

Untersuchungen zur *in vivo* Funktion der Aspartylprotease BACE1



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Andrea Rittger

Kiel, September 2008

Referent/in:.....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt, Kiel,.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | IV |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. Morbus Alzheimer | 1 |
| 1.1.1. Die Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung..... | 1 |
| 1.1.2. Die Amyloid-Hypothese..... | 3 |
| 1.2. Das β -Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) und dessen Prozessierung | 4 |
| 1.3. Die β -Sekretase BACE1 (β APP cleaving enzyme) | 6 |
| 1.3.1. Identifizierung der β -Sekretase BACE1 | 6 |
| 1.3.2. Struktur..... | 7 |
| 1.3.3. Intrazellulärer Transport und posttranslationale Modifikation von BACE1 | 8 |
| 1.3.4. BACE1 Substrate..... | 10 |
| 1.3.5. Phänotyp der BACE1 Knockout-Maus..... | 14 |
| 1.4. <i>Listeria monocytogenes</i> als Modell für bakterielle Infektionen..... | 14 |
| 1.4.1. Das Immunsystem..... | 14 |
| 1.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) | 15 |
| 1.4.3. Abspaltung von Oberflächenmolekülen als wichtiger immunregulatorischer Mechanismus | 16 |
| 1.4.4. TRANCE (<i>tumor necrosis factor-related, activation-induced cytokine</i>)..... | 17 |
| 1.4.5. ICAM1 (<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>)..... | 17 |
| 1.4.6. BAFF (<i>B cell-activating factor belonging to the TNF family</i>) | 19 |
| 2. Fragestellung | 21 |
| 3. Material und Methoden..... | 22 |
| 3.1. Material | 22 |
| 3.1.1. Chemikalien, Enzyme und Materialien | 22 |
| 3.1.2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide..... | 23 |
| 3.1.3. Antikörper | 27 |
| 3.1.4. Zelllinien | 28 |
| 3.1.5. Stimulanzen und Inhibitoren..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.6. Mausstämme..... | 30 |
| 3.2. Methoden | 30 |
| 3.2.1. Molekularbiologische Methoden..... | 30 |
| 3.2.2. Biochemische Methoden | 40 |
| 3.2.3. Zellbiologische Methoden..... | 48 |
| 3.2.4. Immunologische Methoden..... | 53 |
| 4. Ergebnisse..... | 59 |
| 4.1. Charakterisierung der BACE1 knock-out Maus..... | 59 |
| 4.1.1. BACE1 <i>knockout</i> Mäuse sind vital, aber kleiner als ihre Wildtyp- Geschwister. | 59 |
| 4.1.2. Testung von BACE1-Antikörpern und Untersuchung der Expression von BACE1 in neuronalem Gewebe..... | 62 |
| 4.1.3. Untersuchung der möglichen Rolle von BACE1 im Immunsystem | 65 |
| 4.1.4. Untersuchung des Einflusses der BACE1-Defizienz auf die Zellpopulationen der Milz..... | 66 |
| 4.1.5. Auswirkungen der geringeren Anzahl an B-Zellen in BACE1 ^{-/-} Milzen auf die Konzentration an Immunglobulinen im Serum..... | 68 |
| 4.1.6. Untersuchungen mit dem Modellpathogen <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> | 69 |
| 4.2. Suche nach BACE1 Substraten | 75 |
| 4.2.1. TRANCE (<i>tumor necrosis factor-related, activation-induced cytokine</i>)..... | 75 |
| 4.2.2. BAFF (<i>B cell-activating factor belonging to the TNF family</i>) | 82 |
| 4.2.3. ICAM-1 (<i>Inter Cellular Adhesion Molecule 1</i>) | 88 |
| 4.3. Einfluss von BACE1 auf die Maturierung und Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17..... | 94 |
| 4.3.1. Untersuchung der Expression und Aktivität von ADAM10 und ADAM17 in Wildtyp- und BACE1 ^{-/-} Fibroblasten sowie in BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zellen | 94 |
| 4.3.2. Untersuchung der Expression und Aktivität von ADAM10 und ADAM17 in Leber und Gehirn von Wildtyp- und BACE1 ^{-/-} Mäusen | 98 |
| 4.4. Prozessierung der β 2 und β 4 Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen durch BACE1 und der Einfluss von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α | 100 |
| 4.4.1. Die β 2 und β 4 Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.2a sind BACE1 Substrate..... | 101 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.4.2. | Einfluss der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten auf die Aktivierung von Nav1.2 α | 104 |
| 4.4.3. | Einfluss der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten auf die Aktivierung von Nav1.2a in Gegenwart von BACE1 | 106 |
| 4.4.4. | Einfluss der Spaltprodukte der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten auf die Aktivierung von Nav1.2a..... | 108 |
| 4.4.5. | Proteolyse unabhängiger Effekt von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α | 111 |
| 5. | Diskussion..... | 113 |
| 5.1. | Charakterisierung der BACE1-defizienten Maus..... | 113 |
| 5.1.1. | Expression von BACE1 in lymphatischen Geweben..... | 115 |
| 5.1.2. | Einfluss der BACE1-Defizienz auf die Zellpopulationen der Milz..... | 115 |
| 5.1.3. | Einfluss der BACE1-Defizienz auf die Immunabwehr gegen <i>Listeria monocytogenes</i> (LM)..... | 117 |
| 5.2. | Suche nach BACE1-Substraten..... | 119 |
| 5.2.1. | TRANCE (tumor necrosis factor –related, activation induced cytokine) | 120 |
| 5.2.2. | BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) | 123 |
| 5.2.3. | ICAM-1 (<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>)..... | 125 |
| 5.3. | Einfluss von BACE1 auf die Maturierung und Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17..... | 125 |
| 5.4. | Prozessierung der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen durch BACE1 und der Einfluss von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α | 129 |
| 6. | Zusammenfassung | 133 |
| 7. | Summary | 135 |
| | Literaturverzeichnis..... | 137 |
| | Anhang | |
| | Lebenslauf | |
| | Danksagung | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ACDL | <i>acid cluster-dileucin</i> |
| AICP | <i>APP intracellularC-terminal domain</i> |
| Amp | Ampizillin |
| A β | Amyloid β |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APLP | <i>APP like protein</i> |
| APP | <i>Amyloid Precursor Protein</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BACE1 | <i>Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1</i> |
| BAFF | <i>B cell Activating Factor belonging to TNF Family</i> |
| BCA | <i>bicinchoninic acid</i> |
| BCMA | <i>B cell maturation Protein</i> |
| BHI | <i>Brain heart infusion</i> |
| BM-DMs | <i>bone marrow derived macrophages</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CAM | <i>Cell adhesion molecule</i> |
| CFU | <i>colony forming unit</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CIAP | <i>Calf instesitne alkaline phosphatase</i> |
| CTF | c-terminales Fragment |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid |
| DMEM | <i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| DSHB | <i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FACS | <i>fluorescence activated cell scanning</i> |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FKS | fetales Kälberserum |
| GGA | <i>γ-galactose containing</i> |
| GFP | grünfluoreszierendes Protein |
| HA | Hämagglutinin |
| HBSS | <i>Hank's buffered saline solution</i> |
| HRP | <i>horseradish phosphatase</i> |
| ICAM | <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i> |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-1 RII | Interleukin-1 Rezeptor II |
| IVC | <i>Individually Ventilated Cages</i> |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | <i>Luria Broth</i> |
| LFA-1 | <i>Lymphocyte function-associatedantigene-1</i> |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> |
| LM | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| LRP | Das Lipoprotein-Rezeptor verwandtes Protein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MEF | muriner embryonaler Fibroblast |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| Neo | Neomycin |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyakrylamid Gelelektrophorese |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | p-Formaldehyd |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |
| PNGase F | N-Glykosidase F |
| POD | Peroxidase |
| PS | Presenilin |
| PSGL-1 | P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| ROS | Reaktive Sauerstoffstezies |
| RT | Raumtemperatur |
| RZPD | Ressourcenzentrum Primärdatenbank |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ST6Gal1 | β -Galaktosid- α -2,6-Sialyltransferase |
| TACE | <i>TNF-α converting enzyme</i> |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TBS | trisgepufferte Kochsalzlösung |
| Tet | Tetrazyklin |
| TGN | <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TRANCE | <i>TNF-related activation-induced. cytokine</i> |
| TRAP | <i>Tartrate resistant acid phosphatase</i> |
| WB | Westernblot |
| UV | ultraviolett |
| VGSC β | <i>Voltage gated sodium channel β-subunit</i> |
| v/v | <i>volume per volume</i> |

1. Einleitung

1.1. Morbus Alzheimer

Schätzungen zufolge sind derzeit 24 Millionen Menschen weltweit und in Deutschland etwa 1,1 Millionen Menschen von einer Demenzerkrankung betroffen. Mehr als zwei Drittel der Betroffenen leiden an einer Demenz des Typs Morbus Alzheimer, womit die Alzheimersche Krankheit (*Alzheimer Disease, AD*) die häufigste Form von Demenzerkrankungen in der westlichen Welt ist.

Die Prävalenzrate, also der Anteil an Alzheimer-Erkrankten in der Bevölkerung, steigt exponentiell mit dem Alter an. Während von allen 65- bis 69- jährigen nur ca. 1,2 Prozent betroffen sind, ist bei den 80- bis 89- jährigen bereits jeder Vierte an einer Demenz erkrankt. Aktuelle Therapien sind vor allem palliativ und können nur kurzzeitig den Verlauf des geistigen Verfalls der Patienten verlangsamen, womit diese Erkrankung eine große soziale und finanzielle Belastung für die betroffenen Familien darstellt. Die Entwicklung einer Therapie, die Alzheimer verhindern oder den Verlauf der Krankheit verlangsamen könnte, wäre daher von großer wirtschaftlicher und sozialer Bedeutung. Trotz großer Anstrengungen in der Forschung konnten bislang keine Therapien entwickelt werden, welche die zugrunde liegenden molekularen, pathologischen Mechanismen angreifen.

1.1.1. Die Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung

Der erste dokumentierte Fall der Alzheimerschen Erkrankung wurde 1907 von Alois Alzheimer in seinem Artikel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ veröffentlicht. In diesem Artikel wurden erstmals die klinischen Symptome der 51-jährigen Auguste D. wie die Schwächung des Kurzzeitgedächtnisses, Orientierungslosigkeit, Halluzinationen und Beeinträchtigungen der Motorik mit einer neurofibrillären Pathologie im Gehirn in Verbindung gebracht (Alzheimer, 1907).

Da es für die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung derzeit noch keinen zuverlässigen Labortest gibt, erhält man absolute Sicherheit erst durch histologische Untersuchung von Hirngewebe *post mortem*.

Im Endstadium der Krankheit lassen sich große histologische Veränderungen im Gehirn nachweisen. Durch den Verlust von Nervenzellen kann es in schweren Fällen sogar zu einer

Schrumpfung des Gehirns (Atrophie) um bis zu 20% kommen und damit zu einer Erweiterung der Hirnkammern sowie einer Vertiefung der Windungsfurchen der Hirnoberfläche. Im Hippokampus und zerebralen Cortex ist die Atrophie besonders stark ausgeprägt (LaFerla et al., 2007).

Die von Alzheimer betroffenen Gehirne weisen zwei charakteristische histopathologische Veränderungen im Neokortex, Hippokampus und im limbischen System auf: extrazelluläre, herdförmige Amyloidablagerungen sowie intrazelluläre, neurofibrilläre Bündel (Braak et al., 1996).

Die neurofibrillären Bündel bestehen aus Aggregaten des hyperphosphorylierten Tau-Proteins, die sich im Inneren von Neuronen bilden (Grundke-Iqbal et al., 1986; Terry et al., 1964). Unter physiologischen Bedingungen ist dieses Mikrotubuli-assoziierte Protein für die Bildung und Stabilität der axonalen Mikrotubuli von großer Bedeutung (Friedhoff et al., 2000). Durch ein Ungleichgewicht verschiedener Kinasen und Phosphatasen, dessen Ursache noch nicht vollständig geklärt ist, kommt es zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, wodurch der Aufbau des Mikrotubuli-Apparates gestört und dadurch der axonale Transport blockiert wird (Mandelkow and Mandelkow, 1998).

Die amyloiden Ablagerungen („Plaques“) sind ein weiteres, für die Alzheimersche Erkrankung typisches, Phänomen. Viele Plaques zeichnen sich durch einen kompakten Amyloidkern aus, der von dystrophen Neuronen und aktivierten Gliazellen (Mikroglia und Astrozyten) umgeben ist (Apelt et al., 2003; Stalder et al., 1999). Diese Strukturen können Durchmesser von 20 bis 200 μm erreichen (Rudelli et al., 1984). Die Anwesenheit von reaktiven Astrozyten und Mikroglia in der unmittelbaren Umgebung der Plaques, ist Zeichen für eine entzündliche Reaktion.

Die Amyloidablagerungen bestehen zum größten Teil aus dem amphiphatischen Amyloid- β ($\text{A}\beta$)-Peptid, ein Abbauprodukt des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins APP (Allsop et al., 1983; Goldgaber et al., 1987). Weitere Bestandteile der Plaques sind das Apolipoprotein-E (ApoE) und Proteoglykane (Dickson et al., 1997; Snow et al., 1988). Die Bezeichnung $\text{A}\beta$ entstand ursprünglich aus der amyloiden Anfärbbarkeit und seiner β -Faltblatt-Struktur. Die Aggregationsneigung dieses Peptids entsteht erst durch die Umlagerung der ursprünglich α -helikalen zu einer β -Faltblattstruktur (Norstedt et al., 1994; Petkova et al., 2002).

1.1.2. Die Amyloid-Hypothese

Die Bedeutung, die das Amyloid- β ($A\beta$)-Peptid für die Entstehung und Progression der Alzheimerschen Erkrankung hat, zeigt sich in den seltenen Fällen vererbbarer, familiärer Alzheimer-Erkrankungen (FAD). Da sich diese frühe Form von Alzheimer in keiner Weise von der altersbedingten, sporadischen Alzheimer-Erkrankung unterscheidet, liegen wahrscheinlich dieselben Ursachen zugrunde.

Bislang konnten Mutationen in drei verschiedenen Genen als Ursache für die frühen, familiären Formen von Alzheimer (FAD, *familial Alzheimer disease*) identifiziert werden. Dazu zählen das β -Amyloid-Vorläufer-Protein (APP, Chromosom 21) sowie Presenilin 1 und 2 (PS1, Chromosom 14, PS2, Chromosom 1) (Levy-Lahad et al., 1995; Levy et al., 1990; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Obwohl die 180 bekannten Mutationen in diesen drei Genen teilweise sehr unterschiedliche molekulare Auswirkungen haben, führen alle zu einer Veränderung des Metabolismus von $A\beta$ oder dessen Aggregationseigenschaften. Es kommt entweder zu einem Anstieg des $A\beta$ Spiegel, oder das Verhältnis von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{40}$ (40 und 42 geben die Anzahl der Aminosäuren des Peptids an) verändert sich zu Gunsten von $A\beta_{42}$ (Bentahir et al., 2006; Citron et al., 1992; Kumar-Singh et al., 2006). $A\beta_{42}$ hat durch zwei zusätzliche hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus eine deutlich höhere Aggregationsneigung als $A\beta_{40}$ (Jarrett et al., 1993).

Abhängig von seiner Lokalisierung (intra- oder extrazellulär), Konzentration und seinem Oligomerisierungsgrad, besitzt $A\beta$ verschiedene toxische Eigenschaften: z.B. können $A\beta$ -Oligomere Poren in der Membran bilden, die zu einem unkontrollierten Ionenfluss führen (Arispe et al., 1993). Daneben kann $A\beta$ die Proteinkinase C (PKC) inhibieren (Lee et al., 2004). Auch wenn die kompakten amyloiden-Plaques nicht die Auslöser für die Demenz sind, haben sie dennoch einen erheblichen Anteil an der Zerstörung des Gehirns, da die amyloiden-Plaques beispielsweise Mikroglia-Zellen rekrutieren und aktivieren (Perlmutter et al., 1992; Stalder et al., 1999). Mikroglia sind in der Lage präzipitiertes $A\beta$ abzubauen (Qiu et al., 1997) und wirken so anfangs neuroprotektiv (Simard et al., 2006). Allerdings führt eine lang anhaltende Aktivierung von Mikrogliazellen zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und neurotoxischen Substanzen, die die umgebenden Neuronen schädigen (El Khoury et al., 2003; Simard et al., 2006).

1.2. Das β -Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) und dessen Prozessierung

Das für APP codierende Gen enthält 18 Exons, von denen Exon 7, 8 und 15 alternativ gespleißt werden können (Octave, 1995). Die drei Hauptformen werden nach ihrer Größe, bzw. aufgrund ihrer Anzahl an Aminosäuren (AS) als APP695, APP751 und APP770 bezeichnet. Während die Isoformen 751 und 770 vor allem von Zellen der peripheren Gewebe exprimiert werden, wird APP695 nur von Neuronen produziert (Neve et al., 1988). Alle drei Isoformen sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer großen Ektodomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Auf seinem Transport zur Plasmamembran erfährt das APP-Protein zahlreiche, posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung und Sulfatierung (Weidemann et al., 1989).

A β ist, wenn auch das bekannteste, nicht das einzige Fragment das bei der Prozessierung von APP entsteht. Durch sequentielle Proteolyse an verschiedenen Schnittstellen entstehen unterschiedliche lösliche (APPs) und membrangebundene APP-Bruchstücke, von denen jedes wahrscheinlich eigene Funktionen besitzt. Die beteiligten Enzyme werden nach der Position an der sie schneiden, als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnet. Die α -Sekretase schneidet innerhalb der A β -Sequenz zwischen Aminosäure 16 und 17 und verhindert so die Bildung des A β -Peptids, weshalb man vom nicht amyloidogenen Stoffwechselweg spricht (Esch et al., 1990). Die β -Sekretase dagegen leitet durch ihre Prozessierung des β APP die Entstehung des A β -Peptids und somit den amyloidogenen Weg ein (Abb. 1).

Die α -Sekretase generiert bei der Spaltung von β APP das membranständige 9 kDa große C-terminale Fragment (CTF) C83 sowie ein lösliches 100 bis 120 kDa großes Fragment (sAPP α).

Die bisher identifizierten α -Sekretasen sind ADAM10 und ADAM17. Die ADAM-(A *Disintegrin And Metalloprotease*) Proteine sind Zink-abhängige Proteasen und gehören zur Familie der Adamalysine, einer Untergruppe der Metzinkine.

ADAMs werden als Zymogene exprimiert und durch die Abspaltung der Prodomäne durch eine Pro-Protein-Konvertase oder einer Serin-Protease aktiviert (Nagase, 1997). Die Prodomäne ist außerdem für eine korrekte Faltung des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum wichtig.

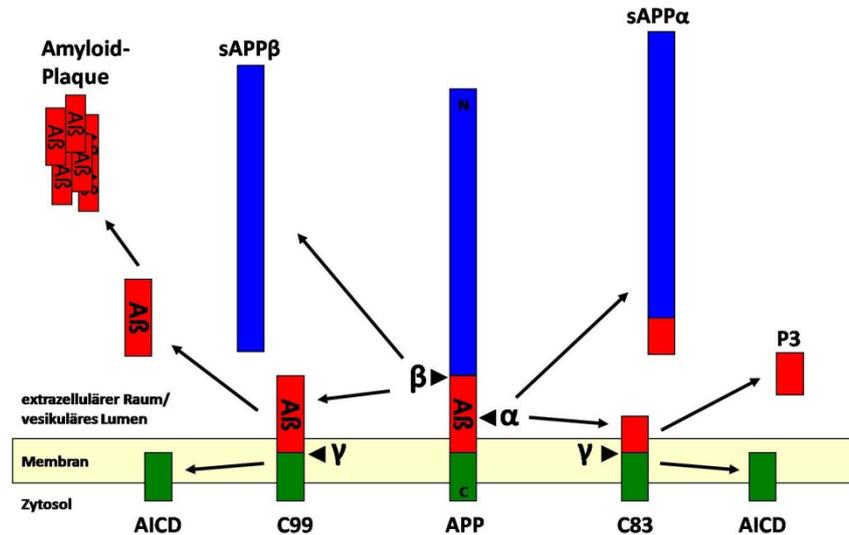


Abbildung 1: Proteolytische Prozessierung von APP durch α -, β - und γ -Sekretase

APP wird sequentiell von der β -Sekretase BACE1 (β) oder einer α -Sekretase (α) und der γ -Sekretase (γ) geschnitten. Durch den Schnitt der β -Sekretase entsteht lösliches APP β (sAPP β) und ein membrangebundenes Fragment (C99). C99 wird anschließend von der γ -Sekretase geschnitten, wodurch das für die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung mitverantwortliche A β -Peptid entsteht. Da der α -Sekretaseschnitt innerhalb der A β -Sequenz erfolgt und somit kein A β mehr gebildet werden kann, spricht man vom nichtamyloiden Weg der APP Prozessierung. Durch den Schnitt der α -Sekretase entsteht sAPP α und das membranständige Fragment C83 welches durch die γ -Sekretase in das lösliche P3-Peptid und die APP-intrazelluläre Domäne (AICD) gespalten wird. (Graphik modifiziert nach (Cole and Vassar, 2007))

ADAM17 wird auch als TACE (*TNF α converting enzyme*) bezeichnet, da es die Freisetzung des Zytokins TNF α von seinem membrangebundenen Vorläufer bewirkt (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). ADAM17 wurde erstmals 1998 als α -Sekretase beschrieben. In Zellkultursystemen konnte durch die Deletion oder die Inhibition von ADAM17 eine verminderte Prozessierung des APP an der α -Schnittstelle erzielt werden (Buxbaum et al., 1998). Da in ADAM17-defizienten, embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) trotz des Fehlens von ADAM17, weiterhin eine konstitutive Proteolyse des APP stattfindet, muss mindestens noch eine weitere α -Sekretase existieren, die 1999 als ADAM10 identifiziert wurde (Lammich et al., 1999). In transgenen Mäusen, die ADAM10 überexprimieren, findet eine vermehrte Prozessierung von APP auf dem nicht-amyloiden α -Sekretaseweg statt. Kreuzt man diese Tiere mit APP-transgenen „Alzheimer-Mäusen“ kommt es kaum noch zur Bildung von amyloiden Plaques (Postina et al., 2004).

Diese Befunde rücken die α -Sekretasen als molekulares Ziel für die Alzheimer-Therapie in den Fokus der Forschung. Hier gilt zu bedenken, dass ADAM10 und 17 ein sehr großes Substratspektrum besitzen. Hier könnte besonders die gesteigerte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF α ein Problem darstellen.

Nach dem Schnitt in der Ektodomäne wird das membranständige APP-C-terminales Fragment von einem weiteren, als γ -Sekretase bezeichneten, Enzym-Komplex prozessiert. Erst mit diesem zweiten Schnitt wird das P3-Peptid freigesetzt.

