silberfärbung lassen sich Proteine ab 10 ng pro Protein nachweisen. Bei dieser empfindlichen Methode wurde das SDS-Gel nach der Auftrennung der Proteine in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) für 2 Stunden fixiert. Danach wurde 3-mal für 5

min mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 50 ml ammoniakalischer Silbernitratlösung geschwenkt. Nach der Färbung wurde das Gel durch 4-maliges Inkubieren für 5 min mit Wasser gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit 50 ml Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Bei gewünschter Bandenintensität wurde die Reaktion durch Waschen mit Methanol/Wasser (1:1) gestoppt.

### **2.2.5.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweissystem, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierfür wird ein spezifischer Antikörper, welcher gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, an eine feste Phase gebunden. Nach der Bindung des Antigens aus einer Probe kann dieses durch Bindung eines zweiten Antikörpers, der gegen das gleiche Antigen, aber gegen ein anderes Epitop gerichtet und mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen werden. Durch die Enzymkopplung kann z.B. das Chromogen p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in das schwach gelbe p-Nitrophenol umgewandelt werden. Diese Reaktion kann im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden. Für die Bestimmung des Gesamt-A $\beta$ -Peptid--Gehalts in den SH-SY5Y-Zellkulturüberständen wurde das Human Amyloid  $\beta$  (1-x) Assay Kit von IBL (Hamburg) verwendet. Die Bestimmung von A $\beta$ 42 wurde aus den Überständen von SH-SY5Y APP695swe-Zellen mit dem Human Amyloid  $\beta$  (42) (N) Assay Kit von IBL (Hamburg) ermittelt. Hierfür wurden die SH-SY5Y-Zellen wie in 2.2.3.6 beschrieben behandelt. Anschließend wurden 800  $\mu$ l Wachstumsmedium ohne Serum aber mit 10  $\mu$ g/ml fettsäurefreiem BSA, ggf. mit den zu untersuchenden Substanzen versetzt, auf die Zellen gegeben und 5 Stunden inkubiert. Danach wurde das Sekretionsmedium in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 U/min in der Zellkultur-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde für die ELISA-Untersuchungen bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden mit 1,5 ml PBS abgespült und bei 14000 U/min für 3 min in der Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 600  $\mu$ l Ameisensäure aufgenommen und bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung des A $\beta$ -Gehalts wurde mit 100  $\mu$ l Zellüberstand pro Loch in Duplikaten nach dem Protokoll des Herstellers und mit dem ELISA-Reader (Biotek, Bad Friedrichshall) durchgeführt. Die gemessene Gesamt-A $\beta$ -Peptidmenge wurde anhand der Proteinmenge im Zellpellet normiert. Für die Bestimmung des A $\beta$ -42 Gehalts in SH-SY5Y-Zellen wurden je 4,5 ml Sekretions-Überstand von 2 konfluent gewachsenen 10 cm-Kulturschalen mit der Speed-Vac (Bachofer, Reutlingen) auf insgesamt 600  $\mu$ l eingeengt. Davon wurden je 300  $\mu$ l für die ELISA-Messung verwendet.

### 2.2.5.8 Immuncytochemie an N2A-Zellen

Für die immuncytochemische Färbung von Zellen mit dem anti-Transferrinantikörper R17-217 (s. 2.1.11.2.6) wurden zunächst Poly-Lysin beschichtete Deckgläschen (10 mm Durchmesser) in 24-Loch-Platten gegeben. Anschließend wurden die N2A-Zellen in geeigneter Verdünnung aufgetragen und mit Wachstumsmedium bis zu einer ca. 50%-igen Konfluenz inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen 24 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  Deferrioxamin behandelt, um die Transferrin-Rezeptorbildung zu stimulieren. Deferrioxamin entzieht dem Medium das Eisen, wodurch ein Eisenmangel in den Zellen entsteht. Um dem Mangel entgegenzuwirken, werden vermehrt Transferrin-Rezeptoren gebildet (Mattia et al., 1984). Zum Fixieren der Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd in PBS überschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen. Für die Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungen wurde mit 5% FCS in PBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der aufgereinigte R17-217 Antikörper (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (2.2.4.1) in 5% FCS und PBS zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen ohne Antikörper inkubiert. Die Färbung erfolgte mit dem SuperPicTure Polymer Detection Kit (Zymed Laboratories, Berlin) nach dem Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden mit Mowiol (Calbiochem, Bad Soden) auf einen Objektträger eingebettet und Ü/N getrocknet. Nach Trocknung wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und fotografisch dokumentiert.

### 2.2.5.9 Mikroskopie von Zellen

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf eine 3,5 cm-Zellkulturschale ausgesät und entsprechend der Versuchsanordnung kultiviert. Die Zellen wurden mittels Phasenkontrast bei einer 100-fachen Gesamtvergrößerung mit dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) betrachtet. Repräsentative Bildausschnitte wurden mit der am Mikroskop installierten MicroMax-CCD-Kamera fotografiert. Die Steuerung des Mikroskops und die Auswertung der Bilder erfolgte durch die Software MetaView Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA (USA))

### 2.2.5.10 Herstellung von Gehirnschnitten für die Mikroskopie

Die in Paraformaldehyd fixierten Gehirnhälften wurden mit einem Skalpell coronal in ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten, in Einbettungsschalen gelegt und 10 min in Wasser gelagert. Die Gehirnschnitte wurden mit Paraffin ausgegossen und bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden mit dem Mikrotom 10  $\mu\text{m}$  dicke, coronale Reihenschnitte angefertigt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gehirnschnitte von jeder Maus aus den

gleichen Hirnregionen stammen. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger gezogen und bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.5.11 $\beta$ -Amyloid-Färbung der Gehirnschnitte

Zum Nachweis der A $\beta$ -Plaques im Gehirn wurden die auf den Objektträgern fixierten, Gehirnschnitte zunächst dreimal für 5 min im Wasserbad gespült. Anschließend wurde für 5 min in 100% Ameisensäure inkubiert. Die Ameisensäure wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,05 M Tris-Puffer pH 7,5 für 5 min entfernt. Danach wurde für 10 min in 3%-iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen Amyloid  $\beta$  (6FD3, Dako, Hamburg) in einer 1:400 Verdünnung auf die Gehirnschnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte Ü/N bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde für 5 min mit 0,05 M Tris-Puffer pH 7,5 gespült. Anschließend wurde für 10 min mit dem HRP Polymer Conjugate Reagent A aus dem SuperPicTure Polymer Detection Kit (Zymed Laboratories, Berlin) inkubiert. Nach erneutem Spülen für 5 min mit 0,05 M Tris-Puffer pH 7,5 wurde für 10 min das AEC Chromogen Reagent B aus dem Kit auf die Schnitte gegeben. Nach dreimaligen Spülen mit Wasser für 5 min wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck, Darmstadt) mit Deckgläschen eingedeckt.

### 2.2.5.12 Mikroskopie der Gehirnschnitte und quantitative Auswertung

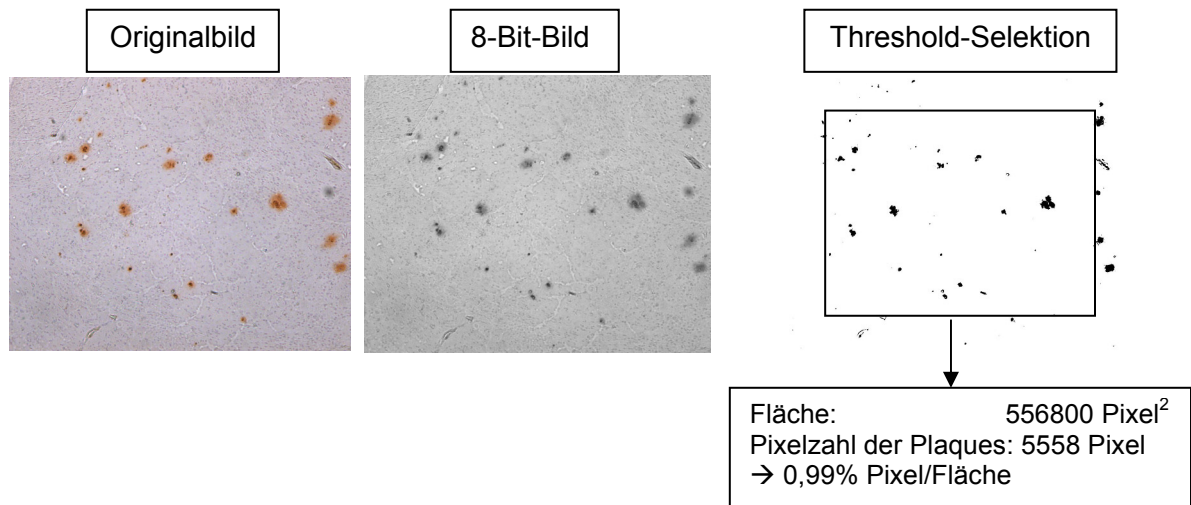
Die gegen Amyloid- $\beta$  gefärbten Gehirnschnitte wurden am Mikroskop (Hund, Wetzlar) bei 12-facher Gesamtvergrößerung untersucht und mit der digitalen Kamera (Olympus, Hamburg) fotografiert. Die Digitalbilder wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J (version 1.26, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) bearbeitet. Für die quantitativen Auswertungen der Plauefärbungen wurde ein Programm (Makro) geschrieben, mit dem alle Bilder von jeder Maus gleich behandelt wurden:

```
run("8-bit");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(30, 102);
run("Threshold", "thresholded remaining black");
run("Histogram");
```

Makro für die Bildbearbeitung mit ImageJ

Dabei wurden die Bilder aus dem Kortex der Mäuse zunächst in 8-Bit-Bilder umgewandelt. Anschließend wurden die gefärbten Plaques durch die „Threshold“ –Einstellungen isoliert. Zur Quantifizierung der A $\beta$ -Plaques wurden auf jedem Gehirnschnitt 3 repräsentative

Areale festgelegt. Von diesen Flächen wurden die schwarzen Bildpunkte, welche mit den A $\beta$ -gefärbten Stellen übereinstimmen, gezählt und im Verhältnis zu der Gesamtfläche betrachtet.



**Abb. 2.14: Beispiel einer Quantifizierung von Amyloid- $\beta$ -Plaques in Gehirnschnitten**

Das lichtmikroskopische Originalbild aus der Kortex-Region des Mausgehirns wird in ein 8-Bit Graustufenbild umgewandelt. Anschließend werden durch die Threshold-Einstellungen mit dem Programm Image J die Färbungen der Amyloid- $\beta$ -Plaques isoliert. Danach kann mit dem Programm die Anzahl der Pixel (=Plaques)/Gesamtfläche bestimmt werden.

## 2.2.6 Herstellung pegylierter Immunoliposomen (PIL) nach Pardridge (2003)

### 2.2.6.1 Thiolierung der Antikörper

Für die Kopplung an die Liposomen mussten die Antikörper thioliert werden. Hierfür wurden 3 mg (~500  $\mu$ l) der aufgereinigten Antikörper (8D3, R17-217) (s. 2.1.11.2.5) zusammen mit ~2  $\mu$ Ci H<sup>3</sup>-markierten Antikörpern (zur nachfolgenden Kopplungsdetektion mittels Szintillationsmessung; hergestellt von Jens Haas, ehemals Institut für Biochemie nach Pardridge et al. 2003) mit 0,15 M Natrium Borat-Puffer (pH8,5) vermischt, um eine Endkonzentration von 0,05 M Na-Borat (pH8,5) zu erhalten. Zu dieser Lösung wurde 10  $\mu$ l 2-Iminoethanol (Traut's Reagenz, Sigma Aldrich, Taufkirchen) gegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die thiolierten Antikörper wurden in ein Amicon Ultra-30kDA- Röhrcchen (Millipore, Schwalbach) gegeben. Durch Zugabe von 10 ml 0,05 M HEPES-Puffer (pH7) und 0,1 mM EDTA und folgender Zentrifugation bei 5000 U/min wurde das Lösungsvolumen auf 1 ml abfiltriert. Dieser Schritt wurde 3-mal wiederholt. Die verbliebene Antikörperlösung (~1 ml) wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 4°C gelagert.

### 2.2.6.2 Herstellung der pegylierten Immunliposomen

Für die PIL-Herstellung wurden 1,2 ml Chloroform in einen 5ml Glaskolben gegeben. Anschließend wurde 97 µl POPC (146 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>), 60 µl DDAB (6,3 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>) 100 µl DSPE-PEG<sub>2000</sub> (16,4 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>) und 120 µl DSPE-PEG<sub>2000</sub> maleimid (5mg/ml in CHCl<sub>3</sub>) (alle: Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)) unter Stickstoffatmosphäre dazu pipettiert.

Die molare Lipidmenge war 20 µmol und setzte sich wie folgt zusammen:

|     |                                   |  |
|-----|-----------------------------------|--|
| 93% | POPC                              | (1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphocholin)    |
| 3%  | DDAB                              | (Didodecyldimethylammonium bromid)                             |
| 3%  | DSPE-PEG <sub>2000</sub>          | (Distearoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol)          |
| 1%  | DSPE-PEG <sub>2000</sub> maleimid | (Distearoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol-maleimid) |

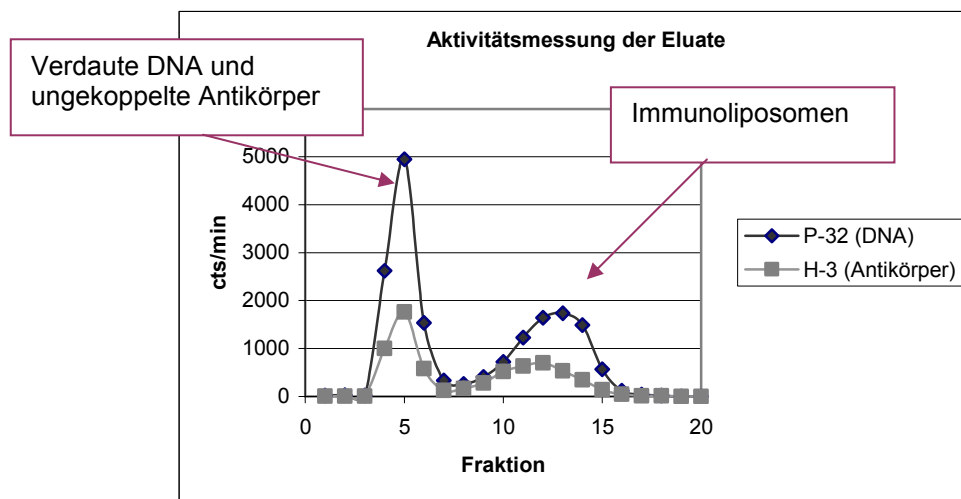
Der Anteil von DDAB und POPC wurde je nach Versuch variiert.

Der Glaskolben wurde zunächst am Rotationsverdampfer (Büchi, Essen) bei 50°C für 10 min und bei 300 mbar unter Vakuum gesetzt. Anschließend wurde bei 50°C für 50 min und danach bei Raumtemperatur für 30 min unter 50 mbar das restliche Chloroform vollständig verdampft. Es entstand ein dünner Lipidfilm an der Kolbenwand. Anschließend wurden unter leichtem Stickstoffstrom 200 µl 0,05 M HEPES-Puffer (pH7) zugegeben und durch 5 min Vortexen die Lipide gelöst. Danach wurde der Kolben zur Generierung multilamellarer Liposomen für 10 min in ein Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) gestellt. Nach dieser Behandlung wurden 100 µl HEPES-Puffer (pH7) und 100µl pHRL-SV40-Plasmid-DNA (2 µg/µl) zu den Lipiden pipettiert. Zur Analyse des DNA-Einbaus in die Liposomen wurden 16 µl P<sup>32</sup>-markierte pHRL-SV40-DNA oder pGL3control-DNA (~1 µCi) (s. 2.2.1.9) zu der Lösung gegeben. Der Kolben wurde mit Stickstoff gefüllt und die Lösung 5 min durch Vortexen vermischt. Nun wurden zur Bestimmung der Ausgangsradioaktivität zweimal 5 µl dieser Lösung für die Messung im Szintillationszähler abgenommen. Der Kolben wurde daraufhin für 1 min in flüssigen Stickstoff gehalten und anschließend für 7 min in 50°C Wasserbad gestellt. Dieser Einfrier/Auftau-Zyklus wurde 8-mal wiederholt. Durch diese Kälteschockbehandlung soll die DNA in die noch mehrere µm großen Liposomen eindringen. Nach dem letzten Auftauschritt wurden 300 µl 0,05 M HEPES-Puffer (pH7) zugegeben. Um ca. 80 nm große Liposomen herzustellen, wurde die Lipid/DNA-Lösung bei 50°C mit einem Handextruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)) 5-mal durch eine Nucleopore Track-Etch Polycarbonat-Membran (Whatman, Dassel) mit einer Porengröße von 400 nm gepresst. Anschließend wurde 5-mal langsam (50µl/min) durch eine Membran mit 50 nm Porengröße extruiert.

Die nicht in die Liposomen eingeschlossene DNA wurde daraufhin durch Nukleaseverdau degeneriert. Dafür wurde 10 µl DNaseI (10 U, Fermentas, St.Leon-Rot), 0,5 µl ExonukleaseIII (100 U, Fermentas, St.Leon-Rot) und 10 µl MgCl<sub>2</sub> (0,5 M) zu der Lösung gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 0,5 M EDTA (pH8) gestoppt. Zu der Liposomenlösung wurde 1 ml thiolierter, H<sub>3</sub>-markierter, Antikörper (8D3, R17-217) (s. 2.2.6.1) gegeben. Durch die Thiolgruppen können die Antikörper an der Maleimidgruppe der Lipide kovalent gebunden werden. Dieser Kopplungsprozess verlief Ü/N bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

### **2.2.6.3 Quantifizierung der eingeschlossenen DNA und gekoppelte Antikörper mittels Szintillationsmessung**

Für die Bestimmung der DNA-Einschlussrate und der Antikörperkopplung wurden die antikörperkonjugierten Liposomen auf eine mit 0,05 M HEPES-Puffer (pH7) äquilibrierten Sepharose-CL-4B- gefüllten (Fluka, Buchs (CH)) Chromatographiesäule (20x1 cm) gegeben. Die Elution erfolgte bei 300 µl/min mit 0,05 M HEPES-Puffer (pH7) in 1ml-Fractionen. Von den Eluaten wurden 100 µl abgenommen und mit 6 ml Szintillationslösung (Roth, Karlsruhe) vermischt. Die Messung der Proben erfolgte im Szintillationszähler (Canberra-Packard, Dreieich). Die P<sup>32</sup>-Aktivität wurde bei 18-1700 keV und Aktivität von H<sup>3</sup> bei 0-7 keV gemessen. Für die Bestimmung der tatsächlichen Einbauraten wurden die Proben, welche vor dem Extrahieren abgenommen wurden, und 5 µl der markierten Antikörper zur Bestimmung der Ausgangsmenge ebenfalls im Szintillator gemessen. Da bei der Auftrennung der Liposomen in der Sepharosesäule die kleinen Moleküle schneller eluieren als die großen Moleküle, sollten bei der Auswertung der Fraktionen zwei Aktivitätsspitzen zu messen sein (Abb. 2.15): Die erste Aktivitätsspitze basiert auf der verdauten DNA bzw. den ungebundenen Antikörpern. Die zweite später eluierende Aktivitätsspitze entsteht aus der in die PIL eingeschlossene DNA und den gekoppelten Antikörpern. Um die Einbaueffektivität und die Kopplung der DNA und Antikörper zu berechnen, mussten demnach die Aktivitäten der später eluierten Fraktionen im Verhältnis zu der Gesamt-Ausgangsaktivität betrachtet werden.



**Abb. 2.15: Aktivitätsmessung der Elutionsfraktionen der Immunoliposomen-Präparation**

Durch Szintillationszählung kann die Aktivität der Sepharose-Säulen-Eluate bestimmt werden. Die Aktivität von  $P^{32}$  zeigt den DNA-Gehalt in den Immunoliposomen (2. Spitze). Die Aktivität von Tritium zeigt den Anteil der gekoppelten Antikörper.

Die PIL's wurden bis zu der Transfektion in Zellen oder in Mäuse bei 4°C gelagert.

#### 2.2.6.4 Größenbestimmung der pegylierten Immunoliposomen

Die Größenbestimmung der Liposomen wurde mit dem Zetasizer Nano-S-Size (Malvern Instruments, USA) am Institut für Biophysik der Uni Mainz unter der Betreuung von Prof. Jaenicke durchgeführt. Als monochromatische Lichtquelle diente ein Helium-Neon Laser mit einer Emission bei einer Wellenlänge von 633 nm.

Für die Messung wurden 60 µl der Liposomenlösung (s. 2.2.6.2) in die Messzelle pipettiert und anschließend 20 Messungen mit einer Zeitdauer von 10 sec durchgeführt. Die integrierte Software lieferte eine tabellarische und graphische Auswertung der Größenverteilung.

### 2.2.7 Tierversuche

#### 2.2.7.1 Genotypisierung der APP/PS1-Mäuse

Die Genotypisierung der APP/PS1-Mäuse für die PACAP-Versuche (s. 2.2.7.6) wurde nach Radde et al. (2006) durchgeführt.

Zur Identifizierung der Mäuse wurden Ohrbiopsien von den Tieren angefertigt. Zu den Biopsien wurden 35 µl PBND-Puffer und 1,5 µl Proteinase K pipettiert und durch Vortexen vermischt. Zur Freisetzung der chromosomalen DNA wurde 2 Stunden bei 56°C inkubiert und die Reaktion durch 30 min Erhitzen bei 95°C gestoppt. Von der DNA-haltigen Lösung

wurde 1 µl für die Standard-PCR mit den jeweiligen Oligonukleotid-Paaren (APP und hPS1) verwendet. Die PCR wurde mit dem RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma Aldrich, Steinheim) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die transgenen Tiere konnten durch ein entstehendes Amplifikat identifiziert werden.

### 2.2.7.2 Sektion der Mäuse

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch durch Überstreckung getötet. Diese schnelle Tötungsmethode gewährleistet die Integrität der isolierten RNA. Bei der Sektion wurde das Cerebellum abgetrennt und das Großhirn sofort in die zwei Hemisphären unterteilt. Eine Gehirnhemisphäre wurde in Gewebestücke von 0,5 cm<sup>2</sup> geteilt, in 500 µl RNA-Later gegeben und für die RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Die andere Hemisphäre wurde auf Trockeneis schockgefroren und für die Proteinaufreinigung ebenfalls bei -80°C gelagert. Teile der Leber (~150 mg) wurden ebenfalls wie oben beschrieben gelagert.

Für die *in vivo*-Applikationsversuche mit PACAP wurden eine Gehirnhemisphäre in 3,6% Paraformaldehyd fixiert und die andere für proteinbiochemische Untersuchungen bei -80°C gelagert.

### 2.2.7.3 Orale Acitretin-Applikation

Die orale Acitretin-Applikation wurde an 2 Monate alten FVB/N-Mäusen durchgeführt. Dabei wurden 6 mg Acitretin/kg/Tag pro Maus appliziert. Die Kontrollmäuse wurden mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (0,3M 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HPBCD), Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt. Die Verabreichung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Schlundsonde durchgeführt. Nach dem 5. Versuchstag wurden die Mäuse getötet.

In einer weiteren Versuchsreihe bekamen die Mäuse 8 Stunden Futterentzug. Anschließend wurde Acitretin wie beschrieben appliziert. Nach weiteren 14 Stunden ohne Futter wurden die Mäuse getötet und sezient.

### 2.2.7.4 Subcutane Acitretin-Applikation

Die subcutane Applikation wurde an 5 Monate alten APP(London)-Mäusen durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen mit einer Injektionsnadel 12 mg Acitretin (in DMSO gelöst - Volumen je nach Gewicht zwischen 100 und 140 µl) pro kg und pro Tag, unter die Haut seitlich der Wirbelsäule injiziert. Die Kontrollmäuse wurden nur mit DMSO behandelt. Die Injektion erfolgte zweimal pro Woche an alternierenden Injektionsstellen. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet und sezient.

### **2.2.7.5 Intranasale Acitretin-Applikation**

Die intranasale Acitretin Applikation erfolgte an 9 Monate alten APP (London)-Mäusen. Hierfür wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze je 5 µl 100 mM Acitretin (in DMSO gelöst) in jedes Nasenloch der Maus pipettiert. Die Behandlung erfolgte täglich über einen Zeitraum von 6 Wochen. Anschließend wurden die Tiere getötet und sezirt.

### **2.2.7.6 Intranasale PACAP-Applikation**

Für die intranasale PACAP-38 (Acetyliert)-Applikation wurden 1 Monate alte APP/PS1-Mäuse verwendet. Dabei wurden in jedes Nasenloch der Maus 5 µg PACAP (0,5 µg/µl in Administrationslösung) mit einer 10 µl Pipettenspitze injiziert. Die Kontrollmäuse wurden mit der entsprechenden Menge Administrationslösung behandelt. Die Mäuse wurden 5 Tage in der Woche über einen Zeitraum von 3 Monaten behandelt. Anschließend wurden die Mäuse getötet und sezirt. Dabei wurde eine Gehirnhemisphäre in 3,6% Paraformaldehyd fixiert und die Andere für proteinbiochemische Untersuchungen bei -80°C gelagert.

### **2.2.7.7 Injektion der pegylierten Immunoliposomen in die Schwanzvene der Maus**

Für die *in vivo*-Transfektion der PIL's (s. 2.2.6) wurden FVB/N-Mäuse in eine Fixierkammer eingespannt. Anschließend wurde die Maus für ca. 2 min mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Durch die Bestrahlung kommt es zu einer Vergrößerung der Schwanzvene. Für die Injektion in die Schwanzvene wurden 5-20 µg in Immunoliposomen eingeschlossene DNA (Injektionsvolumen ~250 µl) mit einer Injektionsnadel langsam injiziert. Nach 48 Stunden wurde die Maus getötet und das Gehirn, die Leber und die Milz entfernt. Die Organe wurden bei -80°C für die Proteinaufreinigung und Luciferasemessung gelagert.

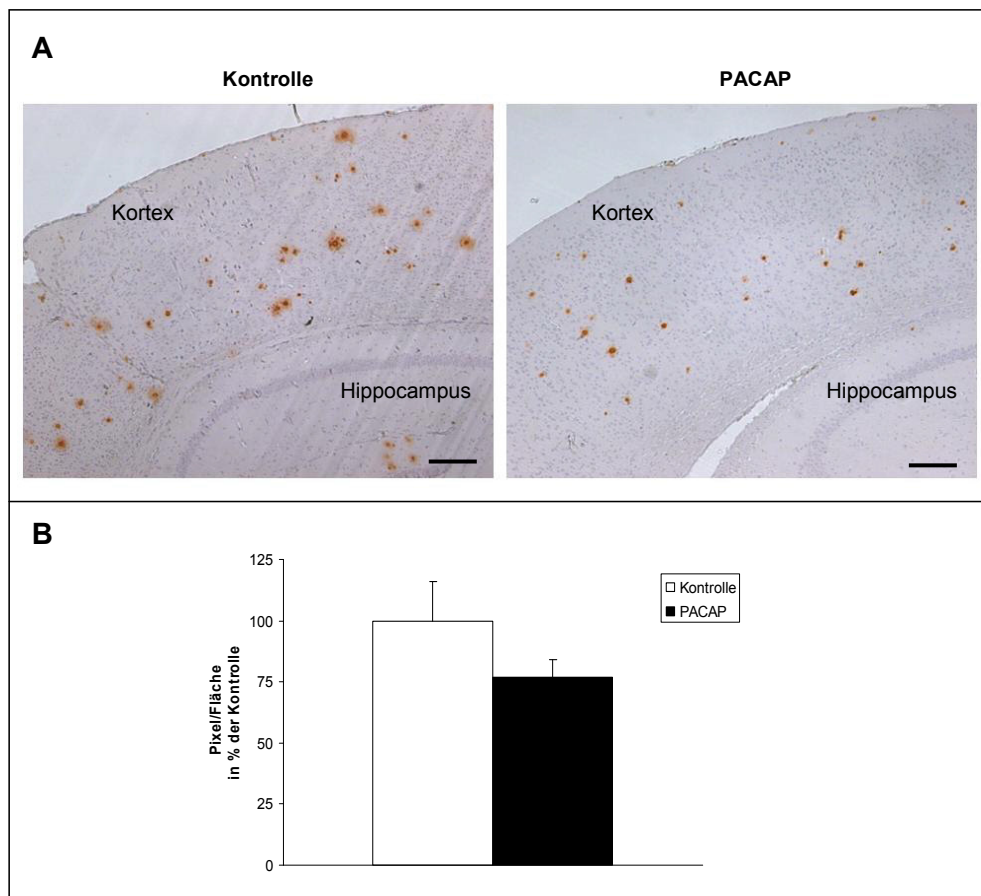
### **2.2.7.8 Hydrodynamische Schwanzvenen-Injektion von DNA**

Bei der hydrodynamischen Schwanzvenen-Injektion wurde das TRANSIT *in vivo* Gene Delivery System von Mirus (Madison, WI (USA)) verwendet. Hierfür wurde nach den Herstellerangaben der Vektor pHRL-SV40 (10 µg) gelöst in der Verabreichungslösung (~ 2 ml) mit großem Druck innerhalb von 5 Sekunden in die Schwanzvene der FVB/N-Maus injiziert. Nach 24 Stunden wurde die Maus getötet, die Organe für die Luciferasebestimmung entnommen und bei -80°C gelagert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Intranasale PACAP-Administration in APP/PS1-Mäuse

PACAP-38 stimuliert die ADAM10-vermittelte APP $\alpha$ -Sekretion in humanen Neuroblastomzellen (Kojro et al., 2006). Daher sollte die Wirkung von PACAP-38 auf die APP-Prozessierung im Mausmodell untersucht werden. In einem Vorversuch wurden hierfür APP/PS1-Mäuse verwendet, welche bereits im frühen Lebensalter amyloide Plaques ausbilden (Radde et al., 2006). Den Mäusen wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten acetyliertes PACAP-38 intranasal appliziert (s. 2.2.7.6).

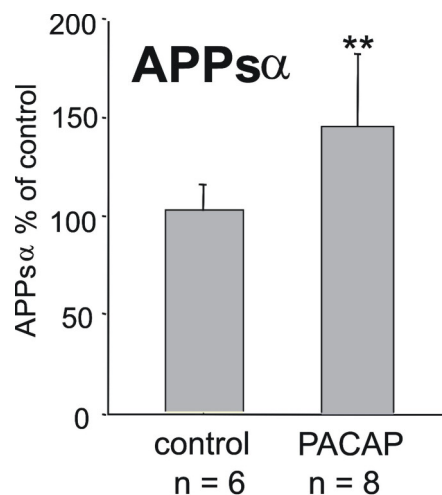


**Abb. 3.1: Amyloid- $\beta$ -Färbung der Gehirnschnitte von PACAP-behandelten APP/PS1-Mäusen**

**A)** Exemplarische Coronalschnitte aus der Kortexregion PACAP-behandelter Mäuse. APP/PS1 Mäusen wurde 5 Tage in der Woche über einen Zeitraum von 3 Monaten 10  $\mu$ g PACAP-38 (acetyliert, 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) intranasal appliziert. Die Kontrollmäuse wurden mit der entsprechenden Menge Administrationslösung behandelt. Die mit Paraformaldehyd fixierten Gehirne wurden coronal geschnitten und mit einem Antikörper gegen Amyloid- $\beta$  (6FD3) angefärbt (Balken entspricht 0,2 mm). **B)** Quantitative Auswertung der Amyloid- $\beta$ -Färbung. Drei repräsentative Areale aus der Kortexregion jeder Maus wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J umgewandelt. Dabei wurden die schwarzen Bildpunkte (Pixel), welche mit den A $\beta$ -gefärbten Stellen korrelieren, gezählt und im Verhältnis zu der Gesamtfläche betrachtet. (Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw), Kontrolle n=5, PACAP n=6)

Die immunhistochemische Färbung der Gehirnschnitte mit dem Amyloid- $\beta$ -Antikörper zeigte eine breit gefächerte und zahlreiche Verteilung der amyloiden Plaques über den gesamten Kortex (Abb. 3.1 A) und Hypothalamus (nicht abgebildet) der 4 Monate alten APP/PS1-Mäuse. Da im Hippocampus (in welchem zu Beginn der Alzheimer-Krankheit amyloide Plaques auftreten) kaum amyloide Plaques nachgewiesen werden konnten, wurde eine quantitative Auswertung der kortikalen Plaques durchgeführt: In den PACAP-38 (acetyliert) behandelten Mäusen war die Amyloid- $\beta$ -Menge im Vergleich zu den mit Administrationslösung behandelten Kontrolltieren um ca. 25% reduziert. Für diese Reduktion konnte jedoch aufgrund der zu geringen Tierzahl keine Signifikanz nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch wurden FVB/N-APP(London)-Mäuse 3 Monate mit PACAP-38 behandelt und auf APP $\alpha$ -Sekretion im Gehirn untersucht. Der APP $\alpha$ -Nachweis wurde von Dr. Elzbieta Kojro (Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) mittels Western Blot-Analyse durchgeführt. Die Untersuchung ergab eine signifikante Erhöhung der APP $\alpha$ -Sekretion PACAP-38 behandelter Mäuse um ca. 40% im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 3.2) (Kojro, 2007). Diese Vorversuche zeigten, dass PACAP auch im Mausmodell die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP stimuliert.



**Abb. 3.2: Der Einfluss von nasaler PACAP-38-Administration auf die APP-Prozessierung im Gehirn**

APP(London)-Mäuse wurden 5 Tage in der Woche über einen Zeitraum von 3 Monaten 10  $\mu$ g PACAP-38 (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) intranasal appliziert (aus: Kojro, 2007).

## **3.2 Die Erhöhung der $\alpha$ -Sekretase-Aktivität durch Immunliposomen-basierte Gentherapie**

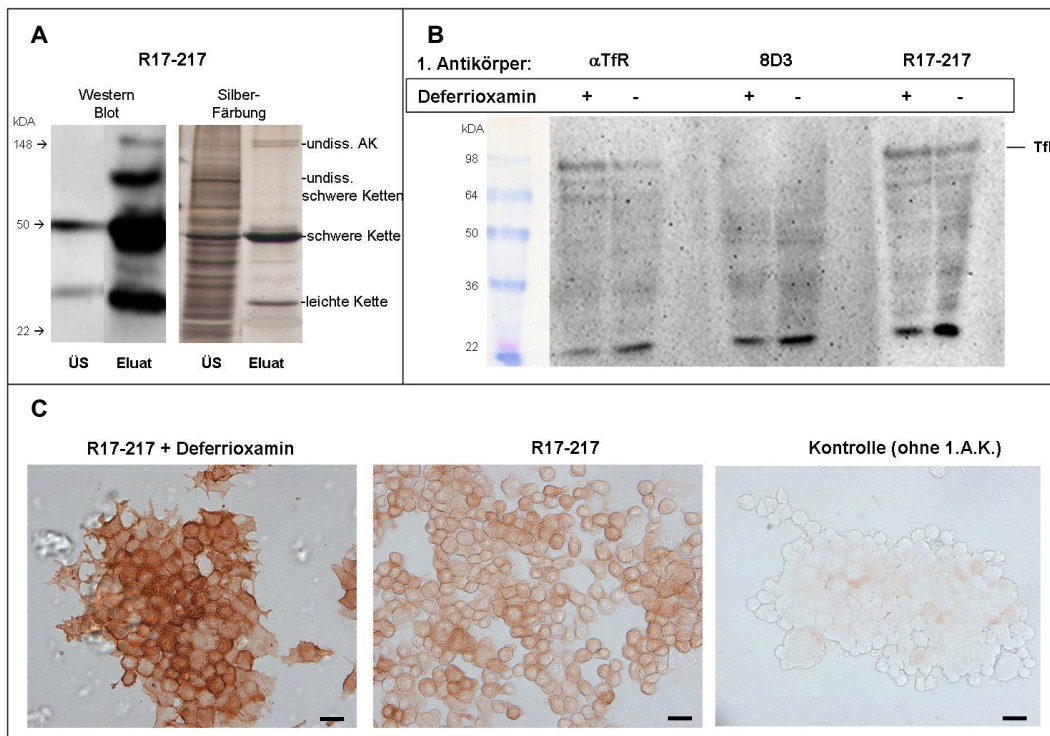
Durch Immunliposomen-basierte Transfektion sollte die humane ADAM10-cDNA in den Neuronen der Maus überexprimiert werden. Hierfür galt es zunächst die Immunliposomen herzustellen.

### **3.2.1 Produktion und Aufreinigung der anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper**

Die Immunliposomen sollten an der extrazellulären Domäne des Transferrin-Rezeptors der Gehirn-Epithelzellen binden, um so von den Epithelzellen transzytiert und danach von den Neuronen endozytiert zu werden. Kommerziell erhältliche anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper binden jedoch nur an der zytosolischen Seite des Rezeptors. Daher wurden für die Immunliposomen-Herstellung die Antikörper 8D3 und R17-217 verwendet, welche an der extrazellulären Seite des Transferrin-Rezeptors der Epithelzellen (Blut-Hirn-Schranke) binden (Lee et al., 2000). Die Liposomen wurden mit diesen Antikörpern gekoppelt, welche aus den Kulturüberständen von Hybridomzellen mittels ProteinG–Sepharose-Säule isoliert wurden (s. 2.2.4.1).

Die Ankonzentrierung der Antikörper aus den Hybridom-Zellkulturüberständen (8D3 und R17-217) wurden zunächst mittels Western Blot-Analyse überprüft. In der Abbildung 3.3. A sind auf einem exemplarischen Western-Blot einer R17-217-Aufreinigungsfraktion (Eluat) die 50 kDa großen schweren Polypeptidketten und die 25 kDa großen leichten Ketten des Antikörpers durch Detektion mit einem anti-Ratte Antikörper zu erkennen. Die Bandenfärbung in diesen Bereichen ist deutlich im Gegensatz zu der Färbung der Banden aus dem Hybridom-Zellkulturüberstand (ÜS) verstärkt, was auf eine Ankonzentrierung des Antikörpers durch die Säulenaufreinigung zurückzuführen war. Weiterhin sind auf dem Blot die undissoziierten schweren Ketten des Antikörpers durch eine Bande bei ~ 100 kDa nachgewiesen. Der undissoziierte tetramere Antikörper ist durch eine schwache Bande bei ~ 150 kDa zu erkennen.

Durch eine Silberfärbung des in einem SDS-Gel aufgetrennten Antikörpers konnte die Reinheit der isolierten Antikörper überprüft werden. Die Färbung zeigt die 50 und 25 kDa großen Peptidketten und den undissoziierten Antikörper bei 150 kDa im Säulen-Eluat (Abb. 3.3. A). Bei dieser Auftrennung waren die undissoziierten schweren Ketten des Antikörpers nicht zu erkennen. Dies lag vermutlich an Abweichungen in der verwendeten Konzentration an Dithiothreitol (DTT) welches die Disulfidbindungen zwischen den Polypeptidketten auftrennt. Zumindest zeigte das Fehlen von weiteren Protein-Banden, dass in der aufgereinigten Probe keine Proteinverunreinigungen waren, welche sich negativ auf die Antikörper-Kopplungseffizienz bei der Immunliposomen-Herstellung auswirken könnten.



**Abb. 3.3: Reinheit und Spezifität der isolierten anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper**

**A)** Exemplarischer Western Blot und Silberfärbung aufgereinigter Antikörper. Die Antikörper (R17-217) der Hybridom-Zellkulturüberstände (ÜS) wurden über eine ProteinG-Sepharose-Säule isoliert (Eluat) und zur Aufreinigungskontrolle mit gleichen Proteinmengen auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran durch einen anti-Ratte-Zweitantikörper bzw. durch Silberfärbung des Gels. **B)** Nachweis der Antikörperspezifität. Konfluent gewachsene N2A-Zellen wurden 24 h mit 50 µM Deferrioxamin oder mit gleichen Mengen Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurden die Zellmembranen aufgereinigt, auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des Transferrin-Rezeptors (TfR) in N2A-Zellen erfolgte mit dem αTfR-Antikörper (Alpha Diagnostik) und mit den isolierten Antikörpern 8D3 und R17-217. **C)** Überprüfung der Antikörperbindung an Zellen. N2A-Zellen wurden wie oben beschrieben mit Deferrioxamin oder Lösungsmittel behandelt und anschließend mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd fixiert und mit dem anti-Transferrin-Rezeptor Antikörper R17-217 (5µg/ml) 1 Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit dem SuperPicture Polymer Detection Kit (Zymed, Berlin). Als Kontrolle wurden Zellen ohne den R17-217-Antikörper mit dem Polymer Detection Kit behandelt (Balken entspricht 50 µm).

Weiterhin wurde die Antikörper-Bindungsfähigkeit an N2A-Zellmembranen überprüft. Hierfür wurden die Zellen mit Deferrioxamin vorbehandelt, welches dem Medium das Eisen entzieht. Dadurch bilden die Zellen vermehrt Transferrin-Rezeptoren an ihrer Oberfläche, um den Eisenmangel entgegenzuwirken (Mattia et al., 1984). Durch Inkubation der aufgetrennten und geblotteten Membranproteine mit dem kommerziell erhältlichen anti Transferrin-Rezeptor-Antikörper (Alpha Diagnostik, San Antonio, CA USA) waren die Transferrin-Rezeptor (TfR)-spezifischen Banden bei 95 kDA zu erkennen (Abb. 3.3 B). Die Erhöhung der Transferrin-Rezeptor Menge durch Eisenentzug, war durch eine

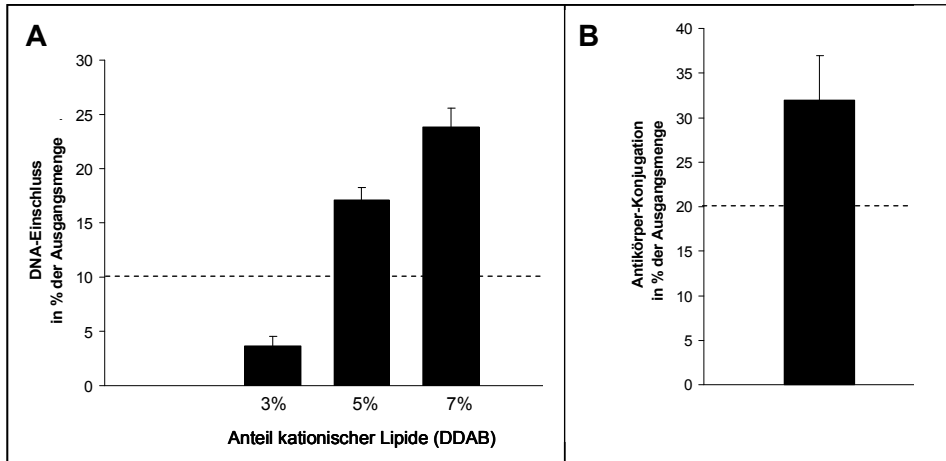
stärkere Bandenfärbung zu erkennen. Ein wesentlich schwächer ausgeprägtes Bandenmuster war nach der Inkubation mit dem 8D3-Antikörper bei 95 kDa erkennbar. Dies ließ auf eine geringere Bindungsfähigkeit des Antikörpers schließen. Eine höhere Bindungsfähigkeit zeigte der R17-217-Antikörper, welcher den Transferrin-Rezeptor stärker markierte.

Die Bindung des R17-217-Antikörpers wurde an dem nativen Transferrin-Rezeptor der N2A-Zellen überprüft. Die mit Deferrioxamin behandelten Zellen waren stärker gefärbt als die unbehandelten Zellen wodurch eine spezifische R17-217-Bindung gezeigt wurde (Abb. 3.3 C). Zellen, welche nicht mit dem Antikörper inkubiert wurden, zeigten keine Färbung, so dass eine unspezifische Färbung durch das Antikörper-Detektionsreagenz ausgeschlossen werden konnte. Eine Antikörperfärbung mit dem kommerziellen Transferrin-Rezeptor Antikörper als positiv Kontrolle konnte ohne vorherige Permeabilisierung der Zellen nicht durchgeführt werden, da dieser an der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors bindet, wohingegen der R17-217 (und 8D3) Antikörper an der extrazellulären Rezeptor-Domäne bindet.

### **3.2.2 Die Herstellung von Immunoliposomen**

Die Immunoliposomen-Herstellung erfolgte nach dem Protokoll von Pardridge (2003). Die in dem Protokoll vorgegebene Lipidzusammensetzung mit einem Anteil von 3% kationischen Lipiden (DDAB) ergibt in Anbetracht der 4% anionischen Lipide und 93% neutralen Lipiden eine negative Nettoladung der Liposomen von 1%. Die pHRL-SV40- und pGL3-Control-Vektor-DNA-Einschlussrate lag bei den in dieser Zusammensetzung hergestellten Liposomen bei ca. 4% der DNA-Ausgangsmenge (Abb. 3.4 A). Die nach Pardridge vorgegebene Einschlussrate sollte bei mindestens 10% liegen. Bei darunterliegenden Werten sollte der Liposomenansatz verworfen werden. Da bei dieser Lipidzusammensetzung keine höheren DNA-Einschlussraten erzielt werden konnten, wurde eine neue Lipidzusammensetzung mit kationischen Lipidanteilen von 5 bzw. 7% gewählt, so dass sich eine positive Nettoladung der Lipide von 1% bzw. 3% ergab. Durch die positivere Nettoladung der Liposomen wurde eine höhere Einschlussrate der negativ geladenen DNA erwartet. Die so hergestellten Liposomen hatten bei einem 5%-igen kationischen Lipidanteil eine DNA-Einkapselung von ca. 17% der eingesetzten Ausgangsmenge, was einem DNA-Gehalt von 34 µg pro 20 µmol Lipid entspricht. Die Liposomen mit 7% kationischen Lipidanteilen hatten eine mittlere DNA-Einschlussrate von ca. 24% der Ausgangsmenge was einem Gehalt von 48 µg pro 20 µmol Lipid entspricht. Der Anteil der konjugierten Antikörper lag bei ca. 34% der Ausgangsmenge was einem Antikörper-Gehalt von ca. 0,05 mg/µmol Lipid entspricht (Abb. 3.4 B). Diese

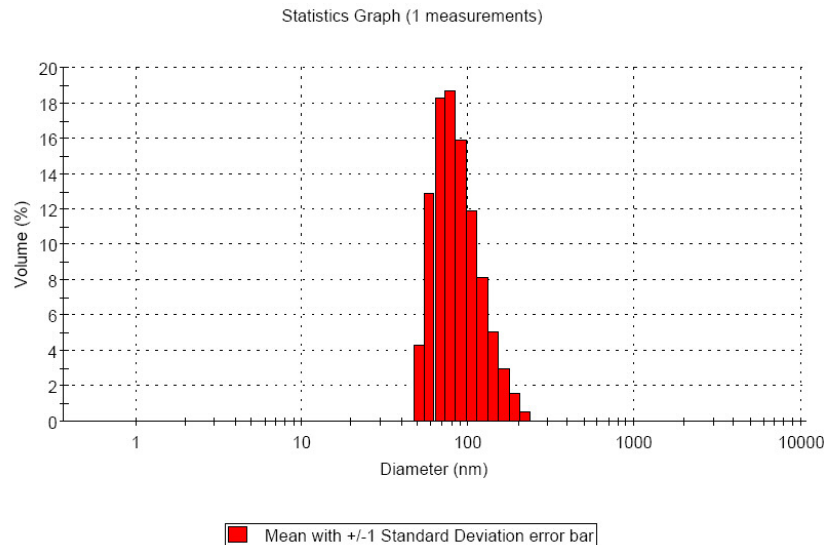
Konjugationseffizienz war unabhängig von dem Anteil kationischer Lipide und von den verwendeten Antikörpern (8D3 oder R17-217). Die von Partridge (2003) vorgegebene mindest-Konjugationsmenge liegt bei 20%, welche in jedem Versuch überschritten wurde.



**Abb. 3.4: DNA-Einbau und Antikörperkonjugation bei der Immunliposomen-Herstellung**

**A)** DNA-Einschluss bei der Herstellung von Immunliposomen unterschiedlicher Ladung. Bei der Herstellung wurden unterschiedliche Anteile kationischer Lipide (DDAB) verwendet. Die DNA-Einschlussrate wurde über  $P^{32}$ -markierte pHRL-SV40- oder pGL3-Control-Vektor-DNA nach Sepharose-Isolation und Szintillationsmessung der Liposomen in Bezug zur DNA-Ausgangsmenge ermittelt. Die nach Partridge et al. (2003) vorgegebene Mindest-Einschlussmenge sollte bei 10% liegen (gestrichelte Linie) (MW + Stabw, n=6 für 3% DDAB, n=5 für 5% DDAB, n=7 für 7% DDAB) **B)** Antikörperkonjugation bei der Immunliposomen-Herstellung. Thiolierte Antikörper (8D3 oder R17-217) wurden über Nacht an die Maleimid-Gruppen der Liposomen gekoppelt. Die Konjugations-Effizienz beider Antikörper wurde anhand der  $H^3$ -Markierung der Antikörper durch Szintillationsmessung im Bezug zur Ausgangsmenge bestimmt und zusammengefasst dargestellt (MW + Stabw, n=9)

Der Durchmesser der Immunliposomen spielt bei der Transfektionseffizienz eine wichtige Rolle (Partridge, 2003). Je kleiner der Durchmesser ist, desto höher ist die Effizienz. Der optimale Durchmesser für eine hohe *in vivo* Transfektionseffizienz bei gleichzeitiger hohen DNA-Einbaurate liegt nach Partridge zwischen 75 und 100 nm. Die Größenmessung der hergestellten Immunliposomen ergab bei 3% kationischen Lipidanteilen einen mittleren Durchmesser von ca. 75 nm (gemessen von Jens Haas, ehemalg Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Eine exemplarische Größenmessung der Liposomen mit einem 7%-igen Anteil kationischer Lipide ergab einen mittleren Durchmesser von 94 nm, wobei ca. 20% der Liposomen einen Durchmesser von 78 nm und ca. 80% der Liposomen einen Durchmesser kleiner als 100 nm hatten (Abb. 3.5).



### Abb. 3.5: Exemplarische Größenbestimmung der Immunliposomen

Die Größe der Immunliposomen wurde mit dem Zetasizer Nano-S-Size (Malvern Instruments) ermittelt. Dargestellt ist die Größenverteilung der Liposomen mit 7% kationischem Lipidanteil in Volumenprozent.

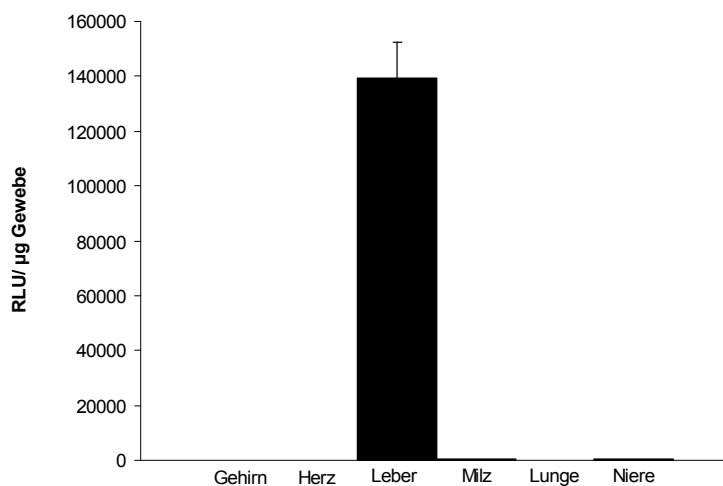
### 3.2.3 Immunliposomen-basierte Transfektion von DNA *in vitro* und *in vivo*

Die hergestellten Immunliposomen wurden für die Transfektion verschiedener Zelllinien verwendet. Die Maus-Zelllinien bEnd5 und Maus-Transferrinrezeptor-überexprimierenden HEK-Zellen wurden mit Immunliposomen mit einem kationischen Lipidanteil von 3% und ~ 4% DNA-Einschluss (s. 3.2.2) und dem gekoppelten 8D3-Antikörper inkubiert. Durch Einschluss eines konstitutiv Luciferase-exprimierenden Vektors wie z.B. pHRL-SV40 oder pGL3-Control sollte eine erfolgreiche Transfektion durch Luciferase-Bestimmung nachgewiesen werden. Es konnte jedoch keine Renilla- bzw. Glühwürmchen- Luciferase-Aktivität in den Immunliposomen behandelten Zellen gemessen werden. Weiterhin wurden N2A-Zellen und Maus-Transferrinrezeptor-überexprimierende HEK-Zellen mit Immunliposomen transfiziert, welche mit 24% eingeschlossener DNA (s. 3.2.2) und gekoppelt mit dem 8D3 bzw. R17-217 Antikörpern einen kationischen Lipidanteil von 7% hatten. Auch hier konnte keine Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden.

Für die Transfektions-Untersuchungen *in vivo* wurden Mäusen Immunliposomen mit 5-20 µg eingeschlossener DNA, gekoppelt mit 8D3 oder R17-217 in die Schwanzvene injiziert. Leber- und Gehirn-Homogenisat der Mäuse wurden nach 24 Stunden auf Luciferase-Aktivität untersucht. In beiden Organen konnte jedoch keine Luciferase-Aktivität gemessen werden.

Damit ein Fehler in der Aufarbeitung und Bestimmung der Luciferase-Aktivität in den Maus-Organen ausgeschlossen werden konnte, wurde ein alternatives *in vivo* Transfektionssystem verwendet. Bei dem Prinzip der hydrodynamischen

Schwanzveneninjektion wird DNA in einem hohen Volumen, mit großem Druck injiziert. Durch den Druck bilden vorwiegend Leberzellen (Hepatozyten) Membranporen aus, wodurch die DNA in die Zellen gelangt (Zhang et al., 2004). Die hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit dem Renilla-Luciferasevektor zeigte nach der Aufarbeitung der Organe eine deutliche Luciferase-Aktivität in der Leber (Abb. 3.6). Allerdings zeigen andere Organhomogenate wie z.B. aus Gehirn und Niere keine Enzymaktivität. Daher konnte eine fehlerhafte Aufarbeitung oder fehlerhafte Luciferase-Messung der Organe ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.6: Luciferase-Aktivität in Organ-Homogenisaten von durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion transfizierten Mäusen**

Mit dem TransIT in vivo Gene Delivery System von Mirus (Madison, WI (USA)) wurden 10 µg pGL3-Control DNA in einem Lösungsvolumen von 2 ml innerhalb von 5 Sekunden in die Schwanzvene einer FVB/N-Maus injiziert. Die Organe wurden homogenisiert und aus dem Überstand die Luciferase-Aktivität in relative Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zur Proteinmenge der bestimmt (MW + Stabw, n=3 Messungen).

Obwohl alle von Pardridge (2003) genannten experimentelle Parameter, wie DNA-Einschluss, Antikörper-Bindung und Liposomengröße eingehalten wurden, konnte *in vitro* und *in vivo* die Immunoliposomen-basierte Transfektion der Kontroll-DNA nicht nachgewiesen werden. Daher wurden keine Transfektionsversuche mit ADAM10 cDNA durchgeführt.

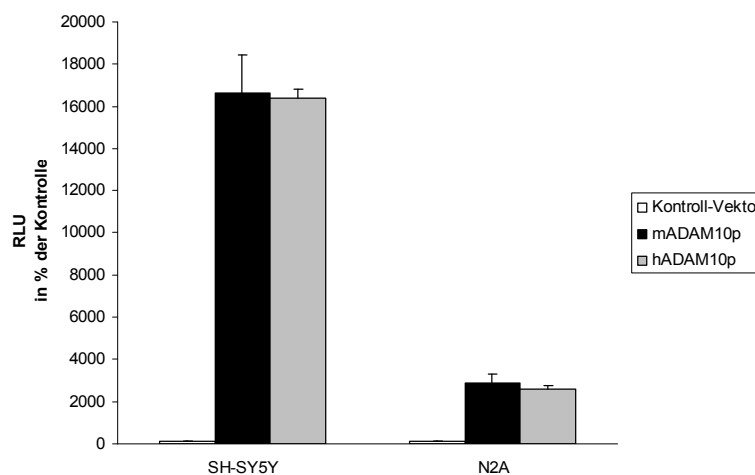
### 3.3 ADAM10-Stimulation durch Retinoid-Rezeptor-vermittelter Transkriptionsaktivierung

Neben der Gentherapie durch Überexpression von ADAM10 bietet die Stimulation der endogenen ADAM10-Genexpression eine weitere Möglichkeit die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung zu erhöhen. Da in vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde, dass der ADAM10-Promotor durch Retinoide aktiviert werden kann (Prinzen et al., 2005; Endres et al.; 2005) sollte diese Aktivierung genauer charakterisiert werden.

#### 3.3.1 Vergleich zwischen dem humanen und dem murinen ADAM10-Promotor

##### 3.3.1.1 Vergleich der konstitutiven und induzierten Aktivität von humanem und murinem ADAM10-Promotor

Der humane ADAM10-Promotor ist mit dem murinen ADAM10-Promotor innerhalb der ersten 500 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt zu 78% identisch (Prinzen et al., 2005) (Abb. 1.7). Für die Entwicklung einer Methode zur Erhöhung der ADAM10-Aktivität durch Promotor-Stimulation im Mausmodell, galt es zunächst zu überprüfen, ob die Basisaktivitäten beider Promotoren in menschlichen und murinen Zellen neuronaler Herkunft gleich sind.

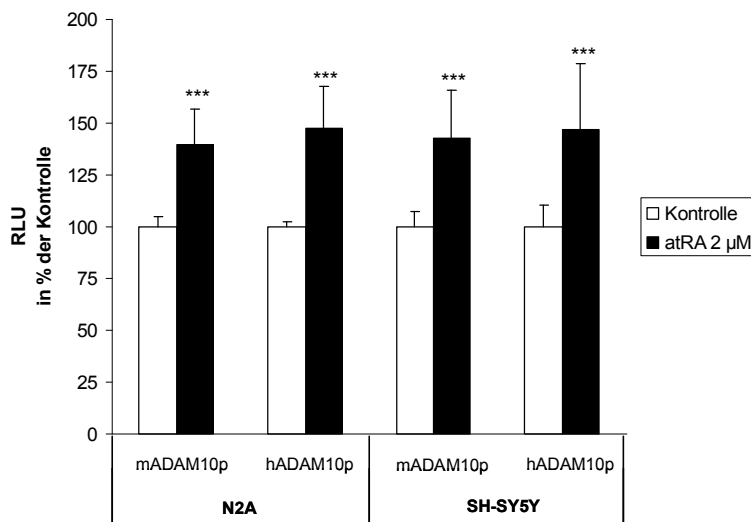


**Abb. 3.7: Basisaktivität der ADAM10-Promotoren in murinen und humanen Neuroblastomzellen**

SH-SY5Y- und N2A-Zellen wurden mit dem konstitutiv Renilla-Luciferase exprimierenden phRL-SV40-Vektor (für die Expressionsnormierung) und mit dem hADAM10p-Vektor oder dem mADAM10p-Vektor transient transfiziert. Als Kontroll-Vektor wurde der pGL3-Basic-Vektor (Leervektor) verwendet. Nach 5 Stunden wurde mit frischem Wachstumsmedium 24 Stunden inkubiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt sind die RLU der Glühwürmchen Luciferase/ RLU der Renilla Luciferase (MW + Stabw, n=6).

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Lysaten von mit dem humanen oder murinen ADAM10-Promotor-Konstrukt transient transfizierter Zellen zeigte nach 24 Stunden, dass die konstitutive Aktivität beider Promotoren in beiden Zelllinien identisch ist (Abb. 3.7). Große Abweichungen zeigten sich jedoch zwischen den unterschiedlichen Zelllinien: Die Basisaktivität beider Promotoren war in den humanen SH-SY5Y-Zellen gegenüber den Promotor-Aktivitäten in den murinen N2A-Zellen um mehr als das 5-fache erhöht.

Die atRA induzierte Stimulation des humanen ADAM10-Promotors wurde bereits an stabil transfizierten SH-SY5Y-Zellen gezeigt (Prinzen et al., 2005). Die beiden potentiellen Retinoid-Rezeptor-Bindeelemente der DNA im Bereich -302 bp und -203 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt unterscheiden sich zwischen dem humanen- und den murinen ADAM10-Promotor am Ende der Bindesequenz um jeweils ein Nukleotid (Thymidin → Guanin (Abb. 1.7, Abb. 3.26)). Daher galt es zu untersuchen, ob sich der murine ADAM10-Promotor durch atRA genauso wie der humane ADAM10-Promotor in neuronalen Zellen von Mensch und Maus stimulieren lässt. Der murine und der humane ADAM10-Promotor wurden in transient transfizierten Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit atRA im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen um 40-50% stärker aktiviert. Die Aktivitätssteigerung war in den murinen (N2A)- und humanen (SH-SY5Y)-Zellen annähernd identisch (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Der Vergleich zwischen der humanen und murinen ADAM10-Promotor-Aktivität in neuronalen Zelllinien nach der Inkubation mit atRA**

SH-SY5Y- und N2A-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit hADAM10p oder mADAM10p für 48 Stunden mit 2 µM atRA oder mit dem entsprechenden Lösungsmittelvolumen (Kontrolle) behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden auf den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der Kontrollen auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n ≥ 6, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p < 0,001).

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in den neuronalen Zellen der Maus (N2A) als auch in denen vom Mensch (SH-SY5Y), die ADAM10-Promotoren aus Mensch und Maus durch atRA in gleicher Intensität stimuliert werden können.

### **3.3.1.2 Vergleich der APP-Prozessierung in Zellen mit den APP695wt- und den APP695swe-überexprimierenden Isoformen**

Für die weitere Untersuchung der Retinoid-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsaktivierung von ADAM10 galt es zunächst die durch atRA induzierte Promotorstimulation in humanen und murinen Neuronalzellen auf Proteinebene zu bestätigen. Hierfür wurden SH-SY5Y- und N2A-Zellen verwendet, welche entweder die APP695-Isoform mit der schwedischen Mutation (swe) oder mit der Wildtyp-Form (wt) überexprimieren.

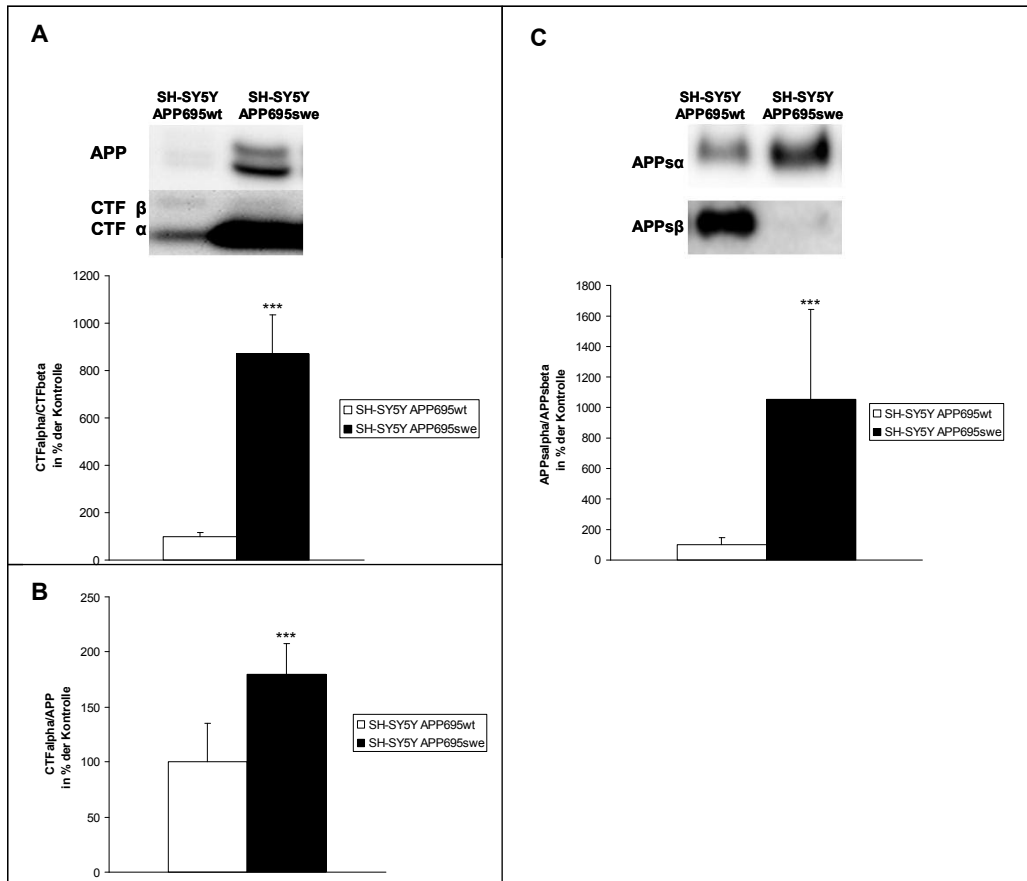
Zellen, welche die schwedische APP695-Isoform überexprimieren sekretieren 6-8-mal mehr A $\beta$  als Zellen mit der APP695wt-Isoform (Citron et al., 1992). Die Zelllinien mit der APP695wt-Isoform hatten jedoch eine deutlich niedrigere Wachstumsrate als Wildtyp-Zelllinien und Zellen mit der APP695swe-Isoform. Die Wachstumsrate der Zellen war gegenüber den Wildtyp-Zelllinien und den Linien mit der schwedischen Isoform um ca.  $\frac{1}{4}$  erniedrigt. Bevor die Untersuchungen mit den Retinoid-Rezeptor-Agonisten durchgeführt wurden, galt es zunächst die APP-Prozessierung der beiden APP-überexprimierenden Zelllinien miteinander zu vergleichen.

Die SH-SY5Y APP695swe-Zellen hatten eine deutlich höhere Menge an membran-gebundenem CTF $\alpha$  bei gleichbleibender CTF $\beta$ -Menge: Das Verhältnis von CTF $\alpha$  zu CTF $\beta$  war in dieser Zelllinie gegenüber den SH-SY5Y APP695wt-Zellen um das 7-10 fache erhöht (Abb. 3.9 A). Auch das Verhältnis von CTF $\alpha$  zu dem ungespaltenen APP war bei den Zellen mit der schwedischen Isoform gegenüber den Zellen mit der überexprimierenden Wildtyp-Isoform um das 1,5 bis 2 fache erhöht (Abb. 3.9 B). Dabei ist zu beachten, dass generell bei der SH-SY5Y APP695swe-Zelllinie im Vergleich zu der SH-SY5Y APP695wt-Zelllinie die Menge an ungespaltenen APP deutlich erhöht war.

Die Menge an sekretierten APPs $\alpha$  war in dieser Zelllinie gegenüber den Zellen mit der Wildtyp-Form ebenfalls deutlich erhöht und die Menge an APPs $\beta$  deutlich erniedrigt. Analog zu dem Verhältnis von CTF $\alpha$ /CTF $\beta$  gab es eine ca. 10-fache Erhöhung des Verhältnisses APPs $\alpha$ /APPs $\beta$  in den Zellen mit der schwedischen Mutation. Ähnliche Unterschiede wurden in den N2A-Zelllinien mit den beiden APP-Varianten beobachtet.

Die erhöhte APPs $\alpha$ - und CTF $\alpha$ -Menge der APP695swe-überexprimierenden Zellen gegenüber den APP695wt-überexprimierenden Zellen war nicht mit den Literaturbeschreibungen vereinbar, nach denen die Zellen mit der APP695swe-Isoform mehr A $\beta$ -Peptide und demnach weniger APPs $\alpha$  und CTF $\alpha$  produzieren. Es wurde daher vermutet, dass die Zelllinien verwechselt wurden. Damit dies ausgeschlossen werden

konnte, wurde aus den N2A APP695wt-, N2A APP695swe-, SH-SY5Y APP695swe- und SH-SY5Y APP695wt-Zellen chromosomale DNA isoliert und mittels geeigneter flankierender Primer der APP695 cDNA die Isoformen amplifiziert. Hierfür wurden bei den SH-SY-Zellen die Oligonukleotide SH-SY5Y\_APP\_Myc\_for und SH-SY5Y\_APP\_rev und bei den N2A-Zellen die Oligonukleotide N2A\_APP\_Myc\_for und N2A\_APP\_Myc\_rev verwendet (s. 2.1.8). Die Silika-säulengereinigten Amplifikate wurden Sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte jedoch die Identität der Zellen wonach keine Verwechslung der Zellen bestand.



**Abb. 3.9: Vergleich der APP-Prozessierung in APP695swe- und APP695wt-überexprimierenden Zellen**

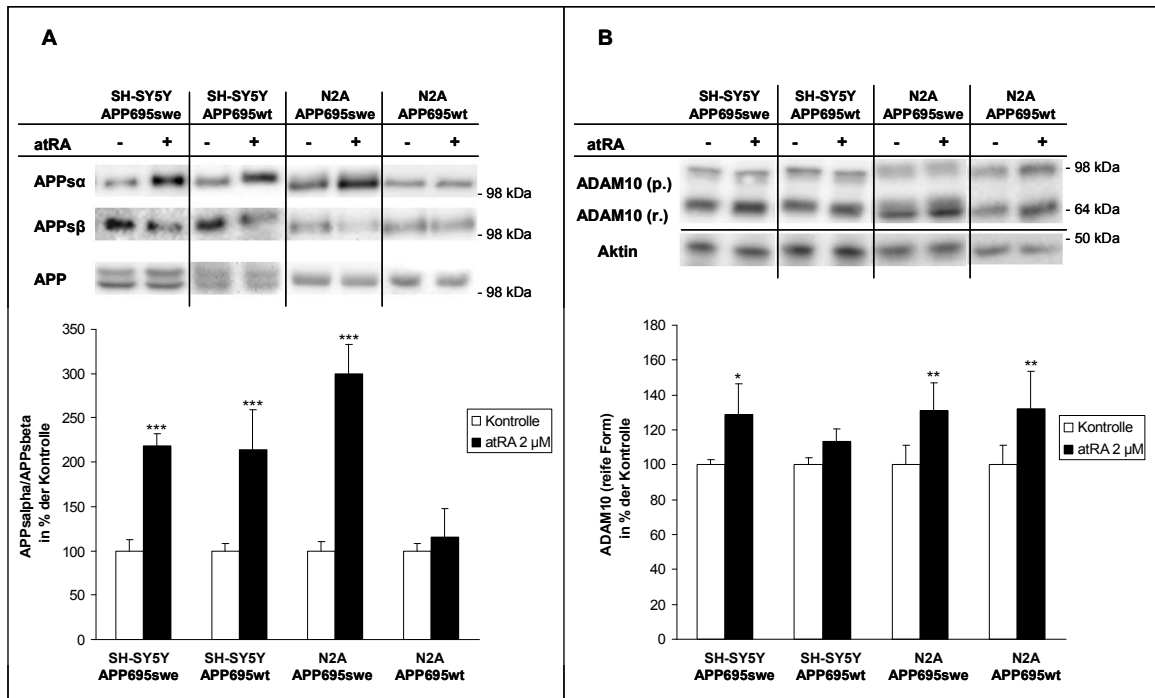
SH-SY5Y APP695wt- und SH-SY5Y APP695swe-Zellen wurden 5 Stunden im serumfreien Medium inkubiert und die Proteine des Kulturüberstands präzipitiert. **A), B)** Die Zellmembran-Proteine wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APP (Antikörper 6687) sowie den CTFs untersucht. **C)** Die präzipitierten Proteine wurden auf den Gehalt an APP $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APP $\beta$  (anti-APP $\beta$ -Antikörper) untersucht.

Die Mittelwerte der Verhältnisse A) CTF $\alpha$ /CTF $\beta$ , B) CTF $\alpha$ /APP und C) APP $\alpha$ /APP $\beta$  aus den Zellen mit der APP695wt-Isoform wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001)

### **3.3.1.3 APP-Prozessierung durch atRA-basierte ADAM10-Stimulation in humanen und murinen Neuroblastom-Zellen**

Die Retinoid-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsaktivierung von ADAM10 durch atRA (s. 3.3.1.1) sollte nun in den humanen und murinen Neuronalzellen, welche die APP695swe- und APP695wt-Isoformen überexprimieren auf Proteinebene untersucht werden.

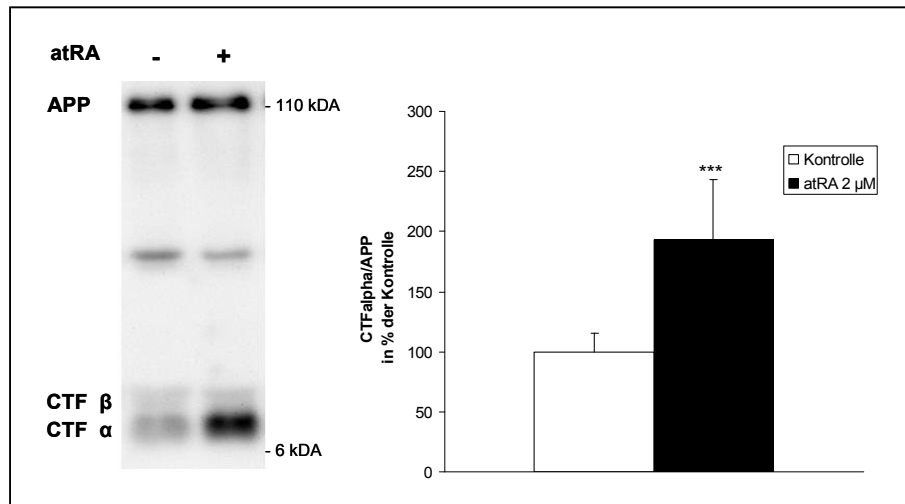
Die Inkubation der APP-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen mit atRA führte zu einer deutlichen Erhöhung der APP $\alpha$ -Sekretion bei gleichzeitiger verminderten APP $\beta$ -Sekretion (Abb. 3.10 A). In beiden SH-SY5Y-Zelllinien erhöhte sich durch atRA das Verhältnis von APP $\alpha$  zu APP $\beta$  um 100% im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen. Die Menge an membrangebundenem ungespaltenem APP blieb dagegen unverändert. In der murinen N2A APP695swe-Zelllinie erhöhte sich das APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis auf fast 200% im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen konnte in den APP-Wildtyp exprimierenden N2A-Zellen keine signifikante Veränderung in der APP $\beta$ -Sekretion nachgewiesen werden. Die Menge des ungeschnittenen APP blieb auch in den beiden N2A-Zelllinien unverändert. Weiterhin konnte in allen Zelllinien eine leichte Erhöhung der reifen ADAM10-Form nachgewiesen werden, welche in allen untersuchten Zelllinien (ausgenommen der SH-SY5Y APP695swe-Zelllinie) signifikant war (Abb. 3.10 B). Bei den N2A APP695wt-Zellen trat jedoch keine direkte Korrelation zwischen der erhöhten ADAM10-Menge und dem kaum veränderten Verhältnis von APP $\alpha$  zu APP $\beta$  auf. Diese fehlende Korrelation lässt sich jedoch nicht erklären. Ein Einfluss von atRA auf die APP-Expression kann ausgeschlossen werden, da die APP-Proteinmengen nicht unterschiedlich waren. Die N2A APP695swe-Zelllinie zeigte eine deutliche Erhöhung des APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis. Daher hätte auch in der N2A APP695wt-Zelllinie, welche bis auf die schwedische Mutation im APP-Gen genetisch identisch ist, durch die atRA-basierte Erhöhung von ADAM10 eine erhöhte  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung zu beobachten sein sollen.



**Abb. 3.10: atRA induzierte APPα-Sekretion und ADAM10 Produktion in verschiedenen neuronalen Zelllinien**

SH-SY5Y APP695swe-, SH-SY5Y APP695wt-, N2A APP695swe- und N2A APP695wt-Zellen wurden mit 2 μM atRA oder Lösungsmittel (Kontrolle) für 43 Stunden vorinkubiert. **A)** Die sekretierten Proteine wurden nach weiteren 5 Stunden Inkubation mit atRA im serumfreien Medium präzipitiert und mittels Western Blot auf den Gehalt an APPα (Antikörper 6E10) und APPβ (anti-APPβ-Antikörper) untersucht. Die Zellmembran-Proteine wurden auf den Gehalt an ungespaltenem APP (Antikörper 6687) untersucht. **B)** Ebenso wurden die ADAM10 Proform (p), ADAM10 reife Form (r.) (anti-ADAM10-Antikörper von Calbiochem für SH-SY5Y und von Chemicon für N2A) in den Membran-Fractionen durch Western Blot-Analyse untersucht. Aktin (anti-Aktin-AK) diente als Kontrolle der gleichen Auftragsmenge an Protein. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n ≥ 8 bzw. n=3 für SH-SY5Y APP695wt, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05).

Neben dem Nachweis der erhöhten APPα- (und verminderten APPβ-) Sekretion, wurde die Menge der membrangebundenen Prozessierungsprodukte von APP exemplarisch in der SH-SY5Y APP695swe-Zelllinie untersucht. Es konnten jedoch nur die 9 kDa großen C83- (C-terminalen Fragmente α, CTFα-) Fragmente deutlich nachgewiesen werden. Die 11 kDa großen C99- (CTFβ-) Fragmente waren nur selten nachweisbar und konnten daher nicht für eine quantitative Auswertung verwendet werden. Die Menge der CTFα-Fragmente war durch atRA gegenüber den mit Lösungsmittel-behandelten Zellen um ca. 100% erhöht (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11: Nachweis von C83 (CTF $\alpha$ ) nach atRA Inkubation**

SH-SY5Y APP695swe-Zellen wurden wie in Abbildung 3.10 beschrieben mit atRA behandelt. Der Nachweis des unprozessierten APP und des membranständigen Fragments CTF $\alpha$  erfolgte mit dem 6687-Antikörper (MW + Stabw, n=8, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Inkubation mit atRA nicht nur in den neuronalen Zellen des Menschen (Endres et al., 2005), sondern auch in den neuronalen Zellen der Maus (ausgenommen die N2A APP695wt-Zelllinie) die ADAM10-Menge erhöht wurde, was sich auf eine verstärkte nicht-amyloide Prozessierung von APP auswirkte.

### 3.3.2 ADAM10-Stimulation durch RAR- und RXR- selektive Retinoide

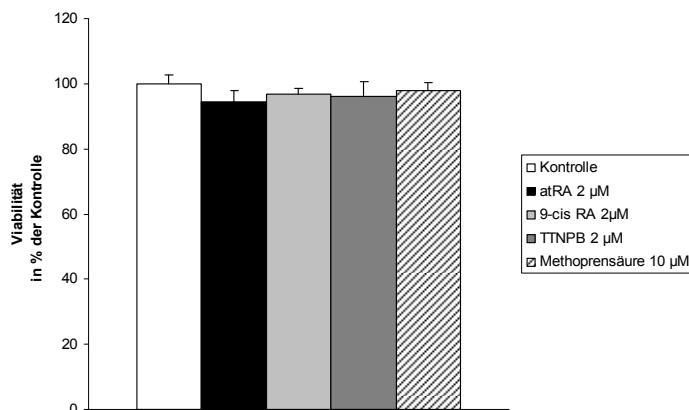
Die verschiedenen Retinoid-Isomere binden mit unterschiedlicher Spezifität an den beiden Retinoid-Rezeptor-Klassen: atRA aktiviert hauptsächlich die RAR-Rezeptoren und besitzt nur geringe Wirkung auf die RXR-Rezeptoren (Veal et al., 2002), wohingegen 9-cis RA vorwiegend an RXRs bindet (Klaholz et al., 1998) aber auch in geringen Maßen RARs aktivieren kann (Heyman et al., 1992; Levin et al., 1992). Um die Beteiligung der Retinoid-Rezeptoren RAR und RXR bei der Retinsäure-vermittelten ADAM10-Stimulation genauer zu untersuchen, wurden Untersuchungen mithilfe des selektiven RAR-Liganden TTNPB und der Methoprensäure sowie DHA als Liganden für RXR gemacht.

#### 3.3.2.1 Bestimmung der Zellviabilität nach der Inkubation mit Retinoid-Rezeptor-Liganden

Für die Untersuchung der ADAM10-Stimulationsfähigkeit der natürlichen und selektiven Retinoid-Rezeptor-Liganden galt es zunächst zu klären, ob die verwendeten Agonisten

mögliche zytotoxische Reaktionen hervorrufen, welche einen Einfluss auf die ADAM10-Promotor-Aktivierung und APP-Prozessierung zur Folge haben könnten.

Die Inkubation der SH-SY5Y-Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden mit den Rezeptor-Liganden atRA, 9-cis RA, TTNPB und Methoprensäure in der angegebenen Konzentration bewirkte keine Verminderung der Zellviabilität (Abb. 3.12). Daher konnte ein zytotoxischer Einfluss durch die verwendeten Liganden ausgeschlossen werden und diese in der getesteten Konzentration verwendet werden.



**Abb. 3.12: Zellviabilität nach der Inkubation mit Retinoid-Rezeptor-Liganden**

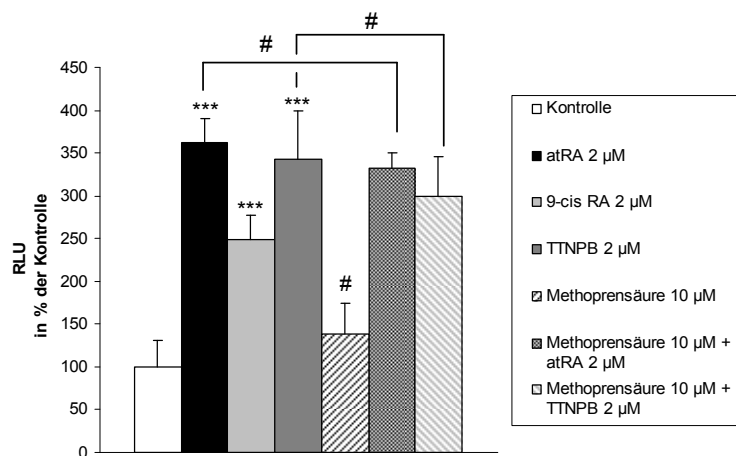
SH-SY5Y-Zellen wurden jeweils mit 2 µM atRA, 2µM 9-cis RA, 2 µM TTNPB, 10 µM Methoprensäure bzw. dem Lösungsmittel (Kontrolle) 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde Medium mit MTT-Reagenz mit den jeweiligen Liganden zugegeben und 4 Stunden inkubiert. Nach der Zugabe von Lysispuffer wurde die Extinktion bei 565 nm im Photometer bestimmt und abzüglich der Hintergrundextinktion und der Extinktion der Mediumkontrolle (s. 2.2.3.5) im prozentualen Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (MW + Stabw, n=3).

### 3.3.2.2 Der Einfluss der Retinoid-Rezeptor-Liganden auf die Retinoid-Rezeptor-Bindeelement (RARE)-vermittelte Transkriptionsaktivierung

Das RARE-Reportergenkonstrukt besteht aus dem DR5-Element, an welchem RAR/RXR-Heterodimere binden, und durch deren Aktivierung die Transkription einleiten können (s. 1.3.1). Mit diesem Konstrukt wurde die Funktionalität der eingesetzten Retinoid-Rezeptor-Liganden getestet. Durch Inkubation mit den natürlichen und selektiven RAR- und RXR-Liganden sollte die Aktivierung der Rezeptoren über RARE-vermittelter Luciferase-Expression nachgewiesen werden.

Die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit atRA bewirkte nach 48 Stunden eine ca. 250%-ige Stimulation der RARE-basierten Luciferaseexpression im Vergleich zu den mit Lösungsmittel (Ethanol) behandelten Zellen (Abb. 3.13). Die Inkubation mit 9-cis RA bewirkte ebenfalls eine erhöhte Expression, die jedoch nur um 150% gegenüber der Kontrolle erhöht war. Der selektive RAR-Ligand TTNPB induzierte in den Zellen eine ähnlich starke Luciferaseexpression wie atRA.

Methoprensäure, ein selektiver RXR-Ligand, hatte keine Auswirkung auf die RAR/RXR-basierte Luciferase-Produktion. Auch in Kombination mit atRA oder TTNPB konnte keine signifikante Stimulationssteigerung im Vergleich zu atRA oder TTNPB alleine nachgewiesen werden. Der Vergleich der selektiven RAR- und RXR-Liganden zeigte, dass TTNPB im Gegensatz zur Methoprensäure eine deutliche Wirkung auf die RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung ausübt. Dies würde bedeuten, dass die RAR/RXR-Heterodimer-Aktivierung nur über die Aktivierung von RAR verläuft oder dass die Methoprensäure im Gegensatz zu den Literaturangaben (Harmon et al., 1995) den RXR-Rezeptor nicht aktiviert.



**Abb. 3.13: Wirkung der RAR- und RXR-Liganden auf die RARE vermittelte Transkriptionsaktivierung**

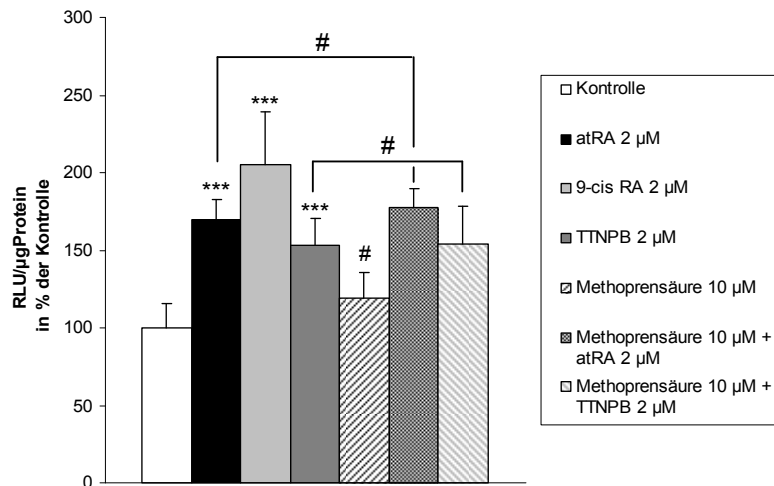
SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit dem RARE-Luc-Vektor und dem pHRL-SV40-Vektor (Expressionskontrolle) transfiziert und für 48 Stunden jeweils mit 2 µM atRA, 2 µM 9-cis RA, 2 µM TTNPB, 10 µM Methoprensäure oder 10 µM Methoprensäure in Kombination mit 2 µM atRA oder 2 µM TTNPB behandelt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Lösungsmittel inkubiert. Die Luciferase-Aktivität wurde im Verhältnis RLU der Glühwürmchen-Luciferase/ RLU der Renilla-Luciferase bestimmt. Der Luciferase-Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001, # keine Signifikanz (p>0,05)).

### 3.3.2.3 ADAM10-Promotoraktivierung durch Retinoid-Rezeptor-Liganden

Die Stimulation des humanen und murinen ADAM10-Promotors war in N2A- und SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit atRA identisch (s. 3.3.1.1). Daher wurde nur die Wirkung der selektiven Retinoid-Rezeptor-Liganden auf den humanen ADAM10-Promotor stellvertretend in SH-SY5Y-Zellen untersucht.