Die γ -Sekretase weist einige Besonderheiten auf. So schneidet diese Protease ihr Substrat innerhalb der hydrophoben Umgebung der Zellmembran. Da für die Hydrolyse von Peptidbindungen ein Wassermolekül benötigt wird, kann diese eigentlich nur in wässrigem Milieu erfolgen (Wolfe et al., 1999). Die γ -Sekretase ist ein großer Komplex, bestehend aus den vier Proteinen Presenilin 1 oder 2 (PS1, PS2), Nicastrin (NCT), APH-1 (anterior pharynx-defective-1) und PEN2 (presenilin enhancer 2), die alle für die Proteaseaktivität notwendig sind. Dieser Komplex bildet wahrscheinlich eine porenförmige Struktur in der Membran, die eine hydrophile Umgebung innerhalb der Lipidumgebung schafft und somit die Proteolyse ermöglicht (Lazarov et al., 2006).

Wie für β APP beschrieben, werden auch andere Substrate wie z.B. Notch, E-Cadherin und CD44, erst nach Abspaltung der Ektodomäne von der γ -Sekretase prozessiert. Da die Abspaltung der Ektodomäne essentiell für die Prozessierung durch die γ -Sekretase ist, spricht man in diesem Zusammenhang von regulierter, intramembranen Proteolyse (RIP) (Brown et al., 2000).

1.3. Die β -Sekretase BACE1 (β APP cleaving enzyme)

BACE1 schneidet das β -Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) an der β -Schnittstelle, wodurch die Ektodomäne als lösliches APP β (soluble APP β , sAPP β) frei wird (Haass, 2004; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Danach wird das 99 Aminosäure lange, C-terminale, membranständige Fragment (C99) vom γ -Sekretase-Komplex weiter prozessiert. Durch den Schnitt der γ -Sekretase wird das A β -Peptid und ein zytosolisches Fragment, die APP-intrazelluläre, C-terminale Domäne (AICD), frei (Haass, 2004) (Abb. 1).

1.3.1. Identifizierung der β -Sekretase BACE1

Seit den 80er Jahren ist bereits bekannt, dass A β das Spaltprodukt eines größeren Vorläuferproteins ist. Die für den β -Schnitt von β APP verantwortliche Protease konnte aber erst 1999 identifiziert werden. Die Entdeckung wurde von fünf unabhängigen Gruppen beinahe zeitgleich gemacht, wodurch die β -Sekretase heute unter den Namen BACE1,

Memapsin-2 und Aps-2 bekannt ist (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

BACE1 wird in fast allen Geweben, am stärksten aber im Gehirn, exprimiert (Yan et al., 1999). Intrazellulär befindet es sich hauptsächlich im Golgi-Apparat und in den Endosomen, welche auch die Kompartimente sind, in denen β APP von der β -Sekretase geschnitten wird (Koo and Squazzo, 1994; Vassar et al., 1999). Darüber hinaus hat BACE1 sein pH-Optimum in leicht saurem Milieu, wie es in den Endosomen herrscht (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999)

Die Überexpression von BACE1 führt zur vermehrten β APP-Prozessierung an der β -Schnittstelle und zur Freisetzung von A β (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Yan et al., 1999); hingegen hat eine Reduktion der Expression von BACE1 durch siRNA (small interference RNA) oder antisense RNA eine verminderte Prozessierung von β APP zur Folge (Basi et al., 2003; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Durch die Analyse von BACE1-defizienten Mäusen und den daraus gewonnen embryonalen Fibroblasten-Zelllinien (MEFs) sowie neuronalen Zellen, konnte gezeigt werden, dass BACE1 vermutlich die einzige β -Sekretase ist. In diesen Zellen konnte kein A β -Peptid nachgewiesen werden (Cai et al., 2001; Dominguez et al., 2005; Roberds et al., 2001).

Die Bedeutung von A β für die Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit sowie die Rolle von BACE1, als einzige β -Sekretase, konnte auch im Mausmodell gezeigt werden. Transgene Mäuse, die humanes APP mit typischen FAD Mutationen exprimieren, sind gute Modelle für die Erforschung der AD. Schaltet man bei diesen Tieren die β -Sekretase aus, wird kein A β mehr gebildet und die Tiere entwickeln keine AD Symptomatik (Rovelet-Lecrux et al., 2006; Sleegers et al., 2006).

1.3.2. Struktur

BACE1 besitzt im katalytischen Zentrum die Motive **D**TGS (AS 93-96) und **D**SGT (AS 289-292) und gehört damit zur Familie der Aspartyl-Proteasen (AP). Die beiden katalytisch wirksamen Aspartatreste sitzen im aktiven Zentrum des Proteins und sind essenziell für dessen Proteaseaktivität (Hussain et al., 1999). Aufgrund von Sequenzhomologien wird BACE1 in die Gruppe der Pepsin-ähnlichen Proteasen eingeordnet, zu der auch Pepsin A und C, Cathepsin D und E, Renin, Napsin-A und BACE2 gehören. BACE1 und BACE2, welches auf Aminosäure-Ebene die größte Homologie zu BACE1 aufweist (71%) (Acquati et al., 2000; Hong et al.,

2000; Ostermann et al., 2006), besitzen, wie für Aspartat-Proteasen üblich, zwei globuläre Domänen, wobei sich das aktive-Zentrum an der Berührungsstelle der N- und C-terminalen Domäne befindet (Hong et al., 2000; Ostermann et al., 2006). BACE1 und BACE2 besitzen einige Eigenschaften, die für Aspartat-Proteasen einmalig sind. Am auffälligsten ist, dass es sich bei BACE1 und BACE2 um Typ-I-Membranproteine handelt, während alle anderen Aspartat-Proteasen lösliche Enzyme sind. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass sich die BACE1-Aktivität nicht durch den Aspartyl-Protease-Inhibitor Pepstatin hemmen lässt.

```

1 MAQALPWLLL WMGAGVLP AH*GTQH GIRLPL RSG LGGAPLG LRLPRETDEE PEEPGRRGSF
61 VEMVDNLRGK SGQGYVEMT VGSP PQT LNI LV DTGS SNFA V GAAPHPFLH RYYQRQLSST
121 YRDLRKG VYV PYTQ GKWEGE LGTDLVSIPH GPNVTVRANI AAITESDKFF INGSNWEGIL
181 GLAYAEIARP DDSLE PFFDS LVKQTHV PNL FSLHL CGAGF PLNQSEVLAS VGGSMIIGGI
241 DHSLYTGSLW YTPIRREWYY EVIIVRVEIN GQDLKMD CKE YNYDKSIV DSGT TNLRLPKK
301 VFEAAVKS IK AASSTEKFPD GFWLGEQLV C WQAGTTPWNI FPVISLYLMG EVTNQSFRI T
361 ILPQQYLRPV EDVATSQDD C YKFAISQ SST GTVMGAVIME GFYVVFDRAR KRIGFAVSA C
421 HVHDEFRTAA VEGPFVTLDM EDCGYNIPQT DESTLMTIAY VMAAICALFM LPLCLMVCQW
481 RCLRCLRQQH DDFADDISLL K
    
```

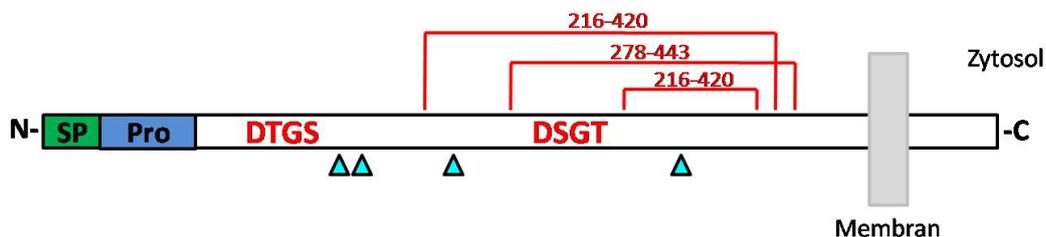


Abbildung 2: Aminosäuresequenz und Struktur von BACE1

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz sowie eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von BACE1. Das Signalpeptid (SP) ist in grün, die Pro-Domäne (Pro) in blau und die Position, an der das Signalpeptid abgespalten wird, ist mit einem * dargestellt. Weiterhin sind die Aspartylmotive des aktiven Zentrums (rote Schrift), die Positionen der N-Glykosylierungstellen (grün) sowie die über Disulfidbrücken verknüpften Cysteine (türkis) hervorgehoben. Die roten Linien markieren die Disulfidbrücken (Graphik modifiziert nach Fischer et al., 2002).

1.3.3. Intrazellulärer Transport und posttranslationale Modifikation von BACE1

BACE1 wird als 501 Aminosäures großes, unreifes Vorläuferprotein (proBACE1) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert und besitzt eine molekulare Masse von ca. 60 kDa (Capell et al., 2000; Creemers et al., 2001; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000). Auf dem Weg vom ER zur Plasmamembran und den Endosomen erfährt BACE1 zahlreiche,

posttranslationale Modifikationen und besitzt schließlich als reifes Enzym ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Im ER erhält es an vier Asparaginresten über N-glykosidische Bindung Kern-Oligosaccharide (Haniu et al., 2000), die im Golgi-Apparat zu Oligosacchariden vom komplexen Typ umgebaut (Charlwood et al., 2001) und im TGN schließlich an einem oder mehreren Zuckern sulfatisiert werden. Die korrekte Glykosylierung ist wichtig für die enzymatische Aktivität (Charlwood et al., 2001), während die Palmitoylierung von drei Cysteinen der zytoplasmatischen Domäne Einfluss auf den Transport und die Lokalisation des Enzyms hat (Benjannet et al., 2001). Weitere posttranslationale Modifikationen sind die Ausbildung von drei Disulfidbrücken und die Phosphorylierung von Serin 489 (Haniu et al., 2000; Pastorino et al., 2002). BACE1 ist in der Lage stabile Homodimere zu bilden, die eine größere enzymatische Aktivität als die Monomere besitzt (Schmechel et al., 2004; Westmeyer et al., 2004).

Im Golgi-Apparat wird die Pro-Domäne zwischen den Aminosäuren Arg45 und Glu46 abgespalten (Bennett et al., 2000). Während die Abspaltung des Propeptids bei fast allen Aspartat-Proteasen, eingeschlossen BACE2, autokatalytisch erfolgt, sind für die Prozessierung von BACE1 die im Golgi-Apparat vorkommenden Proproteinkonvertase und Furin, eine ubiquitär exprimierte Proproteinkonvertase verantwortlich. Bei BACE1 handelt es sich um kein typisches Zymogen, da es auch vor Abspaltung des Propeptids, enzymatische Aktivität besitzt (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001). Das Propeptid ist wahrscheinlich an der korrekten Faltung des Proteins beteiligt (Shi et al., 2001) und Voraussetzung für den Export von proBACE1 aus dem ER in den Golgi-Apparat (Benjannet et al., 2001).

Wie APP zirkuliert aktives BACE1 zwischen den Kompartimenten des sekretorischen Weges (Huse et al., 2000; Pastorino et al., 2002; Walter et al., 2001). Der korrekte intrazelluläre Transport und die richtige Lokalisierung wird dabei von Signalsequenzen in der zytoplasmatischen Domäne kontrolliert (Pastorino et al., 2002). Die Aminosäure-Folge DISLL im C-Terminus von BACE1 (AS 496-500) gehört zu den sogenannten ACDL-Motiven (*acid cluster-dileucin*), die am endosomalen Transport beteiligt sind. Entfernt man die zwei Leucine oder mutiert sie zu Alaninen, befindet sich BACE1 zum Großteil an der Plasmamembran und nur noch zu einem geringen Anteil in den Endosomen (Huse et al., 2000; Pastorino et al., 2002). Das ACDL-Motiv von BACE1 bindet an die Golgi-Apparat-residenten GGA- (*γ-ear containing ADP ribosylation factor-binding*) Proteine, die an der

Sortierung von Transportproteinen zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und den Endosomen beteiligt sind (He et al., 2002; He et al., 2005; Wahle et al., 2005).

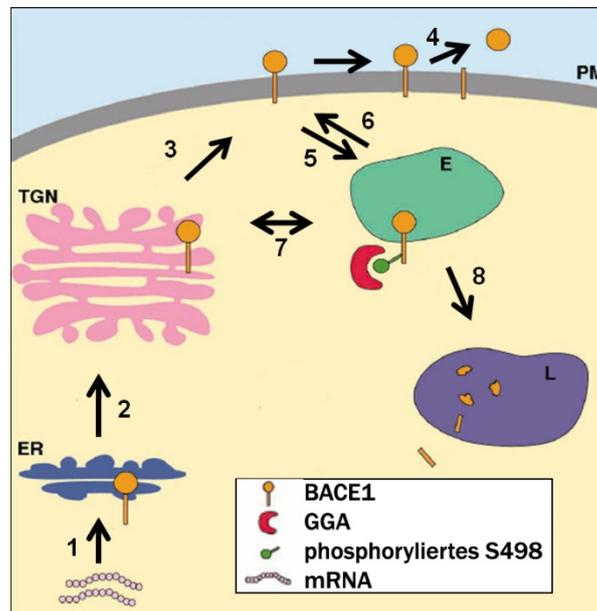


Abbildung 3: Intrazellulärer Transport von BACE1

BACE1 wird als Transmembranprotein am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert (1) und von dort zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert (2). Hier wird die Pro-Domäne abgespalten und BACE1 erfährt wichtige posttranslationale Modifikationen. Die Bindung an das Adapterprotein GGA (*γ-ear containing ADP ribosylation factor-binding*) ist wahrscheinlich wichtig für den anterograden sowie den retrograden Transport von BACE1 zwischen ER zum TGN (7). Ein Teil von BACE1 wird vom TGN aus an die Plasmamembran (PM) transportiert (3). Ein kleiner Teil des Proteins wird prozessiert und lösliches BACE1 frei (4). Der größte Teil bleibt aber in seiner membranständigen Form und wird in endozytotische Kompartimente (E) internalisiert (5). Für die Endozytose ist ein Di-Leuzin-Motiv von großer Bedeutung. Im sauren Milieu der Endosomen besitzt BACE1 seine höchste Aktivität, was optimale Bedingungen für die Proteolyse von APP bietet. Aus den Endosomen kann BACE1 direkt zurück an die Plasmamembran (6) oder retrograd zum TGN transportiert werden (7). Alternativ kann BACE1 auch in die Lysosomen transportiert und dort degradiert werden (8). (Graphik modifiziert nach Cole und Vassar, 2007)

1.3.4. BACE1 Substrate

Da APP zum größten Teil von α -Sekretasen und nur zu einem geringen Teil von BACE1 prozessiert wird, geht man davon aus, dass APP nicht das einzige und wahrscheinlich auch nicht das physiologische Substrat von BACE1 ist. Deshalb wurde intensiv nach möglichen anderen Substraten von BACE1 gesucht und neben APP konnten in den letzten Jahren weitere BACE1 Substrate identifiziert werden. Dazu gehören die APP-Homologen APLP1 und APLP2 (*amyloid precursor-like proteins*) (Li and Sudhof, 2004; Pastorino et al., 2004). APLP1 und 2 werden wie APP von der γ -Sekretase geschnitten, besitzen aber nicht die Sequenz für A β und tragen somit wahrscheinlich nicht zur Alzheimer-Pathogenese bei. Abgesehen von

der putativen Funktion der C-terminalen Fragmente der APLPs als Transkriptionsfaktoren ist wenig über die Funktion der APLPs bekannt (Pardossi-Piquard et al., 2005; Scheinfeld et al., 2002).

1.3.4.1. Neuregulin I Typ III

Besondere Aufmerksamkeit galt der Entdeckung, dass BACE1 an der Prozessierung von Neuregulin I Typ III beteiligt ist (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). Die Expression von BACE1 in Neuronen ist postnatal besonders hoch und nimmt mit fortschreitendem Alter deutlich ab. Zeitlich fällt die starke BACE1-Expression mit der Ausbildung der Myelinschicht von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems zusammen. Neuregulin I Typ III ist ein wichtiges Protein für die Regulation der Myelinisierung von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems und muss für seine korrekte Funktion endoproteolytisch gespalten werden. BACE1-defiziente Mäuse weisen eine Hypomyelinisierung von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems auf und in Lysaten von neuronalen Geweben findet sich in Abwesenheit von BACE1 deutlich mehr ungeschnittenes Neuregulin (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). NRG wird wie APP von einer α -, β - und γ -Sekretase geschnitten. Der α -Sekretase Schnitt erfolgt in unmittelbarer Nähe zum BACE1-Schnitt, was erklärt, dass die Inhibition oder das Fehlen von BACE1 nur zu einer Reduktion des NRG-Spaltproduktes, nicht aber zu dessen vollständigen Verschwinden führt (Hu et al., 2008; Hu et al., 2006).

1.3.4.2. Untereinheiten der spannungsgesteuerten Natriumkanäle β 1- β 4

Weitere identifizierte BACE1-Substrate sind die β -Untereinheiten (VGSC β = *voltage-gated sodium channel β -subunit*) der spannungsgesteuerten Natriumkanäle. Bei Sequenzanalysen zeigte sich, dass die β -Untereinheiten eine putative BACE1 Spaltstelle enthielten und es konnte gezeigt werden, dass sie in den selben Membranmikrodomänen wie BACE1 angereichert sind. Dass die β -Untereinheiten durch BACE1 prozessiert werden, konnte sowohl im Zellkulturmodell als auch *in vivo* belegt werden (Wong et al., 2005). Eine andere Gruppe konnte zeitgleich zeigen, dass die β 2-Untereinheit von einer α -Sekretase und der γ -Sekretase proteolytisch gespalten wird (Kim et al., 2005). Die Prozessierung von β 2 und wahrscheinlich auch der anderen VGSC β erfolgt somit durch die gleichen Proteasen, die auch an der Prozessierung von β APP beteiligt sind.

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle setzen sich aus einer einzigen porenbildenden α -Untereinheit und aus einer oder zwei β -Untereinheiten zusammen (Isom, 2002). Die vier bisher identifizierten β -Untereinheiten (β 1- β 4) sind stark glykosylierte Transmembranproteine mit einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne und besitzen große Homologie zu den Zelladhäsionsmolekülen (CAMs). Während die Untereinheiten β 1 und β 3 nicht kovalent mit der α -Untereinheit assoziiert sind, binden β 2 und β 4 kovalent über Disulfidbrücken an die α -Untereinheit (Yu et al., 2003). Die β -Untereinheiten erfüllen wichtige regulatorische Aufgaben für die Natriumkanäle. Sie spielen eine Rolle beim Transport der Kanäle an die Plasmamembran und stabilisieren sie dort, wodurch die Kanaldichte maßgeblich beeinflusst wird (Isom et al., 1995a; Isom et al., 1995b). Neben der subzellulären Lokalisation wirken β -Untereinheiten auch modulatorisch auf die Funktion der Natriumkanäle. Obwohl Natriumkanäle auch ohne assoziierte Untereinheiten Aktionspotentiale generieren können, sind die Untereinheiten wichtig für eine normale Funktion, wie beispielweise die schnelle Inaktivierbarkeit der Natriumkanäle. Neben ihrer Funktion als Untereinheiten für die Natriumkanäle, sind die VGSC β Zelladhäsionsmoleküle und vermitteln homophile Zelladhäsion und rekrutieren das Protein Ankyrin zu den Zell-Zell-Kontakten, wo es die Bindung des Zytoskellets an die Plasmamembran vermittelt (Malhotra et al., 2000). Dieser Mechanismus ist auch entscheidend für die hohe Dichte an Natriumkanälen in den Ranvierschen Schnürrigen von Axonen.

1.3.4.3. Das Lipoprotein-Rezeptor verwandte Protein LRP

Das Lipoprotein-Rezeptor verwandte Protein LRP wurde vor kurzem ebenfalls als BACE1-Substrat vorgestellt (von Arnim et al., 2005). LRP, ein integrales Typ-I-Membranprotein, ist ein multifunktionaler Endozytose-Rezeptor und ist eng mit der Alzheimer-Pathologie verknüpft. LRP steuert den Transport von A β , bindet A β -Komplexe und vermittelt deren Degradation. *In vivo* führt die Defizienz von LRP bei hAPP-transgenen Mäusen zu vermehrten Amyloidablagerungen, was die wichtige Rolle von LRP beim Abbau der A β -Plaques unterstreicht (Van Uden et al., 2002). Wie die meisten BACE1-Substrate wird auch LRP von Matrixmetalloproteasen (MMP) und dem γ -Sekretase-Komplex geschnitten. BACE1 kann mit LRP in Gehirnlysaten koimmunopräzipitiert werden, die beiden Proteine kolokalisieren in cholesterolreichen Mikrodomänen der Membran, sogenannten „*Lipid Rafts*“. Desweiteren führt die Überexpression von BACE1 zur verstärkten Proteolyse von LRP (von Arnim et al.,

2005). Bis heute wurde jedoch die Prozessierung von LRP durch BACE1 *in vivo* noch nicht gezeigt.

1.3.4.4. β-Galaktosid-α-2,6-Sialyltransferase (ST6Gal1)

Das erste identifizierte, nicht zur βAPP-Familie gehörende, BACE1-Substrat war die an der Regulation der Immunantwort beteiligte β-Galaktosid-α-2,6-Sialyltransferase (ST6Gal1). BACE1 und ST6Gal1 sind zu einem großen Teil in den Membranen des Golgi-Apparates lokalisiert. Die Überexpression von BACE1 im Zellkultursystem führt zur vermehrten Sekretion von löslichem ST6Gal1 (Kitazume et al., 2001), wogegen im Serum von BACE1-defizienten Mäusen weniger ST6Gal1 nachgewiesen wurde (Kitazume et al., 2005).

Ein weiteres immunologisch relevantes BACE1-Substrat ist der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (PSG-L1), der die Adhäsion von Leukozyten bei entzündlichen Reaktionen moduliert. Durch Überexpressionsversuche konnte gezeigt werden, dass BACE1 neben BACE2 und ADAM10 in der Lage ist PSG-L1 zu spalten, was durch Experimente mit BACE1-defizienten MEFs bestätigt werden konnte (Lichtenthaler et al., 2003).

1.3.4.5. Rezeptor für Interleukin 1 (IL-1 RII)

Die Abspaltung der Ektodomäne von Transmembranproteinen spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. Der lösliche Rezeptor für Interleukin-1 (IL-1 RII) wirkt entzündungshemmend indem es die Menge an aktivem IL-1 reduziert. Somit kann die schädliche Wirkung von IL-1 im Gehirn abgeschwächt werden. In der Cerebrospinalflüssigkeit von AD-Patienten wurden erhöhte Mengen an löslichem IL-1RII gemessen (Garlind et al., 1999). Wie schon für andere BACE1-Substrate beschrieben, kann auch IL-1RII von allen an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen gespalten werden (Kuhn et al., 2007). Die Spaltstellen von BACE1 und der α-Sekretase liegen nur 4 Aminosäuren auseinander, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass in BACE1-defizienten Zellen keine Reduktion des C-terminalen Fragments beobachtet werden konnte, da α- und β-CTFs nicht voneinander unterschieden werden konnten. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der Verlust der β-Sekretase-Aktivität durch die α-Sekretase kompensiert werden kann. Diese beiden Punkte könnten die Suche nach neuen BACE1-Substraten deutlich erschweren.