Die Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit atRA führte nach 48 Stunden, wie schon gezeigt, zu einer signifikanten Aktivierung des humanen ADAM10-Promotors um ca. 65% (Abb. 3.14). Die Inkubation mit 9-cis RA bewirkte im Vergleich zu atRA eine noch stärkere Aktivierung des Promotors, wobei allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen der atRA und 9-cis RA-basierten Stimulation bestanden. Auch die Inkubation mit TTNPB

zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der Stimulation mit atRA. Hier erfolgte eine ca. 50%-ige Erhöhung der Promotoraktivität. Der RXR-Ligand Methoprensäure zeigte analog zu den RARE-Stimulationsuntersuchungen (s. 3.3.2.2) keine signifikanten Effekte auf die humane ADAM10-Promotoraktivierung. Auch die Koinkubation mit atRA oder TTNPB führte zu keiner Veränderung der Promotoraktivierung. Dieser Versuch wies auf eine dominierende Rolle der RAR-Aktivierung bei der RAR/RXR-Heterodimer-basierten ADAM10-Stimulation hin.

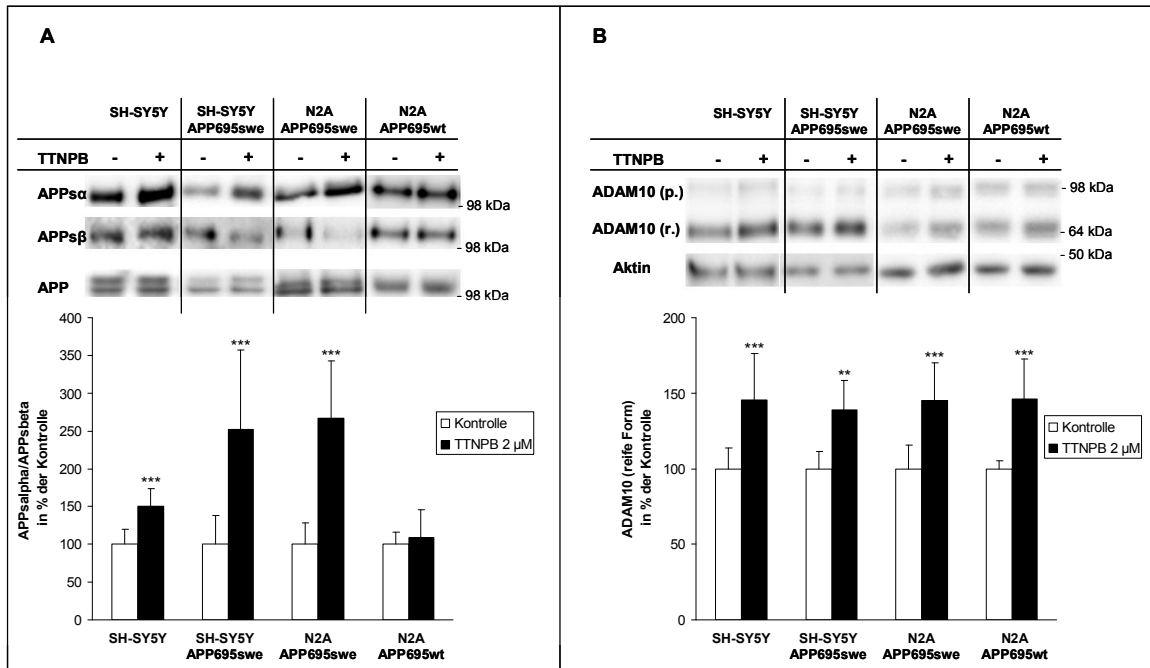


**Abb. 3.14: Wirkung der RAR- und RXR-Liganden auf die ADAM10-Promotorstimulation**

Mit dem humanen ADAM10-Promotor transient transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden für 48 Stunden jeweils mit 2 µM atRA, 2 µM 9-cis RA, 2 µM TTNPB, 10 µM Methoprensäure und 10 µM Methoprensäure in Kombination mit 2 µM atRA oder 2 µM TTNPB oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Lösungsmittelvolumen behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden durch den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der Kontrollen auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n ≥ 3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p < 0,001, # keine Signifikanz).

### 3.3.2.4 APP-Prozessierung durch TTNPB-basierte ADAM10-Stimulation

Die Stimulation der ADAM10-Promotoraktivität durch TTNPB sollte nun auf Proteinebene auf eine mögliche resultierende ADAM10-Expressionserhöhung untersucht werden. Die Inkubation mit TTNPB über 48 Stunden zeigte eine deutliche Erhöhung der APP $\alpha$ - und Erniedrigung der APP $\beta$ -Menge in allen untersuchten Zelllinien ausgenommen der N2A APP695wt-Zelllinie (Abb. 3.15 A). Das APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis erhöhte sich in den Wildtyp-SH-SY5Y-Zellen um ca. 50%. Eine weit deutlichere Erhöhung des APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis konnte in den SH-SY5Y- und N2A-Zelllinien mit der überexprimierten APP695swe-Isoform nachgewiesen werden: Hier war das APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis durch TTNPB gegenüber der mit Lösungsmittel behandelten Zellen um ca. 150% erhöht. Die Menge an ungeschnittenem APP wurde durch TTNPB nicht signifikant verändert (Abb. 3.15 A).



**Abb. 3.15: TTNPB induzierte APP $\alpha$ -Sekretion und ADAM10 Produktion in verschiedenen neuronalen Zelllinien**

SH-SY5Y-, SH-SY5Y APP695swe-, N2A APP695swe- und N2A APP695wt-Zellen wurden mit 2  $\mu$ M TTNPB oder Lösungsmittel (Kontrolle) für 43 Stunden vorinkubiert. **A)** Die sekretierten Proteine wurden nach weiteren 5 Stunden Inkubation mit TTNPB im serumfreien Medium präzipitiert und mittels Western Blot auf den Gehalt an APP $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APP $\beta$  (anti-APP $\beta$ -Antikörper) untersucht. Die Zellmembran-Proteine wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APP (Antikörper 6687) untersucht. **B)** Ebenso wurden die ADAM10 Proform (p.), ADAM10 reife Form (r.) (anti-ADAM10-Antikörper von Calbiochem für SH-SY5Y und von Chemicon für N2A) in den Membran-Fractionen durch Western-Blot-Analyse untersucht. Der Nachweis von Aktin diente als Kontrolle der gleichen Auftragsmenge an Protein. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n $\geq$  9, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05)

Die reife Form von ADAM10 war in Korrelation zu der erhöhten APP $\alpha$ -Menge in allen Zelllinien um ca. 50% erhöht (Abb. 3.15 B). Diese Korrelation bestand jedoch nicht, wie auch schon durch die Behandlung mit atRA beobachtet (s. 3.3.1.3), in den N2A APP695wt-Zellen. Da diese fehlende Korrelation nur in der N2A APP695wt-Zelllinie beobachtet wurde und diese zusätzlich durch ihr ungewöhnlich langsames Wachstum aufwändig zu kultivieren war, wurde diese Zelllinie von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

### 3.3.2.5 Die Wirkung des selektiven RXR-Liganden DHA auf den ADAM10-Promotor

Der RXR-Ligand Methoprensäure zeigte keine stimulierende Effekte auf die RARE-Luc- oder ADAM10-Promotor-Vektoren in neuronalen Zellen (s. 3.3.2.2 und 3.3.2.3). Für die weitere Untersuchung der Rolle des RXR bei der Stimulation des ADAM10-Promotors

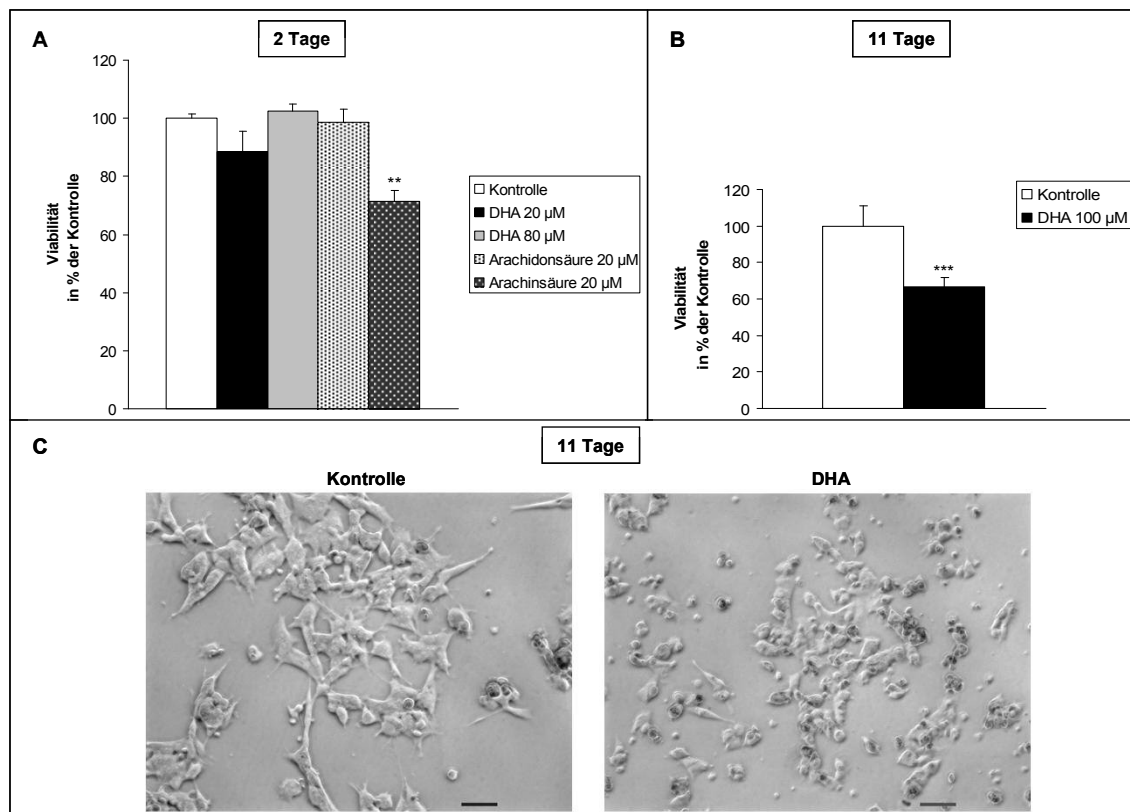
wurde daher ein weiterer in der Literatur beschriebender RXR-Ligand, die Docosahexaensäure (DHA), verwendet.

### **3.3.2.5.1 Bestimmung der Zellviabilität nach Inkubation mit ungesättigten Fettsäuren**

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Docosahexaensäure (DHA, C22:6) und Arachidonsäure (C20:4) können RXR aktivieren, wohingegen gesättigte Fettsäuren wie die Arachinsäure (C20:0) keine Wirkung auf den Rezeptor haben (Lengqvist et al., 2004). DHA bewirkt auch einen signifikanten Anstieg der APP $\alpha$ - und Verminderung der APP $\beta$ -Sekretion in SH-SY5Y APP695swe-Zellen nach Inkubation über einen Zeitraum von 11 Tagen (Sahlin et al., 2007).

Damit eine negative Beeinflussung auf die RXR-Aktivierungsprozesse durch zytotoxische Reaktionen ausgeschlossen werden konnte, wurde die Viabilität der Zellen nach der Inkubation mit diesen Fettsäuren bestimmt. Die 48-stündige Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit den ungesättigten Fettsäuren DHA und Arachidonsäure bewirkte keine signifikanten Veränderungen der Zellviabilität. Dagegen wurde die Viabilität durch die Inkubation mit der Arachinsäure um ca. 30% gegenüber den mit Lösungsmittel behandelten Zellen vermindert (Abb. 3.16 A).

Die Inkubation der Zellen mit 100  $\mu$ M DHA über einen Zeitraum von 11 Tagen nach Sahlin et al. (2007) bewirkte aber eine deutliche Abnahme der Zellviabilität um ca. 40% (Abb. 3.16 B). Fast alle Zellen zeigten nach 11 Tagen DHA-Behandlung eine abgerundete Form mit kleinerem Durchmesser, welche sich deutlich von den unbehandelten Zellen unterschieden: Diese Zellen hatten eine durch viel Ausläufer charakterisierte, typische SH-SY5Y-Zell-Morphologie (Abb. 3.16 C). Dies würde bedeuten, dass DHA in dieser Konzentration und über diesen Zeitraum zytotoxische Reaktionen in den Zellen hervorruft, welche die APP-Prozessierung beeinflussen könnten.



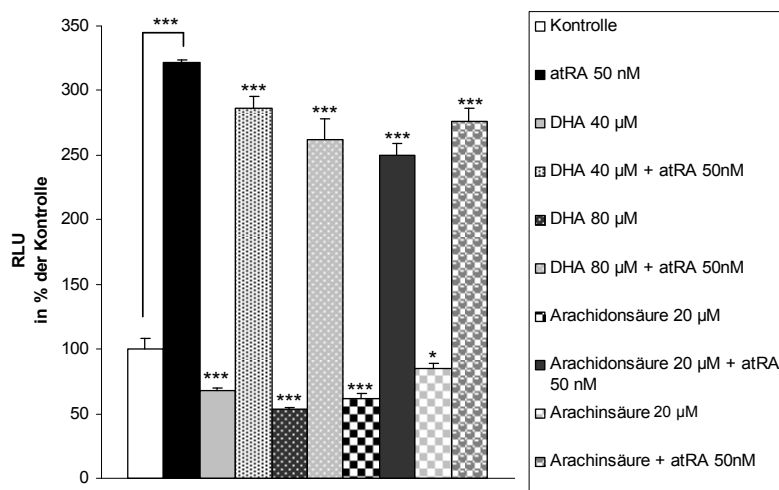
**Abb. 3.16: Viabilitätsbestimmung nach der Inkubation mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren**

**A)** SH-SY5Y-Zellen wurden mit 20 μM bzw. 80 μM DHA, 20 μM Arachidonsäure, 20 μM Arachinsäure oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde Medium mit 10% MTT-Reagenz mit den jeweiligen Liganden zugegeben und 4 Stunden inkubiert. Nach der Zugabe von Lysispuffer wurde die Extinktion bei 565 nm im Photometer bestimmt und abzüglich der Hintergrundextinktion und der Extinktion der Mediumkontrolle im prozentualen Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (MW + Stabw, n=3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*p<0,01). **B)** SH-SY5Y-Zellen wurden 11 Tage mit 100 μM DHA inkubiert. Die Viabilität wurde wie in A beschrieben gemessen (MW + Stabw, n=3, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001). **C)** Mikroskopie der lebenden Zellen nach 11 Tagen DHA-Inkubation im Vergleich zu Zellen, welche mit Lösungsmittel behandelt wurden (Kontrolle) (Balken entspricht 100 μM).

### 3.3.2.5.2 RARE-Aktivierung durch Inkubation mit ungesättigten Fettsäuren

Obwohl die Zellen nach 11 Tagen Behandlung mit 100 μM DHA zu mehr als 1/3 abgestorben waren, sollte als Kontrolle die Wirkung der Fettsäuren auf den RXR-Rezeptor durch Retinoid-Rezeptor-vermittelte RARE-Aktivierung untersucht werden. Die Inkubation von N2A-Zellen mit 40 μM DHA bewirkte nach 48 Stunden keine Erhöhung der RARE-basierten Luciferase-Expression. Vielmehr wurde eine 30%-ige Erniedrigung der Aktivität gemessen, die sich durch Inkubation mit 80 μM DHA im Vergleich zu unbehandelten Zellen weiter auf fast 50% erniedrigt hat (Abb. 3.17). Ähnliche RARE-vermittelte Luciferase-Expressions-minderungen wurden durch Inkubation mit Arachidonsäure und sogar durch die gesättigte Fettsäure Arachinsäure (~ 15%) gemessen. Die Koinkubation von Zellen mit Fettsäuren und atRA verminderte ebenfalls die RARE-stimulierte

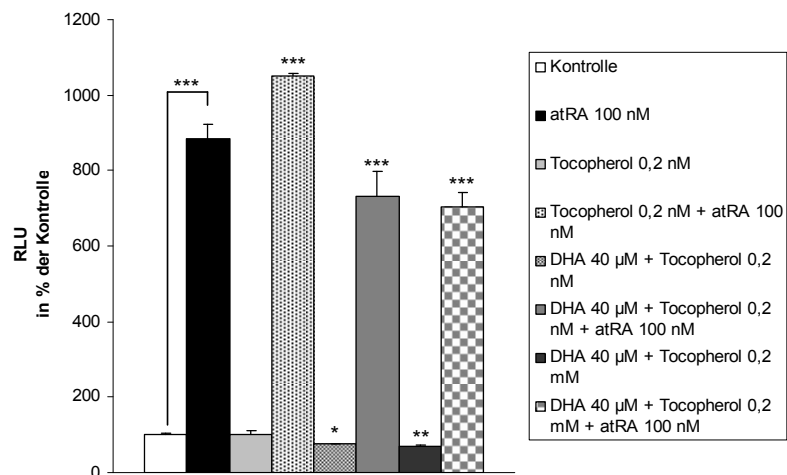
Luciferase-Expression um bis zu 20% im Vergleich zu der Inkubation mit atRA alleine. Hierbei wurde eine niedrige atRA-Konzentration gewählt, um eine Absättigung der RARE-Aktivierung durch atRA zu vermeiden.



**Abb. 3.17: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren**

N2A-Zellen wurden transient mit dem RARE-Luc-Vektor und dem pHRL-SV40-Vektor (Expressionskontrolle) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden jeweils mit 50 nM atRA, 40 bzw. 80 µM DHA, 20 µM Arachidonsäure und 20 µM Arachinsäure jeweils alleine und in Kombination mit 50 nM atRA sowie mit dem Lösungsmittel als Kontrolle inkubiert und anschließend die Luciferase-Aktivität bestimmt und das Verhältnis RLU der Glühwürmchen Luciferase/ RLU der Renilla Luciferase berechnet. Der Luciferase-Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6, Einfaktorische ANOVA, Bonferroni post test zwischen DHA, Arachidonsäure und Arachinsäure und der Kontrolle sowie zwischen DHA, Arachidonsäure und Arachinsäure zusammen mit atRA und atRA alleine : \*\*\*p<0,001,\*p<0,05).

Damit eine Oxidation und somit eine potentielle Inaktivierung von DHA ausgeschlossen werden konnte, wurde als Anti-Oxidantium Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) zusammen mit DHA zu den N2A-Zellen gegeben. Die Inkubation mit Vitamin E alleine zeigte keine Effekte auf die RARE-basierte Luciferase-Expression (Abb. 3.18). Zusammen mit 40 µM DHA zeigte sich jedoch ähnlich wie in Abb. 3.17 eine 25%-ige Reprimierung der Luciferase-Expression die durch eine 1000-fache Erhöhung der Vitamin E Konzentration sogar auf 30% gesteigert wurde. Die Koinkubation von Zellen mit Vitamin E und atRA zeigte dagegen eine signifikante Erhöhung der RARE-vermittelten Luciferase-Expression. In zusätzlicher Kombination mit DHA sank die Luciferase-Expression wieder um ca. 20% unter die atRA-induzierte Expression.



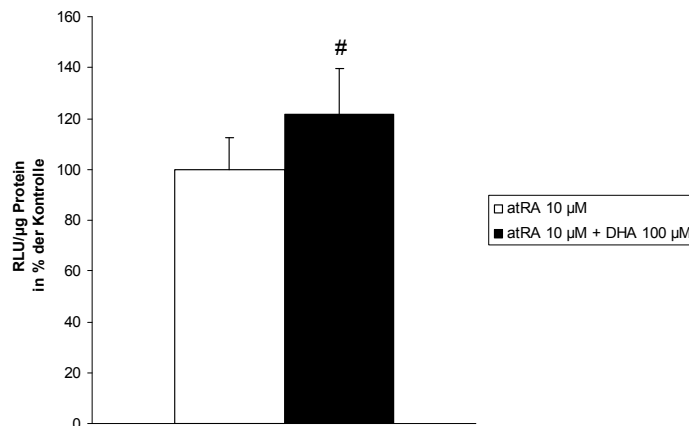
**Abb. 3.18: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch DHA in Kombination mit Vitamin E**

N2A-Zellen wurden wie in Abbildung 3.17 beschrieben transfiziert und 48 Stunden mit 100 nM atRA und 0,2 nM bzw. 0,2 mM  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) in Kombination miteinander sowie mit 40  $\mu$ M DHA und dem Lösungsmittel als Kontrolle inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie in Abb. 3.17 beschrieben (MW + Stabw, n=6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test zwischen DHA +  $\alpha$ -Tocopherol und der Kontrolle sowie zwischen  $\alpha$ -Tocopherol, DHA +  $\alpha$ -Tocopherol + atRA und atRA alleine : \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05).

Die Inkubation mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren bewirkte demnach eher eine Abnahme als eine Zunahme der RARE-vermittelten Luciferase-Expression. Dies könnte zum einen mit den zytotoxischen Reaktionen zusammenhängen, welche zwar erst bei höheren DHA-Konzentrationen auftraten, aber schon bei den eingesetzten niedrigeren Konzentrationen mögliche inhibierende Wirkungen auf das RARE haben könnten. Zum anderen zeigen die Versuche, dass auch DHA keinen stimulierenden Einfluss auf das RARE über RXR-Aktivierung zu haben scheint.

### 3.3.2.5.3 Die Wirkung von DHA auf den ADAM10-Promotor

Die SH-SY5Y-Zellen wurden trotz der oben gezeigten Ergebnisse auf eine mögliche ADAM10-Promotor-Aktivitätssteigerung durch DHA untersucht, da ein signifikanter Anstieg der APP $\alpha$ - und Verminderung der APP $\beta$ -Sekretion in SH-SY5Y APP695swe-Zellen nach Inkubation mit DHA über einen Zeitraum von 11 Tagen beobachtet wurde (Sahlin et al., 2007). Die Zellen wurden nach Sahlin et al. (2007) mit 10  $\mu$ M atRA und zusätzlich 100  $\mu$ M DHA behandelt. Auch in diesem Versuch waren die Zellen durch die DHA-Behandlung deutlich morphologisch verändert (analog zu Abb. 3.16 C). Die Luciferase-Aktivitätsmessung zeigte, dass der ADAM10-Promotor nicht signifikant durch DHA stimuliert wurde (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19: ADAM10-Promotorstimulation durch DHA**

Mit dem humanen ADAM10-Promotor transient transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden für 11 Tage mit 10 µM atRA und 100 µM oder als Kontrolle mit 10 µM atRA behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden auf den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der nur mit atRA behandelten Zellen auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=3, Student's t-test für unabhängige Stichproben: # keine Signifikanz).

### 3.3.3 ADAM10-Stimulation durch RXR-Heterodimere

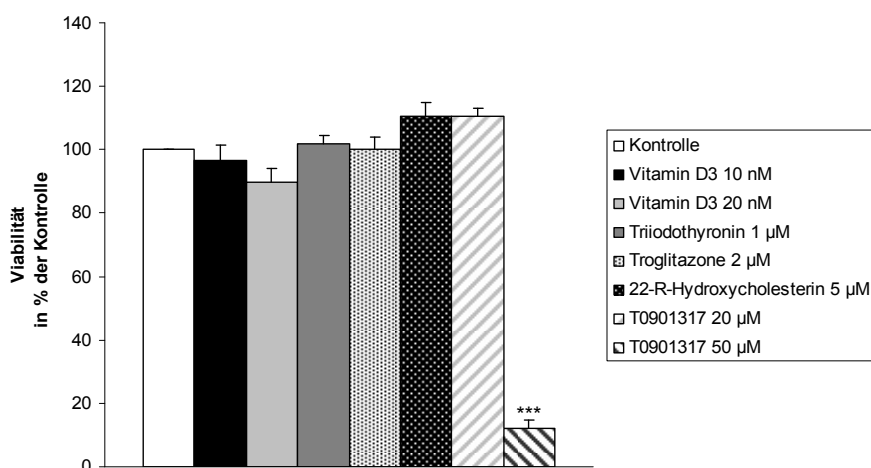
RXR kann neben der Dimerisierung mit RAR noch mit weiteren nukleären Hormonrezeptoren Heterodimere ausbilden (Abb. 1.9). Die Klasse dieser RXR-Heterodimere kann weiter in permissive Heterodimere unterteilt werden, bei welchen der RXR-Ligand alleine ausreicht um die Transkription zu aktivieren (z.B. PPAR $\gamma$  und LXR) und in nicht-permissive Heterodimere, bei welchen der Ligand des RXR Bindungspartners für die Aktivierung benötigt wird (z.B. RAR, VDR und TR) (Aranda und Pascual, 2001; Rizzo et al., 2005). Die Ergebnisse aus 3.3.2 weisen auf eine nicht-permissive RAR/RXR-Heterodimer-aktivierte ADAM10-Expression hin.

Da auf dem ADAM10-Promotor zwei potentielle Bindungsstellen für Retinoid-Rezeptoren liegen (Abb. 1.7), kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem RAR/RXR-Dimer weitere nukleäre Rezeptoren in die Transkriptionsaktivierung involviert sein könnten. Um den Einfluss weiterer RXR-Heterodimerpartner bei der ADAM10-Stimulation zu untersuchen, wurden die humanen und murinen Neuronalzellen SH-SY5Y und N2A mit Liganden der Rezeptoren VDR, TR, PPAR $\gamma$  und LXR behandelt.

### 3.3.3.1 Bestimmung der Zellviabilität nach der Inkubation mit Liganden von RXR-Heterodimerpartnern

Für die Untersuchung der ADAM10-Stimulation durch Liganden nukleärer Hormonrezeptoren, welche mit RXR dimerisieren können, wurden 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3) als Ligand von VDR, Triiodothyronin (T3) als Ligand von TR, Troglitazone als Ligand von PPAR $\gamma$  und 22-R-Hydroxycholesterin sowie T0901317 als Ligand von LXR verwendet. Um mögliche zytotoxische Reaktionen in den Zellen auszuschließen, welche einen Einfluss auf die ADAM10-Promotor-Aktivierung und APP-Prozessierung zur Folge haben könnten, wurde zunächst die Viabilität der Zellen durch den MTT-Test nach Inkubation mit den jeweiligen Liganden untersucht.

Die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen über 48 Stunden mit den jeweiligen Rezeptorliganden zeigte keine zytotoxischen Reaktionen in den Zellen, welche durch Viabilitätsverluste messbar gewesen wären (Abb. 3.20). Ausgenommen war hiervon der LXR-Ligand T0901317, der bei einer Konzentration von 20  $\mu$ M keine Viabilitätsminderung, bei 50  $\mu$ M jedoch eine deutliche Minderung um mehr als 80% zur Folge hatte.



**Abb. 3.20: Zellviabilität nach der Inkubation mit nukleären Hormonrezeptor-Liganden**

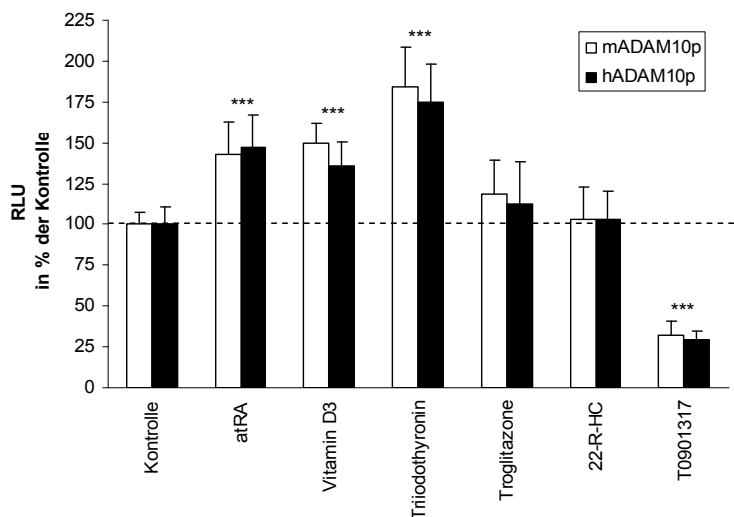
SH-SY5Y-Zellen wurden jeweils mit 10 nM bzw. 20 nM 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3), 1  $\mu$ M Triiodothyronin, 2  $\mu$ M Troglitazone, 5  $\mu$ M 22-R-Hydroxycholesterin, 20  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M T0901317 oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde Medium mit 10% MTT-Reagenz mit den jeweiligen Liganden zugegeben und wie in Abbildung 3.16 beschrieben gemessen (MW + Stabw, n=3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001).

### 3.3.3.2 ADAM10-Promotorstimulation durch Liganden verschiedener RXR-Rezeptorpartner

Die Liganden der nukleären Hormonrezeptoren wurden zunächst in den humanen SH-SY5Y-Zellen auf die Stimulationsfähigkeit der ADAM10-Promotoren überprüft. Da sich der murine ADAM10-Promotor in den potentiellen RXR-Heterodimer-Bindestellen von dem

humanen ADAM10-Promotor unterscheidet (s. 3.3.1.1), wurden beide Promotoren auf die Liganden-basierte Stimulation in dieser Zelllinie untersucht.

Die transient transfizierten ADAM10-Promotoren reagierten in den SH-SY5Y-Zellen auf die Inkubation mit den Liganden annähernd gleich: Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem humanen und murinen ADAM10-Promotor zu erkennen (Abb. 3.21). Neben der in Abschnitt 3.3.1.1 schon beschriebenen atRA-basierten ADAM10-Promotorstimulation konnte eine 35-50%-ige Stimulation beider Promotoren durch die Inkubation mit 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 nachgewiesen werden. Eine etwas stärkere Stimulation konnte durch Triiodothyronin gemessen werden. Hier wurde eine Erhöhung der Promotor-Aktivität von ca. 75% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erreicht. Die PPAR $\gamma$ - und LXR-Liganden Troglitazone und 22-R-Hydroxycholesterin hatten keine Wirkung auf die Promotoren wogegen der synthetische LXR-Ligand T0901317 zu einer ca. 70%-igen Inhibierung der Promotoraktivität führte.

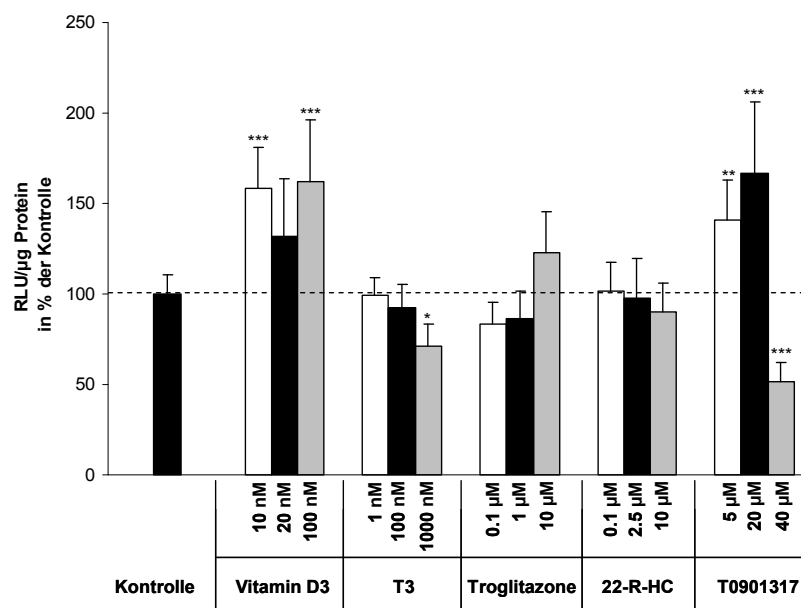


**Abb. 3.21: Stimulation der ADAM10-Promotoren in SH-SY5Y-Zellen durch Liganden von RXR-Heterodimerisierungspartnern**

SH-SY5Y-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit hADAM10p oder mADAM10p für 48 Stunden mit 2 $\mu$ M atRA, 25 nM 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3), 2,5  $\mu$ M Triiodothyronin, 1 $\mu$ M Troglitazone, 10  $\mu$ M 22-R-Hydroxycholesterin (22-R-HC), 20  $\mu$ M T0901317 oder mit dem entsprechenden Lösungsmittelvolumen (Kontrolle) behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden auf den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der Kontrollen auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=9, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001 zwischen den behandelten und den Kontrollzellen).

Für weitere Untersuchungen einer potentiellen Ligandenwirkung im Mausmodell wurde nachfolgend die Stimulation des murinen ADAM10-Promotors in den murinen N2A-Zellen untersucht.

Die Behandlung der N2A-Zellen mit den nukleären Hormonrezeptor-Liganden zeigte teilweise Abweichungen zu der mADAM10-Promotorstimulation in SH-SY5Y-Zellen (Abb. 3.22). Einzig die Inkubation mit 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 führte zu einer signifikanten Stimulation des murinen ADAM10-Promotors, dessen Aktivität bei Konzentrationen von 10 nM und 100 nM um ca. 60% erhöht wurde, und mit der Stimulation in SH-SY5Y vergleichbar war. Allerdings zeigte die Behandlung mit 20 nM 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 eine nicht signifikante Erhöhung der Promotoraktivität. Im Gegensatz zu der Stimulation in SH-SY5Y-Zellen führte die Behandlung mit 1  $\mu$ M Triiodothyronin (T3) in den N2A-Zellen zu einer signifikanten Inhibierung des Promotors um ca. 25%. Die Liganden Troglitazone und 22-R-Hydroxycholesterin zeigten wie in den SH-SY5Y-Zellen keine Effekte. T0901317 bewirkte zunächst in den Konzentrationen von 5 und 20  $\mu$ M eine Stimulation des Promotors um 50 - 75%. Die Erhöhung der Konzentration auf 40  $\mu$ M zeigte dagegen eine Inhibition des murinen ADAM10-Promotors um fast 50%. Da T0901317 in SH-SY5Y-Zellen ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M deutlich toxische Effekte gezeigt hat (Abb. 3.20), ist zu vermuten, dass die zytotoxischen Reaktionen in den SH-SY5Y- (bei 20  $\mu$ M) und N2A-Zellen (bei 40  $\mu$ M) die ADAM10-Promotoraktivität blockiert haben.



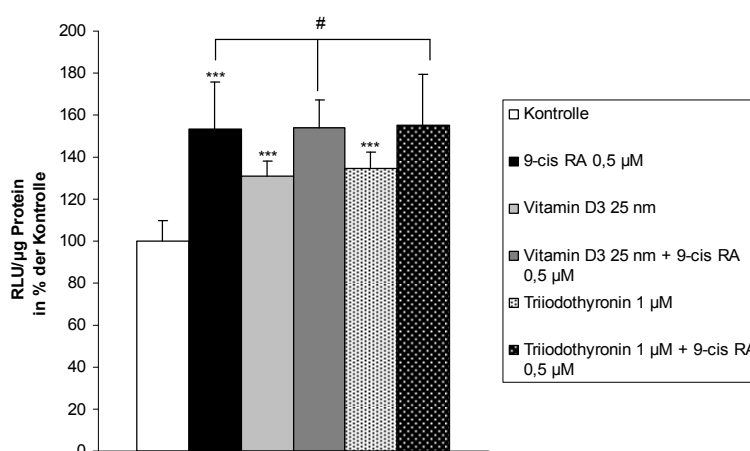
**Abb. 3.22: Stimulation des mADAM10-Promotors in N2A-Zellen durch Liganden nukleärer Rezeptoren**

N2A-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit dem mADAM10p-Vektor für 48 Stunden mit 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3), Triiodothyronin (T3), Troglitazone, 22-R-Hydroxycholesterin (22-R-HC), und T0901317 jeweils in verschiedenen Konzentration oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt und die Luciferase-Aktivität wie in Abb. 3.20 bestimmt. (MW + Stabw, n  $\geq$  6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 zwischen den behandelten- und den Kontrollzellen).

VDR und TR bilden mit RXR sogenannte nicht-permissive Heterodimere. Die Aktivierung der nicht-permissiven Heterodimere erfolgt nur über die Bindung des Liganden an den

RXR-Dimerisierungs-Partner. Wenn diese Bindung und Aktivierung der Transkription erfolgt ist, kann durch die Bindung des RXR-Liganden die Aktivierung der Transkription verstärkt werden (Minucci et al., 1997). Daher sollte untersucht werden, ob die stimulative Wirkung der VDR- und TR-Liganden durch gleichzeitige Inkubation mit dem RXR-Liganden 9-cis RA verstärkt werden kann.

Die Inkubation mit den RXR-, VDR- und TR-Liganden zeigte in den SH-SY5Y-Zellen wie schon oben gezeigt, eine signifikante ADAM10-Promotorstimulation (Abb. 3.23). Die Koinkubation der Zellen mit 9-cis RA und den Liganden 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 bzw. Triiodothyronin bewirkte jedoch keine zusätzliche Erhöhung der ADAM10-Promotoraktivität



**Abb. 3.23: Stimulation des hADAM10-Promotors in SH-SY5Y-Zellen durch Liganden nukleärer Rezeptoren in Kombination mit dem RXR-Liganden 9-cis RA**

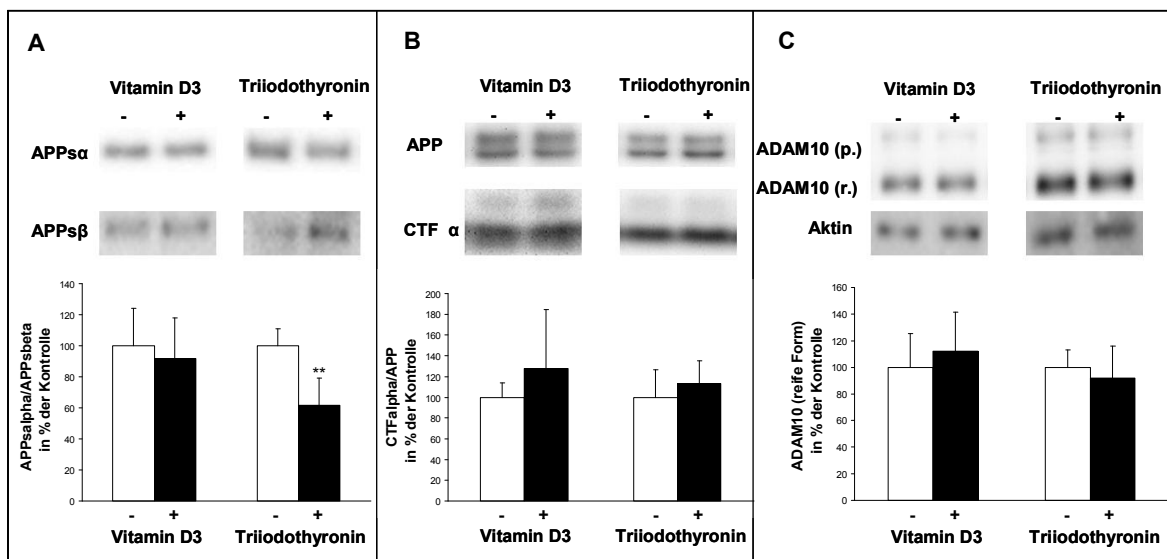
SH-SY5Y-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit dem hADAM10p-Vektor für 48 Stunden mit 25 nM 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3) oder 1 $\mu$ M Triiodothyronin (T3) jeweils alleine oder in Kombination mit 0,5  $\mu$ M 9-cis RA oder dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und die Luciferase-Aktivität wie in Abb. 3.20 bestimmt. (MW + Stabw, n  $\geq$  3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001, # keine Signifikanz).

### 3.3.3.3 Wirkung der VDR- und TR-Liganden auf die ADAM10-basierte APP-Prozessierung

Die VDR- und TR-Liganden 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 und Triiodothyronin bewirkten zumindest in SH-SY5Y-Zellen eine Erhöhung der ADAM10-Promotoraktivität (Abb.3.21). Daher sollte die Wirkung dieser Liganden auf die ADAM10-Proteinmenge und die APP-Prozessierung untersucht werden.

Die Inkubation von SH-SY5Y APP695swe-Zellen mit 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 bewirkte keine Veränderung auf die APP-Prozessierung. Weder die sekretierte Menge an APP $\alpha$  und APP $\beta$  (Abb. 3.24 A), noch die Menge an CTF $\alpha$  (Abb. 3.24 B) wurde durch die Inkubation mit dem VDR-Liganden beeinflusst. Obwohl 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 den

ADAM10-Promotor stimuliert, konnte keine Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge nachgewiesen werden (Abb. 3.24 C). Dies galt auch für Triiodothyronin, das in inkubierten Zellen die ADAM10-Proteinmenge nicht veränderte. Dagegen war die Menge an APPs $\alpha$  erniedrigt und die Menge an APPs $\beta$  erhöht. Das APPs $\alpha$ /APPs $\beta$ -Verhältnis war durch Triiodothyronin im Vergleich zur Kontrolle um ca. 40% signifikant erniedrigt (Abb. 3.24 A). Die Menge an CTF $\alpha$  blieb durch den TR-Liganden hingegen unverändert (Abb. 3.24 B). Triiodothyronin scheint daher weniger einen Einfluss auf die APP-Prozessierung durch ADAM10-Inhibierung (oder BACE-Aktivierung) zu haben, sondern verändert eher die Sekretion der löslichen APP-Fragmente.



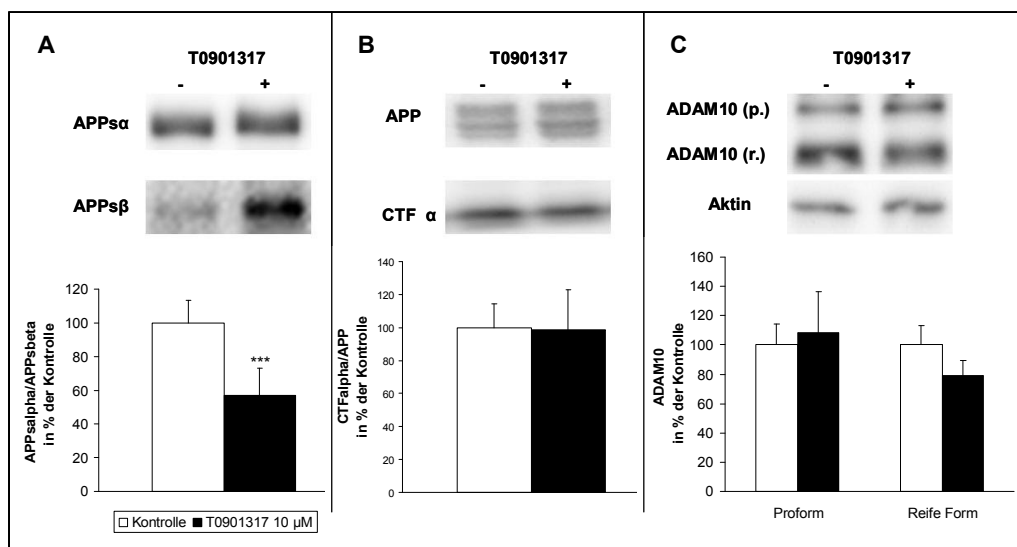
**Abb. 3.24: APP-Prozessierung und ADAM10 Produktion in SH-SY5Y APP695swe-Zellen nach Inkubation mit Liganden von VDR und TR**

SH-SY5Y APP695swe-Zellen wurden mit 25 nM 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3), 2,5  $\mu$ M Triiodothyronin (T3) oder Lösungsmittel (Kontrolle) für 43 Stunden vorinkubiert. **A)** Die sekretierten Proteine wurden nach weiteren 5 Stunden Inkubation mit den Liganden im serumfreien Medium präzipitiert und mittels Western Blot auf den Gehalt an APPs $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APPs $\beta$  (anti-APPs $\beta$ -Antikörper) untersucht. **B)** Die Zellmembran-Proteine wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APP (Antikörper 6687) und CTF $\alpha$  untersucht. **C)** Ebenso wurden die ADAM10 Proform (p.), ADAM10 reife Form (r.) (anti-ADAM10-Antikörper von Calbiochem für SH-SY5Y und von Chemicon für N2A) in den Membran-Fractionen durch Western Blot Analyse untersucht. Aktin (anti-Aktin-AK) diente als Kontrolle der gleichen Auftragsmenge an Protein. Die Mittelwerte der Verhältnisse A) APPs $\alpha$ /APPs $\beta$ , B) CTF $\alpha$ /APP und C) ADAM10 (r.) der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n $\geq$  7, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*p<0,01).

### 3.3.3.4 Wirkung des synthetischen LXR-Liganden T0901317 auf die ADAM10-basierte APP-Prozessierung

Die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit 20  $\mu$ M T0901317 führte zu einer starken Inhibierung der ADAM10-Promotor-basierten Luciferase-Expression (Abb. 3.21). Obwohl hierbei vermutlich zytotoxische Reaktionen eine Rolle spielten (s. 3.3.3.2), sollte

untersucht werden, ob der synthetische LXR-Ligand die ADAM10 Proteinbildung negativ beeinflusst und dementsprechend die  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung reduziert wird. Wie in dem exemplarischen Western Blot in Abbildung 3.25 A dargestellt, wurde die Menge an sekretiertem APP $\alpha$  nur leicht reduziert, die Menge an APP $\beta$  dagegen stark erhöht. Das APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis war daher im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen um ca. 40% erniedrigt. Dagegen konnte bei der CTF $\alpha$ -Menge keine Veränderung in der Proteinmenge festgestellt werden (Abb. 3.25 B). Die Menge der ADAM10-Proform war durch die Inkubation mit T0901317 ebenfalls unverändert. Die Menge an reifer ADAM10 Form war leicht aber nicht signifikant erniedrigt. Cytotoxische Reaktionen könnten daher auch der Grund für die Erhöhung der APP $\beta$ -Menge sein.



**Abb. 3.25: APP-Prozessierung und ADAM10 Produktion nach Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit T0901317**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M T0901317 oder Lösungsmittel (Kontrolle) wie in Abb. 3.24 beschrieben behandelt. **A)** Mittels Western Blot wurde auf den Gehalt an APP $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APP $\beta$  (anti-APP $\beta$ -Antikörper) untersucht. **B)** Die Zellmembran-Proteine wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APP (Antikörper 6687) und CTF $\alpha$  untersucht. **C)** Ebenso wurden die ADAM10 Proform (p.), ADAM10 reife Form (r.) (anti-ADAM10-Antikörper von Calbiochem) in den Membran-Fractionen durch Western Blot Analyse untersucht. Aktin diente als Kontrolle der gleichen Auftragsmenge an Protein. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=9, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001).

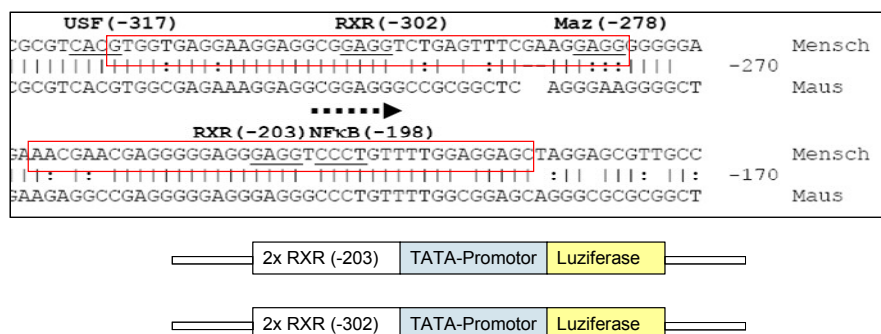
### 3.3.4 Untersuchung einer direkten oder indirekten RXR-vermittelten ADAM10-Promotorstimulation

Die 3.3.2 gezeigten Ergebnisse weisen auf eine RAR/RXR-basierte ADAM10-Promotorstimulation hin, die sich auch auf Proteinebene anhand erhöhter Mengen an ADAM10 sowie APP $\alpha$  nachweisen ließ. Es konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden, ob der ADAM10-Promotor direkt von dem RAR/RXR-Dimer aktiviert wird oder ob

andere Gene von den Retinoiden aktiviert werden, deren Genprodukte sich stimulierend auf die ADAM10 Expression auswirken.

### 3.3.4.1 Nachweis einer direkten ADAM10-Promotorstimulation

Um die direkte Aktivierung des ADAM10-Promotors nachzuweisen, wurden zunächst Reporter-gen-Vektoren hergestellt, in welchen die Sequenzen der putativen Retinoid-Rezeptor Bindestellen aus den Bereichen -203 bp und -302 bp stromaufwärts von Translationsstartpunkt inseriert wurden (Abb 3.26; s. 8.1). Die Sequenzierung der hergestellten Reporter-gen-Vektoren identifizierte den gewünschten 2x203-Luc-Vektor. Die Herstellung des 2x302-Vektors gestaltete sich schwieriger - häufig waren mehrere Nukleotide in die 302-Sequenz inseriert oder daraus deletiert. Daher konnte nur ein 2x302-Luc-Vektor hergestellt werden, bei dem ein Nukleotid am Anfang der Konstrukt-Sequenz (gelb unterlegt) deletiert war: 5'GTGGTGAGGAAGGAGGCGGAGG3' (Rot: die putative RXR-Bindestelle - vergl. 2.1.10.9). Trotz der Deletion wurde der Vektor zusammen mit dem 2x203-Luc-Vektor für Retinoid-Stimulationsversuche verwendet da zumindest eine -302-Retinoid-Rezeptor-Bindestelle die richtige Nukleotidsequenz beinhaltet.



**Abb. 3.26: Aufbau der 2x203-Luc- und 2x302-Luc-Reporter-genkonstrukte**

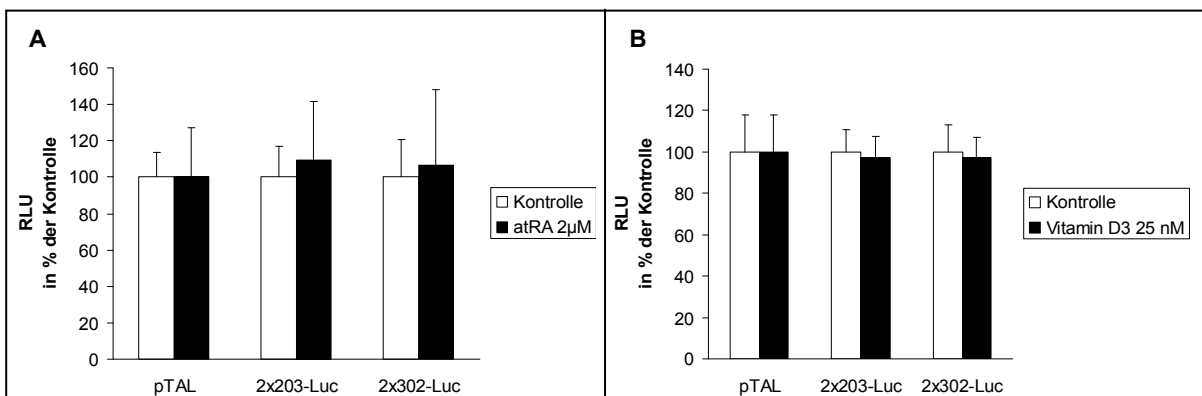
Die putativen RXR-Bindestellen der Bereiche -203 bp und -302 bp (s. 2.1.10.9) wurden zusammen mit den flankierenden DNA-Sequenzen (roter Kasten) zweimal hintereinander vor die expressionsinitiiierende TATA-Box-ähnliche Region des pTAL-Luc Vektors (Clontech) kloniert.

#### 3.3.4.1.1 Untersuchung der Retinoid-basierten Expressionsstimulation an den ADAM10-Promotorsequenzbereichen -203 bp und -302 bp

In den SH-SY5Y-Zellen, welche mit den Leer- (pTAL), 2x203-Luc- und 2x302-Luc-Vektoren transfiziert waren, wurden nach der Inkubation mit atRA die Luciferase-Aktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auch die mit dem Leervektor transfizierten Zellen durch atRA eine 30-50%-ige Erhöhung der Luciferase-Aktivität hatten. Daher wurde für eine bessere Übersicht der atRA-basierten Stimulation der 2x203-Luc- und 2x302-Luc-Vektoren die Luciferase-Werte auf die atRA behandelten Zellen normiert, welche mit den Leervektor transfiziert waren (Abb. 3.27). Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass atRA keine signifikanten

Effekte auf die beiden Promotorkonstrukte 2x203-Luc- und 2x302-Luc hatte. Auch die Inkubation mit 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3, welches den humanen und den murinen ADAM10-Promotor aktiviert (s. 3.3.3.2), zeigte keine signifikanten Veränderungen in der Luciferase-Aktivität beider Vektoren.

In diesem Versuch konnte die direkte Stimulation des ADAM10-Promotors durch atRA nicht nachgewiesen werden. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass durch die leichte Stimulation des Leervektors mögliche leichte Effekte auf die 2x203-Luc- und 2x302-Luc-Vektoren nicht gemessen werden konnten und sich daher dieses Nachweissystem für die direkte Stimulation als ungeeignet erwiesen hat.



**Abb. 3.27: Stimulation der 2x203-Luc und 2x302-Luc Reportergenkonstrukte mit atRA und Vitamin D3**

SH-SY5Y-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit den pTAL-, 2x203-Luc- oder 2x302-Luc-Vektoren für 48 Stunden mit **A)** 2  $\mu$ M atRA oder **B)** 25 nM 1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3) bzw. dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden durch den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der pTAL transfizierten Zellen wurden auf 100% gesetzt und mit der jeweiligen Behandlungsgruppe (Lösungsmittel oder atRA bzw. Vitamin D3 behandelt) verglichen (MW + Stabw, n $\geq$  9 für atRA, n=3 für Vitamin D3).

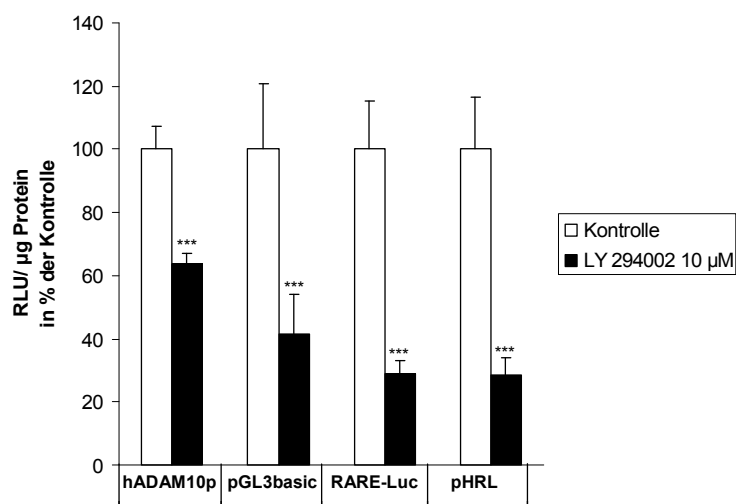
### 3.3.4.2 Indirekte Einflüsse von atRA auf die ADAM10-Promotoraktivierung

#### 3.3.4.2.1 Einfluss des Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalwegs auf die ADAM10-Promotoraktivität

Holback et al. (2008) zeigten kürzlich, dass die atRA induzierte ADAM10-Stimulation von der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) abhängig ist. Durch Koinkubation von Zellen mit atRA und dem PI3-K-Inhibitor LY 294002 war die Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge nur halb so hoch wie durch atRA alleine. Daher sollte die Wirkung der PI3-K auf den ADAM10-Promotor untersucht werden. Hierfür wurden die SH-SY5Y-Zellen mit dem Inhibitor LY 294002 inkubiert.

Wie in Abbildung 3.28 gezeigt, bewirkte der PI3-K-Inhibitor eine Reduktion der Luciferase-Expression in allen transient transfizierten SH-SY5Y-Zellen. Auch in den Zellen, welche

mit den Kontroll-Vektoren pGL3-basic und pHRL transfiziert waren, welche keine transkriptionsinitiierende Sequenzen haben, wurde die konstitutive Reporterexpression durch LY 294002 vermindert. Es war zu vermuten, dass durch die Inhibition der PI3-K generell die DNA-Transkription oder -Translation (zumindest auf dem extrachromosomalen Vektor) reduziert wurde. Eine direkte Inhibierung der Luciferin-Oxidation (s. 2.2.5.3) konnte durch Zugabe von LY 294002 in ein Zell-Lysat ohne vorherige LY294002-Inkubation und nachfolgender Luciferase-Substrat-Zugabe ausgeschlossen werden. Es wurden daher keine weiterführenden Promotor-Stimulationsexperimente mit dem Inhibitor durchgeführt.



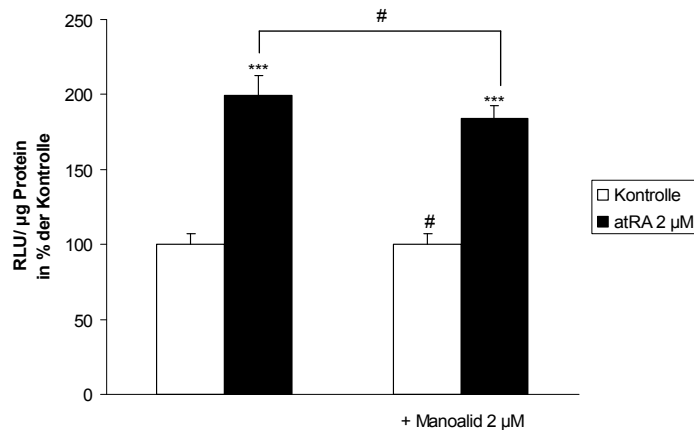
**Abb. 3.28: Luciferase-Aktivität nach Inkubation mit dem PI3-K Inhibitor LY 294002**

SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit den Vektoren hADAM10p, pGL3basic, RARE-Luc oder pHRL transfiziert und für 48 Stunden mit 10 µM LY 294002 oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) inkubiert. Die Glühwürmchen-Luciferase bzw. Renilla-Luciferase-Aktivität wurde wie in Abb. 3.27 beschrieben gemessen. Die Luciferase-Mittelwerte der Kontrollen wurde auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=3, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001).

### 3.3.4.2.2 ADAM10-Promotorstimulation durch Phospholipase A<sub>2</sub>

Die PLA<sub>2</sub> ist an der muscarinischen Rezeptor-vermittelten APP $\alpha$ -Sekretion in SH-SY5Y-Zellen beteiligt (Cho et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass atRA die Expression und Aktivität der lysosomalen Phospholipase A<sub>2</sub> (LPLA<sub>2</sub>) in THP-1-Zellen erhöht (Abe et al., 2004). Der ADAM10-Promotor könnte demnach indirekt über die (durch atRA) aktivierte Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) stimuliert werden. Daher sollte mit dem PLA<sub>2</sub>-Inhibitor Manoalid überprüft werden, ob der ADAM10-Promotor von der Phospholipase beeinflusst wird.

Manoalid zeigte keine Wirkung auf die Basisaktivität des humanen ADAM10-Promotors (Abb. 3.29). Auch die atRA-basierte Promotorstimulation wurde durch den PLA<sub>2</sub>-Inhibitor nicht signifikant reduziert. Die indirekte ADAM10-Promotorstimulation durch atRA über PLA<sub>2</sub> konnte daher ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.29: ADAM10-Promotorstimulation durch Manoalid**

SH-SY5Y-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit dem hADAM10p-Vektor für 48 Stunden mit 2 µM atRA alleine oder in Kombination mit 2 µM Manoalid bzw. dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und die Luciferase-Aktivität wie in Abb. 3.21 bestimmt (MW + Stabw, n=6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001, # keine Signifikanz).

### 3.3.5 Stimulation der ADAM10-Expression durch synthetische Retinoide

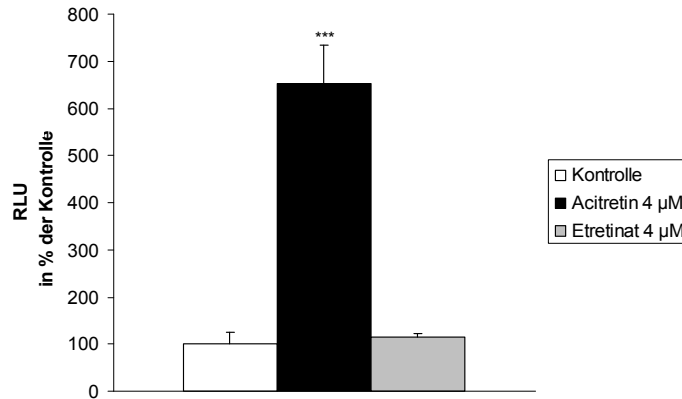
Die Ergebnisse aus 3.3.2 zeigen, dass es möglich ist durch RAR/RXR-Heterodimer-Aktivierung die ADAM10-Expression zu erhöhen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit über die Retinoid-basierte Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge die α-sekretorische Prozessierung von APP zu stimulieren und somit eine Therapie der Alzheimer-Krankheit zu entwickeln. Daher sollten die synthetischen Retinoide Acitretin und Etretinat, welche in der Medizin zur Behandlung diverser Hautkrankheiten angewendet werden, auf die Fähigkeit zur ADAM10 Stimulation *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

#### 3.3.5.1 Vergleich der synthetischen Retinoide Acitretin und Etretinat bezüglich der RARE-basierten Transkriptionsaktivierung und ADAM10-Promotorstimulation

Die Stimulation der Retinoid-Rezeptoren durch Acitretin verläuft über einen indirekten Mechanismus. Es bindet mit hoher Affinität an CRABP und verdrängt atRA von dieser Bindestelle, so dass die intrazelluläre atRA Konzentration erhöht wird und eine vermehrte Retinoid-Rezeptor-Aktivierung daraus resultiert (Abb.1.11) (Tian et al., 1997; Saurat, 1999; Armstrong et al., 2005).

Etretinat unterscheidet sich durch einen zusätzlichen Ethyl-Ester von Acitretin (Abb.1.11). Die Wirkung von Etretinat auf die Verdrängung von atRA aus der Verbindung mit CRABP oder auf die direkte Retinoid-Rezeptorstimulation wurde bisher noch nicht gezeigt. Daher sollte die Wirkung des synthetischen Retinoids ebenso wie die Wirkung von Acitretin zunächst auf die RARE-basierte Transkriptionsaktivierung und ADAM10-

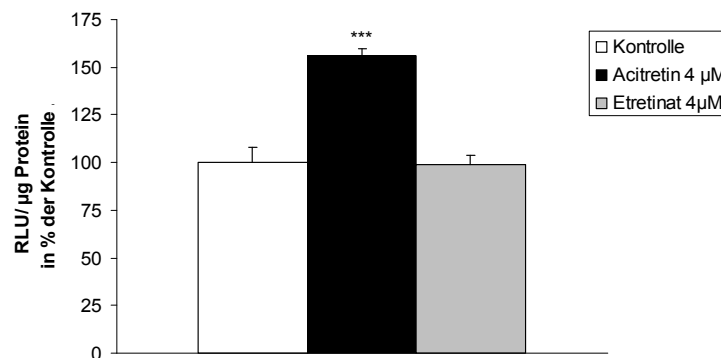
Promotorstimulation untersucht werden. Die Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$  Acitretin in SH-SY5Y-Zellen bewirkte eine signifikante Erhöhung der RARE-basierten Luciferase-Expression um mehr als 500% (Abb. 3.30). Die Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$  Etretnat zeigte dagegen keine Wirkung auf die RAR/RXR-vermittelte Expression.



**Abb. 3.30: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch Acitretin und Etretnat**

SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit dem RARE-Luc-Vektor und dem pHRL-SV40-Vektor (Expressionskontrolle) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden jeweils mit 4  $\mu\text{M}$  Acitretin gelöst in DMSO oder 4  $\mu\text{M}$  Etretnat gelöst in DMSO oder mit dem Lösungsmitteln als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt und das Verhältnis RLU der Glühwürmchen-Luciferase/RLU der Renilla-Luciferase berechnet. Die Luciferase-Mittelwerte der Kontrollen wurde auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001).

Ebenso wie auf die RARE-basierte Luciferase-Expression zeigte Etretnat keinen Effekt auf den ADAM10-Promotor in SH-SY5Y-Zellen. Die Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$  Acitretin führte dagegen zu einer deutlichen ADAM10- Promotoraktivierung um mehr als 50% (Abb. 3.31).



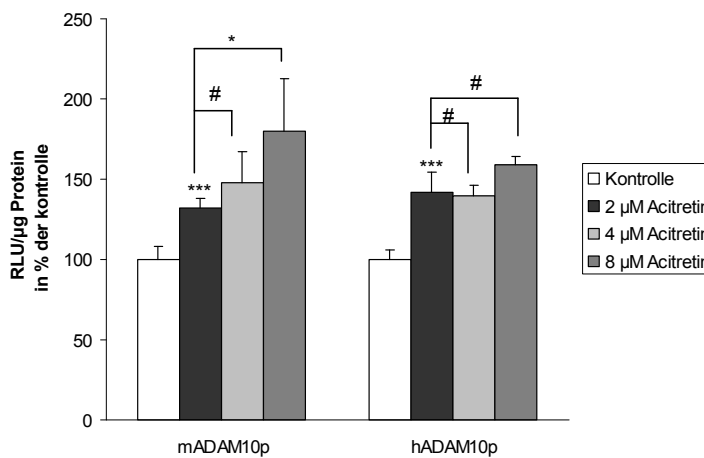
**Abb. 3.31: Vergleich der ADAM10-Promotorstimulation durch Acitretin und Etretnat**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit hADAM10p transient transfiziert und mit jeweils 4  $\mu\text{M}$  Acitretin oder Etretnat inkubiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden durch den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der Lösungsmittel-behandelten Kontrollen auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001)

Die Versuche zeigten, dass Etreinat im Gegensatz zu Acitretin weder die RARE-basierte- noch die ADAM10-Promotor-basierte- Transkription stimulieren konnte. Anscheinend bewirkte Etreinat keine Erhöhung der intrazellulären atRA Konzentration durch Verdrängung der Retinsäure von der CRABP-Bindung. Daher wurden die folgenden Versuche nur mit Acitretin durchgeführt.

### 3.3.5.2 Acitretin induzierte ADAM10-Promotorstimulation

Für die weiteren Zellkultur-Untersuchungen wurde zunächst die optimale Acitretin-Konzentration ermittelt, mit welcher eine ADAM10-Promotorstimulation nachzuweisen ist. Hierfür wurden N2A-Zellen transient mit dem humanen oder dem murinen Promotor transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen an Acitretin inkubiert (Abb. 3.32). Die Inkubation mit 2  $\mu$ M Acitretin gelöst in DMSO bewirkte eine Stimulation der Promotoren um ca. 40-50%. Die Erhöhung der Konzentration auf 4  $\mu$ M führte zu keiner signifikanten Steigerung der Promotoraktivität. Auch die 8  $\mu$ M Acitretin-Konzentration führte zumindest bei dem humanen ADAM10-Promotor zu keiner signifikanten Aktivitätssteigerung. Bei dem murinen ADAM10-Promotor konnte bei einer Acitretin Konzentration von 8  $\mu$ M noch eine leichte Erhöhung gemessen werden.

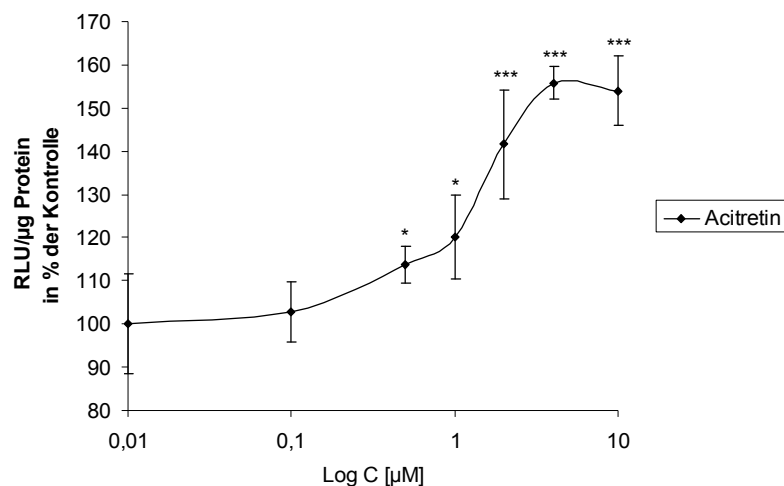


**Abb. 3.32: ADAM10-Promotorstimulation durch Acitretin in N2A-Zellen**

N2A-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit hADAM10p oder mADAM10p für 48 Stunden mit jeweils 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M oder 8  $\mu$ M Acitretin oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden durch den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der Kontrollen auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001, \*p<0,05, # keine Signifikanz).

Weiterhin wurde die optimale Acitretin-Konzentration für die ADAM10-Promotorstimulation in SH-SY5Y-Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit Acitretin in Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M gelöst in DMSO inkubiert (Abb.3.33).

Die Acitretin-Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  wirkte sich nicht signifikant auf die durch den ADAM10-Promotor kontrollierte Expression der Luciferase aus. Ab einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Acitretin wurde die Promotor-Aktivität signifikant um 14% erhöht. Eine weitere Erhöhung der Acitretin-Konzentration auf 1  $\mu\text{M}$  führte zu einer 20%-igen Steigerung und eine Acitretin-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  zu einer 42%-igen Steigerung der Aktivität. Die Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Acitretin führte zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der Aktivität des ADAM10-Promotors. Der Ermittelte EC50-Wert für die Stimulierung des ADAM10-Promotors durch Acitretin lag bei 1,5  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 3.33: Abhängigkeit der ADAM10-Promotoraktivität von der Acitretin-Konzentration in SH-SY5Y-Zellen**

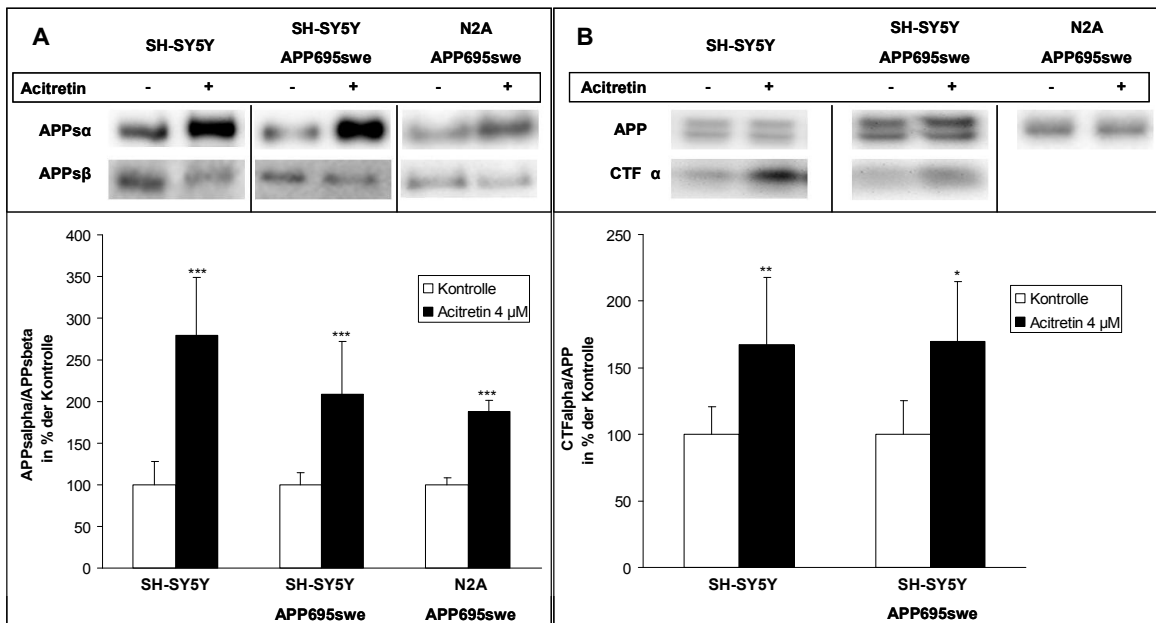
SH-SY5Y-Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit dem hADAM10p für 48 Stunden mit jeweils 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  Acitretin oder mit DMSO behandelt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferasewerte wurden durch den Proteingehalt normiert und die Mittelwerte der Kontrollen auf 100% gesetzt. Aufgrund der logarithmischen Skalierung der ,X'-Achse wurde die DMSO-Konzentration als 0,01  $\mu\text{M}$  angegeben (MW + Stabw, n=3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch eine Acitretin-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  die Aktivierbarkeit des ADAM10-Promotors weitgehend abgesättigt ist. Daher wurde in den folgenden Versuchen Acitretin-Konzentrationen von 2 bis 4  $\mu\text{M}$  verwendet.

### 3.3.5.3 APP-Prozessierung durch Acitretin-induzierte ADAM10-Stimulation

Die Inkubation mit Acitretin bewirkte zumindest eine signifikante Steigerung der ADAM10-Promotoraktivität in SH-SY5Y- und N2A-Zellen (s. 3.3.5.2). Daher sollte die Wirkung von Acitretin auf die ADAM10-basierte APP-Prozessierung untersucht werden.

Die Inkubation mit Acitretin führte in den SH-SY5Y-Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der APP $\alpha$ - und Erniedrigung der APP $\beta$ -Sekretion (Abb. 3.34 A). Das APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis war im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen um ca. 175% erhöht. Auch in den APP695swe-überexprimierenden SH-SY5Y- und N2A-Zelllinien konnte eine signifikante Erhöhung des APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnisses um ca. 100% nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Menge des membrangebundenen APP und CTF $\alpha$  zeigte in den APP-überexprimierenden- und Wildtyp-SH-SY5Y-Zellen eine Erhöhung von CTF $\alpha$  nach Inkubation mit Acitretin (Abb. 3.34 B): Das CTF $\alpha$ /APP-Verhältnis war in beiden Zelllinien um ca. 75% erhöht. In den N2A-Zelllinien konnte dagegen nur selten das C-terminale Fragment  $\alpha$  nachgewiesen werden. Daher war hier keine statistisch abgesicherte Quantifizierung des Fragments möglich. Die Menge an ungeschnittenen APP wurde aber auch in dieser Zelllinie durch Acitretin nicht beeinflusst.

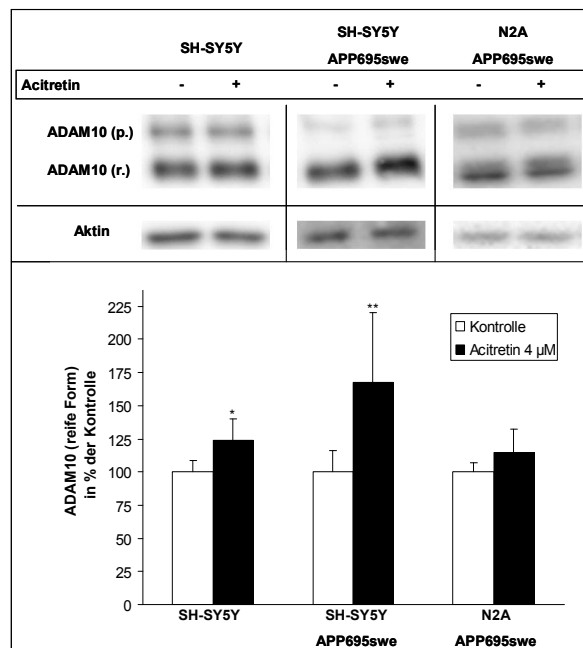


**Abb. 3.34: APP-Prozessierung durch Inkubation mit Acitretin in verschiedenen Zelllinien**

SH-SY5Y-, SH-SY5Y APP695swe- und N2A APP695swe-Zellen wurden jeweils mit 4  $\mu$ M Acitretin gelöst in DMSO oder mit dem Lösungsmittel als Kontrolle für 43 Stunden inkubiert. **A)** Die sekretierten Proteine wurden nach weiteren 5 Stunden Inkubation mit Acitretin im serumfreien Medium präzipitiert und mittels Western Blot auf den Gehalt an APP $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APP $\beta$  (anti-APP $\beta$ -Antikörper) untersucht.

**B)** Die Zellmembran-Proteine wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APP und CTF $\alpha$  (Antikörper 6687) untersucht. Dabei konnte in der N2A APP695swe-Zelllinie CTF $\alpha$  nicht quantifiziert werden. Die Mittelwerte der Kontrolle aus dem Verhältnis APP $\alpha$ /APP $\beta$  (A) und CTF $\alpha$ /APP (B) wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n $\geq$  9, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*\*p<0,001, \*\*<0,01, \*p<0,05).

Die Menge an reifer ADAM10-Form wurde durch Acitretin in der SH-SY5Y-Zelllinie um ca. 25% signifikant erhöht (Abb. 3.35). Eine stärkere Erhöhung der reifen ADAM10-Form wurde in der SH-SY5Y APP695swe-Zelllinie ermittelt. Hier war die Menge an reifer ADAM10-Form durch Acitretin um fast 70% signifikant erhöht. In der N2A APP695swe-Zelllinie konnte nur eine leichte Erhöhung der ADAM10-Menge um ca. 15% gemessen werden.



**Abb. 3.35: ADAM10-Produktion nach Inkubation mit Acitretin**

SH-SY5Y-, SH-SY5Y APP695swe- und N2A APP695swe-Zellen wurden wie in Abbildung 3.39 beschrieben behandelt. Die Zellmembran-Proteine wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an ADAM10 Proform (p), ADAM10 reife Form (r.) (anti-ADAM10-Antikörper von Calbiochem für SH-SY5Y und von Chemicon für N2A) und Aktin als Protein-Ladekontrolle untersucht. Die Mittelwerte der reifen ADAM10 Form der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n ≥ 9, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*\*p < 0,01, \*p < 0,05).

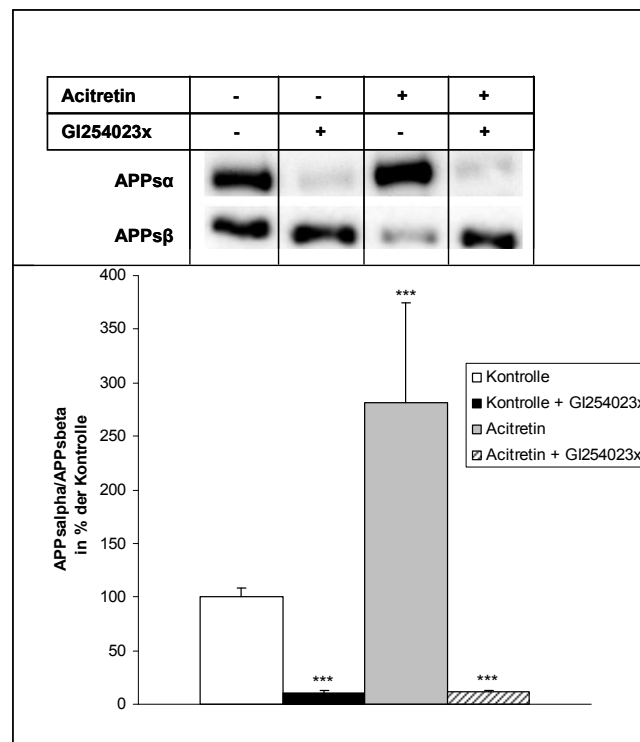
Die Ergebnisse zeigen, dass die Acitretin induzierte ADAM10-Promotorstimulation zu einer erhöhten Menge ADAM10 führt, wodurch APP vermehrt durch nicht-amyloidogene Prozessierung gespalten wird. Dies konnte durch eine Erhöhung der Menge an APP $\alpha$  und Verminderung der Menge an APP $\beta$  gezeigt werden.

### 3.3.5.4 Nachweis der Wirkung von Acitretin auf ADAM10 durch den spezifischen Inhibitor GI254023X

Neben ADAM10 können auch andere Metalloproteinasen wie TACE (ADAM17) als  $\alpha$ -Sekretasen wirken können (Buxbaum et al., 1998). Um die spezifische Wirkung von Acitretin auf die ADAM10-Expression zu bestätigen, wurde der Metalloproteinase-Inhibitor

GI254023X verwendet, welcher überwiegend selektiv auf ADAM10 wirkt (Hundhausen et al., 2003).

Die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit GI254023X resultierte in einer stark verminderten Menge an APPs $\alpha$  (und erhöhten Menge an APPs $\beta$ ), welche auf die Inhibierung der basalen ADAM10-Aktivität zurückzuführen war (Abb. 3.36). Die Koinkubation der Zellen mit Acitretin und dem Inhibitor blockierte die induzierte APPs $\alpha$ -Sekretion vollständig. Der stimulative Effekt von Acitretin auf die  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung ist daher die Konsequenz der direkten ADAM10-Expressionserhöhung durch das synthetische Retinoid.



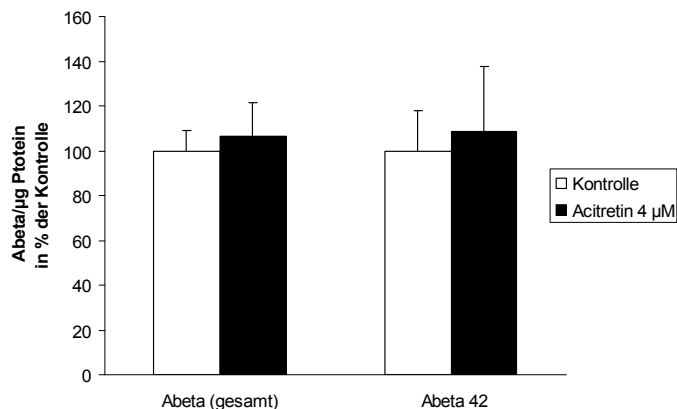
**Abb. 3.36: Wirkung des ADAM10 spezifischen Inhibitors GI254023X auf die Acitretin induzierte APPs $\alpha$ - und APPs $\beta$ -Sekretion**

SH-SY5Y-Zellen wurden jeweils alleine oder in Kombination mit 4  $\mu$ M Acitretin oder 10  $\mu$ M GI254023X sowie mit dem Lösungsmittel als Kontrolle für 43 Stunden inkubiert. Die sekretierten Proteine wurden nach weiteren 5 Stunden Inkubation mit Acitretin und/oder GI254023X im serumfreien Medium auf den Gehalt an APPs $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APPs $\beta$  (anti-APPs $\beta$ -Antikörper) untersucht und das Verhältnis APPs $\alpha$ /APPs $\beta$  dargestellt. Die Mittelwerte der Kontrollen wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=3, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test: \*\*\*p<0,001).

### 3.3.5.5 Amyloid $\beta$ -Sekretion nach Inkubation mit Acitretin

Acitretin erhöht die Menge an APPs $\alpha$  und erniedrigt die Menge an APPs $\beta$  durch erhöhte Expression von ADAM10 in neuronalen Zellen humanen und murinen Ursprungs (s. 3.3.5.3). Daher sollte untersucht werden, ob sich auch die Menge der sekretierten A $\beta$ -Peptide vermindert. Hierfür wurde mittels ELISA-Messung der Gehalt an Gesamt-A $\beta$  und A $\beta$ <sub>42</sub> im Medium der SH-SY5Y-Zellen bestimmt.

Die Bestimmung der Gesamt-A $\beta$ -Menge zeigte keine Erniedrigung an sekretierten Peptid nach Inkubation mit Acitretin (Abb. 3.37). Auch die Menge an A $\beta_{42}$  war nach der Inkubation mit dem Retinoid nicht verändert.



**Abb. 3.37: ELISA-Messung der A $\beta$ -Menge nach Inkubation mit Acitretin in SH-SY5Y-Zellen**

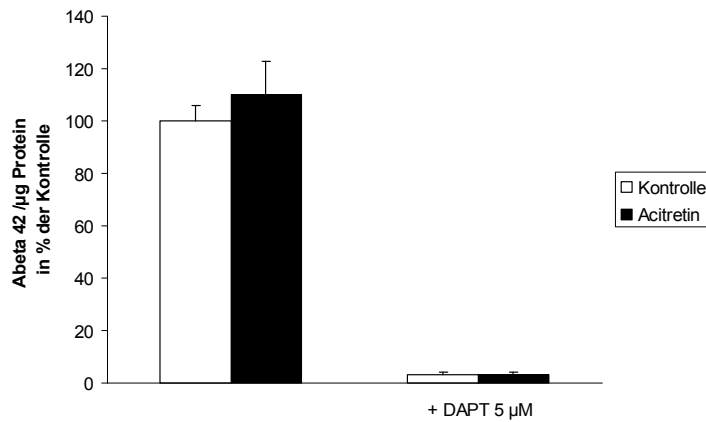
SH-SY5Y-Zellen wurden jeweils mit 4  $\mu$ M Acitretin bzw. mit dem Lösungsmittel (DMSO) als Kontrolle für 43 Stunden vorinkubiert. Die sekretierten Proteine wurden nach weiteren 5 Stunden Inkubation mit Acitretin im serumfreien Medium über ELISA-Messung auf den Gehalt an A $\beta$  (gesamt) und A $\beta_{42}$  untersucht (s. 2.2.5.7). Die Mittelwerte der Kontrollen wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=16 für A $\beta$  (gesamt) und n=3 für A $\beta_{42}$ ).

Da in SH-SY5Y-Zellen die Menge an APP $\alpha$  durch Inkubation mit Acitretin erhöht und die Menge an APP $\beta$  erniedrigt wurde (s. 3.3.5.3), hätte die Menge an C99 und demnach die Menge an sekretiertem A $\beta$ , welches aus der  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung des C99 entsteht, ebenfalls erniedrigt sein müssen. Da dies nicht der Fall war, wäre die unveränderte Menge an A $\beta$  durch eine Acitretin-basierte Erhöhung der  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität erklärbar gewesen. Durch die erhöhte Aktivität könnte der erniedrigte Gehalt an C99 durch vermehrtes Schneiden kompensiert worden sein, wodurch die Menge an A $\beta$  unverändert blieb.

Um neben der Stimulation von ADAM10 einen möglichen Einfluss von Acitretin auf die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase zu überprüfen, wurden zusätzliche Ansätze mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT inkubiert (Sastre et al., 2001).

Da die Messung von A $\beta_{42}$  aufgrund der niedrigen Konzentration des Peptids in den Überständen der SH-SY5Y-Zellen sehr aufwändig und daher fehleranfällig war (s. 2.2.5.7), wurde aus den Überständen der APP695swe-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen der Gehalt an A $\beta_{42}$  bestimmt. Wie auch schon bei den SH-SY5Y-Zellen beobachtet (Abb. 3.37), bewirkte die Inkubation der APP695swe-überexprimierenden Zellen mit Acitretin keine Veränderung in der A $\beta_{42}$ -Sekretion (Abb. 3.38). Auch durch zusätzliche Inkubation mit DAPT konnte keine Veränderung der A $\beta_{42}$ -Menge im Vergleich zu den mit DAPT alleine inkubierten Zellen festgestellt werden. Daher schien ein Einfluss von Acitretin auf die  $\gamma$ -Sekretase ausgeschlossen zu sein.

Die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase zeigte, ob mit oder ohne Acitretin inkubiert, eine deutliche Reduktion der  $A\beta_{42}$ -Menge.



**Abb. 3.38: ELISA-Messung der  $A\beta_{42}$ -Menge nach Inkubation mit Acitretin in SH-SY5Y APP695swe-Zellen**

SH-SY5Y APP695swe -Zellen wurden wie in Abb. 3.37 beschrieben mit 4  $\mu$ M Acitretin alleine oder zusammen mit 5  $\mu$ M DAPT oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt und über ELISA-Messung der Gehalt an  $A\beta_{42}$  bestimmt. Die Mittelwerte der Kontrollen wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6).