1.3.5. Phänotyp der BACE1 Knockout-Maus

Trotz der Beteiligung von BACE1 an zahlreichen proteolytischen Prozessen im Gehirn, konnten in BACE1-defizienten Mäusen zunächst keine auffälligen Verhaltensänderungen beobachtet werden. Erst sehr viel intensivere und genauere Verhaltenstest enthüllten subtile Verhaltensabnormitäten wie Hyperaktivität, Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens und des explorativen Verhaltens (Dominguez et al., 2005; Harrison et al., 2003; Laird et al., 2005; Ohno et al., 2004)

Da einige der kürzlich identifizierten BACE1-Substrate eine Rolle im Immunsystem spielen, stellt sich die Frage, ob BACE1 an der Regulation immunologischer Prozesse beteiligt sein könnte. Zu dieser Überlegung passt ein weiterer Phänotyp der BACE1-defizienten Maus, der allerdings nicht in allen der vier generierten Knock-out-Linien beobachtet wurde. Bei BACE1-defizienten Tieren zeigte sich innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt eine erhöhte Sterblichkeit und eine auffällige Reduktion der Körpergröße im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Dominguez et al., 2005; Roberds et al., 2001). Interessant ist, dass die Sterblichkeit der BACE1^{-/-} Tiere deutlich reduziert ist, wenn die Tiere anstatt konventionell, also unter niedrigen hygienischen Standards, in spezifisch pathogenfreier Umgebung gehalten werden. Dies könnte erklären, warum dieser Phänotyp von anderen Gruppen nicht beobachtet wurde und es stellt sich die Frage, ob BACE1-defiziente Mäuse Krankheitserreger schlechter bekämpfen können als Wildtyp-Tiere.

Um Beeinträchtigungen des Immunsystems in Mausmodellen untersuchen zu können, muss eine Immunantwort provoziert werden. Dazu könnten BACE1-defiziente Mäuse und entsprechende Kontrolltiere mit spezifischen Pathogenen infiziert und der Verlauf der Infektion als Maß für die Immunantwort beobachtet werden.

1.4. *Listeria monocytogenes* als Modell für bakterielle Infektionen

1.4.1. Das Immunsystem

Die Immunabwehr ist die Fähigkeit eines Organismus, Antigene (immunogene Substanzen) spezifisch abzuwehren. Die Antwort des Immunsystems lässt sich in angeborene und adaptive Immunität unterteilen. Die angeborene Immunität bildet die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Pathogene. Fremdorganismen werden über

unspezifische Mechanismen angegriffen, wodurch der Organismus schnell auf das Pathogen reagiert und dessen Ausbreitung verhindert werden kann. Die meisten Infektionen werden so eingedämmt, bevor es überhaupt zu einer Aktivierung der adaptiven Immunantwort kommt. Die adaptive Immunantwort setzt erst etwa 96 Stunden nach der Infektion ein, da die Antigene erst zu den lymphatischen Organen transportiert und von naiven B- und T-Zellen erkannt werden müssen, um so deren klonale Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen auszulösen. Die von B-Zellen vermittelte Antwort wird auch als humorale Immunantwort bezeichnet, da hier lösliche Antikörper eine zentrale Rolle spielen.

1.4.2. *Listeria monocytogenes* (LM)

Listerien sind gram-positive, stäbchenförmige, nicht sporenbildende, fakultativ-anaerobe Bakterien. Die zu dieser Gattung gehörenden *Listeria monocytogenes* sind eine humanpathogene Art, die aber für gesunde Menschen kaum eine Gefahr darstellen. Anfällig für eine Listeriose sind vor allem immungeschwächte Menschen sowie Säuglinge. Da *L. monocytogenes* sich vor allem in immunprivilegierten Geweben vermehrt, stellt eine LM-Infektion bei Schwangeren eine besondere Gefahr für den Fötus dar (Quelle: Bundesinstitut für Risikobewertung, www.bfr.bund.de/cd/8808).

L. monocytogenes wird wegen des relativ ungefährlichen Umgangs und seiner guten Vermehrbarkeit häufig als Infektionsmodell eingesetzt. Ein weiterer Vorteil ist der hoch reproduzierbare Infektionsverlauf von *L. monocytogenes*, was dieses Bakterium zu einem verlässlichen Modell für Infektionsstudien im Mausmodell macht.

Etwa eine Stunde nach der Infektion mit *L. monocytogenes* ist der Großteil der Bakterien von den Makrophagen der Leber, den Kupffer-Zellen, und zu einem geringeren Teil von den Makrophagen der Milz phagozytiert worden (Mackaness, 1962; North, 1970). In den ersten acht bis zwölf Stunden nach intravenöser Infektion von *L. monocytogenes*, werden in der Leber 60 – 80 % der Bakterien inaktiviert (Conlan and North, 1991). In der Milz werden dagegen nur wenige Bakterien innerhalb der ersten 24 Stunden getötet, stattdessen parasitieren die Listerien in der Milz in verschiedene phagozytierende Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), Parenchymzellen und dendritische Zellen (Conlan, 1996; Conlan and North, 1994). Dies ist aufgrund einer besonderen Eigenschaft von *L. monocytogenes* möglich. Listerien können das Phagolysosom nicht-aktivierter Makrophagen verlassen, indem sie das bakterielle Hämolysin Listeriolysin O und eine Phosphatidylinositol-spezifische

Phospholipase exprimieren (Mengaud et al., 1991; Mengaud et al., 1987). Im Zytoplasma rekrutieren Listerien mittels des Oberflächenproteins ActA Aktin der Wirtszelle und bilden Aktinfilamente aus, mit denen sich der Organismus aktiv fortbewegen kann (Domann et al., 1992). Bei Erreichen der Zellmembran der Wirtszelle, ermöglichen die Proteine Internalin A und B die Evasion des Listeriums aus dem Phagozyten und die Invasion in eine benachbarte Zelle, ohne mit dem extrazellulären Raum in Kontakt zu treten (Dramsi et al., 1995; Drevets et al., 1995; Portnoy et al., 1992). Residente, also nicht aktivierte Makrophagen können, trotz starker bakterizider Eigenschaften, die Evasion der Listerien nicht verhindern. Erst nach deren Aktivierung können die Makrophagen die Listerien in den Phagolysosomen zerstören, bevor diese daraus entkommen können (Portnoy et al., 1989; van Dissel et al., 1987). Erst 24 Stunden nach der Infektion beginnt eine effektive Bekämpfung durch die jetzt aktivierten Makrophagen, indem sie auch andere, nicht-phagozytierende, infizierte Zellen abtöten und deren Bakterien aufnehmen und zerstören (Conlan and North, 1994).

Aktiviert Makrophagen töten Pathogene über zahlreiche Mechanismen ab. Der saure pH-Wert des Phagolysosoms wirkt bakteriostatisch und lysosomale Enzyme (Lysozym, saure Hydrolasen) greifen die Zellwand von Bakterien an. Neben der Expression antimikrobieller Peptide (Defensine, kationische Peptide) ist die Produktion reaktiver Stickoxide und reaktiver Sauerstoffintermediate (ROS) ein wichtiger Mechanismus, über den die Abtötung von Pathogenen durch aktivierte Makrophagen stattfindet.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug ist die Präsentation von Erregerantigenen mittels des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (MHCII = major histocompatibility complex type II), der nach Aktivierung verstärkt exprimiert wird. T-Zellen können so die an der Zelloberfläche der Makrophagen präsentierten Antigene erkennen und die spezifische Immunantwort auslösen.

1.4.3. Abspaltung von Oberflächenmolekülen als wichtiger immunregulatorischer Mechanismus

An der Regulation immunologischer Prozesse sind zahlreiche Rezeptoren und deren Liganden beteiligt. Die Abspaltung dieser Proteine von der Zelloberfläche ist ein wichtiger Mechanismus, der es ermöglicht, immunologische Prozesse einzuleiten, die Stärke der Immunantwort zu regulieren und diese auch zu beenden. So kann beispielsweise die Wirkung von membranständigen Zytokinen stärker oder schwächer als die der löslichen

Formen sein. Für einige Zytokinrezeptoren, wie bei den Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF α) Rezeptoren I und II (TNFR1, TNFR2), ist beschrieben, dass der lösliche Rezeptor die Konzentration an freien Zytokinen durch Bindung reduzieren und somit die inflammatorische Reaktion abschwächen kann (Van Zee et al., 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Prozessierung der an wichtigen immunologischen Prozessen beteiligten membranständigen Proteine TRANCE (*tumor necrosis factor-related, activation-induced cytokine*), BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*) und ICAM1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) durch BACE1 untersucht. Diese Proteine werden in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt.

1.4.4. TRANCE (*tumor necrosis factor-related, activation-induced cytokine*)

TRANCE ist ein Typ-II-Transmembranprotein, das Homotrimere bildet, die von ADAM- (*A Disintegrin And Metalloprotease Domain*) und Matrixmetalloproteasen (MMP) gespalten werden und dadurch auch in löslicher Form vorliegt (Hikita et al., 2006; Lynch et al., 2005).

TRANCE, auch unter den Namen RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand*) und ODF (*Osteoclast differentiation factor*) bekannt, ist an der Osteoklastengnese und der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Es wird stark in Lymphknoten, Thymus und Lunge und schwach in vielen anderen Geweben wie Knochenmark und Milz exprimiert (Wada et al., 2006). In entzündeten Gelenken wird TRANCE von Synovialzellen exprimiert und von aktivierten T-Zellen sekretiert. Dieses lösliche TRANCE hat, über die Aktivierung von Osteoklasten, Anteil am Abbau der Gelenkknorpel bei rheumatoider Arthritis (Schett et al., 2005).

1.4.5. ICAM1 (*Intercellular adhesion molecule-1*)

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) ist ein Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie. Es besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Teil, gefolgt von einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Schwanz. ICAM-1 Expression konnte auf Endothelzellen, epithelialen Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Fibroblasten-ähnlichen Zellen sowie in verschiedenen menschlichen Geweben (Thymus, Lymphknoten, Haut, Niere und Leber) nachgewiesen werden (Dustin et al., 1986). Die wichtigsten bekannten Funktionen von

ICAM-1 sind die Emigration von Leukozyten aus Blutgefäßen und die Aktivierung von T-Zellen.

Um Infektionen in Geweben effektiv bekämpfen zu können, müssen Leukozyten aus dem Blutstrom in das betroffenen Gewebe einwandern. Dieser Prozess vollzieht sich in mehreren Schritten. Treten Leukozyten aus dem Blutstrom mit aktivierten Endothelzellen in Kontakt, werden diese über die Bindung von Selektinen an ihre Liganden an der Gefäßwand festgehalten. Dieser Kontakt besteht nur für wenige Sekunden, da die interagierenden Proteine sehr schnell durch Proteolyse von der Membran abgespalten werden (Walcheck et al., 1996). Die Lymphozyten binden an die nächste Endothelzelle, wodurch es zu einer Art Rollen der Zellen entlang des Endothels kommt. Diese „langsamen“ Leukozyten können nun über Integrine an ICAMs, die auf aktivierten Endothelzellen in der Nähe des Entzündungsherds exprimiert werden, binden. Die Expression von ICAM-1 und Integrinen wird durch Entzündungsmediatoren wie Interferon γ (IFN γ), Interleukin (IL)-6 oder Tumornekrose-Faktor (TNF)- α induziert. Die nun fest ans Endothel gebundenen aktivierten Leukozyten transmigrieren durch das Epithel und wandern in das entzündete Gewebe ein (Petri et al., 2008).

Bei der Aktivierung von T-Zellen hat ICAM-1 großen Anteil an der Stabilität der immunologischen Synapse sowie als kostimulierender Faktor. T-Zellen binden über den T-Zellrezeptor an das für sie spezifische Antigen, welches von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) über MHC (*major histocompatibility complex*) präsentiert wird. Durch die zusätzliche Bindung von ICAM-1 an LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) bleibt der Zellkontakt bis zu mehreren Tagen stabil. Darüber hinaus induziert die ICAM-1 - LFA-1-Interaktion die Proliferation von T-Lymphozyten und deren Differenzierung zu Effektorzellen (Van Seventer et al., 1990).

Im Serum gesunder Menschen lässt sich lösliches ICAM-1 nachweisen, dessen Konzentration bei verschiedenen Infektions- und Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder bakterieller Meningitis, erhöht ist (Rieckmann et al., 1994; Seth et al., 1991). Bisher konnten zwei Proteasen beschrieben werden, die an der Freisetzung von löslichem ICAM-1 beteiligt sind. Das ist zum einen die α -Sekretase ADAM17 und zum anderen die Matrixmetalloproteinase MT-1 MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinase) (Essick et al., 2008; Tsakadze et al., 2006).

1.4.6. BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*)

BAFF ist auch unter den Namen BlyS (*B Lymphocyte Stimulator*) (Moore et al., 1999), TALL-1 (*TNF- and ApoL related Leucocyte expressed Ligand 1*) (Shu et al., 1999), THANK (*TNF-Homolog that activates Apoptosis, Nuclear factor κ B and c-Jun NH2-terminal Kinase*) (Mukhopadhyay et al., 1999) und TNFSF13b (*TNF-Superfamily Member 13b*) (Gross et al., 2000) bekannt. Es ist ein Zytokin der TNF-Familie und weist die typischen Eigenschaften dieser Proteinfamilie auf. Es ist ein Transmembranprotein vom Typ II, kommt sowohl membranständig, als auch in löslicher Form vor und bildet in beiden Zuständen Homotrimere aus (Nardelli et al., 2001; Zhukovsky et al., 2004). Die für die Abspaltung des löslichen BAFFs verantwortliche Protease konnte noch nicht identifiziert werden. Es handelt sich dabei aber wahrscheinlich um eine Protease vom Furin-Typ, da BAFF eine Furin-typische Spaltungssequenz besitzt (Schneider et al., 1999). Eine Spleißvariante von BAFF (Δ BAFF) kann mit dem membranständigen BAFF Heteromultimere bilden, wodurch die Prozessierung und die Rezeptoraffinität des Zytokins reduziert wird und so die Effekte von BAFF reguliert werden können (Gavin et al., 2003).

Für BAFF sind drei Rezeptoren beschrieben, die alle der TNF-Rezeptorfamilie angehören. BCMA (*B-cell maturation antigen*) und TACI (*transmembrane activator and CAML interacting protein*) binden neben BAFF auch APRIL (*A proliferation inducing ligand*), welches die größte Homologie zu BAFF aufweist (Thompson et al., 2001). An den BAFF-Rezeptor (BAFF-R) bindet ausschließlich BAFF (Gross et al., 2000; Marsters et al., 2000).

BAFF wird vor allem von peripheren, lymphatischen Zellen des Blutes, in der Milz und in den Lymphknoten exprimiert, kann aber auch in anderen Geweben schwach nachgewiesen werden (Moore et al., 1999). Die exprimierenden Zelltypen sind hauptsächlich Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und aktivierte T-Zellen (Nardelli et al., 2001; Shu et al., 1999).

Die wichtige Rolle, die BAFF für das Überleben und die Entwicklung von muren B-Zellen spielt, zeigt sich in BAFF-defizienten und BAFF-transgenem Mausmodellen. Mäuse die kein BAFF exprimieren, weisen keine muren B-Zellen in der Peripherie auf und in der Milz finden sich nur T1 B-Zellen, nicht aber die reiferen T2-B-Zellen (vgl. Abb. 4) (Schiemann et al., 2001). Dies zeigt, dass für die Reifung von B-Zellen neben dem B-Zell-Rezeptor auch BAFF von essentieller Bedeutung ist. Darüber hinaus ist BAFF auch ein wichtiger antiapoptotischer Faktor. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Überleben reifer T2 B-

Zellen aus der Milz in Anwesenheit von BAFF deutlich verlängert wird (Hsu et al., 2002; Rolink et al., 2002). Mäuse, die BAFF überexprimieren, zeigen phänotypisch erhöhte B-Zellzahlen in der Peripherie, die peripheren lymphatischen Organe sind vergrößert und die Mäuse entwickeln Autoimmunerkrankungen und eine damit verbundene Hypergammaglobulinämie (Khare et al., 2000; Mackay et al., 1999).

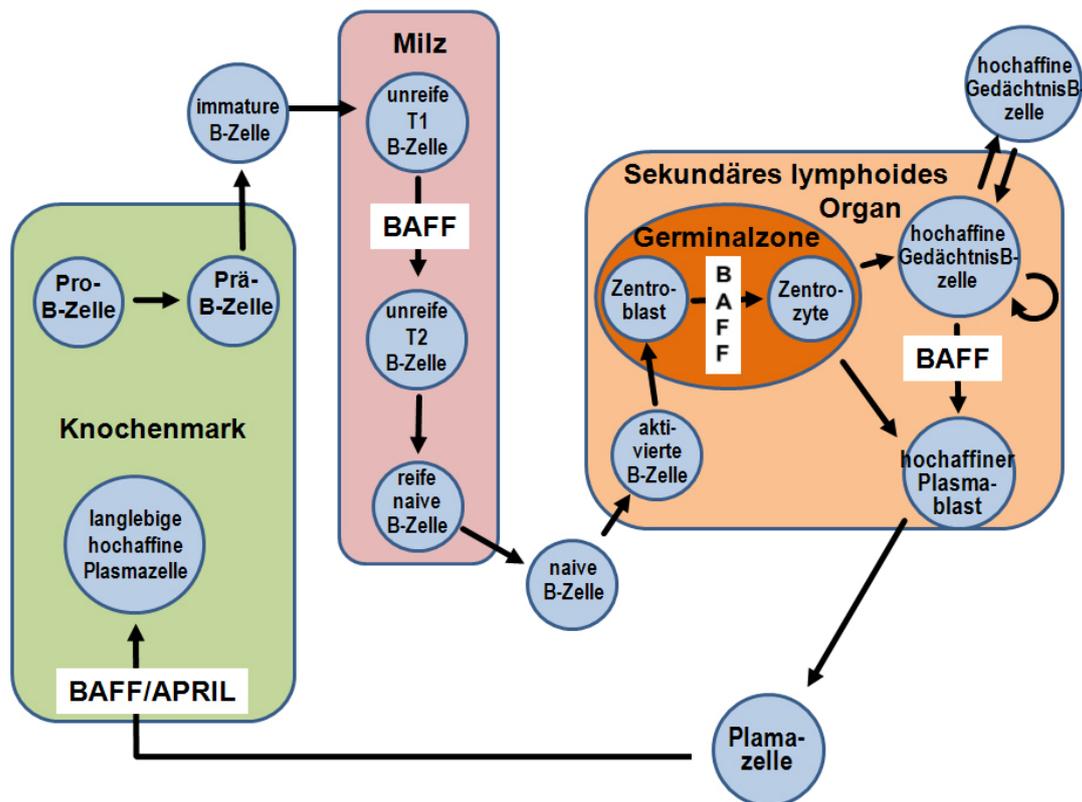


Abbildung 4: Einfluss von BAFF auf die B-Zellentwicklung

Pro-B-Zellen gehen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor und entwickeln sich zu Prä-B-Zellen. Diese verlassen das Knochenmark und gelangen über das Blut in die Milz, wo die Reifung der B-Zellen erfolgt. Für den Übergang (Transition) der T1 zu T2 B-Zellen ist BAFF ein essentieller Faktor. BAFF-defiziente Mäuse besitzen kaum B-Zellen jenseits des T1-Reifestadiums. BAFF ist noch an weiteren B-Zellreifungsprozessen beteiligt. So ist BAFF über die Bindung an BCMA (*B-Cell Maturation Protein*) für das Langzeitüberleben von Plasmazellen sowie bei der Germinalzentrum-Reaktion für die Entwicklung der Zentrozyte aus der Zentroblaste mitverantwortlich. (Graphik modifiziert nach Baker, 2004)

2. Fragestellung

Die Aspartatprotease BACE1 generiert durch die Prozessierung von β APP den N-Terminus des Amyloid- β -Peptids und ist somit maßgeblich an der Entstehung und Progression der Alzheimerschen Krankheit beteiligt. Die Inhibition von BACE1 stellt daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Im Hinblick auf mögliche Folgen einer Inhibition der Protease *in vivo* sollen die Funktionen von BACE1 näher untersucht werden. Dazu sollen Mäuse, die defizient für BACE1 sind, phänotypisch und biochemisch untersucht werden. Der Fokus soll dabei auf die Auswirkungen der BACE1-Defizienz auf das Immunsystem, sowie auf die Identifikation neuer Substrate von BACE1 gelegt werden.

Durch systemische Infektion der Mäuse mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* ist zu überprüfen, ob die BACE1-Defizienz sich auf die Immunantwort der Mäuse auswirkt. Darüber hinaus soll die Fähigkeit der Listerienabtötung von primären, aus dem Knochenmark von BACE1-defizienten und Wildtyp-Mäusen isolierten Makrophagen untersucht werden.

Für die Identifikation von BACE1 Substraten wurden im Vorfeld dieser Arbeit zahlreiche Transmembranproteine in einem Alkalische-Phosphatase-Versuch auf eine Prozessierung durch BACE1 hin untersucht. BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*) und TRANCE (*tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine*) erwiesen sich dabei als potentielle BACE1 Substrate. In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob TRANCE und BAFF tatsächlich Substrate für BACE1 darstellen.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung ob die β -Sekretase BACE1 einen Einfluss auf die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 hat. Mit Hilfe von humanen Neuroblastomazellen (SHSY-5Y-Zellen), die stabil mit BACE1 transfiziert sind, sowie von embryonalen Fibroblasten und Geweben aus Wildtyp- und BACE1-defizienten Mäusen soll ein möglicher Einfluss von BACE1 auf die Expression und die Aktivität der Proteasen ADAM10 und ADAM17 analysiert werden.

Ein separater Teil dieser Arbeit gilt der Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.2 α in Abhängigkeit von BACE1. Anlass für diese Untersuchungen sind Berichte, wonach die modulatorischen Untereinheiten des Natriumkanals β 2 und β 4 Substrate für BACE1 sind. Als Modellsystem werden HEK293T-Zellen verwendet, die mit Nav1.2 α und β 2, β 4 sowie BACE1 in verschiedenen Kombinationen transfiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien, Enzyme und Materialien

Für diese Arbeit wurden Chemikalien, Enzyme und Materialien von folgenden Firmen bezogen:

| | |
|---|--|
| Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden | ECLplus WB Detection System, ECLadvanced WB Detection System, |
| Applichem, Darmstadt | Formaldehydlösung |
| BioRad, München | Dc Protein Assay, Molekulargewichtsmarker, SDS-PAGE Kammer Westernblotkammern |
| Calbiochem, LaJolla, USA | Mowiol, NP-40 |
| Fermentas, St. Leon-Rot | dNTPs, Restriktionsenzyme, 6x Ladepuffer |
| Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe | Antikörper |
| PAA Laboratories, Linz, Österreich | Penicillin/Streptomycin 100x, DMEM, Trypsin-EDTA, RPMI-1640, FKS |
| Roche, Mannheim | High Pure PCR Product Purification Kit, Complete Proteaseinhibitor, FuGene 6, |
| Roth, Karlsruhe | Acrylamid Rotiphorese Gel 30, Agarose Ultra-Qualität, β-Mercaptoethanol, Ethidiumbromidlösung (1%ig), Nitrozellulose, PVDF-Membran, Whatmanpapier |

| | |
|--------------------------|---|
| Sarstedt, Nümbrecht | 6-, 24- und 96-Well-Platten, Zellkulturschalen (3, 6 und 10 cm), Zellschaber, Kunststoffverbrauchsmaterialien |
| Sigma Aldrich, Steinheim | BSA, DABCO, DAPI, Saponin, Triton X-100, Tween 20, |

Eine ausführliche, alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte, Chemikalien, Kits und Materialien findet sich im Anhang.