### 3.3.6 APP-Prozessierung durch Acitretin Administration *in vivo*

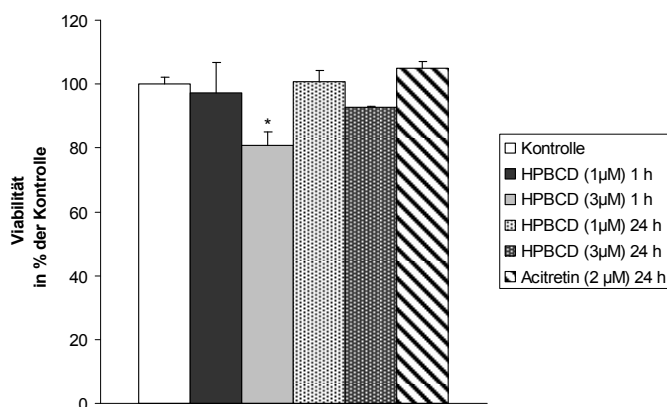
Durch Diät bedingte Vitamin A Defizienz bewirkt eine Verminderung der Lernfähigkeit bei Nagetieren, welche nach oraler Zugabe von Retinoiden reversibel ist (Cocco et al., 2002; Misner et al., 2001). Daher sollte die Wirkung Acitretin auf die Expression von ADAM10 und  $\alpha$ -sekretorischer Prozessierung von APP im Gehirn von Mäusen untersucht werden.

#### 3.3.6.1 Viabilität der Zellen nach Inkubation mit 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin und Acitretin

Für die Untersuchung der Wirkung von Acitretin am Mausmodell sollte das Retinoid gelöst in 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HPBCD) durch orale Administration verabreicht werden. Es wurde gezeigt, dass HPBCD die Bioverfügbarkeit von Acitretin nach oraler Applikation erhöht (Liu et al., 2004). Um mögliche zytotoxische Einflüsse des Lösungsmittels zu ermitteln, wurde die Viabilität der Zellen nach Inkubation mit HPBCD und Acitretin bestimmt.

Die Inkubation mit 1  $\mu$ M HPBCD zeigte nach einer Stunde keine Auswirkungen auf die Viabilität von N2A-Zellen (Abb. 3.39). Dagegen war die Viabilität der Zellen bei 3  $\mu$ M HPBCD nach einer Stunde Inkubation um ca. 20% und nach 24 Stunden um ca. 10% reduziert wobei diese geringfügige Reduktion in der Interpretation der folgenden Versuche

vernachlässigt wurde. Die Inkubation mit 2  $\mu\text{M}$  Acitretin hatte keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der N2A-Zellen.



**Abb. 3.39: Zellviabilität nach der Inkubation mit HPBCD und Acitretin**

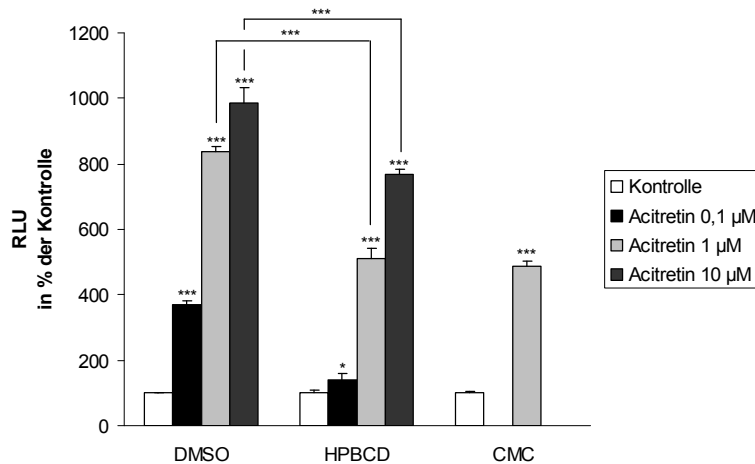
N2A-Zellen wurden jeweils mit 1  $\mu\text{M}$  oder 3  $\mu\text{M}$  2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HPBCD), 2  $\mu\text{M}$  Acitretin bzw. dem Lösungsmittel (Kontrolle) über 1 Stunde oder 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde Medium mit MTT-Reagenz mit den jeweiligen Liganden zugegeben und 4 Stunden inkubiert. Nach der Zugabe von Lysispuffer wurde die Extinktion bei 565 nm im Photometer bestimmt und abzüglich der Hintergrundextinktion und der Extinktion der Mediumkontrolle im prozentualen Verhältnis zur Kontrolle (24 h) gesetzt (MW + Stabw, n=3, Bonferroni post test: \*p<0,05).

### 3.3.6.2 Bioverfügbarkeit von Acitretin durch Lösung in DMSO, HPBCD oder CMC

Für die weitere Untersuchung der Wirkung von Acitretin wurde die Bioverfügbarkeit des Retinoids durch die Lösung in DMSO, HPBCD und Carboxymethyl Cellulose (CMC) in Zellkultur miteinander verglichen.

Die Aktivierung des RAR/RXR-Heterodimers durch Acitretin wurde über die RARE-vermittelte Luciferase-Expression gemessen. Die Inkubation mit in DMSO gelösten Acitretin zeigte signifikant stärkere Effekte auf die RAR/RXR-basierte RARE-Aktivierung gegenüber dem in HPBCD- und CMC- gelösten Liganden (Abb. 3.40). Mit allen drei Lösungsmitteln reichte eine Acitretin Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bereits aus, um eine signifikante Luciferase-Expressionssteigerungen hervorzurufen. Die RARE-basierte Expression konnte bei einer Erhöhung der Acitretin-Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  nur wenig gesteigert werden.

Der Versuch zeigte, dass in Zellkultur die Bioverfügbarkeit von Acitretin gelöst in HPBCD und CMC relativ ähnlich ist, wohingegen durch die Lösung in DMSO die Bioverfügbarkeit gegenüber den anderen Lösungsmitteln HPBCD und CMC um ca. 35% gesteigert war.



**Abb. 3.40: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch Acitretin mit verschiedenen Lösungsmitteln**

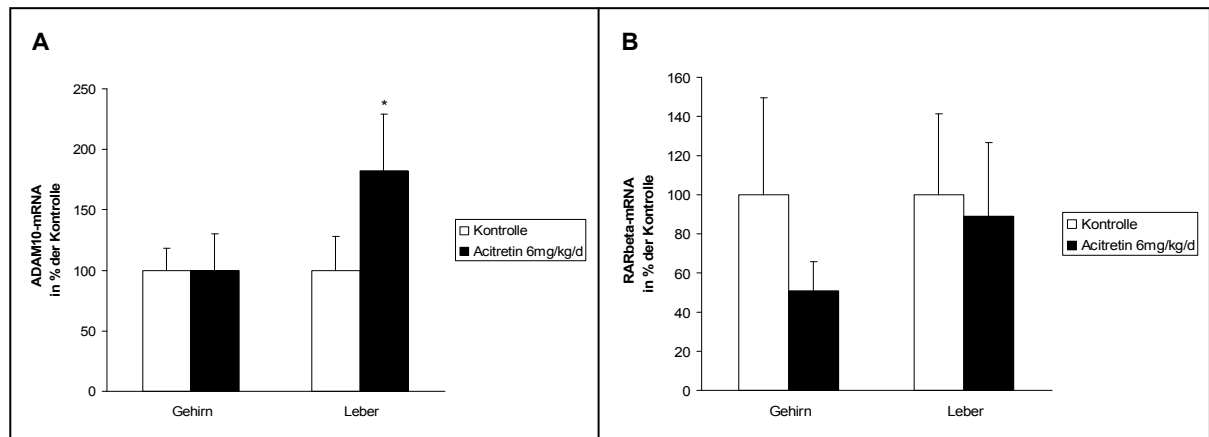
N2A-Zellen wurden transient mit dem RARE-Luc-Vektor und dem pHRL-SV40-Vektor (Expressionskontrolle) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden jeweils mit 0,1 µM, 1µM und 10 µM Acitretin gelöst in DMSO, 3 mM HPBCD bzw. 1% Carboxymethyl Cellulose (CMC) inkubiert. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt und das Verhältnis RLU der Glühwürmchen-Luciferase/ RLU der Renilla-Luciferase berechnet. Die Lösungsmittel-behandelten Zellen dienten als Kontrolle. Die Luciferase-Mittelwerte der Kontrollen wurde auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6, Einfaktorielle ANOVA, Bonferroni post test zwischen Acitretin und Kontrolle sowie zwischen Acitretin in verschiedenen Lösungsmitteln: \*\*\*p<0,001,\*p<0,05).

### 3.3.6.3 Orale Administration von Acitretin

Acitretin bewirkt nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in Zellkultur eine deutliche Erhöhung der ADAM10-Promotoraktivität einhergehend mit einer vermehrten ADAM10-Produktion und  $\alpha$ -sekretorischer APP Prozessierung (s. 3.3.5.2 und 3.3.5.3). Daher wurden FVB/N-Mäuse 3 Tage lang mit Acitretin behandelt. Hierfür wurde einmal täglich 6 mg/kg Acitretin gelöst in 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HPBCD) oral per Schlundsonde verabreicht. HPBCD erhöht die Löslichkeit von Acitretin in wässriger Lösung und ermöglicht nach oraler Administration eine schnelle Aufnahme des Retinoids in den Blutkreislauf (Liu et al., 2003; Liu et al., 2004; Lin et al., 2000). Die Mäuse wurden nach weiteren 2 Tagen seziiert und aus den Gehirnen und der Leber die mRNA von ADAM10 und RAR $\beta$  quantifiziert.

Die Behandlung von Mäusen mit Acitretin bewirkte im Gehirn keine Erhöhung der ADAM10-mRNA-Menge (Abb. 3.41 A). Lediglich in der Leber konnte eine signifikante Erhöhung der ADAM10-mRNA um ca. 80% im Vergleich zu den mit HPBCD behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Die RAR $\beta$ -Expression wird durch atRA stark erhöht (Carpentier et al., 1997). Daher diente die Expression dieses Gens als funktionelle Kontrolle, ob Acitretin in die Zellen der untersuchten Organe aufgenommen worden war und dort die Retinoid-Rezeptoren aktiviert hat. Die Expression von RAR $\beta$  wurde allerdings

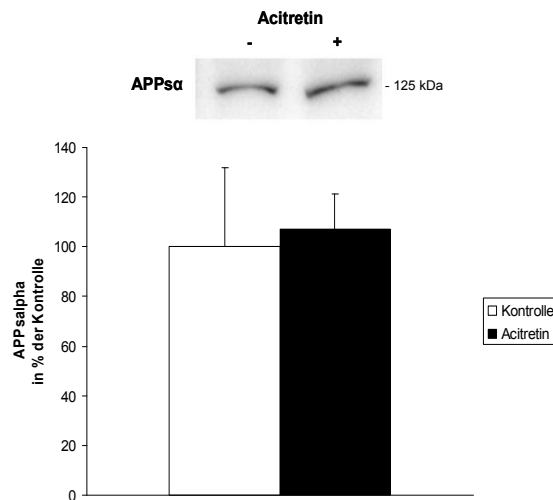
durch Acitretin im Gehirn erniedrigt anstatt erhöht, wobei hierbei keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.41 B). Auch in der Leber konnte eine leichte aber nicht signifikante Erniedrigung der RAR $\beta$ -mRNA-Menge gemessen werden. Die einzelnen Werte zeigten voneinander hohe Abweichungen, so dass kein deutlicher Beweis für eine Genregulation durch Acitretin vorlag.



**Abb. 3.41: ADAM10- und RAR $\beta$ -Expression im Gehirn von FVB/N-Mäusen nach 3 Tagen oraler Acitretin-Applikation**

FVB/N-Mäuse wurden 3 Tage mit 6 mg/kg/Tag Acitretin gelöst in HPBCD oral behandelt. Die Kontroll-Mäuse wurden nur mit HPBCD behandelt. Nach dem 5. Tag wurden die Mäuse seziiert und aus dem Gehirn und der Leber die RNA isoliert und über Real-Time Reverse-Transkriptase PCR die Quantität **A)** der ADAM10-mRNA und **B)** der RAR $\beta$ -mRNA bestimmt, welche im Verhältnis zur GAPDH-mRNA normiert wurde. Die Mittelwerte der nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollen wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=5 Kontrolle, n=6 Acitretin, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*p< 0,05).

Neben der ADAM10-mRNA-Menge wurde die Leber auf die sekretierte Menge an APP $\alpha$  untersucht. Bei der Western-Blot-Analyse konnte mit dem Anti-Maus-APP $\alpha$  Antikörper nur eine Proteinbande bei 125 kDA nachgewiesen werden (Abb. 3.42). Diese entspricht dem Spaltprodukt der  $\alpha$ -Sekretasespaltung der APP751- und APP770-Isoformen (Podlisny et al., 1990). Nach der Behandlung mit Acitretin konnten jedoch keine Unterschiede in der APP $\alpha$ -Menge festgestellt werden.

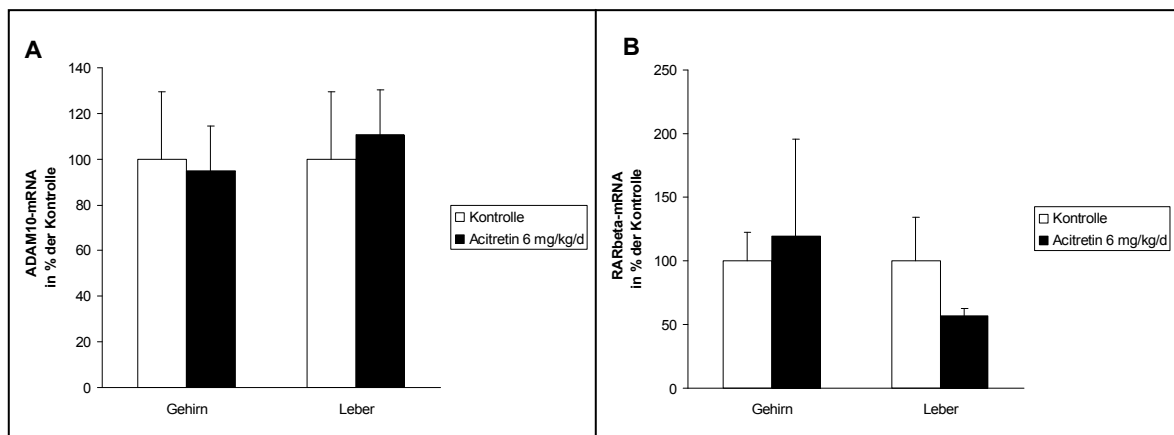


**Abb. 3.42: APPsα in der Leber oral Acitretin-behandelter Mäuse**

FVB/N-Mäuse wurden wie in Abbildung 3.41 beschrieben mit Acitretin behandelt. Die Leber wurde homogenisiert und ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Western Blot auf den Gehalt an APPsα (anti-Maus-APPsα-Antikörper) untersucht. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=5 Kontrolle, n=6 Acitretin).

Die ADAM10-Expressionsuntersuchung der mRNA zeigte nur in der Leber eine Erhöhung der mRNA-Menge. Bei der Untersuchung der mRNA-Menge von RARβ fand dagegen in beiden Organen eine leichte Reduktion der Expression statt (Abb. 3.41). Daher lag die Vermutung nahe, dass die längere Einwirkung von Acitretin durch negative Rückkopplungs-mechanismen abgepuffert worden sein könnte. Diese Mechanismen wirkten demnach gegensätzlich auf die Acitretin-basierte Stimulation. Um dieser Theorie nachzugehen wurden die Mäuse nach vorhergehendem Futterentzug nur kurzzeitig mit Acitretin behandelt. Da gefütterte Mäuse unterschiedliche Mengen Futter im Magen und Darm haben, könnte die Aufnahme des Retinoids hinsichtlich der nur einmaligen Behandlung und kurzen Wirkzeit in den einzelnen Mäusen abweichend sein. Durch den vorherigen und nachfolgenden Futterentzug sollte so die gleiche Aufnahme des Retinoids in jeder Maus erreicht werden.

In dem Gehirn und der Leber der FVB/N-Mäuse, welche 14 Stunden zuvor mit Acitretin per os behandelt wurden, zeigten sich jedoch keine Veränderungen in der ADAM10-mRNA-Menge (Abb. 3.43 A). Auch bei den mRNA-Mengen von RARβ konnten keine signifikanten Unterschiede in beiden Organen nachgewiesen werden (Abb. 3.43 B). Dabei ist zu beachten, dass die RARβ-Quantifizierung in den Organen von nur 2 Mäusen/Gruppe durchgeführt wurde



**Abb. 3.43: ADAM10- und RARβ-Expression im Gehirn von FVB/N-Mäusen 14 Stunden nach oraler Acitretin-Applikation**

FVB/N-Mäuse wurden 8 Stunden vor der Behandlung das Futter entzogen, anschließend wurde 6 mg/kg/Tag Acitretin gelöst in HPBCD oral verabreicht. Die Kontroll-Mäuse wurden nur mit HPBCD behandelt. Nach weiteren 14 h ohne Futter wurden die Mäuse seziiert und aus dem Gehirn und der Leber die RNA isoliert und über Real-Time Reverse-Transkriptase PCR die Quantität **A)** der ADAM10-mRNA und **B)** der RARβ-mRNA bestimmt, welche auf die GAPDH-mRNA-Menge normiert wurde. Die Mittelwerte der nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollen wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=6/Gruppe ADAM10-mRNA, n=2/Gruppe RARβ-mRNA).

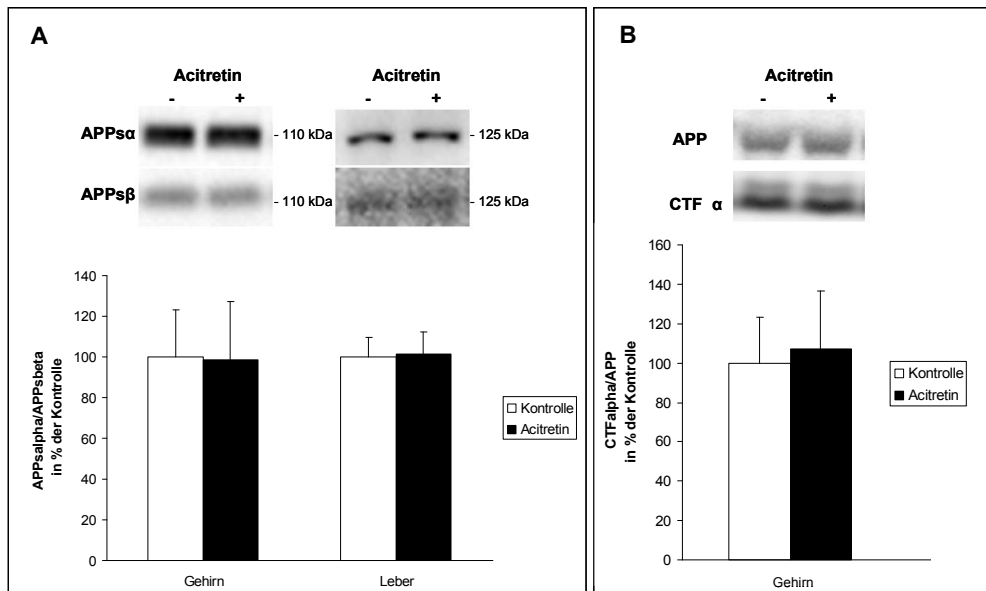
### 3.3.6.4 Subcutane Administration von Acitretin

Nachdem sowohl die kurz- als auch die mittelfristige Behandlung der Mäuse mit Acitretin keine Veränderungen in der APP-Prozessierung bewirkt haben, wurde eine längerfristige Behandlung mit Acitretin durchgeführt. Hierfür wurden FVB/N APP-London Mäuse, welche das humane APP (London Mutation) überexprimieren, über einen Zeitraum von 6 Wochen jeweils 2-mal wöchentlich mit Acitretin behandelt.

In den vorhergehenden Tierversuchen blieb ungeklärt, ob Acitretin tatsächlich nach oraler Applikation über den Verdauungstrakt in den Blutkreislauf gelangt war, da selbst in der Leber keine erhöhte Expression von RARβ, dessen Stimulation durch Retinoide in der Literatur beschrieben ist (Carpentier et al., 1997), nachgewiesen werden konnte (s. 3.3.6.3). Daher wurde in diesem Langzeitversuch das Acitretin für eine garantierte Aufnahme in den Blutkreislauf subcutan injiziert. Da die Bioverfügbarkeit von Acitretin gelöst in DMSO gegenüber HPBCD deutlich erhöht war (s. 3.3.6.2) und sich Acitretin in diesem Lösungsmittel höher ankonzentrieren ließ, wurde das synthetische Retinoid gelöst in DMSO injiziert.

Es zeigte sich, dass auch die subcutane Applikationsart und der längere Behandlungszeitraum keine Auswirkungen auf die APP-Prozessierung in der Leber und im Gehirn hatten (Abb. 3.44 A). Sowohl die Menge an APP $\alpha$  und die Menge an APP $\beta$

blieben in beiden Organen unverändert. Auch die Menge an ungeschnittenem APP sowie dem CTF $\alpha$  im Gehirn blieb im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Mäusen unverändert (Abb. 3.44 B).

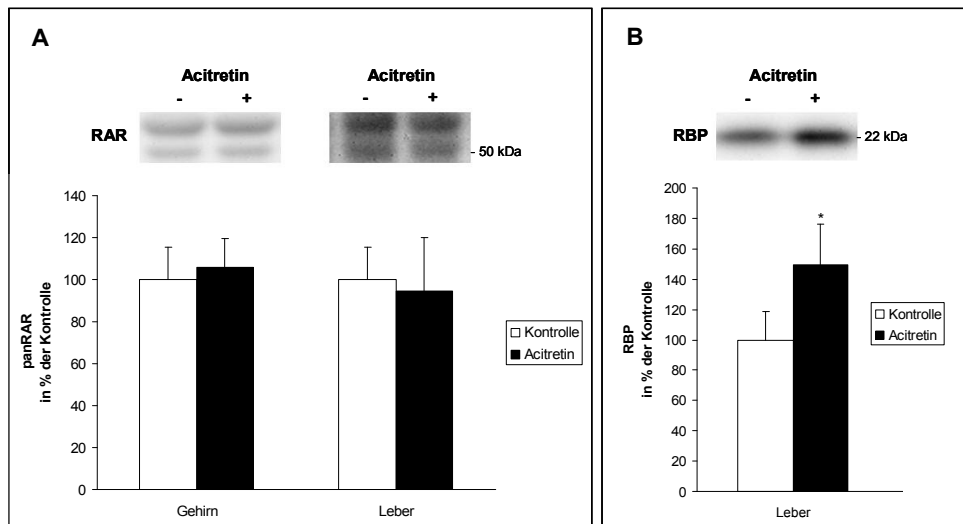


**Abb. 3.44: APP-Prozessierung in Gehirn und Leber von APP/London-Mäusen nach 6 Wochen subcutaner Acitretin-Administration**

APP/London-Mäuse wurden 2x wöchentlich 12,5 mg/kg/Tag Acitretin gelöst in DMSO subcutan injiziert. Die Kontroll-Mäuse wurden nur mit DMSO behandelt. Nach 6 Wochen Behandlung wurden die Mäuse sezirt und das Gehirn und die Leber homogenisiert und ultrazentrifugiert. **A)** Die Überstände wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APP $\alpha$  (Antikörper 6E10 im Gehirn und Antikörper anti-Maus-APP $\alpha$  in der Leber) und APP $\beta$  (anti-APP $\beta$ -Antikörper) untersucht. **B)** Die Zellmembranen wurden auf den Gehalt an APP und CTF $\alpha$  (Antikörper 6687) untersucht. Die Mittelwerte der Kontrolle aus dem Verhältnis APP $\alpha$ /APP $\beta$  (A) und CTF $\alpha$ /APP (B) wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=7/Gruppe).

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die langzeitige Behandlung mit dem Retinoid auch zu einer erhöhten Produktion der RARs in den untersuchten Organen führte, um so die Aufnahme und Funktionalität von Acitretin in den Zellen der Organe nachzuweisen. Die Quantifizierung der RAR Isoform-entsprechenden Banden bei 50-60 kDa auf dem Western Blot (es konnten nur zwei Isoformen nachgewiesen werden) zeigte keine Unterschiede zwischen den Mäusen welche mit Acitretin und denen welche mit DMSO behandelt wurden (Abb. 3.45 A).

Das Retinol Bindeprotein (RBP) ist ein weiteres Protein, welches durch atRA (bzw. Acitretin) reguliert wird (Soprano et al., 1982; Jessen und Satre, 2000). Die Behandlung der Mäuse mit Acitretin bewirkte eine signifikante Erhöhung der Menge an RBP in der Leber um ca. 50% (Abb. 3.45 B). Im Gehirn konnte mit der angewendeten Western-Blot-Methode das RBP-Protein nicht nachgewiesen werden, da im Gehirn im Vergleich zur Leber die RBP-Menge um den Faktor 100 erniedrigt ist (Smith et al., 1975).



**Abb. 3.45: RAR und RBP in Gehirn und Leber von APP/London-Mäusen nach 6 Wochen subcutaner Acitretin Administration**

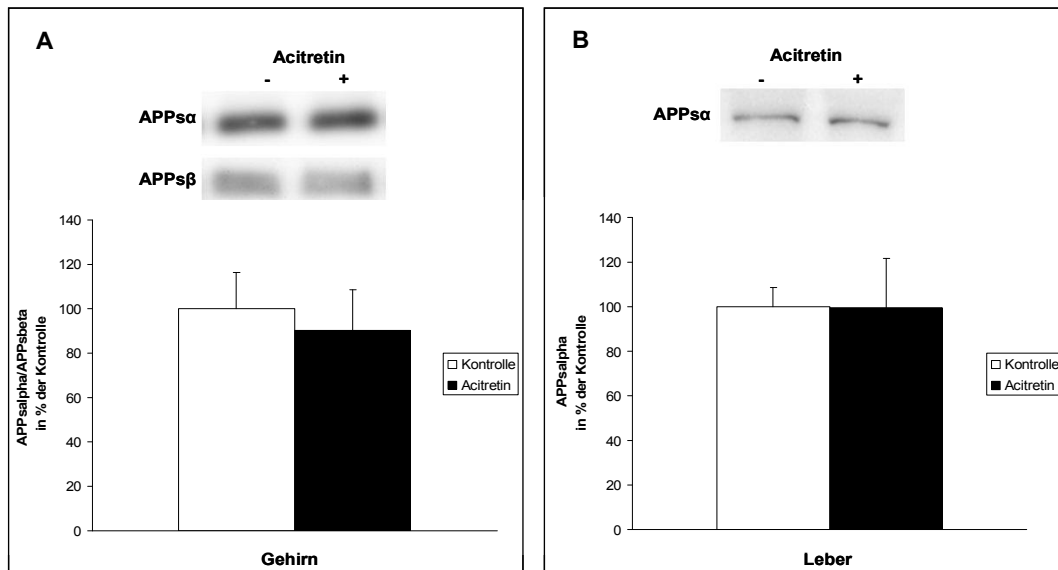
APP/London-Mäuse wurden wie in Abb. 3.44 behandelt. Die Überstände wurden mittels Western Blot auf **A)** den Gehalt an RAR-Isoformen (Antikörper anti-panRAR) und **B)** den Gehalt an RBP (Antikörper anti-RBP) untersucht. Die Mittelwerte der Kontrollen wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=5/Gruppe, Student's t-test für unabhängige Stichproben: \*p< 0,05).

### 3.3.6.5 Intranasale Administration von Acitretin

Da die subcutane Injektion von Acitretin keine Effekte auf die Prozessierung von APP gezeigt hat, wurde versucht Acitretin über intranasale Administration in das Gehirn zu bringen. Lipophile Stoffe werden schnell über den transnasalen Transport in das Gehirn aufgenommen (Vyas et al., 2005). Daher sollte Acitretin aufgrund dessen Hydrophobizität die Blut-Hirn-Schranke über das olfaktorische Epithelium überwinden und in die Cerebrospinalflüssigkeit gelangen können.

Die 6-wöchige intranasale Behandlung der FVB/N-Mäuse mit Acitretin zeigte jedoch keinen Einfluss auf die  $\alpha$ -sekretorische Prozessierung des APP (Abb. 3.46 A). Weder die Menge an APP $\alpha$ , noch die Menge an APP $\beta$  wurde durch die Behandlung verändert.

Weiterhin sollte in der Leber die Wirkung des Acitretin untersucht werden, welches nicht über das olfaktorische Epithel aufgenommen wurde und über den Verdauungstrakt in den Blutkreislauf gelangt war. Die Quantifizierung der Proteinbanden des APP $\alpha$  bei 125 kDa zeigte jedoch, dass auch hier wieder keine Stimulation der  $\alpha$ -Sekretase durch Acitretin stattgefunden hat (Abb. 3.46 B).



**Abb. 3.46: APP-Prozessierung in Gehirn und Leber von APP/London-Mäusen nach 6 Wochen intranasaler Administration**

APP/London-Mäuse wurden 5-mal in der Woche mit 10  $\mu$ l 100 mM Acitretin gelöst in DMSO intranasal behandelt. Die Kontroll-Mäuse wurden nur mit DMSO behandelt. Nach 6 Wochen Behandlung wurden die Mäuse seziiert und das Gehirn und die Leber homogenisiert und ultrazentrifugiert. **A)** Die Gehirnhomogenat-Überstände wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an APPs $\alpha$  (Antikörper 6E10) und APPs $\beta$  (anti-APPs $\beta$ -Antikörper) untersucht. **B)** Ebenso wurden die Überstände der Leberhomogenate auf den Gehalt an APPs $\alpha$  (Antikörper anti-Maus-APPs $\alpha$ ) untersucht. Die Mittelwerte der Kontrolle aus dem Verhältnis APPs $\alpha$ /APPs $\beta$  (A) bzw. APPs $\alpha$  (B) wurden auf 100% gesetzt (MW + Stabw, n=7/Gruppe).

## 4. Diskussion

Die Stimulation der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 ist eine vielversprechende Möglichkeit zur Therapie der Alzheimer-Krankheit. Neben der Prävention der  $\beta$ -Sekretase-Prozessierung mit resultierender A $\beta$ -Peptid-Produktion, entsteht zusätzlich das neuroprotektive und neurotrophe APP $\alpha$ -Fragment, welches positiv auf bereits geschädigte Neurone wirkt (Saitoh et al., 1989; Milward et al., 1992; Morimoto et al., 1998; Smith-Swintosky et al., 1994). Die Erhöhung der APP $\alpha$ -Menge bewirkt zudem eine Verbesserung der Gedächtnisleistung bei Mäusen (Meziane et al., 1998; Ring et al., 2007). Durch Überexpression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 konnte im Mausmodell eine vermehrte nicht-amyloidogene Prozessierung von APP nachgewiesen werden. Dies wirkte sich auf eine verminderte A $\beta$ -Ablagerung in Form von senilen Plaques und einer verbesserten Lern- und Gedächtnisleistung aus (Postina et al., 2004).

Das Ziel dieser Arbeit war einen therapeutischen Ansatz gegen die Alzheimer-Krankheit am Mausmodell zu entwickeln, in welcher durch medikamentöse Behandlung eine Stimulierung der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 hervorgerufen wird. Dafür wurden drei unterschiedliche Strategien zur therapeutischen Aktivierung von ADAM10 verfolgt: Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAC1 durch PACAP, die Gentherapie mit ADAM10-cDNA und die ADAM10-Promotorstimulation durch Retinoid-Rezeptor-Aktivierung.

### 4.1 PACAP-basierte Therapie der Alzheimer-Krankheit

Die Stimulation verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten ist ein möglicher Ansatz zur Steigerung der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP. Dies konnte im Mausmodell durch Stimulation des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors und der muscarinischen Acetylcholin-Rezeptoren M1 und M3 gezeigt werden (Cachard-Chastel et al., 2007; Caccamo et al., 2006). Auch die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAC1 durch intracerebroventrikuläre PACAP-38-Injektion bewirkt bei Ratten eine Verbesserung der Gedächtnisleistung (Sacchetti et al., 2001). Diese Verbesserung der Gedächtnisleistung könnte ADAM10-abhängig sein. Hinweise darauf lieferten Versuche in Zellkultur, in welchen eine PACAP-38-vermittelte ADAM10-Stimulation mit verstärkter  $\alpha$ -sekretorischer APP-Prozessierung nachgewiesen werden konnte (Kojro et al., 2006).

Im Verlauf dieser Arbeit sollte die durch PACAP-38 induzierte ADAM10-Stimulation und  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung in APP/PS1-Mäusen gezeigt werden. Da PACAP-38 bereits nach 2 Minuten im Blut inaktiviert wird (Zhu et al., 2003), wurde das Neuropeptid

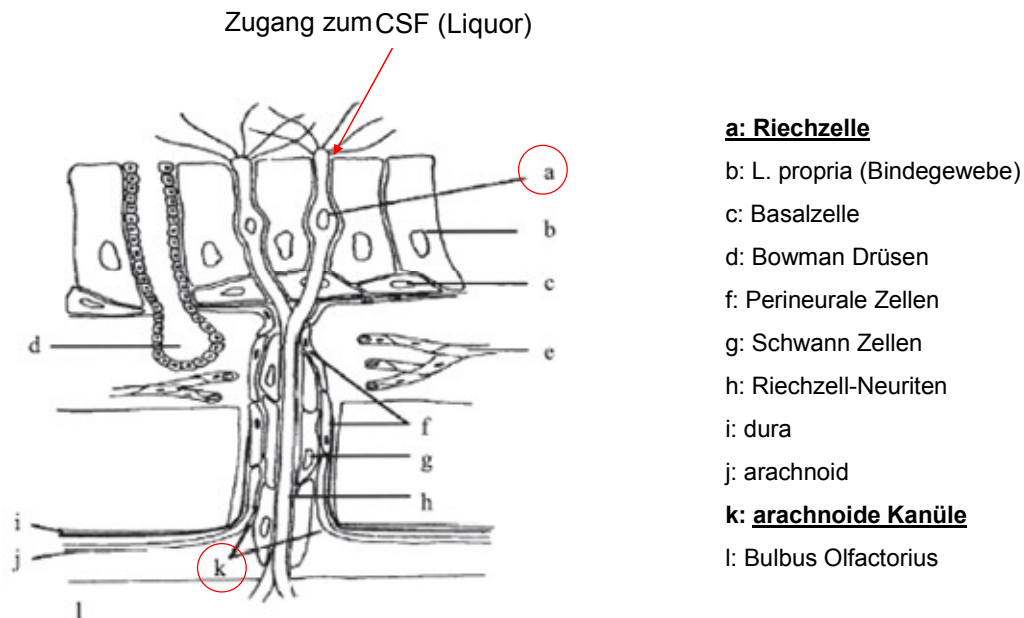
durch intranasale Applikation verabreicht. Versuche mit intranasaler Applikation des vasoaktiven Intestinal-Peptids (VIP), welches mit PACAP-38 eine 76%-ige Sequenzhomologie besitzt und ebenso wie PACAP an den Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 bindet (wohingegen PAC1 nur von PACAP aktiviert wird) (Cardoso et al., 2007), zeigten bereits einen erfolgreichen transnasalen Transport eines Peptids in das Gehirn (Gozes et al., 1996; Dufes et al., 2003).

Die intranasale Behandlung der Mäuse mit PACAP-38 führte zu einer Verminderung der Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen (Abb. 3.1), welche jedoch nicht signifikant war. Dabei gilt zu beachten, dass geringere Abweichungen in der A $\beta$ -Menge durch immunohistologischen Färbungen der Gehirnschnitte nicht nachgewiesen werden können, da die Anzahl der amyloiden Plaques in den verschiedenen Schnittebenen des Gehirns unterschiedlich ist und mit der angewandten Methode nicht bei jeder Maus exakt die gleiche Schnittebene angefertigt werden kann. Daher wurde in einem weiteren Versuch nach intranasaler Behandlung mit PACAP-38 der Gehalt an APP $\alpha$  zunächst durch biochemische Methoden bei einer höheren Anzahl an Mäusen bestimmt. Hierbei wurde eine signifikante Erhöhung des  $\alpha$ -sekretorischen APP-Spaltprodukts im Gehirn PACAP-behandelter Mäuse festgestellt (Abb. 3.2). Darüber hinaus konnte eine signifikante Reduktion der A $\beta_{40}$ - und A $\beta_{42}$ -Peptide durch ELISA-Messungen nachgewiesen werden (Kojro, 2007).

Die Ergebnisse zeigen, dass PACAP-38 die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung *in vivo* stimuliert. Dies geschieht vermutlich, nach den Beobachtungen *in vitro*, über eine Erhöhung der katalytischen Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase, wobei dies jedoch *in vivo* bisher noch nicht bewiesen wurde.

Die Veränderungen in der APP-Prozessierung zeigen weiterhin, dass das Neuropeptid infolge der intranasalen Applikation die Blut-Hirn-Schranke überwunden haben muss. Zusätzliche Hinweise für diesen Hirn-Transfer lieferten Untersuchungen mit radioaktiv markiertem PACAP, welches kurz nach der intranasalen Applikation im Gehirn nachgewiesen werden konnte (mündliche Mitteilung von Dr. Elzbieta Kojro, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Der genaue Mechanismus der Neuropeptid-Aufnahme in das Gehirn über das olfaktorische System ist noch unklar. Neben der rezeptorvermittelten Transzytose durch Riechsinneszellen mit Vesikeltransport über die Axone, könnte der parazelluläre Transport eine wichtige Rolle spielen (Abb. 4.1): Zwischen der Riechsinneszelle und der Arachnoidmembran besteht die arachnoide Kanüle über welche der Liquor in direktem Kontakt zur Nasenschleimhaut steht (Begley, 2004). Auch über die „tight junctions“, welche die Zellen miteinander verbinden und polarisieren wäre ein Durchdringen von PACAP denkbar. Hierbei könnte bei zukünftigen Versuchen die Koadministration des Neuropeptids mit dem Polyaminosaccharid Chitosan hilfreich sein. Chitosan interagiert durch die positiv geladenen Aminogruppen mit der negativ geladenen

Seite der Zellmembran und „tight junctions“ der Nasenschleimhaut-Epithelzellen und fördert so die Öffnung der „tight junctions“, wodurch große hydrophile Moleküle diese Barriere überwinden können (Artursson et al., 1994). Daher wären noch stärkere Effekte auf die APP-Prozessierung durch PACAP gelöst in Chitosan zu erwarten.



**Abb. 4.1: Der olfaktorische Transport in das Zentrale Nervensystem**

Der transnasale Weg von PACAP-38 kann über den transzytotischen Transport der Riechzelle (a) verlaufen. Ebenso kann das Peptid über den parazellulären Transport über die „tight junctions“ oder arachnoide Kanüle (k) in den Liquor gelangen (verändert nach: Begley, 2004).

## 4.2 ADAM10-Überexpression im Mäuse-Gehirn durch nicht-virale Transfektion

In Hinblick auf eine therapeutische Anwendung beim Menschen sollte ADAM10-cDNA über ein geeignetes Transfektionssystem in den Neuronen des Zentralen Nervensystems überexprimiert werden, um der abnormalen A $\beta$ -Produktion bei Alzheimer-Patienten durch vermehrte nicht-amyloidogene APP-Prozessierung entgegenzuwirken. Da intravenös injizierte virale Transfektions-Systeme aufgrund von Immunreaktionen (Reid et al., 2002) und fehlender zielgerichteter Transfektion neuronaler Zellen im Gehirn für die Langzeitbehandlung ungeeignet sind, sollte ein nicht-virales Transfektionssystem für die Gentherapie zunächst am Mausmodell erprobt werden. Hierfür sollten Immunoliposomen hergestellt werden, welche nach intravenöser Injektion im Blutkreislauf zirkulieren können und über die Blut-Hirn-Schranke durch transzytotischen Transport und späteren Endozytose in die Neuronen gelangen (Pardridge, 2003). Die Herstellung der Immunoliposomen richtete sich nach einem in der Gruppe um William M. Pardridge

entwickelten System (Shi und Pardridge, 2000), mit welchem es möglich ist DNA über intravenöse Injektion in die Neuronen des ZNS zu transportieren (Shi und Pardridge, 2000; Shi et al., 2001; Zhang et al., 2002a; Pardridge, 2003).

Es konnte jedoch in dieser Arbeit mit dieser Methode keine Immunoliposomen-basierte Transfektion weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden, obwohl die Herstellung der Liposomen den Vorgaben von Pardridge et al. (2003) entsprachen:

Es wurden Liposomen hergestellt, die mit dem Antikörper 8D3 gekoppelt wurden. Dieser Antikörper bindet an den Transferrin-Rezeptor (TfR), beeinträchtigt ihn aber nicht in seiner Liganden-Bindungsfähigkeit und seiner Trans- bzw. Endozytose durch bzw. in die Zellen. (Kissel et al., 1998). Zusätzlich wurden Immunoliposomen hergestellt, welche mit dem Antikörper R17-217 gekoppelt waren (s. 3.2.3). Dieser Antikörper bindet ebenfalls an der extrazellulären Domäne des TfR (Lesley et al., 1984). Bei der Untersuchung der Bindungsfähigkeit konnte mit beiden Antikörpern die Bindungsfähigkeit an den TfR nachgewiesen werden (Abb. 3.3 B). Dies konnte auch durch die Bindung des R17-217-Antikörpers an die Zellmembran kultivierter N2A-Zellen gezeigt werden (Abb. 3.3. C). Das bedeutet, dass mit 8D3- bzw. R17-217-gekoppelte Immunoliposomen prinzipiell Neuronen im Gehirn von Mäusen oder Maus-Zelllinien hätten transfiziert werden können. Die Wahl zwischen den beiden Antikörpern scheint für die Herstellung der Liposomen nur eine geringe Rolle zu spielen, da neuere Untersuchungen an N2A-Zellen gezeigt haben, dass die Transfektionseffizienz von Immunoliposomen gekoppelt mit 8D3- oder mit R17-217-Antikörpern identisch ist (Rivest et al., 2007).

Ein weiterer kritischer Faktor für die Herstellung der Immunoliposomen war die Kopplungseffizienz der Antikörper. Die Antikörper-Kopplungseffizienz war für beide Antikörper ähnlich (Abb. 3.4 B) und lag mit ~ 34% über dem Bereich der von Pardridge et al. (2003) erreichten Effizienz von ~ 26%.

Ein weiteres Kriterium für eine erfolgreiche Transfektion mit Immunoliposomen war die Effektivität der DNA-Einkapselung. Diese war stark abhängig von der Lipidzusammensetzung der Liposomen. Mit der nach Pardridge et al. (2003) vorgegebenen Lipidzusammensetzung konnte die DNA-Einschlussrate von 4% der Ausgangsmenge nicht überschritten werden (Abb. 3.4 A). Nach Pardridge sollten jedoch Einschussraten größer als 10% erreicht werden. Erst die Erhöhung des kationischen Lipidanteils von 3% auf 7% bewirkte durch die nun positivere Netto-Ladung der Liposomen eine deutliche Erhöhung der Einkapselung der negativ geladenen DNA um das 6-fache auf 24%. Ähnliche Steigerungen in der Einschussrate wurden in der Literatur beschrieben, wo bei der Immunoliposomen- Herstellung nach Erhöhung des kationischen Lipidanteils von 3% auf 7% eine 4-fache Erhöhung der DNA-Einkapselung auf ~ 30% erreicht wurde (Kim et al., 2004). Durch die Erhöhung des kationischen Lipidanteils bestand jedoch die Gefahr,

dass die Immunoliposomen trotz der schützenden PEG-Gruppen mit negativ geladenen Serumproteinen aggregieren und aus dem Blutkreislauf entfernt werden können. Dagegen sollte die positivere Ladung der Immunoliposomen die Endozytose in kultivierten Zellen begünstigen (Schatzlein, 2001). Es konnte jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* eine Transfektion durch Immunoliposomen mit entweder 3% oder 7% kationischen Lipidanteil nachgewiesen werden. Da auch die Größe der hergestellten Immunoliposomen den Vorgaben von Partridge et al. (2003) entsprachen (Abb. 3.5) bleibt unklar, warum die Transfektion mit diesem System nicht funktioniert hat.

Die erste Veröffentlichung dieser Methode mit intravenös injizierter Reporter-gen-Vektor-DNA (eingeschlossen in Immunoliposomen), welche über die Blut-Hirn-Schranke gelangte und eine gezielte Expression des Reportergens im Gehirn hervorrief, war im Jahr 2000 und stammte aus der Gruppe um Partridge (Shi und Partridge, 2000). Seit dieser Veröffentlichung konnte trotz der detaillierten Beschreibung der Methode bis Heute ausschließlich in der Arbeitsgruppe um Partridge diese *in vivo* Transfektion reproduziert werden (Chu et al., 2006; Partridge, 2003; Shi et al., 2001; Shi und Partridge, 2000; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2003b; Zhu et al., 2004). Da in dieser Arbeit trotz der eingehaltenen experimentellen Parameter sowohl in Zellkultur-Versuchen als auch *in vivo* keine Transfektion nachgewiesen werden konnte, wäre zu überdenken, ob ein alternatives (z.B. virales-) Transfektionssystem besser geeignet wäre, mit dem zumindest nach stereotaktischer Injektion die Überexpression von ADAM10-cDNA als potentielle Gentherapie getestet werden kann.

### **4.3 Retinoid-vermittelte Stimulation von ADAM10**

#### **4.3.1 Der Vergleich zwischen dem murinen ADAM10-Promotor und dem humanen ADAM10-Promotor**

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass sich der humane ADAM10-Promotor und daher auch die ADAM10-Aktivität durch Retinoide stimulieren lässt (Prinzen et al., 2005; Endres et al., 2005; Holback et al., 2008). Es blieb bisher allerdings ungeklärt, wie diese Stimulation erfolgt und ob sie nur *in vitro* stattfindet oder ob sie sich auch *in vivo* beobachten lässt. Um dies am Mausmodell zu untersuchen, mussten die humanen und murinen ADAM10-Promotoren miteinander verglichen werden. Die Promotoren sind zu 78% innerhalb der ersten 500 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt ähnlich. Diese Ähnlichkeit nimmt mit größerer Distanz zum Translationsstartpunkt ab (Prinzen et al., 2005).

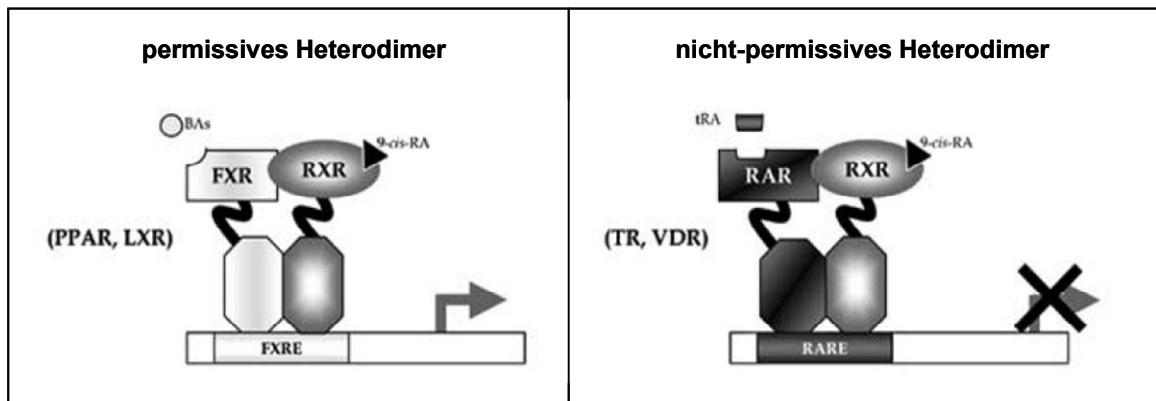
Der humane und der murine ADAM10-Promotor zeigten trotz der Sequenzunterschiede eine identische Basisaktivität. Dagegen unterschied sich die Basisaktivität der Promotoren in verschiedenen Zelllinien deutlich (s. Abb. 3.7): In der humanen Zelllinie SH-SY5Y war die konstitutive Aktivität der beiden Promotoren gegenüber der murinen Zelllinie N2A deutlich erhöht. Die beiden Zelllinien unterscheiden sich bei mikroskopischer Betrachtung in ihrer Morphologie und Dichte der Zell-Zell-Kontakte: SH-SY5Y-Zellen besitzen eine epitheliale Morphologie wohingegen N2A-Zellen die Morphologie neuronaler, amöboider Stammzellen besitzen (<http://www.atcc.org>). Da ADAM10 auch eine Rolle bei der Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte und der Migration der Zellen spielt (Maretzky et al., 2005), könnte aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der Zellen und der unterschiedlichen Anzahl der Zell-Zell-Kontakte der beiden Zelllinien auch die unterschiedlich starke Basis-Promotorstimulation zu erklären sein. Dies würde bedeuten, dass sich die beiden Zelllinien auch in der ADAM10-Proteinmenge unterscheiden. Da jedoch für die Western-Blot-Detektion von ADAM10 in den beiden Zelllinien zwei verschiedene Antikörper aufgrund unterschiedlicher Zelltyp-abhängiger Spezifitäten verwendet wurden, konnten kein direkter Vergleich der Expressionsstärke vorgenommen werden.

Dessen ungeachtet konnte durch die identische Basisaktivität des murinen und humanen ADAM10-Promotors in beiden Zelllinien bewiesen werden, dass die regulativen Sequenzen der Promotoren konserviert sind, was bereits in Prinzen et al. (2005) mittels computergestützter Vorhersage der Transkriptionsfaktorbindestellen vermutet wurde. Zu diesen Transkriptionsfaktorbindestellen, die einen potentiellen Einfluss auf die ADAM10-Promotoren haben, zählen zwei RXR-Bindestellen. Obwohl sich diese Bindestellen jeweils um ein Nukleotid am Ende der putativen RXR-Bindesequenz unterscheiden, konnten beide Promotoren durch Liganden von RXR-Heterodimer-Bindungspartner (RAR, VDR und TR) unabhängig von der Zelllinie (N2A oder SH-SY5Y, s. Abb. 3.8) in gleicher Intensität stimuliert werden (s. Abb. 3.8, Abb. 3.21 und Abb. 3.33). Daher scheint die Bindung und Aktivierung der Rezeptoren von dem geringfügigen Sequenzunterschied nicht beeinträchtigt zu sein.

### **4.3.2 Identifizierung der ADAM10-stimulierenden RXR-Heterodimere**

RXR kann mit anderen nukleären Rezeptoren verschiedene Heterodimere bilden (s. Abb. 1.9). Diese Heterodimere unterteilen sich in sogenannte permissive und nicht-permissive Dimere (Abb. 4.2). In der Gruppe der permissiven Heterodimere reicht der RXR-Ligand alleine aus, um die Transkription zu aktivieren (Aranda und Pascual, 2001). In der Gruppe der nicht-permissiven RXR-Heterodimere ist die Bindung des RXR-Liganden blockiert, wenn der Dimerpartner nicht zuvor von seinem spezifischen Liganden aktiviert wurde. Die

Aktivierung dieser Dimere geschieht nur nach der Bindung eines Liganden an den RXR-Dimerpartner, die Bindung des eigentlichen RXR-Liganden kann lediglich verstärkend wirken. Die Heterodimere TR/RXR, VDR/RXR und RAR/RXR gehören zu der Gruppe der nicht-permissiven Heterodimere, wohingegen die LXR/RXR- und PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimere zu der Gruppe der permissiven Heterodimere gehören (Aranda und Pascual, 2001; Rizzo et al., 2005).



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung der permissiven- und nicht-permissiven Heterodimeraktivierung**

Permissive Heterodimere (z.B. PPAR/RXR und LXR/RXR) können bereits durch den RXR-Liganden alleine aktiviert werden. Nicht-permissive Heterodimere können nur durch Bindung des Liganden eines RXR-Dimerpartners (z.B. RAR, TR und VDR) aktiviert werden (verändert nach: Rizzo et al., 2005)).

Die Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Liganden nukleärer Rezeptoren (s. 3.3.3.2) zeigen, dass die permissiven RXR-Heterodimere keine Rolle bei der ADAM10-Stimulation zu spielen scheinen. Weder der PPAR $\gamma$ -Ligand Troglitazone noch der LXR-Ligand 22-R-Hydroxycholesterin zeigten eine Wirkung auf den ADAM10-Promotor, wobei durch Cholesterinbestimmungen der Transport des 22-R-Hydroxycholesterin in die Zellen nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Lediglich der LXR-Ligand T0901317 in geringen Konzentrationen aktivierte in N2A-Zellen den ADAM10-Promotor. Bei höheren Konzentrationen kam es wie auch in den SH-SY5Y-Zellen zu einer inhibitorischen Wirkung. Die ADAM10-Proteinmenge änderte sich durch geringe Konzentrationen an T0901317 in SH-SY5Y APP695swe-Zellen nicht (Abb. 3.25). Zeitgleich konnte eine erhöhte Menge an APPs $\beta$  bei gleichbleibender APPs $\alpha$ -Menge gemessen werden. Hierzu gibt es Beschreibungen in der Literatur, wo gezeigt wird, dass T0901317 in N2A APP695swe-Zellen die Menge an A $\beta$  erniedrigt und die APPs $\alpha$ -Menge nicht verändert (Sun et al., 2003). Eine andere Gruppe beschreibt wiederum eine Erhöhung der APPs $\alpha$ -Menge im Gehirn von APP23-Mäusen durch T0901317 (Koldamova et al., 2005). Dies geschieht durch die T0901317- und 22-R-Hydroxycholesterin-vermittelte Expressionserhöhung des ABC-Transporters A1, welcher Cholesterin aus der Zelle transportiert (Koldamova et al., 2003; Koldamova et al., 2005). Eine Erniedrigung der

Cholesterin-Konzentration in der Zelle fördert wiederum die ADAM10-basierte,  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung (Kojro et al., 2001). Eine solche Wirkung konnte in dieser Arbeit mit T0901317 jedoch nicht nachvollzogen werden. T0901317 scheint zudem einen Effekt auf die  $\gamma$ -Sekretase zu haben: Kürzlich wurde gezeigt, dass T0901317 in APP-transgenen Mäusen selektiv im Hippocampus die Menge an  $A\beta_{42}$  deutlich erniedrigt, aber keinen Effekt auf die Mengen an APP und die APP-Prozessierungsprodukte APP $\alpha$ /APP $\beta$  und  $A\beta_{40}$  hat (Riddell et al., 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe hat durch Untersuchungen an Zellen gezeigt, dass T0901317 die  $\gamma$ -Sekretase Cholesterin-unabhängig reguliert (Czech et al., 2007). Zudem wurde widersprechend zu den Ergebnissen von Riddell et al. (2007) eine selektive Erhöhung der  $A\beta_{42}$ -Menge um 200% und eine Erniedrigung der  $A\beta_{38}$ -Menge um 80% nach Inkubation mit dem LXR-Liganden nachgewiesen (Czech et al., 2007).

T0901317 wirkte in höheren Konzentrationen zytotoxisch (s. Abb. 3.20). Es wurde gezeigt, dass durch apoptotische Prozesse die APP $\beta$ -Sekretion in cerebellaren Granula-Zellen erhöht wird (Galli et al., 1998). Daher kann ein toxischer Einfluss auf die ADAM10-Promotoraktivität oder Sekretion von APP-Spaltprodukten nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin aktiviert T0901317 auch die Rezeptoren FXR und PXR (Houck et al., 2004; Mitro et al., 2007), deren Einfluss auf die APP-Prozessierung bisher noch unbekannt ist. Daher ist eine abschließende Beurteilung der Wirkung von T0901317 in Bezug auf die APP-Prozessierung eher schwierig. Ein strarker Einfluss auf die Expression von ADAM10 konnte jedoch in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Promotorstimulations-Untersuchungen sprechen eher für die Beteiligung eines nicht-permissive RXR-Heterodimers bei der ADAM10-Promotoraktivierung. Dies konnte durch die Untersuchungen mit RAR-, VDR- und TR-Liganden gezeigt werden, wobei die Wirkung von VDR und TR auf Proteinebene nicht bestätigt werden konnte (s. 3.3.2 und 3.3.3).

Der VDR-Ligand  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> bewirkte eine deutliche Stimulation der ADAM10-Promotoren in den neuronalen Zellen von Mensch und Maus (s. Abb. 3.21 und Abb. 3.22). Das bestätigt die computergesützte Prognose der beiden RXR-Bindestellen in der ADAM10-Promotor-Sequenz in welcher mit dem Programm MatInspector in den Bereichen -203 bp und -302 bp sogenannte „Halbseiten-Bindestellen“ eines VDR/RXR-Heterodimers ermittelt worden sind (Prinzen et al., 2005). Die Stimulation des ADAM10-Promotors durch den VDR-Liganden resultierte allerdings nicht in einer Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge und bewirkte somit keine Veränderung in der APP-Prozessierung. Daher ist zu vermuten, dass  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> entweder inhibierend (indirekt oder direkt) auf weitere regulative Elemente des ADAM10-Promotors wirkt oder einen negativ

regulierenden Einfluss auf die posttranslationale Reifung des Proteins ausübt, wodurch der stimulative Effekt auf den Promotor ausgeglichen wird. In der Literatur ist bis Heute noch kein direkter Zusammenhang zwischen einem veränderten Vitamin D3-Metabolismus und der Alzheimer-Erkrankung beschrieben, obwohl die  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3-Konzentration im Blut gerade im Alter z.B. bei dem Krankheitsbild der Osteoporose verändert ist (DeLuca, 1990). Zudem konnte durch genetische Kopplungsanalysen ein Polymorphismus in der für die Liganden-Bindungsdomäne kodierenden Region auf dem VDR-Gen in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko an AD zu erkranken gebracht werden (Gezen-Ak et al., 2007).

Der TR Ligand Triiodothyronin bewirkte nur in SH-SY5Y-Zellen eine Stimulation der ADAM10-Promotoren aus Mensch und Maus (s. Abb. 3.21), wohingegen in den murinen N2A-Zellen keine Stimulation des ADAM10-Promotors nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.22). Hierbei könnte eine indirekte Regulation des ADAM10-Promotors eine Rolle spielen. Triiodothyronin hat vermutlich in der humanen Zelllinie Gene reguliert, deren Genprodukte sich wiederum regulierend auf den ADAM10-Promotor ausgewirkt haben könnten. Dagegen lassen sich wahrscheinlich diese Gene in der murinen Zelllinie durch den TR-Liganden nicht regulieren. Es gibt Hinweise auf eine unterschiedliche Genregulation durch Thyroidhormone in verschiedenen Spezies. So erhöht Triiodothyronin die Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase- (CYP7A1-) Expression in Ratten (Ness et al., 1990; Hylemon et al., 1992; Pandak et al., 1997; Ellis et al., 1998), wohingegen der CYP7A1-Promotor beim Menschen reprimiert wird (Drover et al., 2002).

Der aktivierte Thyroidhormon-Rezeptor (TR) wirkt nicht nur regulatorisch auf die Genexpression, sondern kann auch über sogenannte schnelle nicht-TR-Element-vermittelte Mechanismen z.B. den Proteinkinase-3 Signalweg aktivieren (Hiroi et al., 2006). Der Proteinkinase-3 Signalweg spielt eine Rolle bei der Retinoid-basierten ADAM10-Stimulation (Holback et al., 2008) und könnte daher auch durch das Thyroidhormon für eine Erhöhung der ADAM10-Promotoraktivität in den humanen Neuronalzellen geführt haben. Auf die ADAM10-Proteinmenge in den SH-SY5Y-Zellen hatte der TR-Ligand jedenfalls keinen Einfluss (s. Abb. 3.24). Dagegen kam es zu einer signifikanten Reduktion der APP $\alpha$ -Menge und Erhöhung der APP $\beta$ -Menge. Triiodothyronin wirkt sich inhibierend auf die Transkriptionsaktivität des APP-Gens aus (Belandia et al., 1998), welche in einer verminderten Sekretion von APP $\alpha$  und APP $\beta$  resultiert (Latasa et al., 1998). Da jedoch in diesem Versuch SH-SY5Y-Zellen mit der überexprimierenden APP695swe-Isoform verwendet wurde, welche unter dem Einfluss eines konstitutiven Cytomegalovirus- (CMV-) Promotors steht, kann das verminderte APP $\alpha$ /APP $\beta$ -Verhältnis nicht mit der transkriptionellen Regulation von APP durch das Thyroidhormon erklärt werden. Diesbezüglich konnte auch keine Veränderung in der

Menge an ungespaltenem APP beobachtet werden. Daher könnte die veränderte Menge der sekretierten APP-Formen nur durch eine Änderung in der Vesikel-Reifung oder Aktivität der  $\beta$ -Sekretase (BACE) erklärt werden. Latasa et al. (1998) zeigten, dass die APPs-Sekretion in Triiodothyronin-behandelten Zellen nicht mit der Menge an zellulärem APP korreliert und folgerten daraus, dass durch den TR-Liganden Proteasen reguliert werden, welche in dem Metabolismus von APP eine Rolle spielen (wie z.B. BACE). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Frauen mit einem veränderten Thyroidhormon-Level ein höheres Risiko haben an Alzheimer zu erkranken, Männer jedoch nicht (Tan et al., 2008). Daher scheint die Funktion des Thyroidhormons im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit sehr vielschichtig zu sein.

Die RXR-Heterodimere mit VDR, TR, PPAR $\gamma$  und LXR scheinen demnach keinen direkten Einfluss auf eine Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge zu haben. Die ADAM10-Promotorstimulation und -Expression erfolgt höchstwahrscheinlich durch die Aktivierung eines nicht-permissiven RAR/RXR-Heterodimers. Dies konnte auf Promotor- und Protein-Ebene durch Inkubation mit dem RAR-selektiven Liganden TTNPB gezeigt werden (s. Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Dafür spricht auch die starke ADAM10-Stimulation durch atRA (Prinzen et al., 2005; Endres et al., 2005; Holback et al., 2008), welche hauptsächlich den RAR-Rezeptor aktiviert und nur geringe Wirkung auf den RXR-Rezeptor hat (Veal et al., 2002). Zur Identifizierung der beteiligten RAR-Isotypen wurde bereits in vorhergehenden Versuchen gezeigt, dass die Expression von RAR $\beta$  durch Inkubation mit atRA deutlich erhöht wird (Jana Hundt, Diplomarbeit 2006, ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz), (Carpentier et al., 1997). In N2A-Zellen, welche mit RAR  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -überexprimierenden-Vektoren und dem humanen ADAM10-Promotor-Reportergen-Vektor kotransfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass RAR $\alpha$  und RAR $\beta$  die basale und atRA-stimulierte ADAM10-Promotoraktivität erhöht (Daniela Kaleve, Bachelorarbeit 2006, ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Es wurde gezeigt, dass RAR $\beta$  sowie RAR $\beta/\gamma$  defiziente Mäuse eine Verminderung in der Lernfähigkeit haben (Chiang et al., 1998; Mingaud et al., 2008). Darüber hinaus führte eine Vitamin A-reduzierte Diät bei Ratten zu einer verminderten RAR $\beta$ -Expression im Gehirn (Husson et al., 2006). Daher könnte eine verminderte RAR $\beta$ -basierte ADAM10-Promotorstimulation für die Erkrankung an Alzheimer mitverantwortlich sein.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal für eine nicht-permissive RXR-Heterodimeraktivierung ist die Verstärkung der Aktivierung, wenn neben dem Liganden des RXR-Dimerpartners auch der RXR-Ligand zur Verfügung steht (Minucci et al., 1997). Daher wurden SH-SY5Y-Zellen mit den RAR-Liganden atRA und TTNPB zusammen mit dem spezifischen RXR-Liganden Methoprensäure koinkubiert. Die Koinkubation mit der

Methoprensäure wie auch die alleinige Inkubation mit Methoprensäure bewirkte jedoch keine Aktivierung des ADAM10-Promotors (s. Abb. 3.14). Die RARE (DR5)-vermittelte Luciferaseexpression wurde ebenfalls nicht durch Methoprensäure aktiviert (s. Abb. 3.13). Der verwendete RARE-Luc-Vektor besteht aus zwei hintereinander liegenden Retinsäure-Rezeptor-Bindeelementen, an welchen RAR/RXR-Heterodimere binden und bei Aktivierung die Genexpression der Luciferase initiieren. Daher stellt sich die Frage, ob die Methoprensäure überhaupt das RAR/RXR-Heterodimer aktivieren kann, welches an dem aus DR5-Sequenzen bestehenden RARE-Element bindet (s. 1.3.1). In EMSA-Studien mit Kernextrakten aus SH-SY5Y-Zellen wurde gezeigt, dass die RAR/RXR-Heterodimere, welche an dem DR5-RARE-Element binden hauptsächlich aus den Isotypen RAR $\beta$  und RXR $\beta$  bestehen (Rana et al., 2002). Harmon et al. (1995) haben gezeigt, dass die Methoprensäure nur sehr schwach den RXR Isotyp  $\beta$  aktiviert, wohingegen die Isotypen  $\alpha$  und  $\gamma$  stark aktiviert werden. Daher wäre es möglich, dass die Methoprensäure zwar DR1- oder DR2-RARE-Elemente über RAR/RXR $\alpha$  oder RAR/RXR $\gamma$  aktivieren kann, aber DR5-RARE-Elemente dagegen nicht oder nur sehr schwach durch die fehlende Bindungsfähigkeit des Liganden an RAR/RXR $\beta$  aktiviert werden. Dies würde jedoch auch bedeuten, dass die ADAM10-Promotoraktivierung über ein RAR $\beta$ /RXR $\beta$ -Heterodimer verläuft. Für die genaue Identifizierung der RAR- und RXR-Isotypen würden EMSA-Studien mit dem ADAM10-Promotor und den aufgereinigten Rezeptoren oder auch die Verwendung RXR Isotyp-spezifischer Liganden Aufschluss geben.

Die nicht natürlich vorkommende Methoprensäure leitet sich von dem Methopren ab, welches ein natürlicher Wachstumsregulator in Insekten ist (Harmon et al., 1995). Es könnte daher auch sein, dass Retinoid-Rezeptoren in Insektenzellen stärker durch Methoprensäure aktiviert werden wie in humanen Neuronzellen, da z.B. der Transport in die Zellen unterschiedlich ist oder mögliche beteiligte, für Insektenzellen spezifische Kofaktoren bei der RXR-Aktivierung eine Rolle spielen. Allerdings wurde auch schon eine RXR-Aktivierung durch Methoprensäure in humanen Monozyten nachgewiesen (Abe et al., 2004).

Als weiterer RXR-Ligand wurde die Docosahexaensäure (DHA) auf die Fähigkeit zur Aktivierung des ADAM10-Promotors untersucht. Es wurde gezeigt, dass DHA RXR *in vitro* (Lengqvist et al., 2004) und *in vivo* (de Urquiza et al., 2000) aktiviert. In Folge von epidemiologischen Studien wird vermutet, dass eine erhöhte Aufnahme von DHA das Risiko an Alzheimer zu erkranken senkt (Morris et al., 2003). Dagegen zeigen klinische Studien mit DHA behandelte Alzheimer-Patienten keine Verbesserung der Kognitionsdefizite (Freund-Levi et al., 2006). Auch eine groß angelegte Verhaltensstudie bewies, dass die Fütterung von APPsw/PS1 Mäusen mit DHA weder eine Verbesserung in der Lernfähigkeit noch eine Verminderung der A $\beta$ -Peptide im Hippocampus bewirkt

(Arendash et al., 2007). Dem widersprechend konnte in DHA-behandelten SH-SY5Y-Zellen ein Anstieg der APP $\alpha$ -Sekretion und Erniedrigung der A $\beta$ -Sekretion beobachtet werden (Sahlin et al., 2007), welcher eine RXR-basierte ADAM10-Stimulation zugrunde liegen könnte. In dieser Arbeit konnte jedoch keine Stimulation des ADAM10-Promotors durch Inkubation mit der ungesättigten Fettsäure nachgewiesen werden (s. Abb. 3.19), was gegen eine Beteiligung von ADAM10 bei der von Sahlin et al. beobachteten Sekretionsveränderungen der APP-Spaltprodukte spricht. Obendrein wurde die RARE-vermittelte Luciferase-Expression durch DHA sogar inhibiert anstatt über RXR-Aktivierung stimuliert zu werden (s. Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Das könnte bedeuten, dass DHA nicht an dem RAR/RXR-Heterodimer des RAREs bindet: Bisher konnte nur *in vitro* eine Aktivierung des RXR Isotyps  $\alpha$  durch DHA nachgewiesen werden (Fan et al., 2003; Lengqvist et al., 2004). Es gibt zwar Vermutungen, dass DHA auch an RXR $\beta$  bindet, dies konnte jedoch bisher noch nicht eindeutig betätigt werden (Radominska-Pandya und Chen, 2002; Stafslin et al., 2007). Da das RARE (DR5) vermutlich nur durch RXR $\beta$  aktiviert wird (s.o.), könnte demnach das Element wahrscheinlich nicht oder nur schwach durch DHA stimuliert worden sein.

Dessen ungeachtet wurde allerdings eine Inhibierung durch DHA beobachtet. Die Inhibierung der RARE-vermittelten Expression, könnte die Folge von zytotoxischen Reaktionen sein, welche durch DHA zumindest nach längerer Inkubation ausgelöst wurden (s. Abb. 3.16). Es wurde gezeigt, dass DHA die Differenzierung von Fettzellen inhibiert und die Apoptose von Fettzell-Vorläufer induziert (Kim et al., 2006). DHA wirkt auch proapoptotisch auf verschiedene Arten von Tumorzelllinien aus dem Darm, Pankreas, Prostata und Lunge durch Aktivierung der Caspasen-3, -8, und -9 und durch Modifikation der Phosphorylierung von MAP-Kinasen wie ERK1/2 und p38 (Serini et al., 2008). SH-SY5Y-Zellen sind Neuroblastom- bzw. Tumorzellen. Daher könnten DHA-induzierte, proapoptotische Prozesse für eine Verminderung der RARE-vermittelten Genexpression geführt haben. Dagegen spricht, dass Sahlin et al. (2007) ebenfalls SH-SY5Y-Zellen für die Untersuchung der Wirkung von DHA auf die APP-Prozessierung verwendet haben. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung von DHA bei der ADAM10-Stimulation jedoch definitiv ausgeschlossen werden. Die möglichen neuroprotektiven Effekte von DHA auf neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer könnten auch RXR-Rezeptor-unabhängig sein. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass DHA auch PPAR $\gamma$  aktivieren kann (Gani und Sylte, 2008). Anti-inflammatorische PPAR $\gamma$ -Aktivatoren führen *in vivo* zu einer Verminderung der BACE-Expression und demnach zu einer A $\beta$ -Reduktion (Sastre et al., 2006).



Genexpression aktivieren (Wang und Yen, 2004). Diese GT-Boxen bestehen aus der Nukleotidkernsequenz GTGGGGGTGGG. Im Vergleich dazu besteht die Sequenz unmittelbar vor der potentiellen RXR-Bindestelle bei -203 bp aus den Nukleotiden GAGGGGGAGGG. Diese Sequenz ist sowohl in dem murinen als auch dem humanen Promotor konserviert (Abb. 4.3). Daher könnte man hier von einer GA-Box sprechen, an welcher RAR/RXR-Heterodimere binden können. Hinweise zu dieser Theorie lieferten die Untersuchung der ADAM10-Promotorstimulation durch atRA, welche sowohl auf dem humanen als auch dem murinen Promotor identisch war (s. 4.3.1).

Einen weiteren Hinweis für eine direkte Bindung des RAR/RXR-Heterodimers lieferten EMSA-Studien, mit welchen zumindest an der RXR-Bindestelle bei -203 bp eine Proteinbindung nachgewiesen werden konnte (Prinzen et al., 2005). Der Nachweis der direkten RAR/RXR-Bindung in den beiden potentiellen Bindungsbereichen konnte in dieser Arbeit dennoch nicht erbracht werden. Die hergestellten Promotorkonstrukte, welche die isolierten Sequenzen der Promotorbereiche -302 bp und -203 bp beinhalten zeigten keine erhöhte Aktivität in mit atRA behandelten Zellen (s. Abb. 3.27). Dies lag jedoch höchstwahrscheinlich an der Wahl des Reporter-gen-Vektors, welcher bereits ohne Promotorsequenz durch atRA stimuliert wurde, wodurch mögliche leichte Effekte auf die RXR-Bindesequenzen überdeckt wurden.

Weiterhin wäre eine indirekte Retinoid-basierte ADAM10-Stimulation denkbar: So kann atRA die Expression des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B regulieren (Na et al., 1999; Bayon et al., 2003). Da sich auf den ADAM10-Promotoren auch eine NF- $\kappa$ B-Bindestelle bei -198 bp befindet (s. Abb.1.7), könnte die Retinoid-induzierte Promotor-Stimulation indirekt über die Regulation von NF- $\kappa$ B eingeleitet worden sein. Eine solche Transkriptionsaktivierung wie auch eine indirekte Transkriptionsaktivierung über die MZF-1-Bindestellen (-237 bp und -273 bp) konnte jedoch durch die Herstellung von Deletionsmutanten im Vorfeld dieser Arbeit ausgeschlossen werden (Jana Hundt, Diplomarbeit 2006, ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). SP1 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, welcher durch Retinoide reguliert wird. Der aktivierte RAR kann zusammen mit SP1 und RXR an GC-reichen Sequenzen (GC-Box) binden und so die Genexpression induzieren (Shimada et al., 2001). In dem ADAM10-Promotor sind zwei GC-Boxen bei -521 bp und -366 bp lokalisiert (s. Abb.1.7). Darüber hinaus konnte eine DNA/Protein-Interaktion durch EMSA-Studien im Bereich der SP1-Bindestelle detektiert werden (Prinzen et al., 2005).

Weiterhin können nicht-genomische Mechanismen der Retinoid-basierten Aktivierung nicht ausgeschlossen werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass die atRA induzierte ADAM10-Aktivierung Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-abhängig ist. Der atRA-stimulierte PI3K-

Einfluss auf ADAM10 scheint jedoch eher auf Proteinebene zu wirken, da die ADAM10-mRNA-Menge durch die Kinase nicht beeinflusst wird (Holback et al., 2008). Dennoch sollte in dieser Arbeit die Wirkung der atRA-induzierten PI3K auf den ADAM10-Promotor mittels Koinkubation von Zellen mit atRA und einem PI3K-Inhibitor untersucht werden. Der PI3K-Inhibitor LY 294002 bewirkte allerdings generell eine Reduktion der Expression in Reporter-gen-Vektoren unabhängig von der Promotorstruktur (s. Abb. 3.28), so dass der Nachweis der PI3K-Abhängigkeit bei der atRA-basierten ADAM10-Promotorstimulation nicht erbracht werden konnte.

All-trans Retinsäure stimuliert auch die Aktivität der lysosomalen Phospholipase A<sub>2</sub> (LPLA<sub>2</sub>) (Abe et al., 2004). Die PLA<sub>2</sub> ist in der muscarinischen Rezeptor-vermittelten APP $\alpha$ -Sekretion von SH-SY5Y-Zellen beteiligt (Cho et al., 2006). Der ADAM10-Promotor könnte demnach indirekt über die (durch atRA) aktivierte Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) stimuliert werden. Die Koinkubation von SH-SY5Y-Zellen mit dem PLA<sub>2</sub>-Inhibitor Manoidalid zeigte indes, dass die Aktivierung des ADAM10-Promotors nicht durch PLA<sub>2</sub> vermittelt wird (s. Abb. 3.29).

Darüber hinaus könnte die ADAM10-Expression von einer Reihe weiterer Retinoid-kontrollierter Faktoren beeinflusst werden, welche bei der Erhaltung der Gedächtnisleistung und der adulten Neurogenese eine Rolle spielen (s. 1.3.4 und 1.3.4). So könnte sich z.B. die atRA-basierte Regulation der Expression der  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheit Presenilin-2, des APP und des BACE (Culvenor et al., 2000; Lahiri, 1995; Yang et al., 1998; Satoh und Kuroda, 2000) indirekt auf die ADAM10-Stimulation auswirken. Daher scheinen weitere Untersuchungen wie z.B. EMSA-Tests mit aufgereinigten Retinoid-Rezeptoren und ADAM10-Promotor-Sequenzen zur Identifizierung der Retinoid-basierten ADAM10-Stimulation notwendig.

#### **4.3.4 Acitretin als Therapeutikum der Alzheimer-Krankheit**

Die Inkubation neuronaler Zellen mit dem synthetischen Retinoid Acitretin bewirkte eine Erhöhung der ADAM10-Promotoraktivität (s. Abb. 3.31, Abb. 3.32 und Abb. 3.33), welche wiederum in einer Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge resultierte (s. Abb. 3.45). Nach der Inkubation der Zellen mit Acitretin wie auch mit atRA (s. Abb. 3.10) und TTNPB (s. Abb. 3.15) konnte eine deutliche Erhöhung der Menge an APP $\alpha$  und eine Erniedrigung der Menge an APP $\beta$  beobachtet werden (s. Abb. 3.34). Weiterhin konnte ein Anstieg in der Menge an CTF $\alpha$  mit Acitretin zumindest in den SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass die gesteigerte nicht-amyloidogene APP-Prozessierung die Folge der Acitretin-induzierten Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge ist. Dies konnte durch Koinkubation von SH-SY5Y-Zellen mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X eindeutig bewiesen werden (s. Abb. 3.46). Die Koinkubation der SH-SY5Y-

Zellen mit Acitretin und dem Inhibitor blockierte die induzierte APP $\alpha$ -Sekretion vollständig.

Obwohl Acitretin die  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung stimulierte, wurde keine Veränderung in der sekretierten A $\beta$ -Menge beobachtet. Da jedoch eine Verminderung der APP $\beta$ -Sekretion nachgewiesen wurde, hätte auch eine Verminderung der CTF $\beta$  (C99) -Menge und demnach eine verminderte A $\beta$ -Sekretion stattfinden müssen. Eine Erhöhung der  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität durch Acitretin wäre eine mögliche Erklärung für die unveränderte A $\beta$ -Menge gewesen. Die  $\gamma$ -Sekretase könnte so vermehrt CTF $\beta$  geschnitten haben, und damit kompensatorisch der verminderten amyloidogenen Prozessierung entgegengewirkt haben. Diese Möglichkeit konnte jedoch durch Koinkubation der SH-SY5Y-Zellen mit einem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT ausgeschlossen werden (s. Abb. 3.38). Durch Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor und Acitretin konnte keine Veränderung der A $\beta$ <sub>42</sub>-Menge im Vergleich zu den mit dem Inhibitor alleine inkubierten Zellen festgestellt werden. Daher konnte ein Einfluss von Acitretin auf die  $\gamma$ -Sekretase ausgeschlossen werden.

Eine andere Ursache für diese Anomalie könnte in dem Zeitpunkt der Messung liegen. Die Zellen wurden 43 Stunden mit Acitretin vorinkubiert. In dieser Zeit wurde die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität durch vermehrte Expression von ADAM10 erhöht und APP prozessiert. Es könnte jedoch sein, dass die Erhöhung der ADAM10-Menge erst kurz vor Ablauf dieser 43 Stunden stattgefunden hat, und das erst in den folgenden 5 Stunden die Sekretion der primären Spaltprodukte APP $\alpha$  und APP $\beta$  verändert wurde. Das würde bedeuten, dass die sekundären APP Spaltprodukte wie z.B. A $\beta$  zu diesem Zeitpunkt noch aus einer unveränderten Menge primärer Spaltprodukte (CTF $\beta$ ) entstanden sind. Eventuell hätte nach einem noch längeren Inkubationszeitraum auch eine Erniedrigung der A $\beta$ -Menge beobachtet werden können. Ein Indiz für diese Vermutung ist die Tatsache, dass die Inkubation mit den Retinoiden erst nach mehr als einem Tag Inkubationszeit zu einer Erhöhung der ADAM10-Promotoraktivität führt. Für diese Theorie spricht ebenfalls die relative niedrige Erhöhung der ADAM10-Proteinmenge nach den insgesamt 48 Stunden Inkubation mit Acitretin (aber auch mit atRA und TTNPB). Daher wäre es sinnvoll, die Acitretin-induzierte ADAM10-Produktion und APP-Prozessierung über einen längeren Zeitverlauf zu überwachen.

Neben Acitretin wurde auch das synthetische Retinoid Etretinat bezüglich der ADAM10-Promotorstimulation getestet. Etretinat wurde seit 1986 ebenso wie Acitretin für die systemischen Behandlung von Hautkrankheiten verwendet (Bollag, 1974; Bollag, 1975; Larsen et al., 1993). Es wurde jedoch aufgrund der schlechteren pharmakokinetischen

Eigenschaften im Vergleich zu Acitretin 1997 wieder vom Markt genommen (Nikam et al., 2006; Larsen et al., 1993; Reynolds et al., 2003).

Etretinat zeigte im Gegensatz zu Acitretin keine Wirkung auf den ADAM10-Promotor. Darüber hinaus wurde die RARE-vermittelte Genexpression durch Etretinat ebenfalls nicht beeinflusst. Das bedeutet, dass Etretinat im Gegensatz zu Acitretin nicht zu einer Aktivierung des RAR/RXR-Heterodimers führt. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Aktivierungs-Eigenschaft könnte in der Struktur des Etretinats liegen. Etretinat unterscheidet sich von Acitretin um einen zusätzlichen Ethyl-Ester (s. Abb. 1.11). Die RAR/RXR-Aktivierung durch Acitretin verläuft über die Bindung an das CRABP, wodurch atRA freigesetzt wird und das RAR/RXR-Heterodimer aktiviert (Armstrong et al., 2005). Durch die zusätzliche Ethyl-Ester-Gruppe könnte die Bindungsfähigkeit des Etretinat an das zelluläre Retinsäure-Bindeprotein (CRABP) verloren gegangen sein. Zum Wirkungsmechanismus von Etretinat ist jedoch bisher nichts Genaueres bekannt.

Eine andere Erklärung für die fehlende RAR/RXR-Aktivierung könnte auch in der Metabolisierung von Etretinat liegen. Durch orale Administration von Etretinat konnte in Hunden gezeigt werden, dass Etretinat im Darm und in den Darmepithelzellen verstärkt in Acitretin umgewandelt wird (Bornemann et al., 1988). Daher ließe sich die therapeutische Wirkung von Etretinat durch die Umwandlung in Acitretin erklären. In den SH-SY5Y-Zellen könnte diese Metabolisierung zu Acitretin aufgrund fehlender Faktoren im Wachstumsmedium oder in den Zellen nicht stattgefunden haben.

Die auf zellulärer Ebene beobachtete ADAM10-Stimulation und  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung durch Acitretin sollte im Gehirn der Mäuse im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden.

Die kurzzeitige orale Administration von Acitretin führte jedoch zu keiner Veränderung der ADAM10-Expression im Gehirn und der Leber der Versuchstiere. Dies galt auch für die RAR $\beta$ -Expression, welche zumindest *in vitro* durch atRA stark erhöht wird (Carpentier et al., 1997). Für die fehlende ADAM10- und RAR $\beta$ -Expressionserhöhung könnte es mehrere Ursachen geben. So bleibt unklar, wieviel Acitretin durch die orale Administration in den Blut-Kreislauf gelangt ist. Die Bioverfügbarkeit von Acitretin liegt nach oraler Verabreichung bei 15-90% (Larsen et al., 1992). Die große Spanne entsteht aufgrund unterschiedlichen Mageninhalts, welcher eine Rolle bei der Aufnahme des Retinoids zu spielen scheint, wobei zusätzlich das Lösungsmittel eine wichtige Rolle spielt. So ist die Bioverfügbarkeit von Acitretin gelöst in HPBCD gegenüber der Lösung in CMC um das 3-fache erhöht (Liu et al., 2004). Daher könnte von dem Acitretin gelöst in HPBCD trotz der hohen Bioverfügbarkeit im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln nur ein Teil in den Blutkreislauf gelangt sein. Möglicherweise war auch die Acitretin-Dosis im Zusammenhang

mit dem Verabreichungszeitraum zu niedrig angesetzt. Die Dosis zur Behandlung der Hautkrankheiten beim Menschen liegt bei 0,3 bis 1 mg Acitretin/kg/Tag und erfolgt zum Teil über mehrere Monate (Lee und Koo, 2005). Die Acitretin-Dosis lag im Tierversuch mit 6 mg/kg/Tag deutlich über der beim Menschen verwendeten Menge. Allerdings war der Behandlungszeitraum maximal 5 Tage und könnte daher zu kurz gewesen sein, um Effekte auf die ADAM10-Expression zu erzielen.

Für die Umgehung der limitierenden Faktoren der oralen Acitretinaufnahme, wurde das Retinoid subcutan über einen Zeitraum von 6 Wochen injiziert. Hierbei konnte in der Leber der behandelten Mäuse eine signifikante Erhöhung der Menge an Retinol Bindeprotein (RBP) gemessen werden (s. Abb. 3.45 B). Das RBP wird durch atRA so reguliert, dass bei einem Mangel, wie z.B. bei einer Vitamin A Defizienz, erhöhte Mengen des Transporters gebildet werden (Soprano et al., 1982; Jessen und Satre, 2000). Daher ist denkbar, dass Acitretin in den Zellen der Leber durch Bindung an das CRABP zelluläre atRA freisetzt und durch die so entstandene Leerung der hepatischen Speicher die Expression des RBP stimuliert wurde. Dies wäre zumindest ein Hinweis darauf, dass subcutan injiziertes Acitretin aus dem Blutkreislauf in die Zellen der Leber gelangt ist und dort die Expression Retinoid-gesteuerter Gene beeinflusst hat. Da jedoch die Menge der RAR-Isotypen nicht verändert wurde, welche ebenfalls durch atRA reguliert werden (Carpentier et al., 1997), bleibt unklar, wie Acitretin in den hepatischen Zellen auf den Retinoid-Metabolismus eingewirkt hat. Darüber hinaus fehlt der Nachweis, dass Acitretin die Blut-Hirn-Schranke überwunden hat und in die Neuronen des ZNS eingedrungen ist, obwohl aufgrund der Hydrophobizität des Acitretins eine passive Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke denkbar wäre. Über die Wirkung von Acitretin im Gehirn gibt es bis heute noch keine Untersuchungen. Es wurden bisher nur seltene Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit und Schwindel im Verlauf der Therapie von Hautkrankheiten beschrieben (Nikam et al., 2006). Die Gewebeverteilung von Acitretin ist nicht spezifisch. Acitretin wird schnell über den ganzen Körper verteilt ohne in bestimmten Geweben zu akkumulieren. Bei intravenöser Injektion sind bereits nach 5 Minuten 21% der Ausgangsdosis in der Leber und 22% im Gehirn nachweisbar. Das restliche Acitretin verteilt sich auf die übrigen Gewebe wobei nur 4% in die Haut gelangt wo es anti-proliferativ und anti-inflammatorisch wirkt (Eisenhardt und Bickel, 1994; Nikam et al., 2006). Das bedeutet, dass im Gehirn mehr Acitretin abgelagert wird als in der Haut. Daher sollte die in der Haut beobachtete Wirkung auch im Gehirn zu beobachten sein.

Für einen direkten Transport in das Gehirn wurde Acitretin intranasal appliziert. Lipophile Stoffe werden schnell über den transnasalen Weg in das Gehirn aufgenommen (Vyas et al., 2005). Daher sollte Acitretin aufgrund seiner Hydrophobizität die Blut-Hirn-Schranke über das olfaktorische Epithelium überwinden und in die Cerebrospinalflüssigkeit gelangen

können. Da jedoch auch mit dieser Methode keine Veränderung der APP-Prozessierung erreicht wurde, bleibt unklar ob Acitretin die Blut-Hirn-Schranke mit der hier gewählten Applikationsart überwunden hat.