3.1.2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2 aufgelistet. Es handelt sich dabei um *E. coli* K-12 Derivate. Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 und die zur Genotypisierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide in Tab. 4 aufgeführt.

3.1.2.1. Bakterienstämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|--------------|---|---------------------------|
| DH5 α | F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA endA1 hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺) | Takara, Shiga, Japan |
| XL1-blue | RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene, La Jolla, USA |
| Top10/P3 | F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA 1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG P3: Kan ^R Amp ^R (am)Tet ^R (am) | Invitrogen, Karlsruhe |

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

3.1.2.2. Leervektoren

| Plasmid | Resistenz | Eigenschaften | Quelle/Referenz |
|----------------------|-----------|--|----------------------------------|
| pcDNA3 | Amp/Neo | Eukariotischer Expressionvektor | Invitrogen, Karlsruhe |
| pcDNA3.1 | Amp/Neo | Eukariotischer Expressionvektor | Invitrogen, Karlsruhe |
| pcDNA3.1/V5-His-TOPO | Amp/Neo | Eukariotischer Expressionvektor für TOPO-Klonierung mit V5 und His Tag | Invitrogen, Karlsruhe |
| pEGFP-N1 | Kan | Eukariotischer Expressionvektor mit <i>Green Fluorescent Protein</i> GFP aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i> | Clontech, Mountain View, CA, USA |

| | | | |
|-------|-----------|---|-----------------------|
| pCDM8 | Amp + Tet | Eukariotischer Expressionvektor, nur in speziellen, das P3-Plasmid tragende ultrakompetenten <i>E-colis</i> zu propagieren, besonders geeignet für sehr lange Sequenzen | Invitrogen, Karlsruhe |
|-------|-----------|---|-----------------------|

Tabelle 2: Verwendete Klonierungsvektoren

3.1.2.3. Expressionsplasmide

| Name | Eigenschaft | Quellen |
|----------------|---|--|
| mBACE1 | Maus BACE1 in pSG5 | <i>Bart de Strooper</i> , Department for Developmental and Molecular Genetics, VIB, Leuven, Belgien |
| mBACE1-myc | Maus BACE1 mit Myc-Tag in pcDNA3 | <i>Bart de Strooper</i> , Department for Developmental and Molecular Genetics, VIB, Leuven, Belgien |
| mBACE1 inaktiv | Inaktives Maus BACE1 mit Myc-Tag in pcDNA3, Austausch eines Aspartylrestes im aktiven Zentrum (D 289 -> N) durch Punktmutation G 865 -> A | Eigene Klonierung |
| hBACE1 | Humanes BACE1 in pcDNA3.1/Zeo | <i>Christian Haas</i> , Center for Integrated Protein Science, Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| TRANCE-AP | Maus TRANCE mit Alkalische Phosphatase (AP)-Tag am C-Terminus und Flag-Tag am N-Terminus in pAptag-5 | <i>Carl Blobel</i> , Hospital for Special Surgery at Weill Medical College of Cornell University, New York, USA |
| mBAFF | Maus BAFF cDNA in pCR Blunt II-TOPO (Invitrogen); RZPD Klon BC106840 | RZPD, Ressourcenzentrum Primärdatenbank, Berlin |
| mBAFF-HA | Maus BAFF mit HA-Tag; in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | Eigene Klonierung |
| ICAM1 | Humanes ICAM1 in pcDNA3.1 | <i>Stanley E. D'Souza</i> , University of Louisville, Louisville, U.S.A. |
| β2-V5 | Maus VGSC-SU β2 in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | <i>Wong et al.</i> , JBC, 2005 |
| β4-V5 | Maus VGSC-SU β4 in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | <i>Wong et al.</i> , JBC, 2005 |
| β2-eGFP | Maus VGSC-SU β2 mit eGFP-Tag in peGFP-N1 | Eigene Klonierung |
| β4-eGFP | Maus VGSC-SU β4 mit eGFP-Tag in peGFP-N1 | Eigene Klonierung |

| | | |
|---------------|---|---|
| β2-CTF-eGFP | Maus VGSC-SU β2-CTF, entspricht dem C-terminalen, membranständigen Fragment von β2, dass durch die Prozessierung durch BACE1 generiert wird; mit Signalpeptid für korrekte Lokalisierung fusioniert; in eGFP-N1 | Eigene Klonierung |
| β4-CTF-eGFP | Maus VGSC-SU β4-CTF, entspricht dem C-terminalen, membranständigen Fragment von β4, dass durch die Prozessierung durch BACE1 generiert wird; mit Signalpeptid für korrekte Lokalisierung fusioniert; in eGFP-N1 | Eigene Klonierung |
| β2-NTF-eGFP | Maus VGSC-SU β2-NTF, entspricht dem N-terminalen, löslichen Fragment von β2, dass durch die Prozessierung durch BACE1 generiert wird, in eGFP-N1 | Eigene Klonierung |
| β4-NTF-eGFP | Maus VGSC-SU β4-NTF, entspricht dem N-terminalen, löslichen Fragment von β2, dass durch die Prozessierung durch BACE1 generiert wird, in eGFP-N1 | Eigene Klonierung |
| β2-CTF | Wie β2-CTF-eGFP aber anstatt eGFP mit V5-His Tag in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | Eigene Klonierung |
| β4-CTF | Wie β4-CTF-eGFP aber anstatt eGFP mit V5-His Tag in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | Eigene Klonierung |
| β2-NTF | Wie β2-NTF-eGFP aber anstatt eGFP mit V5-His Tag in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | Eigene Klonierung |
| β4-NTF | Wie β4-NTF-eGFP aber anstatt eGFP mit V5-His Tag in pcDNA3.1/V5-His-TOPO | Eigene Klonierung |
| rNav1.2α | Spannungsabhängiger Natriumkanal aus der Ratte Nav1.2α; in pCDM8 | <i>Christian Alzheimer,</i> Physiologisches Institut, Christian Albrecht Universität, Kiel |
| rNav1.2α-HA | Spannungsabhängiger Natriumkanal, aus der Ratte Nav1.2a mit HA-Tag fusioniert; in pCDM8 | Eigene Klonierung |
| rNav1.2α-eGFP | Spannungsabhängiger Natriumkanal, aus der Ratte Nav1.2a mit eGFP-Tag fusioniert; in pCDM8 | Eigene Klonierung |

Tabelle 3: Verwendete Expressionsplasmide

3.1.2.4. Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz | Projekt |
|-------------------|---|---------------------------------|
| pcDNA3_seq1_h | CTCTGGCTAACTAGAGAACCCAC | Sequenzierung |
| pcDNA3_seq1_r | CTAGAAGGCACAGTCGAGGC | Sequenzierung |
| pCIneo_seq1_h | CTTTCTCTCCACAGGTGTCCAC | Sequenzierung |
| pCIneo_T3_r | GCATTAACCCCTCACTAAAGGG | Sequenzierung |
| MYC-F1 | ACACCATGGGAGCTGGTAAT | Mycoplasmen PCR |
| MYC-F2 | GTTCTTTGAAAAGTGAAT | Mycoplasmen PCR |
| BACE_Inact_5-3 | TACGACAAGAGCATTGTGAACAGTGGGACCACCAAC | Klonierung mBACE-Myc-Inaktiv |
| BACE_Inact_3-5_rc | GTTGGTGGTCCCCTGTTTACAATGCTCTTGTCGTA | Klonierung mBACE-Myc-Inaktiv |
| pcDNA3_3' | AGTCGAGGCTGATCAGCGAG | Klonierung mBACE-Myc-Inaktiv |
| Seq_BACE_Inact | TTGACTCCCTGGTGAAGCAG | Sequenzierung mBACE-Myc-Inaktiv |
| β4_ctf_5'konstr | AACCACTTGCGCCTGAGTATTGCCCTCGGT | Klonierung β4-CTF_GFP |
| β4_ctf_3'konstr | ACTCAGGCGCAAGTFFFTTATAAATTTFAAAAAGTG | Klonierung β4-CTF_GFP |
| β4_ntf_5'konstr | CCTACGTGGGCCCTTCCGAGGAAGATGGTGGCAGAG | Klonierung β4-NTF_GFP |
| β2_GFP_XhoI_forw | TACGCCGCTCGAGCGGTATGCACAGGGATGCCCTGGC | Klonierung β2-CTF-GFP |
| β2_GFP_HindIII_re | TACGTCCCAAGCTTGGGCTTCTTGGTGCCATCTTCCGC | Klonierung β2-CTF-GFP |
| β2_ntf_rev_ApaI | CCTACGTGGGCCCTTCCCAGGTAAATCTTGCCGTG | Klonierung β2-NTF-GFP |
| HA-tag | CCATCGATGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTACTTTTTACTTTCCCTGATATCTTTCC | Klonierung rNav-HA-Tag |
| rNav_fus-GFP_rev | CTCGCCCTTGCTCACCATtcccccttttactttccct | Klonierung rNav-GFP-Tag |
| GFP_fus_forw | aggggaaagtataaaagggaATGGTGAGCAAGGGCGAG | Klonierung rNav-GFP-Tag |
| GFP_ClaI_rev | CCATCGATGGTTACTTGTACAGCTCGTCC | Klonierung rNav-GFP-Tag |
| in_rNav | aaacaaagtccagctcattg | fast alle Nav Klonierungen |
| β4_ctf_3'_BamHI | CGCGGATCCGCCACTTTTGTGGGTGGCTTCTCTTCT | Klonierung β4-CTF_GFP |
| neo Kiel 3 | GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG | Genotypisierung |
| neo Kiel 4 | GCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGA | Genotypisierung |
| BACE1EX5(2) | ATGGCCCCAGCGCTGCACTGGCTCC | Genotypisierung |
| BACE1EX3' | CTGCCTACGGTCATCTCCACATAGTAG | Genotypisierung |
| rNAV_seq_BspMI | ATCCTCCCCCTCCTCATCG | Sequenzierung Nav |
| HindIII+HA_mBAFF | cAAGCTTgATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGATGA GTCTGCAAAGACCCTGCCACCACCGTGCCCTCTG | Klonierung mBAFF_HA-Tag |
| mBAFF_XhoI | ccgCTCGAGcggTTACAGCAGTTTTAGGGC | Klonierung mBAFF_HA-Tag |
| Seq-BAFF-AP_fw | TCCTGCTACTCGGCTGG | BAFF-AP; Sequenzierung |
| BAFF-AP_Seq-neu | CAGGCTTTAAAAGGGGAAG | BAFF-AP Sequenzierung |
| Seq-Nav-Reverse | TCTCTGTAGGTAGTTTG | Sequenzierung Nav |

Tabelle 4: Für Sequenzierung, Genotypisierung und Klonierung

3.1.3. Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden in wässriger Lösung aufbewahrt und für die Langzeitlagerung Aliquote bei -20°C bzw. -80°C eingefroren. Antikörper die nicht bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden durften wurden nicht aliquotiert.

Für die Immunfluoreszenz (IF) wurden die Antikörper in 3 % BSA in PBS und für den Westernblot (WB) in 5 % Milchpulver in TBS-T (TBS, 0,1 % Tween 20) aufgenommen. Die Bezeichnung der Antikörper, ihre Herstellung und Herkunft sowie Verdünnung der Antikörper finden sich in Tabelle 5.

| Antikörper | erzeugt in | Verdünnung IF: Immunfluoreszenz WB: Westernblot FACS: Durchflusszytometrie | Herkunft |
|-------------------------|------------|--|--|
| Primärantikörper | | | |
| α-Aktin | Maus | 1:5000 (WB) | DSHB, Iowa City, USA |
| α-Myc-Tag (9B11) | Maus | 1:5000 (WB) | Cell Signaling, Danvers, USA |
| α -Maus-B220-PE | Ratte | 1:200 (FACS) | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α-Maus-IgM-FITC | Ratte | 1:100 (FACS) | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α -Maus-CD23-FITC | Ratte | 1:200 (FACS) | BioLegend, San Diego |
| α -Maus-F4/80-FITC | Ratte | 1:100 (FACS) | Serotec, Düsseldorf |
| α -Maus-CD3-FITC | Hamster | 1:50 (FACS) | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α -Maus-CD4-FITC | Ratte | 1:50 (FACS) | Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA |
| α -Maus-CD8-PE | Ratte | 1:50 (FACS) | Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA |
| α –Maus-Gr1 | Ratte | 1:100 (FACS) | Hybridoma Überstand (Klon RBG8C5) DSHB (<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>) |
| α -Maus-Thy1.2-PE | Maus | 1:50 (FACS) | DPC Biermann |
| α -Tubulin | Maus | 1:500 (WB) | DSHB, Iowa City, USA |
| α-Maus-Trance | Maus | 1:1000 (WB) | Imgenex, San Diego, USA |
| α-Maus-ADAM10 | Kaninchen | 1:2000 (WB) | Calbiochem, Gibbstown, USA |
| α-Mensch-BACE-1 (EE17) | Kaninchen | 1:1000 (WB) 1:100 (IF) | Sigma, Saint Louis, USA |
| α-Maus-ICAM-1 | Ziege | 1:2000 (WB) | R&D System, Wiesbaden-Nordenstadt |

| | | | |
|--------------------------------------|-----------|---------------|--|
| α-Maus-ICAM-1-CT | Kaninchen | 1:5000 (WB) | Stanley E. D'Souza, University of Louisville, Louisville, U.S.A. |
| α-Mensch- BACE/Asp2 (CT) | Kaninchen | 1:1000 (WB) | ProSci, Poway, USA |
| α-Maus-BACE1 3D5 | Maus | 1:5000 (WB) | R. Vassar, Cell and Molecular Biology, Northwestern University, Chicago, USA |
| α-V5-Tag | Maus | 1:5000 (WB) | Invitrogen, Karlsruhe |
| α-Mensch-BAFF (CT) | Kaninchen | 1:1000 (WB) | ProSci, Poway, USA |
| α-Maus-BACE (M- 83) | Kaninchen | 1:1000 (WB) | Santa Cruz, Heidelberg |
| α-HA | Ratte | 1:10000 (WB) | Roche Applied Science |
| α-Mensch-ADAM17 | Kaninchen | 1:1000 (WB) | Chemicon, Hofheim |
| α-Mensch-ADAM10 | Kaninchen | 1:1000 (WB) | Chemicon, Hofheim |
| Sekundärantikörper | | | |
| α -Kaninchen, HPR konjugiert, | Esel | 1:10 000 (WB) | Santa Cruz, Heidelberg |
| α -Maus, HPR konjugiert | Schaf | 1:10 000 (WB) | Dianova, Hamburg |
| α -Ratte, HPR konjugiert | Ziege | 1:10 000 (WB) | Dianova, Hamburg |
| α -Ziege, HPR konjugiert | Kaninchen | 1:10 000 (WB) | Dianova, Hamburg |
| α-Kaninchen, Alexa Fluor 488, 594 | Esel | 1:200 (IF) | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α-Kaninchen Alexa Fluor 488, 594 | Ziege | 1:200 (IF) | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α-Maus Alexa Fluor 488, 594 | Esel | 1:200 (IF) | Molecular Probes/Invitrogen Karlsruhe |

Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

3.1.4. Zelllinien

Die in Tabelle 6 aufgeführten Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

| Zelllinie | Eigenschaften | Kultur- bedingungen | Referenz/ATC C-Nummer |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| HEK-293 | Humane embryonale Nierenzellen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC-Nr.: CRL- 1573 |

| | | | |
|---------------|--|------------------------------------|------------------------------|
| Cos7 | Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC-Nr.: CRL 1651 |
| RAW264.7 | Murine Makrophagenzelllinie | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC-Nr.: TIB-71 |
| HL-60 | Humane, promyelotische Suspensionszelllinie | RPMI, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC-Nr.: CCL-240 |
| THP-1 | Humane Monocyten | RPMI, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC-Nr.: TIB-202 |
| PS 1 +/- SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | D. Hartmann, Leuven, Belgien |
| BACE1 -/- | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | eigene Arbeitsgruppe |
| ADAM10/17 dko | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | eigene Arbeitsgruppe |

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

3.1.5. Stimulanzen und Inhibitoren

| Substanz | Wirkung | Konzentration | Herkunft |
|--|--|--------------------|-----------------------------------|
| C3 (β -Secretase Inhibitor IV) | Zellgängiger Inhibitor der β -Secretase BACE1 | 10 μ M | Calbiochem, LaJolla, USA |
| γ -X (γ -Secretase Inhibitor X) | γ -Secretase Inhibitor | 1 μ M | Calbiochem, LaJolla, USA |
| GM6001 | Breitband-Metalloprotease Inhibitor | 10 μ M | Calbiochem, LaJolla, USA |
| TAPI | Breitband-Metalloprotease Inhibitor | 20 μ M | Calbiochem, LaJolla, USA |
| PMA | Aktivator der Proteinkinase C (PKC) | 200 ng/mL | Sigma Aldrich, Steinheim |
| IFN- γ | Interferon- γ , aktiviert unter anderem Makrophagen | 10 ng/mL | R&D System, Wiesbaden-Nordenstadt |
| LPS | Lipopolisaccharid, löst Immunantwort aus | 1 μ g/ μ L | Sigma, Saint Louis, USA |

Tabelle 7: Eingesetzte Inhibitoren und Stimulanzen

3.1.6. Mausstämme

Die in Tab. 8 aufgeführten Mausstämme wurden in den tierexperimentellen Einrichtungen der Universitäten Kiel in konventioneller Haltung oder unter sterilen Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages, IVCs*) gehalten. Die Temperatur in den Mäusräumen betrug 19-21°C und die Luftfeuchtigkeit 45-60%. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (6-18 Uhr) Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

| Stamm | Beschreibung |
|----------|---|
| BACE1-/- | BACE1-defiziente Mauslinie mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C57 BL/6J x 129 Sv; eigene Auszucht, Herstellung in Dominguez et al., JBC, 2005 beschrieben |
| C57BL/6 | Inzucht Wildtyp-Mauslinie (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) |
| CD53S | Wildtyp mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C57 BL/6J x 129 SV/J; eigene Auszucht |

Tabelle 8: Verwendete Mauslinien

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung wird durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt (GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, UK). Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm kann die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Reine Doppelstrang-DNA weist ein Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8 auf. Das Verhältnis in den Proben sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, da abweichende Werte auf Verunreinigungen durch Proteine hinweisen.

3.2.1.2. Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt mittels Gelelektrophorese in 1-2%igen Agarosegelen (w/v) in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Als Laufmittel wird TAE-

Puffer verwendet. Für die Herstellung der Gele wird Agarose (Ultraqualität, Roth, Karlsruhe) in TAE-Puffer erhitzt und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 1%-iger Ethidiumbromid-Lösung (Roth, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 0,8 µg/mL versetzt.

Die leicht abgekühlte, noch flüssige Agarose wird in eine Gelkammer gegossen und zwei Kämme luftblasenfrei eingesteckt. Sobald das Gel abgekühlt und somit fest ist, können die Kämme entfernt und das Gel in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt werden. Die 6:1 mit Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzten Proben sowie 10 µL des 1kb-Molekulargewichtsmarkers (Roche, Mannheim) werden in die Geltaschen pipettiert und für ca. 30 min bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt.

Wenn die Fragmente nicht für weitere Experimente benötigt werden, kann die DNA durch das gebundene Ethidiumbromid bei Beleuchtung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ sichtbar gemacht und mit Hilfe der Geldokumentationsanlage *Gel Jet Imager* (Intas, Göttingen) fotografiert werden.

Soll mit der DNA weitergearbeitet werden, muss das entsprechende Fragment zum Schutz vor Mutationen aus dem Gel entfernt werden, bevor das restliche Gel zur Auswertung fotografiert wird.

TAE-Puffer

| Substanz | 1L | Endkonzentration |
|---------------------|--------|------------------|
| Tris base | 4,84 g | 40mM |
| 100% Essigsäure | 1,1 mL | 0,11% |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) | 2 ml | 1mM |

3.2.1.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten muss zunächst die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Um die Banden sichtbar zu machen, wird das Gel auf einem UV-Tisch (Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz) mit Licht der Wellenlänge 366 nm beleuchtet. Bei UV-Licht geringerer Intensität ist das Risiko von Mutationen deutlich geringer. Die in den Gelstücken enthaltene DNA wird mit dem Agarosegeleextraktionskit von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.1.4. Herstellung elektrokompeter Zellen

Aus einem bei -80°C gelagerten Aliquot *E. coli* XL1-Blue wird zunächst ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit 50 µL Tetrazyklin gemacht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden 50 mL LB-Medium mit 50 µL Tetrazyklin mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht angezogen. Von dieser Vorkultur werden 20 mL abgenommen und damit 1 L vorgewärmtes LB-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wird bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,6 bei 37°C wachsen gelassen und anschließend unter Schütteln auf Eis heruntergekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4°C werden die Zellen pelletiert und das Pellet anschließend zweimal mit 250 mL eiskaltem H₂O bidest. gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 50 mL eiskalter 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und für 20 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Dieses Zellpellet wird in 2 mL 10%-iger Glycerinlösung aufgenommen und je 50 µL Bakteriensuspension in auf Trockeneis gekühlte 1,5 mL Eppendorfgefäße pipettiert. Die Aliquote müssen bei -80°C gelagert werden.

LB-Medium

| Substanz | 1L (pH 7,0) |
|------------------------------|-------------|
| NaCl | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| Tryptone | 10 g |
| Agarose (nur für LB-Platten) | 15 g |

3.2.1.5. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Der *E. coli* Stamm DH5α wird, wie für die Herstellung elektrokompeter Zellen beschrieben, vermehrt und in Portionen zu je 250 mL pelletiert. Die Bakterienpellets werden in je 100 mL 50 mM CaCl₂ (0°C) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden abzentrifugiert, die Pellets in 10mL 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für eine Stunde auf Eis stehen gelassen. Anschließend werden 2,5 mL Glycerin untergemischt und 200 µL Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.2.1.6. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die bei -80°C gelagerten *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue werden auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Vektor-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 2,5 kV 400 Ω und 25 µF im *Gene Pulser* (BioRad, Hercules, USA).