Allgemein ist zu beachten, dass der Retinoid-Metabolismus und der Retinoid-Signalweg sehr komplex sind. Acitretin könnte verschiedenartig in Retinoid-metabolisierenden Zellen gewirkt haben, wodurch die Stimulation von ADAM10 ausgeglichen wurde. So könnte eine erhöhte Acitretin-Konzentration in hepatischen Zellen zu einer erhöhten intrazellulären atRA-Konzentration geführt haben, welche der Zelle einen Überschuss an atRA signalisiert hat. Daher könnte z.B. über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Sekretion von Retinol gebunden an RBP und TTR vermindert worden sein, wodurch weniger Retinol in das Gehirn transportiert wurde und letztendlich weniger atRA in den Neuronen zur Verfügung stand. Weiterhin ist denkbar, dass durch die Acitretin-basierte Erhöhung der intrazellulären atRA-Konzentration die Expression der RBP- oder TTR-Rezeptoren über einen negativen Rückkopplungsmechanismus in den Gehirn-Endothelzellen vermindert wurde, wodurch weniger Retinol über die Blut-Hirn-Schranke zu den Neuronen transportiert wurde. Die so verminderte atRA-Menge in den Neuronen könnte die erhöhte atRA-Verdrängung von den CRABPs durch Acitretin normalisiert haben, so dass keine Stimulation der ADAM10-Promotoraktivität erfolgte. Daher sind für die Acitretin-basierte Therapie der Alzheimer-Erkrankungen weitere Untersuchungen zum Verständnis der Zusammenhänge in den Wirkungsmechanismen der Retinoide notwendig. Hierfür wäre zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke z.B. die gezielte hippocampale Injektion von Acitretin durch stereotaktische Injektion denkbar.

Generell bieten die Retinoide wie Acitretin einen guten Ausgangspunkt für eine therapeutische Anwendung zur Bekämpfung der Alzheimer-Krankheit. So bewirken Retinoide z.B. eine Inhibierung der A $\beta$ -Fibrillenbildung (Ono et al., 2004), eine Verminderung der Inflammations-auslösenden Mikrogliazellen im Gehirn (Shankaran et al., 2007) und eine Erhöhung der Menge an IDE (Insulin degradierendes Enzym), welches A $\beta$ -Peptide abbaut (Kurochkin und Goto, 1994). Weiterhin wurde die Sicherheit des synthetischen Retinoids Acitretin zur Verwendung als Langzeittherapeutikum durch die über 20-jährige medizinische Anwendung ausreichend geprüft.

## 5. Zusammenfassung

Die Stimulation der APP-prozessierenden  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 eröffnet eine vielversprechende Möglichkeit zur medizinischen Behandlung der Alzheimer-Krankheit. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Strategien zur therapeutischen Aktivierung von ADAM10 verfolgt: Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAC1 durch PACAP, die Gentherapie mit ADAM10-cDNA und die ADAM10-Promotorstimulation durch Retinoid-Rezeptor-Aktivierung.

PACAP-38 stimuliert die  $\alpha$ -Sekretase-vermittelte APP $\alpha$ -Sekretion in humanen Neuroblastomzellen. Durch Aktivierung des PAC-1-Rezeptors via intranasal verabreichtem PACAP-38, konnte eine erhöhte  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung bzw. verminderte Ablagerung von amyloiden Plaques in Mäusen gezeigt werden.

Weiterhin sollte durch Immunliposomen-basierte Transfektion die humane ADAM10-cDNA in den Neuronen der Maus überexprimiert werden. Hiefür wurde die DNA in Liposomen eingeschlossen, welche an ihrer Oberfläche mit anti-Transferrin-Antikörpern zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke gekoppelt waren. Für die Herstellung des DNA-Transportsystems wurden die Einzelschritte wie DNA-Einschluss mit einem Reportergen-Vektor, Konjugation mit verschiedenen Antikörpern und Größe der Liposomen erprobt und optimiert. Es konnte allerdings weder *in vitro* noch *in vivo* eine Immunliposomen-vermittelte Transfektion nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde zudem die Retinoid-basierte Expressionssteigerung von ADAM10 untersucht. Dafür wurden die beiden potentiellen Retinoid-Rezeptor-Bindestellen auf dem ADAM10-Promotor durch Verwendung selektiver nukleärer Rezeptor-Agonisten charakterisiert. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass der ADAM10-Promotor durch ein Dimer der nukleären Rezeptoren RAR und RXR aktiviert wird, wodurch eine erhöhte  $\alpha$ -sekretorischen APP-Prozessierung in Neuroblastoma-Zellen resultiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die RAR/RXR-Heterodimeraktivierung sowohl auf dem humanen wie auf dem murinen ADAM10-Promotor identisch ist, so dass am Mausmodell entwickelte Retinoid-basierte Therapien auf den Menschen übertragbar sind. Für das Modell einer solchen Therapie wurde Acitretin verwendet, welches für die medizinische Behandlung humaner Hautkrankheiten seit Jahrzehnten eingesetzt wird. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Acitretin in humanen und murinen Neuroblastoma-Zellen die Menge an ADAM10 erhöht, wodurch die  $\alpha$ -sekretorische APP-Prozessierung gesteigert wird. Zudem wurden Mäuse mit Acitretin oral, subcutan und intranasal behandelt, wobei jedoch weder eine Veränderung in der APP-Prozessierung noch der Blut-Hirn-Transport von Acitretin eindeutig belegt werden konnten. Dennoch erschließt die  $\alpha$ -Sekretase-erhöhende Eigenschaft von Acitretin einen neuen Therapieansatz, zur Behandlung von Demenzformen vom Typ des Morbus Alzheimer.

## 6. Abstract

The stimulation of the APP-cleaving  $\alpha$ -secretase ADAM10 opens a promising approach for the medical treatment of Alzheimer's disease. Three different strategies for the activation of the  $\alpha$ -secretase expression were used in this research: (i) mediation through PACAP induced signalling of the G-protein-coupled-receptor PAC1, (ii) gene therapy with ADAM10-cDNA and (iii) stimulation of the ADAM10-promoter by activation of the retinoid receptors.

PACAP-38 stimulates the  $\alpha$ -secretase-mediated secretion of APPs $\alpha$  in human neuroblastoma cells. By activation of the PAC1-receptor via intranasally administrated PACAP-38, an increased  $\alpha$ -secretory processing of APP, and a decreased amount of amyloid deposits in mice was demonstrated.

Furthermore, human ADAM10-cDNA was supposed to be overexpressed by immunoliposome-mediated transfection of mouse brain neurons. Therefore, DNA was encapsulated in liposomes coated with anti-transferrin antibodies to pass the blood-brain-barrier. For preparation of the DNA-transport system, the producing-steps like inclusion of reporter genes, antibody conjugation and liposome size had been tested and optimized. However, no transfection of murine cells in vitro and in vivo by immunoliposomes was observed.

As the major part of the thesis, the retinoid-mediated stimulation of ADAM10 expression was examined. Therefore, the two potential retinoid receptor binding sites on the ADAM10-promoter were characterized by using selective agonists of nuclear receptors. It could be demonstrated for the first time that the ADAM10-promoter is activated by a dimer of the nuclear receptors RAR and RXR, followed by an increased  $\alpha$ -secretory shedding of APP. In addition, the results indicate an identical RAR/RXR-based activation of either human or mouse ADAM10 promoter which opens the possibility to transfer retinoid-based therapies from mouse to humans. To develop such a therapy, acitretin, a drug already applied for medical treatment of skin diseases was used. For the first time acitretin was demonstrated to increase the amount of ADAM10 in murine as well as human neuroblastoma cells, which leads to an increased  $\alpha$ -secretory shedding of APP. In addition, mice were treated with acitretin via oral, subcutaneous and intranasal administration. However, neither changes in APP-processing nor evidence for a blood-brain-transport of acitretin were observed. Nevertheless, due to its  $\alpha$ -secretase-enhancing properties, it will be interesting to examine whether acitretin might be useful for enhancing cognitive performance and memory function in dementia like Alzheimer's disease.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abe,A., Poucher,H.K., Hiraoka,M., and Shayman,J.A. (2004). Induction of lysosomal phospholipase A2 through the retinoid X receptor in THP-1 cells. *J.Lipid Res.* **45**, 667-673.
2. Allemann,E., Gravel,P., Leroux,J.C., Balant,L., and Gurny,R. (1997). Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement. *J.Biomed.Mater.Res.* **37**, 229-234.
3. Alvarez,R., Vega,M.J., Kammerer,S., Rossin,A., Germain,P., Gronemeyer,H., and de Lera,A.R. (2004). 9-cis-retinoic acid analogues with bulky hydrophobic rings: new RXR-selective agonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **14**, 6117-6122.
4. Alzheimer,A.(1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und physisch-Gerichtliche Medizin (Berlin)* **64**, 146-148.
5. Amour,A., Knight,C.G., Webster,A., Slocombe,P.M., Stephens,P.E., Knauper,V., Docherty,A.J., and Murphy,G. (2000). The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* **473**, 275-279.
6. Anders,A., Gilbert,S., Garten,W., Postina,R., and Fahrenholz,F. (2001). Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* **15**, 1837-1839.
7. Aranda,A. and Pascual,A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* **81**, 1269-1304.
8. Arendash,G.W., Jensen,M.T., Salem,N., Jr., Hussein,N., Cracchiolo,J., Dickson,A., Leighty,R., and Potter,H. (2007). A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. *Neuroscience* **149**, 286-302.
9. Armstrong,J.L., Ruiz,M., Boddy,A.V., Redfern,C.P., Pearson,A.D., and Veal,G.J. (2005). Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br.J.Cancer* **92**, 696-704.
10. Artursson,P., Lindmark,T., Davis,S.S., and Illum,L. (1994). Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm.Res.* **11**, 1358-1361.
11. Barron,L.G., Uyechi,L.S., and Szoka,F.C., Jr. (1999). Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther.* **6**, 1179-1183.
12. Barrow,C.J. and Zagorski,M.G. (1991). Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* **253**, 179-182.
13. Bastien,J. and Rochette-Egly,C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**, 1-16.
14. Bayon,Y., Ortiz,M.A., Lopez-Hernandez,F.J., Gao,F., Karin,M., Pfahl,M., and Piedrafita,F.J. (2003). Inhibition of I $\kappa$ B kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis. *Mol.Cell Biol.* **23**, 1061-1074.
15. Begley,D.J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol.Ther.* **104**, 29-45.
16. Belandia,B., Latasa,M.J., Villa,A., and Pascual,A. (1998). Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J.Biol.Chem.* **273**, 30366-30371.
16. Bell,K.F., Zheng,L., Fahrenholz,F., and Cuello,A.C. (2008). ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol.Aging* **29**, 554-565.
17. Blobel,C.P. (1997). Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* **90**, 589-592.
18. Blomhoff,R. (1994). Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr.Rev.* **52**, S13-S23.

19. Blomhoff,R. and Blomhoff,H.K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *J.Neurobiol.* 66, 606-630.
20. Blomhoff,R., Green,M.H., Berg,T., and Norum,K.R. (1990). Transport and storage of vitamin A. *Science* 250, 399-404.
21. Blomhoff,R., Helgerud,P., Rasmussen,M., Berg,T., and Norum,K.R. (1982). In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79, 7326-7330.
22. Bollag,W. (1974). Therapeutic effects of an aromatic retinoic acid analog on chemically induced skin papillomas and carcinomas of mice. *Eur.J.Cancer* 10, 731-737.
23. Bollag,W. (1975). Prophylaxis of chemically induced epithelial tumors with an aromatic retinoic acid analog (Ro 10-9359). *Eur.J.Cancer* 11, 721-724.
24. Bornemann,L.D., Cotler,S., Khoo,K.C., Carbone,J.J., and Colburn,W.A. (1988). Effect of route of administration on the pharmacokinetics of etretinate in the dog. *Biopharm.Drug Dispos.* 9, 119-126.
25. Boudjelal,M., Wang,Z., Voorhees,J.J., and Fisher,G.J. (2000). Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha in human keratinocytes. *Cancer Res.* 60, 2247-2252.
26. Bourguet,W., Vivat,V., Wurtz,J.M., Chambon,P., Gronemeyer,H., and Moras,D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol.Cell* 5, 289-298.
27. Boylan,J.F. and Gudas,L.J. (1992). The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J.Biol.Chem.* 267, 21486-21491.
28. Braak,H. and Braak,E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
29. Brigham,K.L., Meyrick,B., Christman,B., Magnuson,M., King,G., and Berry,L.C., Jr. (1989). In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am.J.Med.Sci.* 298, 278-281.
30. Brown,M.D., Schatzlein,A.G., and Uchegbu,I.F. (2001). Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int.J.Pharm.* 229, 1-21.
31. Budagian,V., Bulanova,E., Orinska,Z., Duitman,E., Brandt,K., Ludwig,A., Hartmann,D., Lemke,G., Saftig,P., and Bulfone-Paus,S. (2005). Soluble Axl is generated by ADAM10-dependent cleavage and associates with Gas6 in mouse serum. *Mol.Cell Biol.* 25, 9324-9339.
32. Buxbaum,J.D., Liu,K.N., Luo,Y., Slack,J.L., Stocking,K.L., Peschon,J.J., Johnson,R.S., Castner,B.J., Cerretti,D.P., and Black,R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J.Biol.Chem.* 273, 27765-27767.
33. Buxbaum,J.N., Ye,Z., Reixach,N., Friske,L., Levy,C., Das,P., Golde,T., Masliah,E., Roberts,A.R., and Bartfai,T. (2008). Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Abeta toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 2681-2686.
34. Caccamo,A., Oddo,S., Billings,L.M., Green,K.N., Martinez-Coria,H., Fisher,A., and LaFerla,F.M. (2006). M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49, 671-682.
35. Cachard-Chastel,M., Lezoualc'h,F., Dewachter,I., Delomenie,C., Croes,S., Devijver,H., Langlois,M., van Leuven,F., Sicsic,S., and Gardier,A.M. (2007). 5-HT4 receptor agonists increase sAPPalpha levels in the cortex and hippocampus of male C57BL/6j mice. *Br.J.Pharmacol.* 150, 883-892.
36. Camacho,I.E., Serneels,L., Spittaels,K., Merchiers,P., Dominguez,D., and de Strooper,B. (2004). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. *J.Neurosci.* 24, 10908-10917.

37. Cardoso, J.C., Vieira, F.A., Gomes, A.S., and Power, D.M. (2007). PACAP, VIP and their receptors in the metazoa: insights about the origin and evolution of the ligand-receptor pair. *Peptides* 28, 1902-1919.
38. Carpentier, A., Balitrand, N., Rochette-Egly, C., Shroot, B., Degos, L., and Chomienne, C. (1997). Distinct sensitivity of neuroblastoma cells for retinoid receptor agonists: evidence for functional receptor heterodimers. *Oncogene* 15, 1805-1813.
39. Cedazo-Minguez, A., Hamker, U., Meske, V., Veh, R.W., Hellweg, R., Jacobi, C., Albert, F., Cowburn, R.F., and Ohm, T.G. (2001). Regulation of apolipoprotein E secretion in rat primary hippocampal astrocyte cultures. *Neuroscience* 105, 651-661.
40. Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.
41. Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
42. Chen, C.D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S.E., and Abraham, C.R. (2007). Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 19796-19801.
43. Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., and Evans, R.M. (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21, 1353-1361.
44. Cho, H.W., Kim, J.H., Choi, S., and Kim, H.J. (2006). Phospholipase A2 is involved in muscarinic receptor-mediated sAPPalpha release independently of cyclooxygenase or lipoxygenase activity in SH-SY5Y cells. *Neurosci.Lett.* 397, 214-218.
45. Chu, C., Zhang, Y., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2006). Decline in exogenous gene expression in primate brain following intravenous administration is due to plasmid degradation. *Pharm.Res.* 23, 1586-1590.
46. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
47. Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat.Neurosci.* 8, 79-84.
48. Clement, A.B., Hanstein, R., Schroder, A., Nagel, H., Endres, K., Fahrenholz, F., and Behl, C. (2008). Effects of neuron-specific ADAM10 modulation in an in vivo model of acute excitotoxic stress. *Neuroscience* 152, 459-468.
49. Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., and Fadda, F. (2002). Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475-482.
50. Connor, M.J. and Sidell, N. (1997). Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol.Chem.Neuropathol.* 30, 239-252.
51. Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.W., Kovacina, K.S., and Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am.J.Pathol.* 162, 313-319.
52. Corcoran, J., So, P.L., and Maden, M. (2002). Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients. *J.Cell Sci.* 115, 4735-4741.
53. Corcoran, J.P., So, P.L., and Maden, M. (2004). Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur.J.Neurosci.* 20, 896-902.

54. Crandall,J., Sakai,Y., Zhang,J., Koul,O., Mineur,Y., Crusio,W.E., and McCaffery,P. (2004). 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 5111-5116.
55. Culvenor,J.G., Evin,G., Cooney,M.A., Wardan,H., Sharples,R.A., Maher,F., Reed,G., Diehlmann,A., Weidemann,A., Beyreuther,K., and Masters,C.L. (2000). Presenilin 2 expression in neuronal cells: induction during differentiation of embryonic carcinoma cells. *Exp.Cell Res.* 255, 192-206.
56. Czech,C., Burns,M.P., Vardanian,L., Augustin,A., Jacobsen,H., Baumann,K., and Rebeck,G.W. (2007). Cholesterol independent effect of LXR agonist TO-901317 on gamma-secretase. *J.Neurochem.* 101, 929-936.
56. Cziir,E., Cottrell,B.A., Leuchtenberger,S., Kukar,T., Ladd,T.B., Esselmann,H., Paul,S., Schubel,R., Torpey,J.W., Pietrzik,C.U., Golde,T.E., Wiltfang,J., Baumann,K., Koo,E.H., and Weggen,S. (2008). Independent generation of Abeta42 and Abeta38 peptide species by gamma-secretase. *J.Biol.Chem.* 283, 17049-17054.
57. Dagert,M. and Ehrlich,S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6, 23-28.
58. Dahlgren,K.N., Manelli,A.M., Stine,W.B., Jr., Baker,L.K., Krafft,G.A., and LaDu,M.J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J.Biol.Chem.* 277, 32046-32053.
59. Davies,P. and Maloney,A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
60. de Craen,A.J., Gussekloo,J., Vrijsen,B., and Westendorp,R.G. (2005). Meta-analysis of nonsteroidal antiinflammatory drug use and risk of dementia. *Am.J.Epidemiol.* 161, 114-120.
61. de Strooper,B., Annaert,W., Cupers,P., Saftig,P., Craessaerts,K., Mumm,J.S., Schroeter,E.H., Schrijvers,V., Wolfe,M.S., Ray,W.J., Goate,A., and Kopan,R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
62. de Urquiza,A.M., Liu,S., Sjoberg,M., Zetterstrom,R.H., Griffiths,W., Sjoval,J., and Perlmann,T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
63. DeLuca,H.F. (1990). Osteoporosis and the metabolites of vitamin D. *Metabolism* 39, 3-9.
64. Desvergne,B., Michalik,L., and Wahli,W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 86, 465-514.
65. DiGiovanna,J.J., Zech,L.A., Ruddel,M.E., Gantt,G., and Peck,G.L. (1989). Etretinate. Persistent serum levels after long-term therapy. *Arch.Dermatol.* 125, 246-251.
66. Dogrukol-Ak,D., Tore,F., and Tuncel,N. (2004). Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Curr.Pharm.Des* 10, 1325-1340.
67. Drover,V.A., Wong,N.C., and Agellon,L.B. (2002). A distinct thyroid hormone response element mediates repression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene promoter. *Mol.Endocrinol.* 16, 14-23.
68. Dufes,C., Olivier,J.C., Gaillard,F., Gaillard,A., Couet,W., and Muller,J.M. (2003). Brain delivery of vasoactive intestinal peptide (VIP) following nasal administration to rats. *Int.J.Pharm.* 255, 87-97.
69. Ehehalt,R., Keller,P., Haass,C., Thiele,C., and Simons,K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J.Cell Biol.* 160, 113-123.
70. Eichele,G. (1997). Retinoids: from hindbrain patterning to Parkinson disease. *Trends Genet.* 13, 343-345.
71. Eisenhardt,E.U. and Bickel,M.H. (1994). Kinetics of tissue distribution and elimination of retinoid drugs in the rat. I. Acitretin. *Drug Metab Dispos.* 22, 26-30.

72. Ekins,S., Mirny,L., and Schuetz,E.G. (2002). A ligand-based approach to understanding selectivity of nuclear hormone receptors PXR, CAR, FXR, LXRalpha, and LXRbeta. *Pharm.Res.* 19, 1788-1800.
73. Ellis,E., Goodwin,B., Abrahamsson,A., Liddle,C., Mode,A., Rudling,M., Bjorkhem,I., and Einarsson,C. (1998). Bile acid synthesis in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Hepatology* 27, 615-620.
74. 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.
75. Esch,F.S., Keim,P.S., Beattie,E.C., Blacher,R.W., Culwell,A.R., Oltersdorf,T., McClure,D., and Ward,P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
76. Etchamendy,N., Enderlin,V., Marighetto,A., Pallet,V., Higuere,P., and Jaffard,R. (2003). Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav.Brain Res.* 145, 37-49.
77. Etcheberrigaray,R., Tan,M., Dewachter,I., Kuiperi,C., Van,d.A., I, Wera,S., Qiao,L., Bank,B., Nelson,T.J., Kozikowski,A.P., van Leuven,F., and Alkon,D.L. (2004). Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 11141-11146.
78. Fahrenholz,F., Gilbert,S., Kojro,E., Lammich,S., and Postina,R. (2000). Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 920, 215-222.
79. Fahrenholz,F. (2007). Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr.Alzheimer Res.* 4, 412-417.
79. Fan,Y.Y., Spencer,T.E., Wang,N., Moyer,M.P., and Chapkin,R.S. (2003). Chemopreventive n-3 fatty acids activate RXRalpha in colonocytes. *Carcinogenesis* 24, 1541-1548.
80. Felgner,P.L., Gadek,T.R., Holm,M., Roman,R., Chan,H.W., Wenz,M., Northrop,J.P., Ringold,G.M., and Danielsen,M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 7413-7417.
81. FINDER,V.H. and GLOCKSHUBER,R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener.Dis.* 4, 13-27.
82. Franzke,C.W., Tasanen,K., Schacke,H., Zhou,Z., Tryggvason,K., Mauch,C., Zigrino,P., Sunnarborg,S., Lee,D.C., Fahrenholz,F., and Bruckner-Tuderman,L. (2002). Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* 21, 5026-5035.
83. Freund-Levi,Y., Eriksdotter-Jonhagen,M., Cederholm,T., Basun,H., Faxen-Irving,G., Garlind,A., Vedin,I., Vessby,B., Wahlund,L.O., and Palmblad,J. (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch.Neurol.* 63, 1402-1408.
84. Galli,C., Piccini,A., Ciotti,M.T., Castellani,L., Calissano,P., Zaccheo,D., and Tabaton,M. (1998). Increased amyloidogenic secretion in cerebellar granule cells undergoing apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 1247-1252.
85. Gani,O.A. and Sylte,I. (2008). Molecular recognition of Docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. *J.Mol.Graph.Model.*
86. Gao,Y. and Pimplikar,S.W. (2001). The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 14979-14984.
87. Gardlik,R., Palfy,R., Hodossy,J., Lukacs,J., Turna,J., and Celec,P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med.Sci.Monit.* 11, RA110-RA121.
88. Geubel,A.P., De Galocsy,C., Alves,N., Rahier,J., and Dive,C. (1991). Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration: estimate of dose-related toxicity in 41 cases. *Gastroenterology* 100, 1701-1709.

89. Gezen-Ak,D., Dursun,E., Ertan,T., Hanagasi,H., Gurvit,H., Emre,M., Eker,E., Ozturk,M., Engin,F., and Yilmazer,S. (2007). Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J.Exp.Med.* *212*, 275-282.
90. Ghosh,A.K., Kumaragurubaran,N., Hong,L., Koelsh,G., and Tang,J. (2008). Memapsin 2 (Beta-secretase) inhibitors: drug development. *Curr.Alzheimer Res.* *5*, 121-131.
91. Giardino,L., Bettelli,C., and Calza,L. (2000). In vivo regulation of precursor cells in the subventricular zone of adult rat brain by thyroid hormone and retinoids. *Neurosci.Lett.* *295*, 17-20.
92. Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* *14*, 121-141.
93. Glenner,G.G., Wong,C.W., Quaranta,V., and Eanes,E.D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl.Pathol.* *2*, 357-369.
94. Goate,A., Chartier-Harlin,M.C., Mullan,M., Brown,J., Crawford,F., Fidani,L., Giuffra,L., Haynes,A., Irving,N., James,L., and . (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* *349*, 704-706.
95. Goodman,A.B. (1998). Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *95*, 7240-7244.
96. Goodman,A.B. and Pardee,A.B. (2003). Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *100*, 2901-2905.
97. Gough,P.J., Garton,K.J., Wille,P.T., Rychlewski,M., Dempsey,P.J., and Raines,E.W. (2004). A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J.Immunol.* *172*, 3678-3685.
98. Gozes,I., Bardea,A., Reshef,A., Zamostiano,R., Zhukovsky,S., Rubinraut,S., Fridkin,M., and Brenneman,D.E. (1996). Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *93*, 427-432.
99. Gref,R., Luck,M., Quellec,P., Marchand,M., Dellacherie,E., Harnisch,S., Blunk,T., and Muller,R.H. (2000). 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf.B Biointerfaces.* *18*, 301-313.
100. Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., Quinlan,M., Tung,Y.C., Zaidi,M.S., and Wisniewski,H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J.Biol.Chem.* *261*, 6084-6089.
101. Haas,C., Koo,E.H.,Mellon,A., Hung, A.Y., Selkoe,D.J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes:alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* *357*, 500-503
101. Hakulinen,J. and Keski-Oja,J. (2006). ADAM10-mediated release of complement membrane cofactor protein during apoptosis of epithelial cells. *J.Biol.Chem.* *281*, 21369-21376.
102. Hardy,J. and Selkoe,D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353-356.
103. Harmon,M.A., Boehm,M.F., Heyman,R.A., and Mangelsdorf,D.J. (1995). Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *92*, 6157-6160.
104. Hartley,D.M., Walsh,D.M., Ye,C.P., Diehl,T., Vasquez,S., Vassilev,P.M., Teplow,D.B., and Selkoe,D.J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J.Neurosci.* *19*, 8876-8884.
105. Hartmann,D., de Strooper,B., Serneels,L., Craessaerts,K., Herreman,A., Annaert,W., Umans,L., Lubke,T., Lena,I.A., von Figura,K., and Saftig,P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum.Mol.Genet.* *11*, 2615-2624.

106. Hattori,M., Osterfield,M., and Flanagan,J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* *289*, 1360-1365.
107. Heber,S., Herms,J., Gajic,V., Hainfellner,J., Aguzzi,A., Rulicke,T., von Kretschmar,H., von Koch,C., Sisodia,S., Tremml,P., Lipp,H.P., Wolfer,D.P., and Muller,U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J.Neurosci.* *20*, 7951-7963.
108. Heneka,M.T. and Landreth,G.E. (2007). PPARs in the brain. *Biochim.Biophys.Acta* *1771*, 1031-1045.
109. Hernandez-Pinto,A.M., Puebla-Jimenez,L., and Arilla-Ferreiro,E. (2006). A vitamin A-free diet results in impairment of the rat hippocampal somatostatinergic system. *Neuroscience* *141*, 851-861.
110. Heyman,R.A., Mangelsdorf,D.J., Dyck,J.A., Stein,R.B., Eichele,G., Evans,R.M., and Thaller,C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* *68*, 397-406.
111. Hiroi,Y., Kim,H.H., Ying,H., Furuya,F., Huang,Z., Simoncini,T., Noma,K., Ueki,K., Nguyen,N.H., Scanlan,T.S., Moskowitz,M.A., Cheng,S.Y., and Liao,J.K. (2006). Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *103*, 14104-14109.
112. Hoe,H.S., Cooper,M.J., Burns,M.P., Lewis,P.A., van der,B.M., Chakraborty,G., Cartagena,C.M., Pak,D.T., Cookson,M.R., and Rebeck,G.W. (2007). The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J.Neurosci.* *27*, 10895-10905.
113. Holback,S., Adlerz,L., Gatsinzi,T., Jacobsen,K.T., and Iverfeldt,K. (2008). PI3-K- and PKC-dependent up-regulation of APP processing enzymes by retinoic acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *365*, 298-303.
114. Holmes,D.S. and Quigley,M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* *114*, 193-197.
115. Houck,K.A., Borchert,K.M., Hepler,C.D., Thomas,J.S., Bramlett,K.S., Michael,L.F., and Burris,T.P. (2004). T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol.Genet.Metab* *83*, 184-187.
116. Hundhausen,C., Misztela,D., Berkhout,T.A., Broadway,N., Saftig,P., Reiss,K., Hartmann,D., Fahrenholz,F., Postina,R., Matthews,V., Kallen,K.J., Rose-John,S., and Ludwig,A. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* *102*, 1186-1195.
117. Hung,A.Y., Haass,C., Nitsch,R.M., Qiu,W.Q., Citron,M., Wurtman,R.J., Growdon,J.H., and Selkoe,D.J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J.Biol.Chem.* *268*, 22959-22962.
118. Hussain,I., Powell,D., Howlett,D.R., Tew,D.G., Meek,T.D., Chapman,C., Gloger,I.S., Murphy,K.E., Southan,C.D., Ryan,D.M., Smith,T.S., Simmons,D.L., Walsh,F.S., Dingwall,C., and Christie,G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol.Cell Neurosci.* *14*, 419-427.
119. Husson,M., Enderlin,V., Delacourte,A., Ghenimi,N., Alfos,S., Pallet,V., and Huguere,P. (2006). Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol.Dis.* *23*, 1-10.
120. Hutton,M., Lendon,C.L., 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,R.C., Stevens,M., de Graaff,E., Wauters,E., van Baren,J., Hillebrand,M., Joosse,M., Kwon,J.M., Nowotny,P., Che,L.K., Norton,J., Morris,J.C., Reed,L.A., Trojanowski,J., Basun,H., Lannfelt,L., Neystat,M., Fahn,S., Dark,F., Tannenberg,T., Dodd,P.R., Hayward,N., Kwok,J.B., Schofield,P.R., Andreadis,A., Snowden,J., Craufurd,D., Neary,D., Owen,F., Oostra,B.A., Hardy,J., Goate,A., van Swieten,J., Mann,D., Lynch,T., and Heutink,P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* *393*, 702-705.
121. Hylemon,P.B., Gurley,E.C., Stravitz,R.T., Litz,J.S., Pandak,W.M., Chiang,J.Y., and Vlahcevic,Z.R. (1992). Hormonal regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA levels and transcriptional activity in primary rat hepatocyte cultures. *J.Biol.Chem.* *267*, 16866-16871.

122. Iniguez,M.A., Morte,B., Rodriguez-Pena,A., Munoz,A., Gerendasy,D., Sutcliffe,J.G., and Bernal,J. (1994). Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res.Mol.Brain Res.* 27, 205-214.
123. Iqbal,K. and Grundke-Iqbal,I. (2007). Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. *Cell Mol.Life Sci.* 64, 2234-2244.
124. Jehan,F., Naveilhan,P., Neveu,I., Harvie,D., Dicou,E., Brachet,P., and Wion,D. (1996). Regulation of NGF, BDNF and LNGFR gene expression in ROS 17/2.8 cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 116, 149-156.
125. Jellinger,K.A. (2006). Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *J.Neural Transm.* 113, 1603-1623.
126. Jessen,K.A. and Satre,M.A. (2000). Mouse retinol binding protein gene: cloning, expression and regulation by retinoic acid. *Mol.Cell Biochem.* 211, 85-94.
127. Jimenez-Jimenez,F.J., Molina,J.A., de Bustos,F., Orti-Pareja,M., Benito-Leon,J., Tallon-Barranco,A., Gasalla,T., Porta,J., and Arenas,J. (1999). Serum levels of beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A in patients with Alzheimer's disease. *Eur.J.Neurol.* 6, 495-497.
128. Jonsson,L. and Berr,C. (2005). Cost of dementia in Europe. *Eur.J.Neurol.* 12 *Suppl* 1, 50-53.
129. Kang,J., Lemaire,H.G., Unterbeck,A., Salbaum,J.M., Masters,C.L., Grzeschik,K.H., Multhaup,G., Beyreuther,K., and Muller-Hill,B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
130. Kibbey,M.C., Jucker,M., Weeks,B.S., Neve,R.L., Van Nostrand,W.E., and Kleinman,H.K. (1993). beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 10150-10153.
131. Kim,H.K., Della-Fera,M., Lin,J., and Baile,C.A. (2006). Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J.Nutr.* 136, 2965-2969.
132. Kim,N.H., Park,H.M., Chung,S.Y., Go,E.J., and Lee,H.J. (2004). Immunoliposomes carrying plasmid DNA: preparation and characterization. *Arch.Pharm.Res.* 27, 1263-1269.
133. Kissel,K., Hamm,S., Schulz,M., Vecchi,A., Garlanda,C., and Engelhardt,B. (1998). Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem.Cell Biol.* 110, 63-72.
134. Klaholz,B.P., Renaud,J.P., Mitschler,A., Zusi,C., Chambon,P., Gronemeyer,H., and Moras,D. (1998). Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma. *Nat.Struct.Biol.* 5, 199-202.
135. Kobayashi,M., Matsuoka,I., and Kurihara,K. (1994). Cholinergic differentiation of cultured sympathetic neurons induced by retinoic acid. Induction of choline acetyltransferase-mRNA and suppression of tyrosine hydroxylase-mRNA levels. *FEBS Lett.* 337, 259-264.
136. Koike,H., Tomioka,S., Sorimachi,H., Saido,T.C., Maruyama,K., Okuyama,A., Fujisawa-Sehara,A., Ohno,S., Suzuki,K., and Ishiura,S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem.J.* 343 *Pt* 2, 371-375.
137. Kojro,E., Gimpl,G., Lammich,S., Marz,W., and 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.
138. Kojro,E., Postina,R., Buro,C., Meiringer,C., Gehrig-Burger,K., and Fahrenholz,F. (2006). The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB J.* 20, 512-514.
139. Kojro, E., Postina, R., Tippmann, F., Wiczczak, E., Dewachter, I., Van Leuven, F. and Fahrenholz, F. (2007). The neuropeptide PACAP acts as á-secretase activator in vitro and in vivo. In: Kh.Iqbal, B.Winblad, J.Avila, (Eds.), Alzheimer's disease: new advances.10th International conference on and related disorders (Madrid, 16-20 July 2006).Medimond S.r.l., Bologna, 2007, 335-339.

140. Koldamova,R.P., Leferov,I.M., Ikonovic,M.D., Skoko,J., Leferov,P.I., Isanski,B.A., DeKosky,S.T., and Lazo,J.S. (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J.Biol.Chem.* 278, 13244-13256.
141. Koldamova,R.P., Leferov,I.M., Staufenbiel,M., Wolfe,D., Huang,S., Glorioso,J.C., Walter,M., Roth,M.G., and Lazo,J.S. (2005). The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J.Biol.Chem.* 280, 4079-4088.
142. Koltover,I., Salditt,T., Radler,J.O., and Safinya,C.R. (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* 281, 78-81.
143. Kowalski,T.E., Falestin,M., Furth,E., and Malet,P.F. (1994). Vitamin A hepatotoxicity: a cautionary note regarding 25,000 IU supplements. *Am.J.Med.* 97, 523-528.
144. Krezel,W., Ghyselink,N., Samad,T.A., Dupe,V., Kastner,P., Borrelli,E., and Chambon,P. (1998). Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279, 863-867.
145. Kurochkin,I.V. and Goto,S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345, 33-37.
146. Kwoh,D.Y., Coffin,C.C., Lollo,C.P., Jovenal,J., Banaszczyk,M.G., Mullen,P., Phillips,A., Amini,A., Fabrycki,J., Bartholomew,R.M., Brostoff,S.W., and Carlo,D.J. (1999). Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. *Biochim.Biophys.Acta* 1444, 171-190.
147. Laffitte,B.A., Repa,J.J., Joseph,S.B., Wilpitz,D.C., Kast,H.R., Mangelsdorf,D.J., and Tontonoz,P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 507-512.
148. Lahiri,D.K. (1995). Molecular analysis of the promoter region of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein. *Indian J.Biochem.Biophys.* 32, 329-335.
149. Lammich,S., Kojro,E., Postina,R., Gilbert,S., Pfeiffer,R., Jasionowski,M., Haass,C., and 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.
150. Lammich,S., Schobel,S., Zimmer,A.K., Lichtenthaler,S.F., and Haass,C. (2004). Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep.* 5, 620-625.
150. Lane,M.A. and Bailey,S.J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog.Neurobiol.* 75, 275-293.
151. Langmade,S.J., Gale,S.E., Frolov,A., Mohri,I., Suzuki,K., Mellon,S.H., Walkley,S.U., Covey,D.F., Schaffer,J.E., and Ory,D.S. (2006). Pregnane X receptor (PXR) activation: a mechanism for neuroprotection in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 13807-13812.
152. Lansbury,P.T., Jr. (1999). Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 3342-3344.
153. Larsen,F.G., Jakobsen,P., Knudsen,J., Weismann,K., Kragballe,K., and Nielsen-Kudsk,F. (1993). Conversion of acitretin to etretinate in psoriatic patients is influenced by ethanol. *J.Invest Dermatol.* 100, 623-627.
154. Larsen,F.G., Nielsen-Kudsk,F., Jakobsen,P., Weismann,K., and Kragballe,K. (1992). Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of retinoids in skin diseases. *Clin.Pharmacokinet.* 23, 42-61.
155. Latasa,M.J., Belandia,B., and Pascual,A. (1998). Thyroid hormones regulate beta-amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells. *Endocrinology* 139, 2692-2698.
156. Lee,C.S. and Koo,J. (2005). A review of acitretin, a systemic retinoid for the treatment of psoriasis. *Expert.Opin.Pharmacother.* 6, 1725-1734.

157. Lee,H.J., Engelhardt,B., Lesley,J., Bickel,U., and Pardridge,W.M. (2000). Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 292, 1048-1052.
158. Lee,M.S., Kliewer,S.A., Provencal,J., Wright,P.E., and Evans,R.M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260, 1117-1121.
159. Leid,M., Kastner,P., and Chambon,P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem.Sci.* 17, 427-433.
160. Lengqvist,J., Mata,D.U., Bergman,A.C., Willson,T.M., Sjovall,J., Perlmann,T., and Griffiths,W.J. (2004). Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol.Cell Proteomics.* 3, 692-703.
161. Lesley,J., Hyman,R., Schulte,R., and Trotter,J. (1984). Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. *Cell Immunol.* 83, 14-25.
162. Lesne,S., Koh,M.T., Kotilinek,L., Kaye,R., Glabe,C.G., Yang,A., Gallagher,M., and Ashe,K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352-357.
163. Levin,A.A., Sturzenbecker,L.J., Kazmer,S., Bosakowski,T., Huselton,C., Allenby,G., Speck,J., Kratzeisen,C., Rosenberger,M., Lovey,A., and . (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355, 359-361.
164. Levy-Lahad,E., Wijsman,E.M., Nemens,E., Anderson,L., Goddard,K.A., Weber,J.L., Bird,T.D., and Schellenberg,G.D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.
165. Leyssen,M., Ayaz,D., Hebert,S.S., Reeve,S., de Strooper,B., and Hassan,B.A. (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the Drosophila brain. *EMBO J.* 24, 2944-2955.
166. Lichtenthaler,S.F. and Haass,C. (2004). Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J.Clin.Invest* 113, 1384-1387.
167. Lichtlen,P. and Mohajeri,M.H. (2008). Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *J.Neurochem.* 104, 859-874.
168. Lin,H.S., Chean,C.S., Ng,Y.Y., Chan,S.Y., and Ho,P.C. (2000). 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-trans-retinoic acid. *J.Clin.Pharm.Ther.* 25, 265-269.
169. Lin,L., Georgievska,B., Mattsson,A., and Isacson,O. (1999). Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12108-12113.
170. Liu,J.P., Laufer,E., and Jessell,T.M. (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* 32, 997-1012.
171. Liu,X., Lin,H.S., Chan,S.Y., and Ho,P.C. (2004). Biopharmaceutics of beta-cyclodextrin derivative-based formulations of acitretin in Sprague-Dawley rats. *J.Pharm.Sci.* 93, 805-815.
172. Liu,X., Lin,H.S., Thenmozhiyal,J.C., Chan,S.Y., and Ho,P.C. (2003). Inclusion of acitretin into cyclodextrins: phase solubility, photostability, and physicochemical characterization. *J.Pharm.Sci.* 92, 2449-2457.
173. Loffler,J. and Huber,G. (1992). Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J.Neurochem.* 59, 1316-1324.
174. Luisi,B.F., Xu,W.X., Otwinowski,Z., Freedman,L.P., Yamamoto,K.R., and Sigler,P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.
175. Lungwitz,U., Breunig,M., Blunk,T., and Gopferich,A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 60, 247-266.

176. Lunn,C.A., Fan,X., Dalie,B., Miller,K., Zavodny,P.J., Narula,S.K., and Lundell,D. (1997). Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett.* 400, 333-335.
177. Luten,J., van Nostrum,C.F., De Smedt,S.C., and Hennink,W.E. (2008). Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J.Control Release* 126, 97-110.
178. Lyckman,A.W., Confaloni,A.M., Thinakaran,G., Sisodia,S.S., and Moya,K.L. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J.Biol.Chem.* 273, 11100-11106.
179. Maden,M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat.Rev.Neurosci.* 8, 755-765.
180. Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
181. Mangelsdorf,D.J., Umesono,K., Kliewer,S.A., Borgmeyer,U., Ong,E.S., and Evans,R.M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561.
182. Maretzky,T., Reiss,K., Ludwig,A., Buchholz,J., Scholz,F., Proksch,E., de Strooper,B., Hartmann,D., and Saftig,P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 9182-9187.
183. Marr,R.A., Rockenstein,E., Mukherjee,A., Kindy,M.S., Hersh,L.B., Gage,F.H., Verma,I.M., and Masliah,E. (2003). Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J.Neurosci.* 23, 1992-1996.
184. Martin,L., Fluhrer,R., Reiss,K., Kremmer,E., Saftig,P., and Haass,C. (2008). Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J.Biol.Chem.* 283, 1644-1652.
185. Maskos,K., Fernandez-Catalan,C., Huber,R., Bourenkov,G.P., Bartunik,H., Ellestad,G.A., Reddy,P., Wolfson,M.F., Rauch,C.T., Castner,B.J., Davis,R., Clarke,H.R., Petersen,M., Fitzner,J.N., Cerretti,D.P., March,C.J., Paxton,R.J., Black,R.A., and Bode,W. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3408-3412.
186. Mattia,E., Rao,K., Shapiro,D.S., Sussman,H.H., and Klausner,R.D. (1984). Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells. *J.Biol.Chem.* 259, 2689-2692.
187. Mattson,M.P., Cheng,B., Culwell,A.R., Esch,F.S., Lieberburg,I., and Rydel,R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243-254.
188. McCaffery,P. and Drager,U.C. (1994). High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 7772-7776.
189. Mechtersheimer,S., Gutwein,P., Agmon-Levin,N., Stoeck,A., Oleszewski,M., Riedle,S., Postina,R., Fahrenholz,F., Fogel,M., Lemmon,V., and Altevogt,P. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J.Cell Biol.* 155, 661-673.
190. Melino,G., Draoui,M., Bernardini,S., Bellincampi,L., Reichert,U., and Cohen,P. (1996). Regulation by retinoic acid of insulin-degrading enzyme and of a related endoprotease in human neuroblastoma cell lines. *Cell Growth Differ.* 7, 787-796.
191. Meziane,H., Dodart,J.C., Mathis,C., Little,S., Clemens,J., Paul,S.M., and Ungerer,A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 12683-12688.
192. Millichip,M.I., Dallas,D.J., Wu,E., Dale,S., and McKie,N. (1998). The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 245, 594-598.

193. Milward,E.A., Papadopoulos,R., Fuller,S.J., Moir,R.D., Small,D., Beyreuther,K., and Masters,C.L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9, 129-137.
194. Mingaud,F., Mormede,C., Etchamendy,N., Mons,N., Niedergang,B., Wietrzych,M., Pallet,V., Jaffard,R., Krezel,W., Higuere,P., and Marighetto,A. (2008). Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J.Neurosci.* 28, 279-291.
195. Minucci,S., Leid,M., Toyama,R., Saint-Jeannet,J.P., Peterson,V.J., Horn,V., Ishmael,J.E., Bhattacharyya,N., Dey,A., Dawid,I.B., and Ozato,K. (1997). Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol.Cell Biol.* 17, 644-655.
196. Misner,D.L., Jacobs,S., Shimizu,Y., de Urquiza,A.M., Solomin,L., Perlmann,T., De Luca,L.M., Stevens,C.F., and Evans,R.M. (2001). Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 11714-11719.
197. Mitro,N., Vargas,L., Romeo,R., Koder,A., and Saez,E. (2007). T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* 581, 1721-1726.
198. Moghimi,S.M., Hunter,A.C., and Murray,J.C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol.Rev.* 53, 283-318.
199. Monnard,P.A., Oberholzer,T., and Luisi,P. (1997). Entrapment of nucleic acids in liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 1329, 39-50.
200. Morimoto,T., Ohsawa,I., Takamura,C., Ishiguro,M., Nakamura,Y., and Kohsaka,S. (1998). Novel domain-specific actions of amyloid precursor protein on developing synapses. *J.Neurosci.* 18, 9386-9393.
201. Morris,M.C., Evans,D.A., Bienias,J.L., Tangney,C.C., Bennett,D.A., Aggarwal,N., Schneider,J., and Wilson,R.S. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch.Neurol.* 60, 194-200.
202. Mount,C. and Downton,C. (2006). Alzheimer disease: progress or profit? *Nat.Med.* 12, 780-784.
203. Mullan,M., Crawford,F., Axelman,K., Houlden,H., Lilius,L., Winblad,B., and Lannfelt,L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat.Genet.* 1, 345-347.
204. Muraguchi,T., Takegami,Y., Ohtsuka,T., Kitajima,S., Chandana,E.P., Omura,A., Miki,T., Takahashi,R., Matsumoto,N., Ludwig,A., Noda,M., and Takahashi,C. (2007). RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat.Neurosci.* 10, 838-845.
204. Murphy,M.F., wilcke, S.J., Graham,E.A., Kurtz,N.M. (2007) First-in man experience with NGX267, a selective M1 agonist for disease modification and symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegenerative diseases Abstracts: Alzheimer's and Parkinson's diseases, 8<sup>th</sup> international conference AD/PD Salzburg, Austria March14-18, 98.*
205. Na,S.Y., Kang,B.Y., Chung,S.W., Han,S.J., Ma,X., Trinchieri,G., Im,S.Y., Lee,J.W., and Kim,T.S. (1999). Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB. *J.Biol.Chem.* 274, 7674-7680.
206. Nakagawa,T., Zhu,H., Morishima,N., Li,E., Xu,J., Yankner,B.A., and Yuan,J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
207. Ness,G.C., Pendleton,L.C., Li,Y.C., and Chiang,J.Y. (1990). Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 alpha hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 172, 1150-1156.
208. Neveu,I., Naveilhan,P., Baudet,C., Brachet,P., and Metsis,M. (1994). 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport* 6, 124-126.

209. Nicoll, J.A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat.Med.* 9, 448-452.
210. Nikam, B.P., Amladi, S., and Wadhwa, S.L. (2006). Acitretin. *Indian J.Dermatol.Venereol.Leprol.* 72, 167-172.
211. Nitsch, R.M., Deng, M., Tennis, M., Schoenfeld, D., and Growdon, J.H. (2000). The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann.Neurol.* 48, 913-918.
212. Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., and Growdon, J.H. (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258, 304-307.
213. Norman, A.W., Olivera, C.J., Barreto Silva, F.R., and Bishop, J.E. (2002). A specific binding protein/receptor for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) is present in an intestinal caveolae membrane fraction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 298, 414-419.
214. O'Barr, S.A., Oh, J.S., Ma, C., Brent, G.A., and Schultz, J.J. (2006). Thyroid hormone regulates endogenous amyloid-beta precursor protein gene expression and processing in both in vitro and in vivo models. *Thyroid* 16, 1207-1213.
215. O'Reilly, K.C., Shumake, J., Gonzalez-Lima, F., Lane, M.A., and Bailey, S.J. (2006). Chronic administration of 13-cis-retinoic acid increases depression-related behavior in mice. *Neuropsychopharmacology* 31, 1919-1927.
216. Ogris, M., Walker, G., Blessing, T., Kircheis, R., Wolschek, M., and Wagner, E. (2003). Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J.Control Release* 91, 173-181.
217. Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2004). Vitamin A exhibits potent antiamyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp.Neurol.* 189, 380-392.
218. Osburn, D.L., Shao, G., Seidel, H.M., and Schulman, I.G. (2001). Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions. *Mol.Cell Biol.* 21, 4909-4918.
219. Pan, D. and Rubin, G.M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90, 271-280.
220. Pandak, W.M., Heuman, D.M., Redford, K., Stravitz, R.T., Chiang, J.Y., Hylemon, P.B., and Vlahcevic, Z.R. (1997). Hormonal regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase specific activity, mRNA levels, and transcriptional activity in vivo in the rat. *J.Lipid Res.* 38, 2483-2491.
221. Papahadjopoulos, D., Allen, T.M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthey, K., Huang, S.K., Lee, K.D., Woodle, M.C., Lasic, D.D., Redemann, C., and . (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 11460-11464.
222. Pardridge, W.M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat.Rev.Drug Discov.* 1, 131-139.
223. Pardridge, W.M. (2003). Gene targeting in vivo with pegylated immunoliposomes. *Methods Enzymol.* 373, 507-528.
224. Perez, C., Sanchez, A., Putnam, D., Ting, D., Langer, R., and Alonso, M.J. (2001). Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J.Control Release* 75, 211-224.
225. Peterson, P.A. (1971). Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A. *J.Biol.Chem.* 246, 44-49.
226. Pietrzik, C.U., Hoffmann, J., Stober, K., Chen, C.Y., Bauer, C., Otero, D.A., Roch, J.M., and Herzog, V. (1998). From differentiation to proliferation: the secretory amyloid precursor protein as a local mediator of growth in thyroid epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 1770-1775.

227. Podlisny, M.B., Mammen, A.L., Schlossmacher, M.G., Palmert, M.R., Younkin, S.G., and Selkoe, D.J. (1990). Detection of soluble forms of the beta-amyloid precursor protein in human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *167*, 1094-1101.
228. Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F., 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.
229. Prinzen, C. (2005) Genomische Struktur und Promotorcharakterisierung des humanen ADAM10-Gens.  
Ref Type: Dissertation
230. Prinzen, C., Muller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2005). Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* *19*, 1522-1524.
231. Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* *283*, 91-94.
232. Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jaggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Holscher, 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.
233. Radomska-Pandya, A. and Chen, G. (2002). Photoaffinity labeling of human retinoid X receptor beta (RXRbeta) with 9-cis-retinoic acid: identification of phytanic acid, docosahexaenoic acid, and lithocholic acid as ligands for RXRbeta. *Biochemistry* *41*, 4883-4890.
234. Rajendran, L., Schneider, A., Schlechtingen, G., Weidlich, S., Ries, J., Braxmeier, T., Schwille, P., Schulz, J.B., Schroeder, C., Simons, M., Jennings, G., Knolker, H.J., and Simons, K. (2008). Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* *320*, 520-523.
235. Rana, B., Veal, G.J., Pearson, A.D., and Redfern, C.P. (2002). Retinoid X receptors and retinoid response in neuroblastoma cells. *J. Cell Biochem.* *86*, 67-78.
236. Raskind, M.A., Peskind, E.R., Wessel, T., and Yuan, W. (2000). Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* *54*, 2261-2268.
237. Reglodi, D., Somogyvari-Vigh, A., Vigh, S., Maderdrut, J.L., and Arimura, A. (2000). Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* *921*, 119-128.
238. Reid, T., Warren, R., and Kim, D. (2002). Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther.* *9*, 979-986.
239. Reisberg, B., Doody, R., Stoffer, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Mobius, H.J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1333-1341.
240. Reisberg, B., Ferris, S.H., de Leon, M.J., and Crook, T. (1982). The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am. J. Psychiatry* *139*, 1136-1139.
241. Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* *24*, 742-752.
242. Reynolds, C.P., Matthay, K.K., Villablanca, J.G., and Maurer, B.J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett.* *197*, 185-192.
243. Riddell, D.R., Christie, G., Hussain, I., and Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol.* *11*, 1288-1293.
244. Riddell, D.R., Zhou, H., Comery, T.A., Kouranova, E., Lo, C.F., Warwick, H.K., Ring, R.H., Kirksey, Y., Aschmies, S., Xu, J., Kubek, K., Hirst, W.D., Gonzales, C., Chen, Y., Murphy, E., Leonard, S., Vasylyev, D., Oganessian, A., Martone, R.L., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., and Jacobsen, J.S. (2007). The LXR

- agonist TO901317 selectively lowers hippocampal Abeta42 and improves memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol.Cell Neurosci.* 34, 621-628.
245. Ring,S., Weyer,S.W., Kilian,S.B., Waldron,E., Pietrzik,C.U., Filippov,M.A., Herms,J., Buchholz,C., Eckman,C.B., Korte,M., Wolfer,D.P., and Muller,U.C. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J.Neurosci.* 27, 7817-7826.
246. Rivest,V., Phivilay,A., Julien,C., Belanger,S., Tremblay,C., Emond,V., and Calon,F. (2007). Novel liposomal formulation for targeted gene delivery. *Pharm.Res.* 24, 981-990.
247. Rizzo,G., Renga,B., Mencarelli,A., Pellicciari,R., and Fiorucci,S. (2005). Role of FXR in regulating bile acid homeostasis and relevance for human diseases. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* 5, 289-303.
248. Robert,S.J., Zugaza,J.L., Fischmeister,R., Gardier,A.M., and Lezoualc'h,F. (2001). The human serotonin 5-HT4 receptor regulates secretion of non-amyloidogenic precursor protein. *J.Biol.Chem.* 276, 44881-44888.
249. Rogaev,E.I., Sherrington,R., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Ikeda,M., Liang,Y., Chi,H., Lin,C., Holman,K., Tsuda,T., and . (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.
250. Rogers,S.L., Doody,R.S., Mohs,R.C., and Friedhoff,L.T. (1998). Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group. *Arch.Intern.Med.* 158, 1021-1031.
251. Roghani,M., Becherer,J.D., Moss,M.L., Atherton,R.E., Erdjument-Bromage,H., Arribas,J., Blackburn,R.K., Weskamp,G., Tempst,P., and Blobel,C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J.Biol.Chem.* 274, 3531-3540.
252. Ronne,H., Ocklind,C., Wiman,K., Rask,L., Obrink,B., and Peterson,P.A. (1983). Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin a on the secretion of the retinol-binding protein. *J.Cell Biol.* 96, 907-910.
253. Rosendahl,M.S., Ko,S.C., Long,D.L., Brewer,M.T., Rosenzweig,B., Hedl,E., Anderson,L., Pyle,S.M., Moreland,J., Meyers,M.A., Kohno,T., Lyons,D., and Lichenstein,H.S. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J.Biol.Chem.* 272, 24588-24593.
254. Rosenfeld,J.M., Vargas,R., Jr., Xie,W., and Evans,R.M. (2003). Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol.Endocrinol.* 17, 1268-1282.
255. Rosler,M., Anand,R., Cicin-Sain,A., Gauthier,S., Agid,Y., Dal Bianco,P., Stahelin,H.B., Hartman,R., and Gharabawi,M. (1999). Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ* 318, 633-638.
256. Roy,A.L., Meisterernst,M., Pognonec,P., and Roeder,R.G. (1991). Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354, 245-248.
257. Sacchetti,B., Lorenzini,C.A., Baldi,E., Bucherelli,C., Roberto,M., Tassoni,G., and Brunelli,M. (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat. *Neurobiol.Learn.Mem.* 76, 1-6.
258. Sahin,M., Karauzum,S.B., Perry,G., Smith,M.A., and Aliciguzel,Y. (2005). Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox.Res.* 7, 243-250.
259. Sahin,U., Weskamp,G., Kelly,K., Zhou,H.M., Higashiyama,S., Peschon,J., Hartmann,D., Saftig,P., and Blobel,C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J.Cell Biol.* 164, 769-779.

260. Sahlin,C., Pettersson,F.E., Nilsson,L.N., Lannfelt,L., and Johansson,A.S. (2007). Docosahexaenoic acid stimulates non-amyloidogenic APP processing resulting in reduced Abeta levels in cellular models of Alzheimer's disease. *Eur.J.Neurosci.* 26, 882-889.
261. Saitoh,T., Sundsmo,M., Roch,J.M., Kimura,N., Cole,G., Schubert,D., Oltersdorf,T., and Schenk,D.B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58, 615-622.
262. Sandbrink,R., Monning,U., Masters,C.L., and Beyreuther,K. (1997). Expression of the APP gene family in brain cells, brain development and aging. *Gerontology* 43, 119-131.
263. Sastre,M., Dewachter,I., Rossner,S., Bogdanovic,N., Rosen,E., Borghgraef,P., Evert,B.O., Dumitrescu-Ozimek,L., Thal,D.R., Landreth,G., Walter,J., Klockgether,T., van Leuven,F., and Heneka,M.T. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 443-448.
264. Sastre,M., Steiner,H., Fuchs,K., Capell,A., Multhaup,G., Condron,M.M., Teplow,D.B., and Haass,C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835-841.
265. Satoh,J. and Kuroda,Y. (2000). Amyloid precursor protein beta-secretase (BACE) mRNA expression in human neural cell lines following induction of neuronal differentiation and exposure to cytokines and growth factors. *Neuropathology.* 20, 289-296.
266. Saurat,J.H. (1999). Retinoids and psoriasis: novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. *J.Am.Acad.Dermatol.* 41, S2-S6.
267. Sawadogo,M. (1988). Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J.Biol.Chem.* 263, 11994-12001.
268. Schatzlein,A.G. (2001). Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anticancer Drugs* 12, 275-304.
269. Schenk,D., Barbour,R., Dunn,W., Gordon,G., Grajeda,H., Guido,T., Hu,K., Huang,J., Johnson-Wood,K., Khan,K., Kholodenko,D., Lee,M., Liao,Z., Lieberburg,I., Motter,R., Mutter,L., Soriano,F., Shopp,G., Vasquez,N., Vandeventer,C., Walker,S., Wogulis,M., Yednock,T., Games,D., and Seubert,P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
270. Schlondorff,J., Becherer,J.D., and Blobel,C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem.J.* 347 Pt 1, 131-138.
271. Schnyder,A. and Huwyler,J. (2005). Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx.* 2, 99-107.
272. Schubert,D., LaCorbiere,M., Saitoh,T., and Cole,G. (1989). Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2066-2069.
273. Schultz,J.R., Tu,H., Luk,A., Repa,J.J., Medina,J.C., Li,L., Schwendner,S., Wang,S., Thoolen,M., Mangelsdorf,D.J., Lustig,K.D., and Shan,B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831-2838.
274. Schwabe,J.W., Chapman,L., Finch,J.T., and Rhodes,D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567-578.
275. Schwarzman,A.L. and Goldgaber,D. (1996). Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation. *Ciba Found.Symp.* 199, 146-160.
276. Seals,D.F. and Courtneidge,S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7-30.
277. Selkoe,D.J. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat.Cell Biol.* 6, 1054-1061.

278. Serini,S., Trombino,S., Oliva,F., Piccioni,E., Monego,G., Resci,F., Boninsegna,A., Picci,N., Ranelletti,F.O., and Calviello,G. (2008). Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis*. 13, 1172-1183.
279. Seubert,P., Oltersdorf,T., Lee,M.G., Barbour,R., Blomquist,C., Davis,D.L., Bryant,K., Fritz,L.C., Galasko,D., Thal,L.J., and . (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361, 260-263.
280. Shankaran,M., Marino,M.E., Busch,R., Keim,C., King,C., Lee,J., Killion,S., Awada,M., and Hellerstein,M.K. (2007). Measurement of brain microglial proliferation rates in vivo in response to neuroinflammatory stimuli: application to drug discovery. *J.Neurosci.Res.* 85, 2374-2384.
281. Sherrington,R., Rogaev,E.I., Liang,Y., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Ikeda,M., Chi,H., Lin,C., Li,G., Holman,K., and . (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
282. Shi,N. and Pardridge,W.M. (2000). Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 7567-7572.
283. Shi,N., Zhang,Y., Zhu,C., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2001). Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 12754-12759.
284. Shimada,J., Suzuki,Y., Kim,S.J., Wang,P.C., Matsumura,M., and Kojima,S. (2001). Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol.Endocrinol.* 15, 1677-1692.
285. Shumaker,S.A., Legault,C., Rapp,S.R., Thal,L., Wallace,R.B., Ockene,J.K., Hendrix,S.L., Jones,B.N., III, Assaf,A.R., Jackson,R.D., Kotchen,J.M., Wassertheil-Smoller,S., and Wactawski-Wende,J. (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 289, 2651-2662.
286. Siemers,E.R., Quinn,J.F., Kaye,J., Farlow,M.R., Porsteinsson,A., Tariot,P., Zoulnouni,P., Galvin,J.E., Holtzman,D.M., Knopman,D.S., Satterwhite,J., Gonzales,C., Dean,R.A., and May,P.C. (2006). Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* 66, 602-604.
287. Simons,M., Keller,P., de Strooper,B., Beyreuther,K., Dotti,C.G., and Simons,K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6460-6464.
288. Singh,S., Mulley,G.P., and Losowsky,M.S. (1988). Carotenaemia in Alzheimer's disease. *BMJ* 297, 458-459.
289. Sisodia,S.S., Koo,E.H., Beyreuther,K., Unterbeck,A., and Price,D.L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.
290. Slack,B.E., Ma,L.K., and Seah,C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem.J.* 357, 787-794.
291. Smith,J.E., Muto,Y., and Goodman,D.S. (1975). Tissue distribution and subcellular localization of retinol-binding protein in normal and vitamin A-deficient rats. *J.Lipid Res.* 16, 318-323.
292. Smith-Swintosky,V.L., Pettigrew,L.C., Craddock,S.D., Culwell,A.R., Rydel,R.E., and Mattson,M.P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J.Neurochem.* 63, 781-784.
293. Soba,P., Eggert,S., Wagner,K., Zentgraf,H., Siehl,K., Kreger,S., Lower,A., Langer,A., Merdes,G., Paro,R., Masters,C.L., Muller,U., Kins,S., and Beyreuther,K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24, 3624-3634.
294. Soprano,D.R., Smith,J.E., and Goodman,D.S. (1982). Effect of retinol status on retinol-binding protein biosynthesis rate and translatable messenger RNA level in rat liver. *J.Biol.Chem.* 257, 7693-7697.

295. Soto,C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat.Rev.Neurosci.* 4, 49-60.
296. Stafslie, D.K., Vedvik, K.L., De Rosier, T., and Ozers, M.S. (2007). Analysis of ligand-dependent recruitment of coactivator peptides to RXRbeta in a time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *Mol.Cell Endocrinol.* 264, 82-89.
297. Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., and Bode, W. (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4, 823-840.
298. Stone, A.L., Kroeger, M., and Sang, Q.X. (1999). Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J.Protein Chem.* 18, 447-465.
299. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 1977-1981.
300. Sun, Y., Yao, J., Kim, T.W., and Tall, A.R. (2003). Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion. *J.Biol.Chem.* 278, 27688-27694.
301. Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B., and Petkovich, M. (2004). A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J.Biol.Chem.* 279, 77-85.
302. Takahashi, J., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (1999). Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J.Neurobiol.* 38, 65-81.
303. Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T., and . (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 2065-2069.
304. Tan, Z.S., Beiser, A., Vasan, R.S., Au, R., Auerbach, S., Kiel, D.P., Wolf, P.A., and Seshadri, S. (2008). Thyroid function and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch.Intern.Med.* 168, 1514-1520.
305. Thinakaran, G., Teplow, D.B., Siman, R., Greenberg, B., and Sisodia, S.S. (1996). Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J.Biol.Chem.* 271, 9390-9397.
306. Tian, K., Norris, A.W., Lin, C.L., and Li, E. (1997). The isolation and characterization of purified heterocomplexes of recombinant retinoic acid receptor and retinoid X receptor ligand binding domains. *Biochemistry* 36, 5669-5676.
307. Tirona, R.G. and Kim, R.B. (2005). Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J.Pharm.Sci.* 94, 1169-1186.
308. Tranheim, K.E., Andersen, B., Nebb, H.I., Rustan, A.C., and Thoresen, G.H. (2006). 22-Hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes. *Biochim.Biophys.Acta* 1761, 1515-1522.
309. Trapp, B.D. and Hauer, P.E. (1994). Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development. *J.Neurosci.Res.* 37, 538-550.
310. Van Wart, H.E. and Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 5578-5582.
311. Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., and Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol.Rev.* 52, 269-324.
312. Veal, G.J., Errington, J., Redfern, C.P., Pearson, A.D., and Boddy, A.V. (2002). Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Biochem.Pharmacol.* 63, 207-215.

313. Vyas,T.K., Shahiwala,A., Marathe,S., and Misra,A. (2005). Intranasal drug delivery for brain targeting. *Curr.Drug Deliv.* 2, 165-175.
314. Wang,J. and Yen,A. (2004). A novel retinoic acid-responsive element regulates retinoic acid-induced BLR1 expression. *Mol.Cell Biol.* 24, 2423-2443.
315. Wang,P., Yang,G., Mosier,D.R., Chang,P., Zaidi,T., Gong,Y.D., Zhao,N.M., Dominguez,B., Lee,K.F., Gan,W.B., and Zheng,H. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J.Neurosci.* 25, 1219-1225.
316. Wang,Y.Z. and Christakos,S. (1995). Retinoic acid regulates the expression of the calcium binding protein, calbindin-D28K. *Mol.Endocrinol.* 9, 1510-1521.
317. Waring,S.C. and Rosenberg,R.N. (2008). Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch.Neurol.* 65, 329-334.
318. Weskamp,G., Cai,H., Brodie,T.A., Higashiyama,S., Manova,K., Ludwig,T., and Blobel,C.P. (2002). Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol.Cell Biol.* 22, 1537-1544.
319. Weskamp,G., Ford,J.W., Sturgill,J., Martin,S., Docherty,A.J., Swendeman,S., Broadway,N., Hartmann,D., Saftig,P., Umland,S., Sehara-Fujisawa,A., Black,R.A., Ludwig,A., Becherer,J.D., Conrad,D.H., and Blobel,C.P. (2006). ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat.Immunol.* 7, 1293-1298.
320. White,J.A., Beckett-Jones,B., Guo,Y.D., Dilworth,F.J., Bonasoro,J., Jones,G., and Petkovich,M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J.Biol.Chem.* 272, 18538-18541.
321. White,J.A., Ramshaw,H., Taimi,M., Stangle,W., Zhang,A., Everingham,S., Creighton,S., Tam,S.P., Jones,G., and Petkovich,M. (2000). Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 6403-6408.
322. Willem,M., Garratt,A.N., Novak,B., Citron,M., Kaufmann,S., Rittger,A., DeStrooper,B., Saftig,P., Birchmeier,C., and Haass,C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
323. Wilson,L.J., Myat,A., Sharma,A., Maden,M., and Wingate,R.J. (2007). Retinoic acid is a potential dorsalising signal in the late embryonic chick hindbrain. *BMC.Dev.Biol.* 7, 138.
324. Wion,D., MacGrogan,D., Neveu,I., Jehan,F., Houlgatte,R., and Brachet,P. (1991). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent inducer of nerve growth factor synthesis. *J.Neurosci.Res.* 28, 110-114.
325. Woychik,N.A. and Hampsey,M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-463.
326. Wurtz,J.M., Bourguet,W., Renaud,J.P., Vivat,V., Chambon,P., Moras,D., and Gronemeyer,H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat.Struct.Biol.* 3, 87-94.
327. Yamauchi,P.S., Rizk,D., Kormeili,T., Patnaik,R., and Lowe,N.J. (2003). Current systemic therapies for psoriasis: where are we now? *J.Am.Acad.Dermatol.* 49, S66-S77.
328. Yamazaki,K., Mizui,Y., Sagane,K., and Tanaka,I. (1997). Assignment of a disintegrin and metalloproteinase domain 10 (Adam10) gene to mouse chromosome 9. *Genomics* 46, 528-529.
329. Yang,Y., Quitschke,W.W., and Brewer,G.J. (1998). Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 60, 40-49.
330. Zaman,Z., Roche,S., Fielden,P., Frost,P.G., Niriella,D.C., and Cayley,A.C. (1992). Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 21, 91-94.

331. Zandi,P.P., Anthony,J.C., Khachaturian,A.S., Stone,S.V., Gustafson,D., Tschanz,J.T., Norton,M.C., Welsh-Bohmer,K.A., and Breitner,J.C. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch.Neurol.* *61*, 82-88.
332. Zhang,G., Gao,X., Song,Y.K., Vollmer,R., Stolz,D.B., Gasiorowski,J.Z., Dean,D.A., and Liu,D. (2004). Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.* *11*, 675-682.
333. Zhang,L., Song,L., Terracina,G., Liu,Y., Pramanik,B., and Parker,E. (2001). Biochemical characterization of the gamma-secretase activity that produces beta-amyloid peptides. *Biochemistry* *40*, 5049-5055.
334. Zhang,S., Iwata,K., Lachenmann,M.J., Peng,J.W., Li,S., Stimson,E.R., Lu,Y., Felix,A.M., Maggio,J.E., and Lee,J.P. (2000). The Alzheimer's peptide a beta adopts a collapsed coil structure in water. *J.Struct.Biol.* *130*, 130-141.
335. Zhang,Y., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2003a). In vivo knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *J.Gene Med.* *5*, 1039-1045.
336. Zhang,Y., Jeong,L.H., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2002a). Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J.Gene Med.* *4*, 183-194.
337. Zhang,Y., McLaughlin,R., Goodyer,C., and LeBlanc,A. (2002b). Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J.Cell Biol.* *156*, 519-529.
338. Zhang,Y., Wang,Y., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2008). Lysosomal enzyme replacement of the brain with intravenous non-viral gene transfer. *Pharm.Res.* *25*, 400-406.
339. Zhang,Y.F., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2003b). Absence of toxicity of chronic weekly intravenous gene therapy with pegylated immunoliposomes. *Pharm.Res.* *20*, 1779-1785.
340. Zhu,C., Zhang,Y., Zhang,Y.F., Yi,L.J., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2004). Organ-specific expression of the lacZ gene controlled by the opsin promoter after intravenous gene administration in adult mice. *J.Gene Med.* *6*, 906-912.
341. Zhu,L., Tamvakopoulos,C., Xie,D., Dragovic,J., Shen,X., Fenyk-Melody,J.E., Schmidt,K., Bagchi,A., Griffin,P.R., Thornberry,N.A., and Sinha,R.R. (2003). The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J.Biol.Chem.* *278*, 22418-22423.
342. Zouboulis,C.C. (2001). Retinoids--which dermatological indications will benefit in the near future? *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* *14*, 303-315.

## 8. Anhang

### 8.1 Klonierung des murinen ADAM10-Promotor-Luciferase-Reportervektors

Für den Vergleich des humanen ADAM10-Promotor mit dem murinen ADAM10-Promotor galt es zunächst analog zu dem humanen ADAM10-Promotor-Luciferase-Reportervektor (hergestellt von Dr. Claudia Prinzen, ehemals Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) den murinen ADAM10-Promotor-Luciferase-Reportervektor herzustellen: Für die Klonierung des murinen ADAM10-Promotors in den pGL3-Basic-Vektor (Promega), wurde zunächst mit den flankierenden Oligonukleotiden (s. 2.1.8, mAD10p, s.41) und der Bacmid-DNA aus dem BAC-Klon RPCI 23.C (ResGen Invitrogen, Karlsruhe) mittels PCR der Maus-ADAM10-Promotor amplifiziert (s. 2.2.1.10, s.56). Die Anlagerungs-Temperatur der Oligonukleotide lag bei 54,7°C. Es wurden 20 ng Bacmid-DNA mit einem *Pfu-I/Taq*-Polymerasegemisch (5:1) verwendet. Das 2194 bp große Promotorfragment wurde über ein präparatives Gel isoliert (s. 2.2.1.12, s.57) und über eine Säule (NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey und Nagel) aufgereinigt (s. 2.2.1.2.2, s.53). Zur Vorbereitung der Ligation wurde das Amplifikat mit dem Restriktionsenzym *HindIII* an der durch das Oligonukleotid mAD10p\_rev generierten Schnittstelle gespalten. Der pGL3-Basic-Vektor (Promega) wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SmaI* gespalten (s.2.2.1.4, s.54). Nach der Ligation (s. 2.2.1.8, s.55) wurde der nun als mADAM10p bezeichnete Vektor in *E.coli* DH5α transformiert (s. 2.2.2.4, s.58). Die Plasmid-DNA der transformierten Klone wurde aufgereinigt und durch Restriktionsanalyse mit *KspI* und *SphI* identifiziert. Die Plasmid-DNA eines positiv getesteten Klons wurde anschließend mit dem GL\_for-Oligonukleotid (s. 2.1.8, s.41) sequenziert (s. 2.2.1.3, s.54). Das Ergebnis der Sequenzierung stimmte mit der Promotorsequenz der Internet-Datenbank (NCBI) zu 100% überein.

### 8.2 Klonierung der putativen Retinoid-Rezeptorbindungsstellen -203 und -302

Die Klonierung der ADAM10-Promotorkonstrukte im Bereich -203 bp und -302 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt, in den pTAL-Vektor erforderte zunächst eine Klonierung der Konstrukte in den Übergangsvektor pUC19mod (s. 2.1.10.6, s.46). Dieser mit einer *EcoRV*-Schnittstelle modifizierte Vektor wurde zunächst mit *EcoRV* geschnitten und Thymidin-Nukleotide angehängt (s. 2.2.1.5, s.54). Die Promotorfragmente wurden durch Zusammenlagerung der Oligonukleotide (2x203\_for und 2x203\_rev, 2x302\_for und

2x302\_rev) (s. 2.1.8, s.41) gebildet, adenyliert (s. 2.2.1.5, s.54) und mittels T/A-Ligation mit den vorbereiteten pUC19mod-Vektor fusioniert (s. 2.2.1.8, s.55). Nach anschließender Transformation in *E.coli* DH5 $\alpha$ , konnte eine Blau/Weiß-Selektion zur Identifizierung positiver Transformanden durchgeführt werden (s. 2.2.2.1, s.58). Die Plasmide der positiven Klone wurden durch Restriktionskontrolle mit *NheI* und *BglII* identifiziert (s. 2.2.1.4, s.54). Mit diesen Enzymen wurde das Promotorfragment aus pUC19mod ausgeschnitten und mit dem pTAL-Vektor (s. 2.1.10.7, s.46) (*NheI*, *BglII* geschnitten und dephosphoyliert) ligiert. Nach erfolgreicher Transformation in *E.coli* DH5 $\alpha$  und Aufreinigung der Plasmide (s. 2.2.1.2.1, s.52) konnte durch die von den Oligonukleotiden generierte *BamHI*-Schnittstelle mit dem Restriktionsenzym *BamHI* die gewünschten Plasmide aus den verschiedenen Klonen identifiziert werden. Die 2x203 pTAL bzw. 2x302 pTAL -Vektoren wurden sequenziert (s. 2.2.1.3, s.54) und die transformierten Klone bei -80°C gelagert (s. 2.2.2.2, s.58).

### 8.3 Abkürzungen

|               |   |
|---------------|---|
| °C            | Grad Celsius  |
| $\mu$ g       | Mikrogramm  |
| $\mu$ l       | Mikroliter  |
| ADAM          | „ <i>a disintegrine and metalloproteinase</i> “                                 |
| AD            | <i>Alzheimers disease</i>   |
| A $\beta$     | Amyloid $\beta$ -Peptid   |
| APP           | Amyloid-Vorläuferprotein ( <i>amyloid precursor protein</i> )                   |
| APPs $\alpha$ | lösliches Spaltprodukt des APP nach Prozessierung durch die $\alpha$ -Sekretase |
| APPs $\beta$  | lösliches Spaltprodukt des APP nach Prozessierung durch die $\beta$ -Sekretase  |
| bp            | Basenpaare  |
| CAR           | „ <i>constitutive androstane receptor</i> “                                     |
| Da            | Dalton  |
| DMEM          | Dulbecco's modified Eagle medium  |
| ELISA         | „ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> “                                    |
| engl.         | Englisch  |
| etc.          | Et cetera   |
| FXR           | „ <i>farnesoid x receptor</i> “   |
| g             | Gramm   |
| Hz            | Herz  |
| Luc.          | Luciferase  |
| LXR           | „ <i>liver x receptor</i> “   |
| M             | Molarität   |
| mA            | Milliampère   |
| MEM           | Minimum essential medium  |
| min           | Minuten   |
| ml            | Milliliter  |
| MMP           | Matrixmetalloproteinase   |
| ng            | Nanogramm   |
| OD            | optische Dichte   |
| PACAP         | „ <i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i> “                   |
| PIL           | Pegylierte Immunoliposomen  |
| PCR           | Polymerasekettenreaktion  |

|          |  |
|----------|--|
| PPAR     | „peroxisome proliferator acitvated receptor“         |
| RAR      | „retinoic acid receptor“                             |
| RARE     | „retinoic acid receptor response element“            |
| RXR      | “retinoic x receptor”                                |
| rpm      | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)           |
| RT       | Raumtemperatur                                       |
| RT-PCR   | Reverse Transkriptase PCR                            |
| Sec.     | Sekunden   |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| s.o.     | Siehe Oben   |
| s.u.     | Siehe Unten  |
| u        | Unit (Einheit)                                       |
| u.A.     | Unter Anderem  |
| ÜB       | Überstand  |
| Ü/N      | Über Nacht   |
| V        | Volt   |
| VDR      | „vitamin D receptor“                                 |
| z.B.     | Zum Beispiel   |

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb.1.1: Neuropathologische Merkmale der AD .....   | 2  |
| Abb.1.2: Die Entstehung von neurofibrillären Bündeln bei der AD .....                                   | 2  |
| Abb.1.3: Schematische Darstellung der A $\beta$ -Fibrillogenese .....                                   | 5  |
| Abb.1.4: Proteolytische Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins (APP).....                        | 7  |
| Abb.1.5: Domänenstruktur eines ADAM-Proteins .....  | 10 |
| Abb.1.6: Schematische Darstellung eines Immunoliposoms mit integrierter DNA .....                       | 14 |
| Abb.1.7: Vergleich der ADAM10-Promotorregionen aus Mensch und Maus.....                                 | 16 |
| Abb.1.8: Domänenstruktur eines Retinoid-Rezeptors .....   | 17 |
| Abb.1.9: Die potentiellen RXR-Dimere und deren Agonisten für die Aktivierung des ADAM10-Promotors ..... | 20 |
| Abb.1.10: Der Vitamin A-Metabolismus .....  | 21 |
| Abb.1.11: Die Verdrängung von atRA aus dem zellulären Retinsäure-Bindeprotein (CRABP) durch Acitretin . | 26 |
| Abb. 2.1: DNA-Größenstandards von Fermentas .....   | 43 |
| Abb.2.2: Protein-Größenstandard SeeBlue Plus2.....  | 43 |
| Abb.2.3: Vektorkarte von pGL3-Basic (Promega) .....   | 44 |
| Abb.2.4: Vektorkarte von CP53 AB.1 (hADAM10p) .....   | 45 |
| Abb.2.5: Vektorkarte von mADAM10p .....   | 45 |
| Abb.2.6: Vektorkarte von phRL-SV40 (Promega) .....  | 46 |
| Abb.2.7: Vektorkarte von pUC19 (Fermentas) .....  | 46 |
| Abb.2.8: Vektorkarte von pTAL-Luc (Clontech).....   | 47 |
| Abb.2.9: Sequenz des Retinoidrezeptor-Bindeelements im Vektor RARE-Luc.....                             | 47 |
| Abb.2.10: Sequenzen der putativen Retinoidrezeptor-Bindeelemente auf dem humanen ADAM10-Promotor.       | 48 |
| Abb. 2.11: Beispiel zweier Dissoziationskurven von mRNA-Proben .....                                    | 67 |
| Abb.2.12: Beispiel einer RT-PCR von zwei unterschiedlichen Proben.....                                  | 67 |
| Abb.2.13: Beispiel für 2 Standardkurven unterschiedlicher Gen-Amplifikate .....                         | 68 |
| Abb. 2.14: Beispiel einer Quantifizierung von Amyloid- $\beta$ -Plaques in Gehirnschnitten.....         | 75 |
| Abb. 2.15: Aktivitätsmessung der Elutionsfraktionen der Immunoliposomen-Präparation .....               | 78 |

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 3.1: Amyloid- $\beta$ -Färbung der Gehirnschnitte von PACAP-behandelten APP/PS1-Mäusen .....   | 81  |
| Abb. 3.2: Der Einfluss von nasaler PACAP-38-Administration auf die APP-Prozessierung im Gehirn .....  | 82  |
| Abb. 3.3: Reinheit und Spezifität der isolierten anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper.....  | 84  |
| Abb. 3.4: DNA-Einbau und Antikörperkonjugation bei der Immunoliposomen-Herstellung .....  | 86  |
| Abb. 3.5: Exemplarische Größenbestimmung der Immunoliposomen.....   | 87  |
| Abb. 3.6: Luciferase-Aktivität in Organ-Homogenisaten von durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion<br>transfizierten Mäusen .....                    | 88  |
| Abb. 3.7: Basisaktivität der ADAM10-Promotoren in murinen und humanen Neuroblastomzellen.....   | 89  |
| Abb. 3.8: Der Vergleich zwischen der humanen und murinen ADAM10-Promotor-Aktivität in neuronalen<br>Zelllinien nach der Inkubation mit atRA .....       | 90  |
| Abb. 3.9: Vergleich der APP-Prozessierung in APP695swe- und APP695wt-überexprimierenden Zellen .....  | 92  |
| Abb. 3.10: atRA induzierte APP $\alpha$ -Sekretion und ADAM10 Produktion in verschiedenen neuronalen Zelllinien   | 94  |
| Abb. 3.11: Nachweis von C83 (CTF $\alpha$ ) nach atRA Inkubation.....   | 95  |
| Abb. 3.12: Zellviabilität nach der Inkubation mit Retinoid-Rezeptor-Liganden.....   | 96  |
| Abb. 3.13: Wirkung der RAR- und RXR-Liganden auf die RARE vermittelte Transkriptionsaktivierung.....  | 97  |
| Abb. 3.14: Wirkung der RAR- und RXR-Liganden auf die ADAM10-Promotorstimulation.....  | 98  |
| Abb. 3.15: TTNPB induzierte APP $\alpha$ -Sekretion und ADAM10 Produktion in verschiedenen neuronalen Zelllinien<br>.....                               | 99  |
| Abb. 3.16: Viabilitätsbestimmung nach der Inkubation mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....   | 101 |
| Abb. 3.17: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....   | 102 |
| Abb. 3.18: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch DHA in Kombination mit Vitamin E.....   | 103 |
| Abb. 3.19: ADAM10-Promotorstimulation durch DHA .....   | 104 |
| Abb. 3.20: Zellviabilität nach der Inkubation mit nukleären Hormonrezeptor-Liganden.....  | 105 |
| Abb. 3.21: Stimulation der ADAM10-Promotoren in SH-SY5Y-Zellen durch Liganden von RXR-<br>Heterodimerisierungspartnern .....                            | 106 |
| Abb. 3.22: Stimulation des mADAM10-Promotors in N2A-Zellen durch Liganden nukleärer Rezeptoren .....  | 107 |
| Abb. 3.23: Stimulation des hADAM10-Promotors in SH-SY5Y-Zellen durch Liganden nukleärer Rezeptoren in<br>Kombination mit dem RXR-Liganden 9-cis RA..... | 108 |
| Abb. 3.24: APP-Prozessierung und ADAM10 Produktion in SH-SY5Y APP695swe-Zellen nach Inkubation mit<br>Liganden von VDR und TR.....                      | 109 |
| Abb. 3.25: APP-Prozessierung und ADAM10 Produktion nach Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit T0901317<br>.....   | 110 |
| Abb. 3.26: Aufbau der 2x203-Luc- und 2x302-Luc-Reportergenkonstrukte.....   | 111 |
| Abb. 3.27: Stimulation der 2x203-Luc und 2x302-Luc Reportergenkonstrukte mit atRA und Vitamin D3.....   | 112 |
| Abb. 3.28: Luciferase-Aktivität nach Inkubation mit dem PI3-K Inhibitor LY 294002 .....   | 113 |
| Abb. 3.29: ADAM10-Promotorstimulation durch Manoalid .....  | 114 |
| Abb. 3.30: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch Acitretin und Etretinat.....  | 115 |
| Abb. 3.31: Vergleich der ADAM10-Promotorstimulation durch Acitretin und Etretinat.....  | 115 |
| Abb. 3.32: ADAM10-Promotorstimulation durch Acitretin in N2A-Zellen .....   | 116 |
| Abb. 3.33: Abhängigkeit der ADAM10-Promotoraktivität von der Acitretin-Konzentration in SH-SY5Y-Zellen  | 117 |
| Abb. 3.34: APP-Prozessierung durch Inkubation mit Acitretin in verschiedenen Zelllinien.....  | 118 |
| Abb. 3.35: ADAM10-Produktion nach Inkubation mit Acitretin.....   | 119 |
| Abb. 3.36: Wirkung des ADAM10 spezifischen Inhibitors GI254023X auf die Acitretin induzierte APP $\alpha$ -und<br>APP $\beta$ -Sekretion .....          | 120 |
| Abb. 3.37: ELISA-Messung der A $\beta$ -Menge nach Inkubation mit Acitretin in SH-SY5Y-Zellen.....  | 121 |
| Abb. 3.38: ELISA-Messung der A $\beta$ <sub>42</sub> -Menge nach Inkubation mit Acitretin in SH-SY5Y APP695swe-Zellen..                                 | 122 |

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 3.39: Zellviabilität nach der Inkubation mit HPBCD und Acitretin .....   | 123 |
| Abb. 3.40: RARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch Acitretin mit verschiedenen Lösungsmitteln....                        | 124 |
| Abb. 3.41: ADAM10- und RAR $\beta$ -Expression im Gehirn von FVB/N-Mäusen nach 3 Tagen oraler Acitretin-<br>Applikation .....     | 125 |
| Abb. 3.42: APP $\alpha$ in der Leber oral Acitretin-behandelter Mäuse .....   | 126 |
| Abb. 3.43: ADAM10- und RAR $\beta$ -Expression im Gehirn von FVB/N-Mäusen 14 Stunden nach oraler Acitretin-<br>Applikation .....  | 127 |
| Abb. 3.44: APP-Prozessierung in Gehirn und Leber von APP/London-Mäusen nach 6 Wochen subcutaner<br>Acitretin-Administration ..... | 128 |
| Abb. 3.45: RAR und RBP in Gehirn und Leber von APP/London-Mäusen nach 6 Wochen subcutaner Acitretin<br>Administration .....       | 129 |
| Abb. 3.46: APP-Prozessierung in Gehirn und Leber von APP/London-Mäusen nach 6 Wochen intranasaler<br>Administration .....         | 130 |
| Abb. 4.1: Der olfaktorische Transport in das Zentrale Nervensystem .....  | 133 |
| Abb. 4.2: Schematische Darstellung der permissiven- und nicht-permissiven Heterodimeraktivierung .....                            | 137 |
| Abb. 4.3: RXR-Bindeelemente auf dem murinen und humanen ADAM10-Promotor .....   | 143 |

## 8.5 Lebenslauf