Anschließend werden die transformierten Bakterien in 1mL LB-Medium aufgenommen und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für 30 Minuten bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Nach der Inkubation wird die Zellsuspension 1 min bei 10.500 x g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert, 750 µL des Überstandes abgenommen und die pelletierten Bakterien werden in den restlichen 250 µL LB-Medium resuspendiert. Schließlich wird die Bakteriensuspension auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C für 12-16 Stunden inkubiert.

3.2.1.7. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Die bei -80°C gelagerten, chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µL Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis, erfolgt bei 42°C für 40 Sekunden ein Hitzeschock. Nach fünfminütigem Abkühlen auf Eis wird 300 µL SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und diese für eine Stunde bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Anschließend werden die transformierten Bakterien, wie für Elektroporation beschrieben, auf LB-Agarplatten, ausgestrichen und inkubiert.

SOC-Medium

| Substanz | 1L (pH 7,0) |
|-------------------|--------------------|
| NaCl | 0,5 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| Tryptone | 20 g |
| KCl | 0,186 g |
| MgCl ₂ | 0.952 g |
| Glukose | 3.603g |

3.2.1.8. Plasmidamplifikation und –aufreinigung

Nach erfolgreicher Transformation sollten über Nacht *E. coli* Kolonien auf den LB-Agarplatten gewachsen sein, welche das zu amplifizierende Plasmid produzieren. Diese Kolonien werden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und je nach Bedarf 3 mL oder 200 mL antibiotikumhaltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei 3 mL Ansätzen werden die Plasmide mit dem Miniprep Kit von Peqlab (Erlangen), bei 200 mL Ansätzen mit dem *Jet Star Plasmid Purification Kit* (Genomed GmbH, Löhne) oder dem *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.1.9. Aufreinigung von cDNA-Plasmiden vom Ressourcenzentrum Primärdatenbank (RZPD)

Die cDNA von hBAFF und mBAFF wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Ressourcenzentrum Primärdatenbank, Berlin) bezogen. Die cDNA ist in Plasmide eingebaut, die sich in Agarose-Gel eingebetteten Bakterien befinden. Um einzelne dieser cDNA tragenden Bakterien zu erhalten, wird eine sterile Impföse in das von RZPD gelieferte Bakterien-Agarose-Gel gesteckt und die Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit passendem Antibiotikum (siehe Plasmidbeschreibung) ausgestrichen. Nach Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37°C, können einzelne Kolonien, die aus einem einzelnen Klon gewachsen sind, gepickt und mit diesen 3 mL LB-Wachstumsmedium angeimpft werden (Antibiotikaresistenz und Wachstumsbedingungen siehe Beschreibung cDNA-Klon). Die Plasmidpräparation erfolgt nach dem Standardprotokoll wie in 3.2.1.8 beschrieben. Um sicher zu stellen, dass die gereinigten Plasmide die cDNA enthalten, wird diese zur Kontrolle mit einer Restriktionsendonuklease (mBAFF (995) – EcoRI, hBAFF (969) – SfiI) verdaut (3.2.1.14). Zur weiteren Qualitätskontrolle werden je cDNA zwei Plasmide sequenziert (3.2.1.17).

3.2.1.10. Klonierung

Als Klonierung wird die Integration eines Gens oder DNA-Fragments in einen Klonierungs- bzw. Expressionsvektor sowie die nachfolgende Vermehrung und Expression dieser rekombinanten DNA in einem geeigneten Wirtssystem bezeichnet.

Dies macht es möglich, gezielt Proteine in geeigneten Zelllinien rekombinant zu exprimieren und deren Funktion näher zu untersuchen. Weiterhin besteht die Möglichkeit Fusionsproteine aus dem zu untersuchenden Protein und einem Markerprotein herzustellen. Als Marker (= tag) dienen kurze Aminosäuresequenzen, die spezielle Epitope (wie z.B. Hämagglutini (HA)) bilden oder fluoreszierende Proteine, wie beispielsweise das grün fluoreszierende Protein GFP. Diese Marker können sehr gut mit spezifischen Antikörpern oder in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die gezielte Mutation von Proteinen mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (3.2.1.11). Die verschiedenen für die Klonierung wichtigen Schritte werden im folgenden beschrieben.

3.2.1.11. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente logarithmisch *in vitro* zu amplifizieren. Grundlage für die Automatisierung dieser Technik ist die Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) von Saiki et al. (Saiki et al., 1988).

3.2.1.12. Standard PCR

Jede PCR basiert auf drei Schritten, die für die DNA-Synthese nötig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge bei 95°C
2. Annealing = Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge bei 55°C
3. Extension = Synthese der DNA, ausgehend von den gebundenen Primern bei 72°C

| Reaktionsansatz: | | PCR Programm | | |
|-------------------------------|-------|--------------------|---------|------|
| Primer A (100 nM) | 2 µL | 1 | 5 min | 95°C |
| Primer B (100 nM) | 2 µL | 2 | 30 s | 95°C |
| dNTP Mix (2 mM) | 5 µL | 3 | 30 s | 55°C |
| 10 PCR Puffer (Fermentas) | 5 µL | 4 | 2-3 min | 72°C |
| Dream Taq (X U/µL, Fermentas) | 1 µL | 5 | 7 min | 72°C |
| DMSO | 2 µL | 6 | ∞ | 10°C |
| Template | 1 µL | Schritt 2-4 30-35x | | |
| Wasser | 37 µL | | | |
| Endvolumen | 50 µL | | | |

Tabelle 9: Protokolle für Standard-Klonierungs-PCR

Die amplifizierte DNA wird im Agarosegel aufgetrennt, um die Größe zu bestimmen(3.2.1.2) und kann anschließend für weitere Experimente aus dem Gel aufgereinigt werden (3.2.1.3).

3.2.1.13. PCR-basierende Methoden zur Herstellung spezieller DNA-Konstrukte

Mittels der Polymerasen Kettenreaktion kann man DNA auf vielfältige Weise manipulieren. Dazu zählen der Austausch einzelner oder mehrerer Basen sowie das Fusionieren

verschiedener DNA-Sequenzen miteinander. Die wichtigsten PCR-basierten Methoden zur Herstellung spezieller DNA-Konstrukte werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

3.2.1.13.1. Anhängen von Tags und Restriktionsschnittstellen

Für viele Proteine gibt es keine oder nur unzureichende Antikörper für den Nachweis im Western-Blot oder der Immunzytochemie. Diese Proteine können durch gentechnische Verfahren mit einer Art „Fahne“, einem sogenannten „Tag“, fusioniert werden. Diese Tags sind meistens kurze (ca. 10-15 AS) Abschnitte von viralen oder bakteriellen Proteinen, für die es sehr spezifische, kommerzielle Antikörper gibt. Das Anhängen dieser Tags erfolgt mittels PCR. Der einzige Unterschied zu der in 3.2.1.12 beschriebenen PCR ist das Primer Design. Der Primer bindet zu mindestens 50% an der DNA-Sequenz an die der Tag angehängt wird. Der Rest des Primers bindet nicht an das Template, sondern enthält die genetische Information für das angehängte Peptid und in der Regel noch die Sequenz für eine Restriktionsschnittstelle für die weitere Klonierung. Mit dieser Methode des Primerüberhangs lassen sich auch gezielt Restriktionsschnittstellen an DNA Abschnitte anhängen, um diese beispielsweise in andere Vektoren zu bringen.

3.2.1.13.2. Fusions-PCR

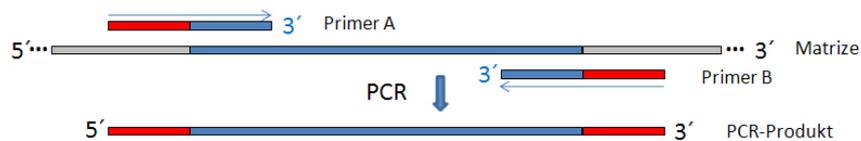
Sollen größere DNA Fragmente miteinander verbunden werden und es stehen keine passenden Restriktionsschnittstellen zur Verfügung, erfolgt dieses mittels Fusions-PCR.

Dazu werden die zu fusionierenden DNA Fragmente mittels PCR amplifiziert und in einer zweiten PCR fusioniert. Die erste PCR dient neben der Amplifikation vor allem der Erzeugung eines DNA-Überhangs. Dieser Überhang wird wie in 3.2.1.12 beschrieben durch Primer erzeugt, welche zum Teil am Ende bzw. Anfang der zu amplifizierenden Sequenz und zum Teil am Anfang bzw. Ende des DNA Fragments binden, welches fusioniert werden soll. Die Überhangsprimer der beiden Fragmente sind somit zueinander revers komplementär. In der zweiten, eigentlichen Fusions-PCR verwendet man den 5'Primer des 5'Fragments und den 3'Primer des 3'Fragments. Die beiden Fragmente dienen gleichzeitig als Matrize für die PCR, sowie in dem Bereich der die Überhangsprimer-Sequenz enthält gegenseitig als eine Art „Megaprimer“ (Abb. 5)

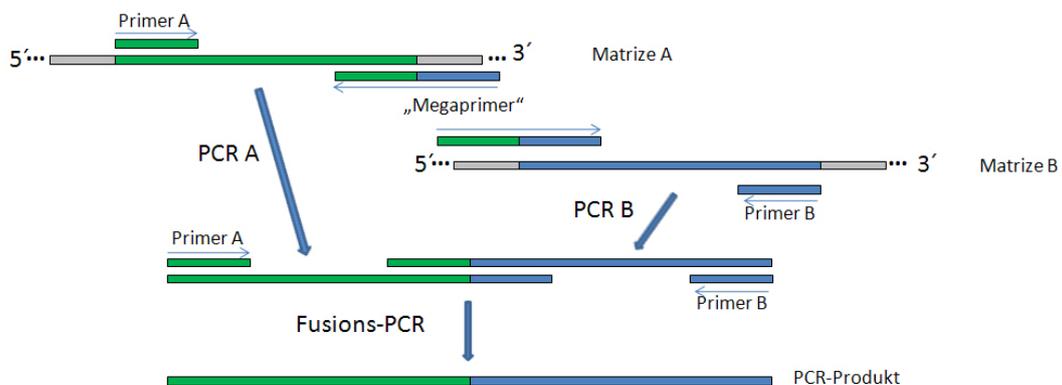
3.2.1.13.3. Gerichtete Mutagenese (Punktmutation)

Mittels PCR lassen sich auch gezielte Punktmutationen in DNA-Abschnitte einfügen, die zu einem Aminosäureaustausch im codierten Protein führen. Die Punktmutation wird mit Hilfe einer Fusions-PCR (s.o.) eingefügt, indem man den „Megaprimer“ so designt, dass er die gewünschte Mutation enthält (Abb. 5).

A) Anhängen von DNA-Sequenzen mittels Primerüberhang



B) Fusions-PCR



C) Einfügen von Punktmutationen

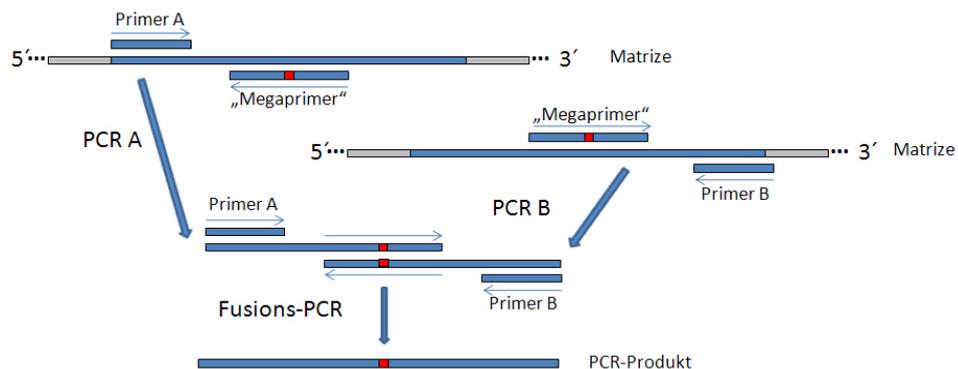


Abbildung 5: PCR-basierende Methoden zur Herstellung von DNA-Konstrukten

A: Schematische Darstellung des Prinzips beim Anhängen von DNA-Sequenzen mittels Primerüberhangs. In blau ist die zu amplifizierende DNA-Sequenz und in rot die DNA-Sequenzen die angehängt werden sollen. **B:** Schematische Darstellung des Prinzips der Fusions-PCR. In zwei unabhängigen PCRs werden zunächst die Sequenz von Matrize A (grün) und von Matrize B (blau) amplifiziert. Dabei wird durch den „Megaprimer“ ans 3`Ende der Sequenz an, ca. 20 bp der Sequenz des 5` Endes der Sequenz angehängt. Das gleiche geschieht für Sequenz B, nur wird hier das 3` Ende von A an das 5` Ende von B gehängt. In der eigentlichen Fusions-PCR werden beide Sequenzen miteinander fusioniert, indem sie sowohl Matrize, als auch Primer darstellen. **C:** Schematische Darstellung des Prinzips beim Einfügen von Punktmutationen mittels Fusions-PCR. Das Prinzip

entspricht der Fusions-PCR, mit dem Unterschied, dass es nur eine Matrize (zu amplifizierende Sequenz blau) und einen Megaprimer, der die gewünschte Punktmutation enthält (rot).

3.2.1.14. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA an spezifischen, meist palindromischen Basenabfolgen. Erfolgt der Schnitt in beiden Strängen versetzt, entstehen so genannte „klebrige“ Enden (sticky ends), die mit einer DNA-Ligase wieder verbunden werden können (3.2.1.16).

Die Reaktionsbedingungen für die verwendeten Enzyme entsprechen den Angaben des Herstellers Fermentas (St. Leon-Rot). Der Verdau von PCR-Produkten wird in einem Ansatzvolumen von 50 μL durchgeführt, wobei die gesamte Menge der aufgereinigten DNA eingesetzt wird. Beim Verdau von Plasmid-DNA wird 1 μg in einem 20 μL Ansatz eingesetzt. Je nach Enzym und verwendeter DNA erfolgt der Verdau bei 37°C für eine Stunde oder über Nacht. Die entstehenden Fragmente werden im Agarosegel aufgetrennt und können aufgereinigt werden (3.2.1.3). Verdaute Plasmid-DNA wird vor der Auftrennung noch dephosphoryliert.

3.2.1.15. Dephosphorylierung

Vor Ligationen ist es notwendig, den verdauten Leervektor zu dephosphorylieren, um die Religation des Vektors ohne *Insert* zu vermeiden. Die Dephosphorylierung wurde mit 2 U der alkalischen Phosphatase CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) (Fermentas) für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA durch Agarosegelelektrophorese von den Restriktionsendonukleasen und der CIAP getrennt und nach 3.2.1.3 aufgereinigt.

3.2.1.16. Ligation

Für Ligationen werden 1 μl (= 1 U) T4 DNA-Ligase (Fermentas) und 1 μl 10x Ligasepuffer mit 7 μL geschnittenem *Insert* und 1 μL verdautem, dephosphoryliertem Leervektor gemischt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 17°C im Wasserbad. Als Negativkontrolle wird anstelle des *Inserts* Wasser eingesetzt, um die Religationsfähigkeit des Vektors abzuschätzen. Nach Ablauf der Ligation wird der Ansatz zur Inaktivierung der Ligase für 10min bei 65°C erhitzt und kann anschließend durch Transformation in *E. coli* eingebracht werden (3.2.1.6 und 3.2.1.7).

3.2.1.17. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen werden von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) oder GATC-Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mit den Programmen DNASTar (Lasergene, Madison, WI, USA).

3.2.1.18. Präparation genomischer DNA aus Schwanzgewebe

Zur Genotypisierung der BACE1-defizienten Mäuse wird im Alter von zwei bis drei Wochen ein etwa 0,3-1 cm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten. Die DNA wird mit Hilfe des Kits InnuPrep DNA Mini Kit (AJ Innuscreen, Jena) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wird in 100 µL Elutions Puffer eluiert und die Konzentration wird anschließend mit dem DNA-Photometer (GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK) bestimmt.

3.2.1.19. Genotypisierung von BACE1-defizienten Mäusen

Durch eine BACE1 Exon-PCR kann das intakte BACE1-Gen mit spezifischen Primern (Tabelle 4) nachgewiesen werden. Die BACE1-defizienten Mäuse wurden durch Einfügen eines Neomycin-Resistenzgens (Neo) in Exon1 des BACE1 Gens hergestellt (Abb. 6) und können mit Neomycin-spezifischen Primern (Tabelle 4) identifiziert werden.

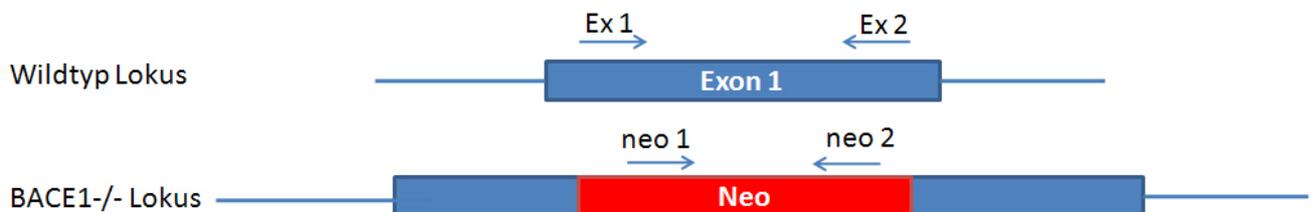


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Primerbindestellen für die Genotypisierungs-PCR

Im BACE1-/- Allel ist das Exon 1 durch ein Neomycinresistenzgen unterbrochen. Ex 1, Ex 2 symbolisieren die Oligonukleotidprimer für die Exon-PCR, neo 1 und neo 2 die Primer für die Neo-PCR

Für die jeweilige PCR wird zunächst ein Premix (Tabelle 10) hergestellt. Anschließend erfolgt die Herstellung des PCR-Ansatzes (Tabelle 10). Das PCR-Programm ist in Tabelle 11 wiedergegeben. Nach Zugabe von 6x DNA Lade-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot) zu den Proben werden diese auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und das Ergebnis dokumentiert (3.2.1.2). Bei einer positiven Neo-PCR ergibt sich eine Bande von ca. 280 bp, die BACE11-Exonbande liegt bei etwa 250 bp.

| Premix | 1 x | PCR-Ansatz | |
|------------------------------|---------|------------------|-------|
| Oligo 1 | 1 µL | Premix | 30 µL |
| Oligo 2 | 1 µL | 1 µg DNA | X µL |
| 10x Puffer | 5 µL | H ₂ O | X µL |
| dNTP, stock 2 mM (Fermentas) | 5 µL | Vol. total | 50 µL |
| DreamTaq 2,5 U (Fermentas) | 0,5 µL | | |
| DMSO | 1 µL | | |
| H ₂ O | 16,5 µL | | |
| Vol. total | 30 µL | | |

Tabelle 10: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für Genotypisierungs-PCR

Je nach Anzahl der Proben werden die Volumina für den Premix vervielfacht. Für den PCR Ansatz wird Wasser vorgelegt, 30 µL Premix zugegeben und mit der genomischen DNA (1 µg) koplettiert. Das Volumen von DNA plus Wasser beträgt 20 µL.

| | Neo | | BACE1 Exon | |
|-----------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Zyklen | 30 | | 35 | |
| Start | 5 min | 95°C | 5 min | 95°C |
| Denaturierung | 15 sec | 96°C | 15 sec | 96°C |
| Annealing | 30 sec | 58°C | 30 sec | 55°C |
| Extension | 2 min | 72°C | 2 min | 72°C |
| Letzter Zyklus | 3 min | 72°C | 3 min | 72°C |
| Ende | ∞ | 10°C | ∞ | 10°C |

Tabelle 11: PCR-Programm für Neo- und Exon-PCR

Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge, *Annealing* = Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge, *Extension* = Synthese der DNA, ausgehend von den gebundenen Primern.

3.2.2. Biochemische Methoden

3.2.2.1. Herstellung von Zell- und Gewebelysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten werden die kultivierten Zellen mit PBS gewaschen, in kaltem PBS geerntet, bei 4°C 5 Minuten bei 14 000 g zentrifugiert und die pelletierten Zellen je nach Größe, in 50-400 µl Lysepuffer (siehe unten) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 100 µl-Eppendorfpipette resuspendiert. Für die Herstellung von Gesamtproteinlysaten von Organen und Geweben werden bei -80°C gelagerte Organe gewogen und nach Zugabe von 5 Volumen (v/w) Lysepuffer mit einem Homogenisator (Precellys 24, PeqLab, Erlangen, Geräteeinstellung: 600 rpm, 2 x 15 s, 15 s Pause) homogenisiert. Für Zellsuspension und Gewebehomogenat sind die folgenden Schritte identisch. Es folgt eine 20-minütige Inkubation auf Eis, bevor die Proben im Ultraschallbad (Branson Sonifier 450, G. Heinemann, Ultraschall und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, Geräteeinstellung: *Duty Cycles* 90%, *Output Control* 3, 10 s) weiter aufgeschlossen werden.

Im Anschluss wird das Lysat zur Abtrennung von Zellkernen und anderem Zelldebris 10 Minuten bei 3 000 g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und vom Überstand wird die Proteinkonzentration bestimmt. Das Lysat wird, wenn es die Proteinkonzentration erlaubt, mit Lysispuffer und 5x konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE Probenauftragungspuffer (siehe unten) so versetzt, dass eine Endkonzentration von 2 µg Protein pro µL erreicht wird. Nach 5 Minuten Erhitzen im Thermoblock bei 95°C können die Proben entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel (3.2.2.4) aufgetragen oder bei -20°C aufbewahrt werden.

PBS (phosphat buffered solution)

| Substanz | 1 L (pH 7,4) | Endkonzentration |
|----------------------------------|--------------|------------------|
| NaCl | 8 g | 137 mM |
| KCl | 0,2 g | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g | 10 mM |

A10-Lysepuffer

| Substanz | 100 mL | Endkonzentration |
|--------------|----------|------------------|
| Tris base | 0,0606 g | 5 mM |
| EGTA | 0,038 g | 1 mM |
| Sucrose | 8,558 g | 250 mM |
| Triton-X-100 | 1 mL | 1% |

RIPA-Lysepuffer

| Substanz | 100 mL | Endkonzentration |
|-----------------|--------|------------------|
| 1 M Tris pH 7,4 | 5 mL | 50 mM |
| NaCl | 8,1 g | 150 mM |
| EDTA | 1,86 g | 5 mM |
| NP-40 | 1 mL | 1% |
| SDS | 0,1 mL | 0,1% |
| Deoxicholat | 1 mL | 1% |

5x SDS-Probenauftragungspuffer

| | Substanz | 40 mL |
|----------------------|--------------------|---------|
| | H ₂ O | 21,5 mL |
| | 1M Tris-HCl pH 6,8 | 2,5 mL |
| | Glycerol | 10 mL |
| | 20% SDS | 4 mL |
| | Bromphenolblau | wenig |
| a) reduzierend | β-Mercaptoethanol | 2 mL |
| b) nicht reduzierend | H ₂ O | 2 mL |

3.2.2.2. Membranpräparation

Für eine Membranpräparation werden, wie oben beschrieben, zunächst Lysate von Geweben oder Zellen hergestellt. Der einzige Unterschied ist die Verwendung von detergentfreien Lysispuffern. Die anschließende Membranpräparation erfolgt durch Ultrazentrifugation bei 4°C in einer Beckman Optima™ TLX Ultrazentrifuge (45 min, 55 000 x g, TLA 55-Rotor, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Membranpellet zum Lösen der Proteine, je nach anfänglicher Zellpelletgröße, mit 50-200 µl RIPA-Puffer versetzt. Es folgt eine dreimalige Ultraschallbehandlung von 30 s mit anschließender 30-minütiger Inkubation auf Eis. Nach einer erneuten zweimaligen Ultraschallbehandlung werden die Membranpräparationen 5 min bei höchster Geschwindigkeit in einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und eine Proteinbestimmung des Überstandes nach 0 durchgeführt. Die Membranpräparationen werden mit RIPA-Puffer und 5x konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE Probenauftragspuffer versetzt und 5 min in einem Thermoblock bei 55°C erwärmt. Werden die Proben nicht im direkten Anschluss auf ein Polyacrylamidgel (3.2.2.4) aufgetragen, erfolgt eine Lagerung bei -20°C.

Hypotoner-Puffer

| Substanz | 1 L | Endkonzentration |
|-----------------|------------|-------------------------|
| 1 M Tris pH 7,4 | 10 mL | 10 mM |
| EGTA | 0,38 g | 1 mM |
| EDTA | 0,37 g | 1 mM |

Succrose-Puffer, pH 7,4

| Substanz | 1 L | Endkonzentration |
|-----------------|------------|-------------------------|
| Succrose | 110 g | 0,32 M |
| Hepes | 1,19 g | 5 mM |

3.2.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zell- und Gewebelysaten sowie Membranpräparationen wird der BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, USA) benutzt. Dieser Versuch toleriert gängige Detergenzien wie Triton X-100, SDS, Tween 20 oder NP40 und ist daher besonders geeignet für die in Anwesenheit von Detergenz hergestellten Proteinlösungen. Die Proteinbestimmung wird nach dem Protokoll für Mikrotiterplattenversuche im Produkthandbuch durchgeführt. Die Extinktion wird bei

562 nm mit dem Mikrotiterplattenleser Sunrise (Tecan, Crailsheim) gemessen. Als Standard dienten Verdünnungen der mitgelieferten BSA-Lösung (2 mg/mL) in ddH₂O. Es werden Doppelwerte gemessen und deren Mittelwert für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

3.2.2.4. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (Laemmli, 1970) werden die Proben (Zell-, bzw. Gewebelysate, Membranpräparationen) zunächst mit 5x reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die so denaturierten und durch die Anlagerung von SDS negativ geladenen Proteine können nun im elektrischen Feld wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Polyacrylamid-Matrix ist dabei proportional zum Molekulargewicht des jeweiligen Proteins. Die Proteine werden zuerst in einem Sammelgel mit 4,5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins werden Gele mit einem Acrylamidanteil von 7, 10, 12,5 oder 15% benutzt. Zur Herstellung der Gele dienen vertikale Minigel-Gießkammern von Bio-Rad (Hercules, USA). Die Elektrophorese erfolgt zunächst für ca. 15 Minuten bei 100 V in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer Bio-Rad (Hercules, USA). Haben die Proben das Trenngel erreicht, kann die Spannung auf bis zu 160 V erhöht werden. Als Molekulargewichtsmarker dient ein Gemisch aus gefärbten Proteinen mit definierten Molekulargewichtsgrößen (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese wird beendet sobald die gewünschte Auftrennung erreicht ist.

Sammelgelpuffer

| Substanz | 500 mL (pH6,8) | Endkonzentration |
|-----------|----------------|------------------|
| Tris base | 30,275 g | 0,5 M |
| SDS | 2 g | 0,4% |

Trenngelpuffer

| Substanz | 500 mL (pH8,8) | Endkonzentration |
|-----------|----------------|------------------|
| Tris base | 90,85 g | 1,5 M |
| SDS | 2 g | 0,4% |

SDS-Elektrodenlaufpuffer

| Substanz | 1 L | Endkonzentration |
|-----------|------|------------------|
| Glycin | 15 g | 1,5% |
| Tris base | 3 g | 25 mM |
| SDS | 1 g | 0,1% |

3.2.2.5. Proteintransfer durch Western-Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran (NCMembran) oder eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran erfolgt elektrophoretisch. Dabei werden sowohl das Tank-Blotting- als auch das Semi-Dry-Verfahren angewendet. PVDF-Membranen müssen vor dem Transfer mit Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert werden. Der Protein-Transfer aus den 1,5 mm dicken Gelen erfolgt je nach Verfahren entweder in einem Tank- oder Semi-Dry-Transfer System (beides Bio-Rad) in entsprechendem Transferpuffer. Der Semi-Dry-Blot wird bei konstanten 22 V für 75-90 Minuten bei Raumtemperatur und der Tank-Blot bei 4°C bei konstanten 600 mA für ca. 2 h durchgeführt. Der Erfolg des Transfers kann anhand des aufgetragenen gefärbten Markers beurteilt werden. Zusätzlich können die auf die Membran transferierten Proteine mit Ponceau-Rot angefärbt werden. Dazu wird die Membran für ca. 2 min in der Ponceau-Färbelösung belassen und anschließend solange mit Wasser schrittweise entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar sind.

Semi-dry Transferpuffer

| Substanz | 2,5 L (pH 8,4 – 9,0) | Endkonzentration |
|-------------------|----------------------|------------------|
| Tris base | 7,5 g | 25 mM |
| Glycin | 30,3 g | 100 mM |
| Methanol (techn.) | 250 mL | 10% |

Tank-Blot Transferpuffer

| Substanz | 2,5 L (pH 8,3) | Endkonzentration |
|------------------|----------------|------------------|
| Tris base | 7,5 g | 25 mM |
| Glycin | 60,6 g | 200 mM |
| Methanol (techn) | 500 mL | 20% |

3.2.2.6. Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Blot-Membranen

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf der Blot-Membran wird diese für mindestens 30 min bei RT oder 4°C über Nacht in 5% Magermilchpulver (Roth, Karlsruhe) in TBST (*Blotto*) inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung des Primärantikörpers. Dafür wird der Antikörper in *Blotto* verdünnt und entweder für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für ca. 10 Minuten erfolgt die Inkubation mit dem für den Erstantikörper spezifischen Peroxidase- (POD) gekoppelten Zweitantikörper (in TBST) für 45 min bei RT. Die Spezifitäten und Verdünnungen der

verwendeten Primär- und Sekundärantikörper ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Nach drei weiteren Waschschrritten kann der Blot detektiert werden (3.2.2.7)

TBS/TBST

| Substanz | 1 L (pH 7,4) | Endkonzentration |
|-----------|--------------|------------------|
| NaCl | 8 g | 137 mM |
| KCl | 0,2 g | 2,7 mM |
| Tris base | 3 g | 25 mM |

für TBST: + 1% (v/v) Tween

3.2.2.7. Detektion von POD-markierten Immunkomplexen auf Western-Blot-Membranen

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wird das ECL-Plus-, bzw. ECL-Advanced Western *Blotting Detektion Reagenz* der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxid entsteht eine intensive Chemilumineszenz. Diese kann mit einer speziellen CCD-Kamera (LAS-3000, FujiFilm, Japan) detektiert und als Bilddatei gespeichert werden.

3.2.2.8. “Strippen“ von Nitrozellulose und PVDF Membranen

Um bereits gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, kann man diese “Strippen“ und mit einem anderen primären Antikörper inkubieren. Dies ermöglicht es, dass auf einer Membran mehrere Proteine nacheinander nachweisbar sind. Dazu wird die Membran für 30 Minuten bei 60-70°C in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend solange mit destilliertem Wasser gespült, bis der β -Mercaptoethanol-Geruch nicht mehr wahrnehmbar ist. Nach zwei weiteren 30-minütigen Waschschrritten in TBST kann eine erneute Immunedektion (3.2.2.7) durchgeführt werden.

Stripping-Puffer

| Substanz | 500 mL | Endkonzentration |
|--------------------------|--------|------------------|
| β -Mercaptoethanol | | 100 mM |
| SDS | | 2% (w/v) |
| Tris-HCl pH 6,7 | | 62,3 mM |

3.2.2.9. In vitro ADAM17 Aktivitätstest

Die Aktivität von ADAM17 kann anhand der zeitlichen Umsetzung eines Peptides gemessen werden, das aus der Aminosäuresequenz der ADAM17-Spaltstelle von TNF α besteht. Das 13 Aminosäure lange Peptid ist am C-Terminus mit dem Fluorophor Karboxyfluoreszein (Wahle *et al.*) und am N-Terminus mit dem Akzeptor Tetramethylrhodamin (TAMRA) gekoppelt. Im ungespaltenen Zustand wird die Fluoreszenz der FAM-Gruppe durch das benachbarte TAMRA unterbunden. Werden die beiden Gruppen durch Spaltung des Peptidanteils räumlich voneinander getrennt, wird die Fluoreszenz messbar. Diese ist ein direktes Maß für die Peptidspaltung (Alvarez-Iglesias *et al.*, 2005) (siehe Abb. 7).

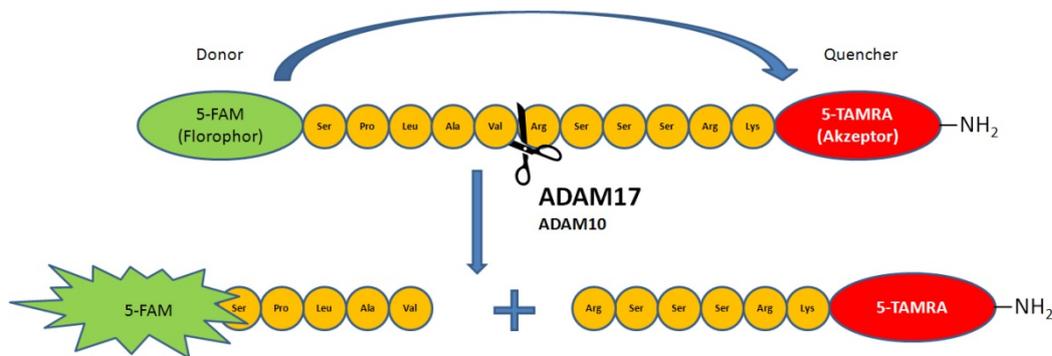


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips des fluoreszenzbasierten Enzymaktivitätstests

Das Fluorophor emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm Licht der Wellenlänge 535 nm. Das Licht wird im ungeschnittenen Peptid durch die Akzeptorgruppe absorbiert und kann nicht detektiert werden. Erst durch die Spaltung des Peptids und die räumliche Trennung von Donor und Akzeptor kann das emittierte Licht gemessen werden.

Für den Aktivitätstest wird das TACE Substrat II (Biomol, Hamburg) in einer Endkonzentration von 5 μ M eingesetzt. Zellen oder Gewebe werden nach 3.2.2.1 lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (0). Je nach Zell- und Gewebeart werden 5 bis 50 μ g Protein eingesetzt. Wird zusätzlich ein Inhibitor verwendet, wird dieser zusammen mit dem Lysat in einem Endvolumen von 70 μ L in TACE-Puffer (25 mM Tris, pH 9.0, 2.5 μ M ZnCl₂, 0.005% Brij 35) für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 μ L in TACE-Puffer gelöstem Peptid gestartet. Die Messung erfolgt in einem Mikrotiterplatten Fluoreszenz Lesegerät (Lambda Fluoro 320, MWG Biotech, Ebersberg) bei 37°C. Die Anregungswellenlänge beträgt 485 nm und die Emission wird bei 535 nm gemessen.

3.2.2.10. Alkalische-Phosphatase-Versuch

Um zu untersuchen, ob ein Transmembranprotein von einer Protease prozessiert wird, wurden die Proteine an der extrazellulären Domäne mit einer Alkalischen Phosphatase fusioniert (Konstrukte freundlicher Weise von Prof. Carl Blobel (New York, USA) zur Verfügung gestellt). Dafür werden Zellen transient mit dem AP-Fusionsprotein und der Protease oder einem Kontrollplasmid transient transfiziert (3.2.3.9). Die Expression erfolgt für 48 Stunden, nach 24 Stunden wird das Zellkulturmedium durch 1 mL DMEM ersetzt. Wird zusätzlich ein Inhibitor eingesetzt, wird dieser 16 Stunden vor Ernte der Zellen und des Überstandes (3.2.3.5) zugegeben. Das Zellpellet wird in 100 µL A10-Lysispuffer lysiert (3.2.2.1).

Für die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die proportional zu der Menge an Fusionsprotein im Zellpellet oder Überstand ist, wird eine Tablette pNPP (p-Nitrophenyl Phosphat, Sigma N-9389) in 5 mL Substratlösung aufgelöst. In einer 96-Well Mikotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) werden die Proben in Triplikaten vorgelegt. Vom Zellkulturüberstand werden je 100 µL, vom Zelllysat 10 µL sowie zur Kontrolle 10 µL A10-Lysispuffer und 100 µL DMEM eingesetzt. Zelllysat und Lysepuffer werden mit je 90 µL DMEM auf 100 µL aufgefüllt. Mit einer Multipipette werden je Well 100 µL Substratlösung mit pNPP zugeben und die Absorptionen der Proben sofort bei 405 nm in Mikrotiterplattenleser gemessen. Die optische Dichte (OD) wird anschließend in regelmäßigen Abständen von 5 Minuten gemessen. Sobald die optische Dichte nicht mehr stark steigt, kann die Messung beendet werden. Die ODs werden in Excel (Microsoft) gegen die Zeit aufgetragen und für den linearen Bereich die Steigung ermittelt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt mittels der nachstehenden Formel, die auf dem Lambert-Beerschen Gesetz beruht:

$$\text{Aktivität/mL} = (V_{G(W)} * 1000 * \Delta E * V_{P(L)}) / (\epsilon * V_{P(W)} * \Delta t) \text{ in U/mL}$$

$V_{G(W)}$: Gesamtvolumen

$V_{P(L)}$: Gesamtvolumen der Proben (Zellkulturüberstand bzw. Zelllysat)

$V_{P(W)}$: eingesetztes Probenvolumen

ΔE : Änderung der Extinktion über Δt

Δt : Zeitabstände

ϵ : Extinktionskoeffizient (hier 18,5)

Mit der Formel $\text{Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{Aktivität}_{\text{Überstand}} + \text{Aktivität}_{\text{Zellpellet}}) * 100\%$ kann berechnet werden, wieviel Prozent des exprimierten AP-Fusionsproteins prozessiert wurde.

Substratlösung, pH 10,8

| Substanz | 1 L (pH 10,8) | Endkonzentration |
|-------------------|---------------|------------------|
| Glycin | 7,51 g | 0,1 M |
| MgCl ₂ | 203 mg | 1 mM |
| ZnCl ₂ | 136 mg | 1 mM |

3.2.3. Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden beziehen sich auf adhärent wachsende Zelllinien. Der Umgang mit Suspensionszelllinien, sowie der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wird in Kapitel 3.2.3.6 und 3.2.3.7 gesondert erläutert.

3.2.3.1. Kultivierung und Passagieren von Zellen

Der Umgang mit lebenden Säugerzelllinien erfolgt an einer Sterilbank und es werden ausschließlich sterile Materialien und Lösungen verwendet. Kulturmedien und Trypsin werden bei 4°C aufbewahrt und vor jeder Anwendung auf 37°C erwärmt. Die für die jeweiligen Zelllinien verwendeten Medien sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Zellen werden in speziellen Zellkulturschalen oder -flaschen in einem Begasungsbrutschrank mit 5%-iger CO₂- und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5-10 mL 1 x PBS gewaschen um das Trypsininhibitoren enthaltende FCS zu entfernen. Danach werden die Zellen mit 0,5-1 mL (je nach Schalengröße) Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen abrunden und vom Untergrund ablösen. Der Ablösungsprozess wird stetig mit einem inversen Mikroskop (Eclipse TS 100, Nikon, Düsseldorf) kontrolliert. Die Trypsinreaktion wird durch eine Verdünnung mit dem 10-fachen Volumen an Zellkulturmedium gestoppt. Es folgt eine Vereinzelung der Zellen durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pipette. Bei Zelllinien, die empfindlich gegenüber Trypsinresten sind, werden diese bei 600 g für 5 Minuten zentrifugiert (Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen) und das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Die entstandene Suspension wird schließlich in der gewünschten Verdünnung mit zusätzlichem frischem Medium in neue Zellkulturschalen ausgesät.

3.2.3.2. Herstellung von murinen Fibroblastenzelllinien (MEFs)

Für die Gewinnung von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Embryonen zur Herstellung muriner, embryonaler Fibroblasten, werden heterozygote Mäuse (BACE1^{+/-}) Terminverpaart. Bei

positiver Plaque-Kontrolle wird das tragende Weibchen nach 12,5 oder 13,5 Tagen durch cervikale Dislokation getötet und die Embryonen steril entnommen. Die Embryonen werden aus ihrer Hülle präpariert und einzeln in mit PBS gefüllte Schalen gelegt. Alle sichtbaren roten Organe (Leber, Herz, Milz und Lunge), der Darm sowie der Kopf werden entfernt. Der Kopf wird für die Genotypisierung aufbewahrt. Der Körper wird in die mit 400 μ L D50-Medium (DMEM + 50% FCS + PenStrep) gefüllte Vertiefung einer 6-Well-Platte überführt und darin mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. Die dabei im Plastik entstehenden Furchen erleichtern den Zellen das Anwachsen. Das Medium auf den Zellen wird mit D50-Medium auf 1 mL aufgefüllt und die Platten in einen vibrationsfreien Brutschrank gestellt. Nach 2 bis 3 Tagen beginne die Zellen zu proliferieren. Sobald erste Zellteilungsaktivitäten beobachtet wird, kann vorsichtig ein Mediumwechsel vorgenommen werden. In den folgenden Tagen bis Wochen wird der FCS-Gehalt im Medium sukzessive auf 10% reduziert und die Zellen in größere Schalen umgesetzt. Nach einigen Wochen haben die Fibroblasten alle anderen Zelltypen überwachsen und können mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus immortalisiert werden, wodurch sie eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit erhalten.

3.2.3.3. Einfrieren von Zellen

Neben den in Zellkultur gehaltenen Zellen, werden von allen Zelllinien Aliquote zur Aufbewahrung und späteren Wiederverwendung eingefroren. Dazu werden die konfluenten Zellen wie in 3.2.3.5 beschrieben in Suspension gebracht und 5 Minuten bei 600 g zentrifugiert (Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 1 mL kaltem Gefriermedium (10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in vollständigem Zellkulturmedium) pro wegzufrierender Probe resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Diese Suspension wird zu 1 mL Portionen in 1,5 mL Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und zunächst für 24 Stunden im „Mr Frosty“ (Nalgene, Rochester, USA) bei -80°C gelagert. Dies gewährt eine konstante Abkühlung der Proben von -1°C pro Minute. Zur langfristigen Aufbewahrung werden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

3.2.3.4. Auftauen von Zellen

Die aufzutauenden Röhrchen werden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37°C-Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Unter der Sterilbank wird die aufgetaute Zellsuspension möglichst schnell in ein 15 mL Röhrchen mit 10 mL Zellkulturmedium

gegeben und für 5 Minuten bei 600 x g (Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert, um das im Gefriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in 5 mL Zellkulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in einer 25 mm²-Flasche in den Brutschrank überführt. Am nächsten Tag wird das Anwachsen der aufgetauten Zellen kontrolliert und tote Zellen durch Mediumwechsel entfernt.

3.2.3.5. Ernten von eukaryotischen Zellen und Zellkulturüberstand

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt, um eine proteolytische Degradation der Proteine zu vermeiden. Ein weiterer Schutz vor Proteindegredation wird durch das Zusetzen von Complete Proteaseinhibitor (Roche, Basel, CH) zu den Lysaten erreicht. Die Zellkulturschalen werden auf Eis gestellt und die Zellen nach Absaugen des Mediums einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 1 mL eiskaltem PBS mit einem biegsamen Zellschaber abgeschabt und in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt. Nach fünf minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14 000 g in einer Tischzentrifuge wird der Überstand abgesaugt und das Pellet entweder direkt weiterverwendet oder auf Trockeneis abgekühlt und anschließend bei -80°C eingefroren.

Zellkulturüberstand wird von den Zellen abgenommen und in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt. Um tote Zellen und Debris zu entfernen wird der Überstand für 10 Minuten bei 4°C und 14 000 g zentrifugiert, der geklärte Überstand in ein neues Gefäß überführt und wie das Zellpellet für eine späterer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3.6. Umgang mit Suspensionszelllinien

Nicht adhärent wachsende Zelllinien, werden in speziellen Zellkulturschalen und -flaschen für Suspensionzellen kultiviert. Bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte wird ein Teil der Zellen abgesaugt und die restlichen Zellen mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Sollen neue Kulturgefäße verwendet werden, wird in diese Medium vorgelegt und ein Teil der Zellen in die neue Flasche oder Schale überführt. Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgt nach dem selben Protokoll wie für adhärent wachsende Zellen, allerdings ohne den Trypsinisierungsschritt.

3.2.3.7. Passagieren der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Da die adhären wachsende Makrophagenzelllinie RAW 264.7 unverträglich gegenüber Trypsin ist, muss diese mechanisch in Suspension gebracht werden. Dafür wird das alte Medium abgesaugt und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt. Sollten unter dem Mikroskop noch größere Zelleaggregate zu sehen sein, werden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

3.2.3.8. Mycoplasmandetektion und -behandlung

Alle in Kultur gehaltenen Zelllinien werden regelmäßig auf Mycoplasmeninfektionen untersucht. Der Nachweis der Mycoplasmen erfolgt durch eine *Nested-PCR*, bei der in Anwesenheit des Bakteriums Fragmente mit einer Länge von 300-500 bp entstehen. Die Zellen werden zwei Tage kultiviert und dann 200 µL des Mediums abgenommen. Die Überstandproben werden 1 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt und danach 1 min bei 7.000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 1 µL des Überstands wird für die erste PCR verwendet. Es werden zwei PCR-Schritte, PCR1 und PCR2, durchgeführt, wobei mycoplasmaspezifische DNA-Bereiche amplifiziert werden. Das Produkt der ersten PCR wird dabei als Template für die zweite PCR verwendet. In Tabelle 12 sind die Standardprotokolle für die *Nested-PCR* aufgeführt. Bei jedem Versuch werden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (1 µL H₂O statt Überstand) mitgeführt. Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglichte eine sichere Detektion schon in frühen Infektionsstadien.

A) Reaktionsansatz für PCR1 und 2

| Substanz | Volumen |
|--|---------|
| Primer MycoF1 (F2), 10 µM | 1 µL |
| Primer MycoR1 (R2), 10 µM | 1 µL |
| dNTPs | 4 µL |
| 10x <i>Taq</i> -Puffer (+MgSO ₄) | 5 µL |
| <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µL) | 0,3 µL |
| Template (PCR1: gekochten Zellkulturüberstandes, PCR2: Produkt aus PCR1) | 1 µL |
| ddH ₂ O (autoklaviert) | 39 µL |
| Endvolumen | 50,3 µL |

B) PCR Program für PCR1 und 2

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|-----------------|---------|------------|
| 0 | 3 min | 94°C |
| 1 | 0,5 min | 94°C |
| 2 | 2 min | 55°C |
| 3 | 1 min | 72°C |
| 4 | 6 min | 72°C |
| 5 | ∞ | 10°C |
| Schritt 2-4 36x | | |

Tabelle 12: A: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes, B: Übersicht über das PCR-Programm

In einem späten Infektionsstadium können die Mycoplasmen durch eine Färbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzmarker 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht werden (Russell *et al.*, 1975). Der Vorteil dieser Methode besteht in der einfachen Durchführung. Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und in einem Mowiol/Diazobicyclooctan (DABCO)- Gemisch (17% Mowiol; 3 % Glycerol; 50 mg/mL DABCO in PBS), das 1 µg/mL DAPI enthält, auf Objektträgern fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Göttingen) betrachtet. Sind zusätzlich zu den Zellkernen weite Bereiche des Zytoplasmas und zum Teil auch extrazelluläre Bereiche unregelmäßig angefärbt, kann von einer Infektion mit Mycoplasmen ausgegangen werden. Versuche mit infizierten Zellen werden eingestellt und eine neue Charge der Zelllinie aufgetaut. Ist diese ebenfalls mit Mycoplasmen infiziert oder stehen keine eingefrorenen Vorräte der benutzten Zelllinie zur Verfügung, werden die Zellen mit Ciprobay 100 (Bayer, Leverkusen) nach Herstellerangaben behandelt. Die Behandlung wird für einen Zeitraum von etwa zehn Tagen durchgeführt. Anschließend erfolgt erneut ein Mycoplasmentest. Konnten keine Mycoplasmen nachgewiesen werden, werden die Zellen wieder auf normales Zellkulturmedium umgestellt und die Untersuchungen fortgesetzt.

3.2.3.9. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion werden die Zellen in einer 6-Well-Schale so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Dichte von etwa 60% erreichen. Sollten die transfizierten Zellen später für eine indirekte Immunfluoreszenz (3.2.4.1) verwendet werden, werden vorher vier sterile Deckgläschen in jedes Well gelegt und die Zellen darauf ausgesät. Für die Immunfluoreszenz sollten die Zellen am nächsten Tag eine Dichte von maximal 30% haben. Die Transfektion erfolgt mit dem Reagenz FuGene (Roche, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Es werden 100 µL DMEM ohne Serum mit FuGene und DNA, in einem Verhältnis von 3 µL FuGene pro 1 µg DNA, in einem Eppendorfgemisch und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das lipophile Reagenz bildet mit der zu transfizierenden DNA einen Lipid-DNA-Komplex, der zu einer effizienten DNA-Aufnahme in die Zelle und anschließender Expression in dieser führen soll. Das Transfektionsreagenz kann bis zur Weiterverwendung der Zellen (in der Regel nach 48 Stunden) auf diesen bleiben.

3.2.4. Immunologische Methoden

3.2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz an kultivierten Zellen

Durch eine immunzytochemische Färbung können Proteine in der Zelle nachgewiesen und ihre subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Alle beschriebenen Schritte erfolgen bei Raumtemperatur (RT). Die auf runden Deckgläschen (\varnothing 13 mm) in 6-Well-Platten kultivierten Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4% PFA in PBS (w/v) fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das PFA zu entfernen. Die Zellen können nun bis zur Antikörperfärbung in ausreichend PBS bei 4°C gelagert werden. Für die Immunfärbung werden die fixierten Zellen 5 Minuten mit 0,1% Triton X-100 (v/v) in PBS permeabilisiert. Bei einer Permeabilisierung mit 0,02% Saponin (w/v) (Sigma Aldrich, Steinheim) in PBS entfällt dieser Schritt, es muss dafür in allen folgenden Wasch- und Inkubationsschritten Saponin zugesetzt werden, um die Zellen permeabel zu halten. Nach der Permeabilisierung folgt die Absättigung der freien Aldehydgruppen für 10 Minuten mit 0,12 % Glycin in PBS. Zwischen den Schritten wird jeweils einmal mit PBS gewaschen. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen, werden die Zellen 15 min mit 3% BSA (w/v) in PBS blockiert. Zur Bindung des primären Antikörpers (Tabelle 5) werden 30 μ L der Antikörperverdünnung in 3% BSA auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen, mit der Zellseite zur Lösung gewandt, auf den Antikörpertropfen gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden in einer feuchten Kammer werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wird auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper für 60 min im Dunkeln inkubiert. Vor der Einbettung der Zellen, werden die Deckgläschen dreimal mit PBS und einmal mit dest. H₂O gewaschen sowie kurz auf Zellstoffpapier abgetupft. Anschließend werden die Deckgläschen in einem Gemisch aus Mowiol, DABCO (17% Mowiol, 33% Glycerin, 50 mg/mL DABCO) eingebettet. DABCO enthält Antibleichmittel, Stabilisatoren und Signalverstärker. Sollen auch die Zellkerne der Zellen angefärbt werden, wird dem Mowiol/DABCO-Gemisch noch 1 μ L einer 1 μ g/mL DAPI-Lösung in DMSO zugesetzt. Die auf den Objektträgern fixierten Deckgläschen werden bei 4°C oder -20°C im Dunkeln gelagert und schließlich mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen) ausgewertet.

3.2.4.2. Durchflusszytometrie

Mittels der FACS-Analyse (*Fluorescence-Activated Cell Scanning*) können einzelne Zellen in einer Suspension aufgrund ihrer Größe, Granularität und Expression von Oberflächenmolekülen charakterisiert werden. Oberflächenmoleküle können durch spezifische Bindung von fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden, wobei die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper und somit zur Expression der Antigene ist.

Bei der FACS-Messung werden die gefärbten Zellen in einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden Elektronen des Chromophors auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im „*Forward-Scatter*“) und die Granularität der Zelle (im „*Sideward-Scatter*“) gewonnen.

3.2.4.3. Markierung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Für die Fluoreszenzmarkierung werden pro Färbung 0,5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Färbung erfolgt in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur. Die Zellen werden bei 3000 rpm (ca. 700 g) zentrifugiert, das Pellet in 20 μ L humanem Serum resuspendiert und für mindestens 10 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern.

Nach der Zugabe der Primär-Antikörper werden die Zellen für 15 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer (1% BSA, 0,025% Natriumazid in PBS) gewaschen. Ist der Primärantikörper nicht direkt fluoreszenzgekoppelt muss dieser mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper für 15 Minuten inkubiert und anschließend wieder 2x mit FACS-Puffer gewaschen werden. Die markierten Zellen werden in 0,5 bis 1 mL FACS-Puffer aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung in Dunkelheit bei 4°C gehalten. Im Durchflusszytometer (FACSCanto, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) werden pro Ansatz 30 000 Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der Software *CellQuest*.

3.2.4.4. Isolierung und Differenzierung von Makrophagenvorläuferzellen aus Knochenmark von Mäusen

Um eine große Anzahl Makrophagen aus Mäusen zu gewinnen, bietet sich die Möglichkeit Knochenmark zu isolieren und die darin enthaltenen Makrophagenvorläuferzellen in reife Makrophagen zu differenzieren.

Nach Tötung der Mäuse durch Vergasen mit CO₂ und/oder zervikaler Dislokation werden *Femora* und *Tibiae* präpariert, weitgehend von Gewebe befreit und in eiskaltem RPMI-Medium aufbewahrt. Alle weiteren Schritte finden unter einer Sterilbank statt. Zuerst werden die Knochen unmittelbar an den Gelenken lateral abgeschnitten. Das so zugängliche Knochenmark wird anschließend mittels einer 27G-Kanüle mit kaltem Makrophagenmedium aus den Knochen gespült und die darin enthaltenen Knochenmarkszellen in sterilen 50 mL Röhrchen aufgefangen. Zur Vereinzelung der Zellen wird ein 70 µm Nylon Zellsieb (BD Bioscience, Belgien) verwendet. Die isolierten Zellen der einzelnen Tiere werden jeweils mit Medium auf 50mL aufgefüllt und 12,5µL (=20ng/mL) rekombinater muriner Makrophagen Kolonie Stimulationsfaktor (M-CSF, PeproTech EC., London, UK) zugesetzt.

Die Knochenmarkszellen werden auf Bakterienplatten ausgesät (10 mL je P100). Dies ist erforderlich, da die Makrophagen im Vergleich zu anderen Zellen des Knochenmarks sehr adhären sind und so später wieder von ihrer Unterfläche abgelöst werden können. Nach 7 bis 10 Tagen Differenzierung können die Makrophagen geerntet werden. Nach vorsichtigem Waschen mit 10 mL warmen PBS werden die Zellen mit 3 mL eiskaltem PBS überschichtet und für ca. 20 Minuten bei 4°C belassen. Danach können die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt und alle Zellen aus einer Maus in einem 15 mL Plastikröhrchen gesammelt werden. Nach Bestimmung der Zellzahl (s.o.) und 5-minütiger Zentrifugation bei 450 g kann das Zellpellet je nach gewünschter Zelldichte in Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen für weitere Versuche ausgesät werden.

Makrophagenmedium

| | 500 mL |
|--------------------------|-----------|
| Makrophagen Medium (PAA) | 250 mL |
| DMEM | 250 mL |
| Gentamycin | 50µg/ml |
| Vankomycin | 100 µg/ml |
| Amphotericin | 2.5 µg/ml |

3.2.4.5. Isolierung von Peritoneal Makrophagen

Zwei bis vier Monate alten weiblichen Mäusen werden 1 mL 4% Thioglykolatlösung intraperitoneal gespritzt. Nach 72 Stunden werden die Mäuse getötet und das Peritoneum freigelegt. Nach der Injektion von 5-10 mL eiskaltem PBS/0,02% EDTA in die Peritonealhöhle wird die Mäuse sorgfältig geschüttelt. Anschließend wird mit einer Pasteurpipette das Bauchfell (Peritoneum) durchstoßen, die Peritonealflüssigkeit vorsichtig abgesaugt und in ein auf Eis stehendes Röhrchen überführt. Der Spülvorgang wird noch zweimal wiederholt. Die gesammelte Peritonealflüssigkeit wird für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Wenn nicht anders angegeben, werden die Zellen in RPMI-1640 Medium (10% FKS, mit Pen/Strep) aufgenommen und bis zur Kultivierung auf Eis gehalten. Die Zellzahl des Peritonealexsudats wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.4.6. Listerienabtötungs-Versuch in primären Makrophagen

Listeria monocytogenes (LM) ist ein intrazellulär wachsendes Bakterium, das von seinen Wirtszellen durch Phagozytose aufgenommen wird. Listerien können das Phagolysom, aktiv verlassen und sich im Zytoplasma vermehren, bevor sie in benachbarte Zellen einwandern. Je nach Zelltyp können die Bakterien unterschiedlich gut bekämpft werden. Dabei spielt besonders die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine große Rolle. *Listeria monocytogenes* ist ein sehr gut erforschtes Pathogen, lässt sich einfach kultivieren und es existieren zahlreiche Mutanten und gentechnisch veränderte Stämme, was LM zu einem beliebten Modell für die Untersuchung von Phagozytose und intrazellulärer Bakterienabtötung macht. In einem Abtötungsversuch werden Zellen mit Listerien infiziert und die Zahl der intrazellulären Bakterien zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Die Abtötungsrate, bzw. der Replikationsindex ermittelt sich dann aus dem Verhältnis der Bakterienzahl zu einer bestimmten Zeit nach der Phagozytose ($t=X$) zur Bakterienzahl direkt nach der Phagozytose ($t=0$): $RI = LM_{t=X} / LM_{t=0}$. Ist der RI kleiner 1 wurden die Listerien abgetötet, bei einem RI größer 1 konnten sie sich vermehren.

Die aus dem Knochenmark gewonnenen und differenzierten Makrophagen (BM-DMs) (3.2.4.4) werden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Well in eine 24-Well Zellkulturschale ausgesät. Je Zeitpunkt und Zelllinie werden drei Wells ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium entfernt, die Zellen 3 x mit HBSS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) gewaschen und

für ein Stunde in 400 μL DMEM ohne Zusätze kultiviert. Am Vortag werden 3 mL BHI (*Brain-Heart-Infusion*) -Medium mit *Listeria monocytogenes* (wt strain 10403S, GFP Listeria +) aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wird 3-4 Stunden vor der Infektion der Zellen in 50 mL vorgewärmtes BHI-Medium überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm kann die Listerienkonzentration nach der Formel: Anzahl Bakterien * $10^5/\mu\text{L} = 50,08 \cdot \text{OD} + 3,3$ bestimmt werden. $1,5 \times 10^6$ Listerien/100 μL DMEM werden auf die Makrophagen gegeben, was einem Verhältnis von 5 Listerien pro Makrophagenzelle entspricht. Um die Phagozytose zu synchronisieren werden die 24-Well-Platten bei 720 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und anschließend bei 37°C im CO₂-Inkubator belassen. Die Phagozytose wird nach 25 Minuten gestoppt, indem die nicht von Makrophagen aufgenommenen, extrazellulären Listerien durch dreimaliges Waschen mit HBSS entfernt werden. Listerien, die nicht durch Waschen entfernt werden konnten, werden durch Gentamycin, welches in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMEM für 45 Minuten auf die Zellen gegeben wird. Danach werden die Zellen erneut 3x mit HBSS gewaschen und je Well 300 μL DMEM auf die Zellen gegeben. Zu den Zellen auf der Platte, die den Zeitpunkt t=0 darstellt, wird 300 μL Lysepuffer (0,005% Triton-X in PBS) gegeben und anschließend bei -80°C eingefroren. Die Platten für die anderen gewählten Zeitpunkte werden bis zur Lyse und dem Einfrieren im Inkubator belassen.

Zur Bestimmung der Bakterienzahl werden die Platten einmal aufgetaut und wieder eingefroren und ein weiteres mal aufgetaut. Diese Prozedur schadet den Listerien nicht, hilft aber die Makrophagen zu zerstören und so die intrazellulären Listerien in Lösung zu bringen. Aus jedem Well werden nach mehrmaliger Resuspension der Zellen 100 μL Bakterien-Zell-Suspension auf Blutagarplatten (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) ausplattiert und für 24 bis 36 Stunden bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen kolonieformenden-Einheiten (CFU, *colony forming unit*) pro Platte werden gezählt und geben Aufschluss über die Bakterienzahl im jeweiligen Well.

3.2.4.7. BAFF-ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration an löslichem BAFF im Serum von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der Firma Apotech (APO-54N-013) verwendet. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die

Serumproben wurden durch retrobulbäre Blutentnahme von Mäusen gewonnen, indem das Blut für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen wurde und anschließend durch 30 minütige Zentrifugation bei 3 000 rpm und 4°C das Serum von den zellulären Bestandteilen getrennt wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der BACE1 knock-out Maus

Die BACE1-defiziente Maus wurde im Vorfeld dieser Arbeit in Kollaboration mit *Bart de Strooper* (Leuven, Belgien) hergestellt und erste Daten zu dieser Maus wurden bereits veröffentlicht (Dominguez *et al.*, 2005).

4.1.1. BACE1 knockout Mäuse sind vital, aber kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister

Für den überwiegenden Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden BACE1 Wildtyp- (im Folgenden auch als BACE1^{+/+} bezeichnet) und BACE1-defiziente Mäuse (BACE1^{-/-}) aus heterozygoten Verpaarungen verwendet, um genetische Varianzen, die aufgrund des gemischten genetischen Hintergrundes der BACE1^{-/-} Linie gegeben sind, möglichst gering zu halten. Die heterozygoten Zuchttiere (BACE1^{+/-}) stammen aus Verpaarungen von BACE1^{-/-} Böcken mit weiblichen C57BL/6 Wildtyp-Tieren, und besaßen somit ein BACE1 Wildtyp-Allel und ein *knockout* Allel mit dem Neomycin-Resistenzgen in Exon 1 (3.2.1.19). Parallel erfolgte eine Auszucht der BACE1^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund. Dazu wurden BACE1^{+/-} Böcke mit weiblichen C57BL/6 Mäusen verpaart. Die heterozygoten männlichen Nachkommen wurden wiederum mit weiblichen C57BL/6 Mäusen gekreuzt. Zur Gewährleistung eines einheitlichen genetischen Hintergrundes muss die Rückkreuzung mindestens über sieben Generationen erfolgen. Die Zucht erfolgte in konventioneller Haltung in den Tierhaltungsräumen der Universität Kiel. Der Zugang zu den Tieren ist bei dieser Haltungsform nur einem eingeschränkten Personenkreis in Schutzbekleidung erlaubt, bietet aber nur begrenzten Schutz vor dem Einschleppen von Infektionen. Daher wurde der mikrobielle Status der Tiere in regelmäßigen Abständen nach den FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) Empfehlungen überprüft. Parallel erfolgte die Erhaltungszucht des BACE1^{-/-} Mausstamms in Barriersystemen. Dieses IVC (*isolated ventilated cages*) System bietet durch einzeln belüftete Käfige einen hohen hygienischen Standard. Auch innerhalb dieser Haltungsform wurde der mikrobielle Standard der Mäuse in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

Die Verteilung des BACE1^{-/-} Allels erfolgte unter den Nachkommen nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen. Die genetische Analyse von 798 geborenen Tieren ergab für 184 Tiere

den Genotyp homozygot für das Wildtyp-Allel, für 423 heterozygot und 191 Tiere besaßen beide *knockout* Allele. Dies entspricht einer prozentualen Verteilung von 23,1 : 53,0 : 23,9 (+/+ : +/- : -/-). Dies zeigt, dass die fehlende Expression von funktionalem BACE1 keinen unmittelbaren letalen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat.

Bis zu einem Alter von 12 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Sterblichkeit von Wildtyp, heterozygoten und *knockout*-Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). BACE1^{-/-} Mäuse sind also im Rahmen der konventionellen Tierhaltung in Kiel vital.

Dominguez *et al.* (2005) konnten zeigen, dass BACE1-defiziente Mäuse Gewichtsunterschiede im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern zeigten. Dieser Phänotyp konnte auch bei Mäusen aus eigener Zucht bestätigt werden. BACE1^{-/-} Mäuse waren kleiner als ihre Wildtyp- und heterozygoten Geschwister (Abb. 8); Daten zu heterozygoten Mäusen nicht gezeigt). Im Alter von 3 Wochen war der Gewichtsunterschied am größten. Während Wildtyp-Tiere in diesem Alter durchschnittlich 10 g wogen, lag das Gewicht von BACE1-defizienten Mäusen im Durchschnitt bei 6 g. In der weiteren Entwicklung der Tiere nahm der prozentuale Gewichtsunterschied wieder ab; die BACE1-defizienten Tiere blieben jedoch zu jedem analysierten Zeitpunkt im Durchschnitt leichter als Wildtyp-Tiere (Abb. 8, B). Die Gewichtsreduktion konnte für beide Geschlechter gleichermaßen nachgewiesen werden. Mit drei Wochen waren männliche BACE1^{-/-} Tiere durchschnittlich 40,9 % und weibliche 44,7 % leichter als ihre Wildtyp-Geschwister (Abb. 8, C).

Die reine BACE1^{-/-} Erhaltungszucht erfolgte in IVCs (3.1.6). Die Wurfgröße von BACE1-defizienten Weibchen lag hier durchschnittlich bei $6,35 \pm 1,56$ Tieren ($n = 23$ Würfe). Bei einer ebenfalls in IVCs gehaltenen Wildtypelinie lag die Wurfgröße im Durchschnitt bei $5,24 \pm 1,43$ Tieren ($n = 25$ Würfe). BACE1^{-/-} Mäuse zeigten somit normale Fertilität. Erste Daten aus der BACE1^{-/-} Auszucht, nach sieben Generationen Rückkreuzung auf C57BL/6 Hintergrund, zeigten ebenfalls, dass BACE1^{-/-} Tiere gesunde Nachkommen gebären, und es deutete auf eine Tendenz zu kleineren Nachkommenszahlen bei BACE1^{-/-} Müttern im Vergleich zu Wildtyp-Tieren hin. Die Zahl der Würfe war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit allerdings noch zu klein um gesicherte statistische Analysen durchzuführen.

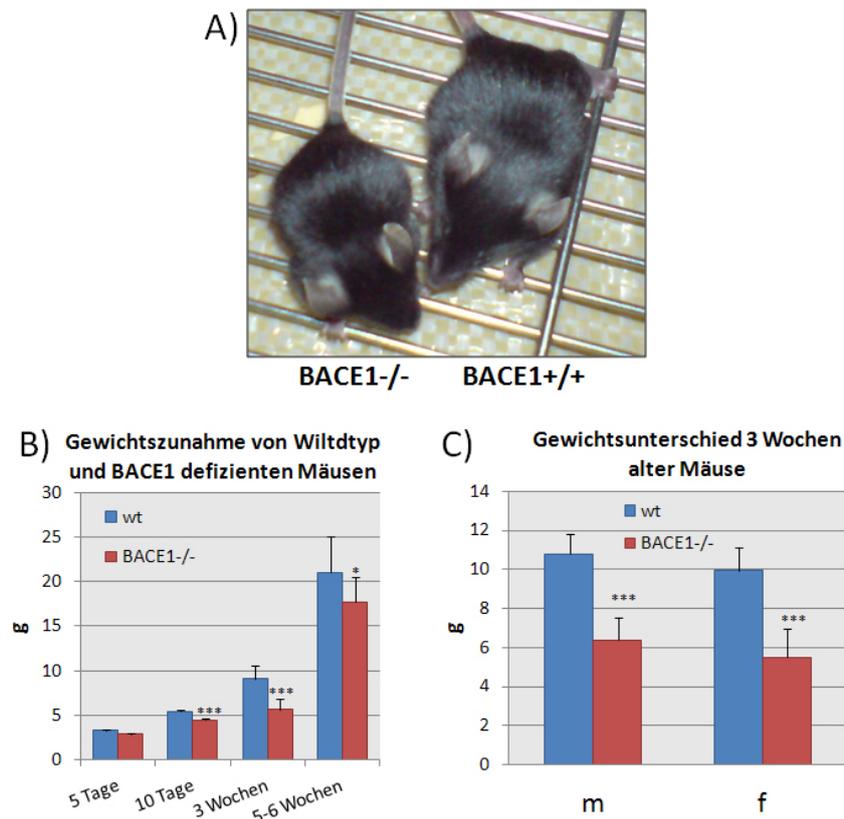


Abbildung 8: Gewichtszunahme von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

A) 20 Tage alte BACE1^{-/-} Mäuse sind kleiner als ihre BACE1^{+/+} und Wurfgeschwister, photographische Aufnahme
 B) BACE1^{+/+} (wt) und BACE1^{-/-} (ko) Tiere wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen gewogen und die Gewichtszunahme dokumentiert. Zu allen gemessenen Zeitpunkten waren BACE1^{-/-} Tiere leichter als BACE1^{+/+} Tiere. (5 Tage n_{wt} = 3, n_{ko} = 3, 10 Tage n_{wt} = 3, n_{ko} = 3, 3 Wochen n_{wt} = 10, n_{ko} = 10, 5-6 Wochen n_{wt} = 9, n_{ko} = 10)
 C) 20 und 21 Tage alte BACE1^{-/-} Böcke (m) weibliche (f) BACE1^{-/-} Mäuse und sind leichter als BACE1^{+/+} Mäuse des gleichen Geschlechts (m: n_{wt} = 13, n_{ko} = 18; f: n_{wt} = 13, n_{ko} = 14). (g = Gramm; * P<0,01, *** P<0,001, Berechnung nach Tukey)

Bei der Präparation von BACE1^{-/-} und BACE1^{+/+} Tieren konnten keine auffälligen makroskopischen Veränderungen der Organe festgestellt werden, was von histologischen Analysen von Niere, Lunge, Leber, Pankreas, Herz und Gehirn bestätigt wurde, die im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt wurden. Bezüglich der Verhaltens der BACE1-defizienten Mäuse bestand der subjektive Eindruck, dass *knockout* Tiere agiler als Wildtyp-Tiere sind, was zu der Beobachtung von (Dominguez *et al.*, 2005) *et al.* passt, dass BACE1^{-/-} Mäuse hyperaktiv sind. Junge BACE1-defiziente Mäuse (< 4 Wochen) fielen durch einen unsicheren, wackeligen Gang auf. Ganganalysen, sogenannte „Footprints“ von zwei Wochen alten Tieren zeigten jedoch keinen auffälligen Unterschied zwischen BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Tieren (Daten nicht gezeigt).

4.1.2. Testung von BACE1-Antikörpern und Untersuchung der Expression von BACE1 in neuronalem Gewebe

Zu Beginn der Arbeit standen die kommerziell erhältlichen anti-BACE1 Antikörper EE17 (Invitrogen, Karlsruhe), anti-BACE/Asp2-CT (ProSci, Poway, USA) und anti-BACE (M-83) (SantaCruz, Santa Cruz, USA) zur Verfügung. Gegen Ende der experimentellen Arbeit wurde noch zusätzlich von Prof. Vassar (Northwestern University, Chicago, USA) der in BACE1-defizienten Mäusen generierte monoklonale anti-BACE1 Antikörper 3D5 zur Verfügung gestellt (Zhao *et al.*, 2007). Alle Antikörper erkannten spezifisch das murine und das humane BACE1 Protein nach Überexpression in SHSY-5Y Zellen im Westernblot (Abb. 9).

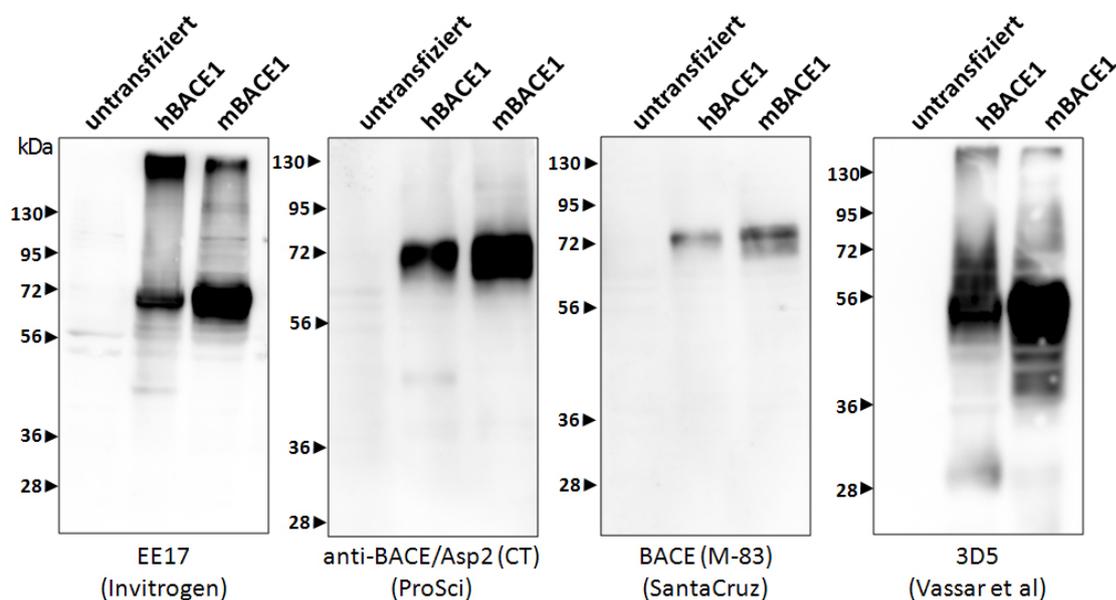


Abbildung 9: Westernblot von stabil humanes bzw. murines BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zelllysaten zur Testung von anti-BACE1 Antikörpern

Zur Testung der zur Verfügung stehenden anti-BACE1 Antikörper wurden Zelllysate von SHSY-5Y Neuroblastomzellen, die stabil murines (mBACE1) und humanes (hBACE1) BACE1 überexprimieren in einer SDS-PAGE aufgetrennt (20 µg Protein pro Spur) und im Tankblotverfahren auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden über Nacht mit den kommerziell erhältlichen polyklonalen, aus Kaninchen stammenden anti-BACE1 Antikörpern EE17 (Invitrogen), anti-BACE/Asp2-CT (ProSci) und BACE M-83 (Santa Cruz) sowie dem monoklonalen murinen Antikörper 3D5 (Zhao *et al.*, 2007) inkubiert und am nächsten Tag mit den entsprechenden POD-konjugierten sekundären Antikörpern behandelt (Esel anti-Kaninchen-IgG POD (SantaCruz), Schaf-anti-Maus-IgG POD (Dianova) und mit ECL-Advanced (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) detektiert. Die kommerziell erhältlichen Antikörper EE17, anti-BACE/Asp2-CT und BACE M-83 erkennen vorwiegend die ca. 70 kDa große glykosylierte mature Form, während der monoklonale murine Antikörper 3D5 vor allem die kleinere, weniger glykosylierte Proform von BACE1 erkennt. Die Antikörper EE17 und 3D5 erkennen zusätzlich die bei höheren Molekulargewichten wandernden dimeren, bzw. multimeren Formen von murinem und humanem BACE1.

Zur Spezifitätsüberprüfung der Antikörper wurden gleiche Mengen an Proteinlysate von untransfizierten und stabil mit humanem oder murinem BACE1 transfizierten SHSY-5Y Zellen verwendet. Alle kommerziellen Antikörper erkannten vorwiegend die ca. 70 kDa große glykosylierte mature Form von BACE1, während der Antikörper 3D5 die kleinere ER residente immature Form (ca. 60 kDa) detektierte (Charlwood *et al.*, 2001; Haniu *et al.*, 2000). Der BACE Antikörper (M-83) von SantaCruz liefert von allen Antikörpern, bei gleichmäßiger Proteinbeladung der SDS-Gele, die schwächsten Signale und wurde deshalb für weitere Versuche nicht verwendet. Da das murine BACE1 in den SHSY-5Y Zellen mit einer höheren Effizienz exprimiert wird als das humane Protein, kommen im Westernblot unterschiedlich starke Signale zustande. Bei den hochmolekularen Banden die mit den Antikörpern EE17 und 3D5 zu sehen sind, könnte es sich um multimere Formen von BACE1 handeln (Schmechel *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit sollte vor allem die *in vivo* Funktion von BACE1 untersucht werden, daher war es wichtig die Expression von endogenem BACE1 in verschiedenen Geweben und Organen nachweisen zu können. Für die Testung der anti-BACE1 Antikörper EE17 und anti-BACE/Asp2-CT, wurden verschiedene murine, neuronale Gewebe, die besonders stark BACE1 exprimieren (Yan *et al.*, 1999), im Westernblot auf ihre Spezifität hin untersucht. Verwendet wurden Gewebelysate (3.2.2.1) von Großhirn, Kleinhirn (*Cerebellum*), Rückenmark und *Bulbus Olfactorius* aus adulten BACE1^{+/+} und als Negativkontrolle aus BACE1^{-/-} Mäusen. Beide Antikörper erkannten die glykosylierte, mature Form von BACE1 bei 70 kDa. In allen Geweben war bei den BACE1-defizienten Proben eine unspezifische, schwache Bande auf Höhe des BACE1 Signals zu erkennen. Zusätzlich zu der spezifischen Bande für BACE1 gaben beide Antikörper unspezifische Signale im höheren und niedrigerem Molekulargewichtsbereich (Abb. 10, markiert mit *).

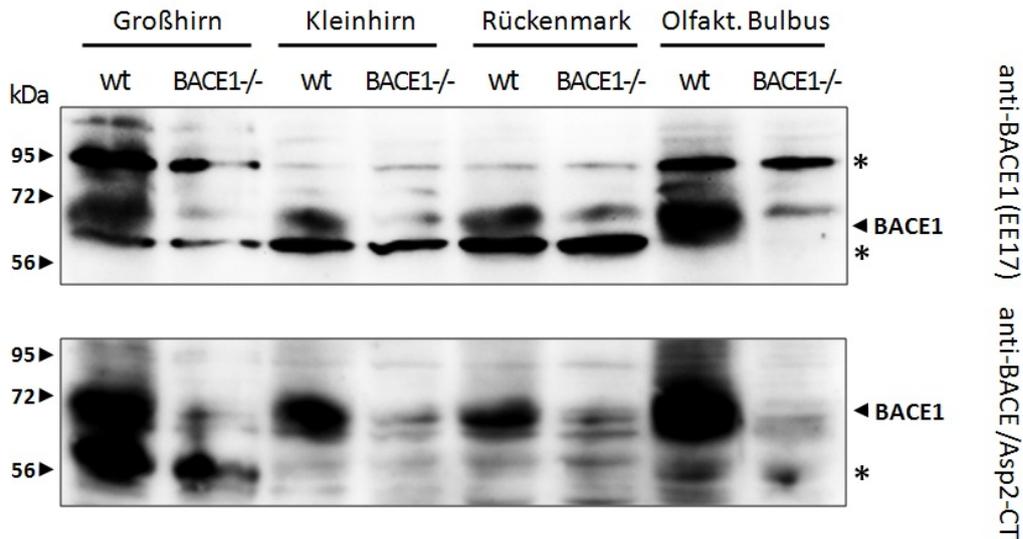


Abbildung 10: Antikörpertestung in verschiedenen murinen neuronalen Gewebelysaten

Die Gehirnregionen Großhirn, Kleinhirn, die olfaktorischen Bulben und das Rückenmark von BACE1^{+/+} (wt) und BACE1^{-/-} Mäusen wurden präpariert und in RIPA-Puffer lysiert. Je 30µg Protein pro Bahn wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Tankblot auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die polyklonalen Kaninchen-anti-BACE1 Antikörper EE17 und anti-BACE/Asp2-CT wurden 1:1000 eingesetzt. Der sekundäre, POD-gekoppelten Esel anti-Kaninchen-IgG-Antikörper wurde in einer 1:10 000 Verdünnung verwendet. Beide Antikörper erkennen bei ca. 70 kDa das endogene, glykosylierte mature BACE1 Protein, sowie ein kreuzreaktives Protein gleichen Molekulargewichts, was für die schwachen Banden auf Höhe des BACE1 Signals verantwortlich ist. Weitere unspezifische Banden sind mit * markiert.

Da BACE1 ein Transmembranprotein ist, wurde zur Reduktion der Hintergrundsignale eine einfache Membranpräparation von Kleinhirngewebe durchgeführt (3.2.2.2) und die zytosolische sowie die Membranfraktion im Westernblot untersucht. Die Membranpräparation bewirkte besonders für den anti-BACE1 EE17 Antikörper eine deutliche Reduktion der unspezifischen Bande auf Höhe des BACE1 Signals in der BACE1-defizienten Probe und es konnte gezeigt werden, dass die unspezifische Bande von einem Protein stammt, das in der zytosolischen Fraktion angereichert war.

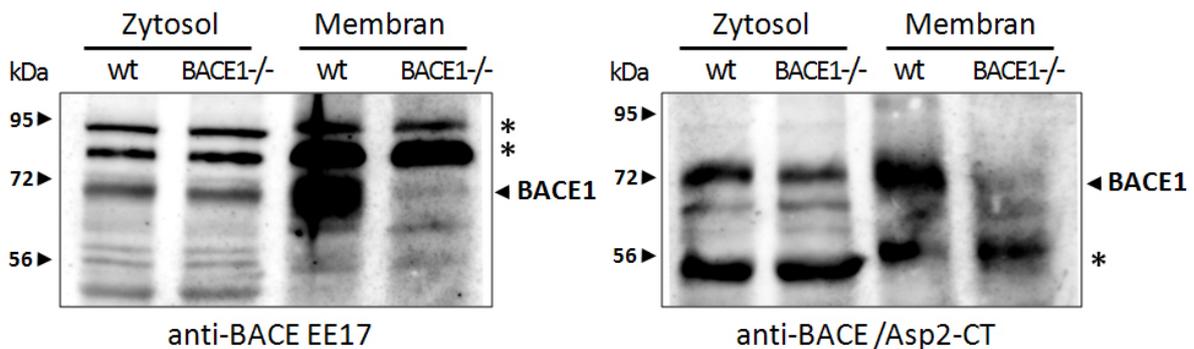


Abbildung 11: Antikörpertestung in der zytosolischen und Membranfraktion von murinem Kleinhirn

Aus Lysaten von Cerebellum von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurde mittels Ultrazentrifugation die zytosolische und die Membranfraktion gewonnen und im Westernblot analysiert. Die polyklonalen Kaninchen-anti-BACE1 Antikörper EE17 und anti-BACE/Asp2-CT wurden 1:1000 eingesetzt. Der sekundäre, POD-gekoppelten Esel anti-Kaninchen-IgG Antikörper wurde in einer 1:10 000 Verdünnung verwendet. Beide Antikörper erkennen bei ca. 70 kDa das endogene, glykosylierte mature BACE1 Protein. In der Membranfraktion ist die Kreuzreaktion der getesteten Antikörper deutlich geringer als zuvor in Gesamtlisat beobachtet (Abb. 10). In der zytosolischen Fraktion ist zu erkennen, dass die unspezifische Bande auf ein zytosolisches Protein der gleichen Größe wie BACE1 zurückzuführen ist. Unspezifische Banden sind mit * markiert.

4.1.3. Untersuchung der möglichen Rolle von BACE1 im Immunsystem

Die Beteiligung von BACE1 an der Prozessierung der immunologisch relevanten Proteine β -Galaktosid α -2,6-Sialyltransferase (ST6Gal1) (Kitazume *et al.*, 2001), P-Selektin-Glykoprotein Ligand (PSG-L1) (Lichtenthaler *et al.*, 2003) sowie des Interleukin-1-Rezeptors (IL-1 RII) (Kuhn *et al.*, 2007) führten zu der Frage, ob die Defizienz von BACE1 bei Mäusen eine Auswirkung auf das Immunsystem hat. Bestärkt wurde diese Annahme durch die Beobachtung von Dominguez *et al.* (2005), dass BACE1-defiziente Mäuse, in konventioneller Haltung, eine erhöhte Letalität in den ersten Lebenswochen zeigten, die in pathogenarmer Umgebung nicht auftrat (Dominguez *et al.*, 2005; Kitazume *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2007; Lichtenthaler *et al.*, 2003))

Zunächst wurde die Expression von BACE1 in immunologischen Geweben (Milz, Thymus und Lymphknoten von adulten Wildtyp-Mäuse) mittels Westernblot untersucht.

Mit dem anti-BACE/Asp-CT (ProSci) Antikörper, der gegen den C-Terminus von BACE1 gerichtet ist, war in der Milz und im Thymus von Wildtyp-Tieren bei 70 kDa eine Bande für BACE1 detektierbar. Wie zuvor für die Testung der anti-BACE1 Antikörper beschrieben, lässt sich die schwache Bande bei 70 kDa in den BACE1-defizienten Geweben dadurch erklären, dass der Antikörper unspezifisch mit einem Protein gleichen Molekulargewichts kreuzreagiert. Im Thymus war neben der maturen Form von BACE1 eine weitere Bande bei ca. 45 kDa zu erkennen, welche im BACE1-defizienten Geweben nur sehr schwach zu erkennen war. Hierbei könnte es sich um eine Spleißvariante oder ein Spaltprodukt von BACE1 (BACE1 Δ) handeln. In den Lysaten der Lymphknoten ließ sich mittels Western-Blot kaum BACE1 detektieren. Eine Membranpräparation war aufgrund der geringen Probemenge nicht möglich.

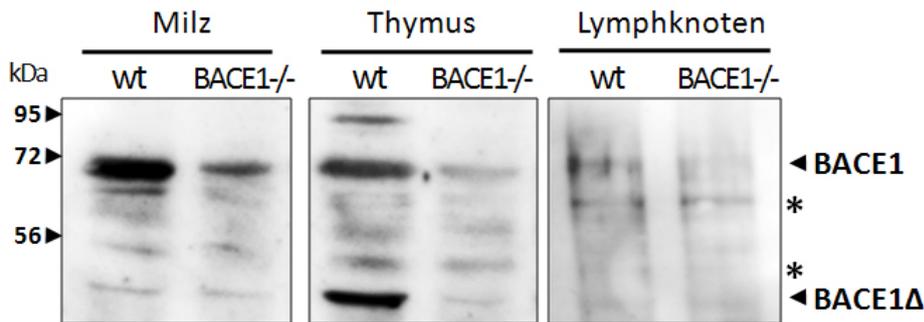


Abbildung 12: BACE1 Expression in den immunologischen Geweben Milz, Thymus und Lymphknoten

Milz, Thymus und Lymphknoten von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurden präpariert, in Lysepuffer homogenisiert und 40 µg Protein je Spur in einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf PVDF-Membran, wurde diese über Nacht mit dem Kaninchen anti-BACE1 Antikörper anti-BACE/Asp2-CT (ProSci) (1:1000) inkubiert und am nächsten Tag nach Inkubation mit dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper Esel anti-Kaninchen-IgG (1:10 000) mit ECL-Advance detektiert. Mit dem anti-BACE1 Antikörper anti-BACE/Asp2-CT (ProSci) konnte in Milz, Thymus und Lymphknoten BACE1-Protein nachgewiesen werden. Wie schon zuvor beobachtet, kreuzreagierte der Antikörper mit einem Protein der gleichen Größe wie BACE1. Die BACE1 Expression in Lymphknoten ist deutlich geringer als in Milz und Thymus. Die zusätzliche, spezifische Bande in Wildtyp-Thymus könnte auf eine Spleißvariante von BACE1 (BACE1Δ) zurückzuführen sein.

4.1.4. Untersuchung des Einflusses der BACE1-Defizienz auf die Zellpopulationen der Milz

An der Abwehr von Pathogenen sind zahlreiche Zelltypen des Immunsystems beteiligt. Um zu untersuchen, ob die Anzahl dieser Zellen in BACE1^{-/-} Tieren verändert ist, wurden Milzzellen von vier BACE1^{+/+} und sechs BACE1^{-/-} Tieren, im Alter von 10 Wochen, mittels Durchflusszytometrie (FACS = *fluorescence activated cell scanning*) analysiert. Die Mittelwerte der prozentualen Anteile, der für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Marker positiven Zellen ist in Tabelle 13 zusammengefasst. Der murine B-Lymphozyten-Marker B220 wird auf allen B-Zellen exprimiert. In BACE1^{+/+} Milzen waren 47,8% aller lebenden, kernhaltigen Zellen B220 positiv, während in BACE1^{-/-} Milzen der Anteil bei 38,3% lag. Für Makrophagen, die mit dem Marker Mac-1 gefärbt wurden, lagen die Werte bei 13,4% für Wildtyp- und 11,2% für BACE1-defizienten Milzzellen. Die Menge der für den Marker Gr-1 positiven Granulozyten war in BACE1^{-/-} Milzen geringer als in BACE1^{+/+} Milzen. Die Zahl der T-Zellen (CD3) war in BACE1-defizienten Milzzellen mit 53,4% im Vergleich zum Wildtyp mit 46,9% leicht erhöht. Die Subpopulation der CD4-positiven T-Helferzellen war in beiden Gruppen gleich, wohingegen der Anteil der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen in BACE1^{-/-} Milzen mit 21,6% gegenüber den BACE1^{+/+} Milzen mit 18,7% erhöht war.

Ergebnisse

| Zelltyp | Marker | % lebender Zellen | |
|-----------------------|--------|-------------------|------------|
| | | BACE1 +/+ | BACE1 -/- |
| B-Zellen | B220 | 47,8 ± 4,8 | 38,3 ± 3,3 |
| Makrophagen | Mac-1 | 13,4 ± 5,3 | 11,2 ± 2,3 |
| Granulozyten | Gr-1 | 15,2 ± 9,1 | 11,3 ± 1,5 |
| T-Zellen | CD3 | 46,9 ± 2,6 | 53,4 ± 3,2 |
| T-Helfer-Zellen | CD4 | 37,4 ± 9,0 | 37,3 ± 3,2 |
| Zytotoxische T-Zellen | CD8 | 18,7 ± 1,6 | 21,6 ± 2,0 |

Tabelle 13: FACS-Analyse von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Milzzellen

Von vier BACE1^{+/+} und sechs BACE1^{-/-} Mäusen wurde die Milz präpariert und von den Milzen Einzelzellsuspensionen angefertigt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen für 30 Minuten, im Dunkeln, mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern anti-B220-PE (1:150), anti-CD3-FITC (1:10), anti-CD4-FITC (1:100) und anti-CD8-PE (1:100) sowie mit den ungefärbten Hybridoma-Antikörpern aus der Ratte anti-Gr-1 (1/1) und anti-Mac-1 (1/1) inkubiert. Zum Nachweis der ungefärbten Antikörper gegen Gr-1 und Mac-1 wurden die Zellen für weitere 30 Minuten mit dem fluoreszenzgekoppelten anti-Ratte-FITC Sekundärantikörper inkubiert. Durch eine Propidiumiodid-Färbung wurde die Population der lebenden, kernhaltigen Zellen bestimmt und für diese der Anteil an der für den jeweiligen Marker positiven Zellpopulation bestimmt.

Von den untersuchten Zelltypen, war der einzige signifikante Unterschied zwischen BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Milzen in der Anzahl der B-Zellen zu beobachten. In Milzen von BACE1-defizienten Mäusen wurden ca. 20% weniger B-220 positive B-Zellen detektiert als in den Kontrollen.

Um zu untersuchen, ob dieser Phänotyp altersabhängig ist, wurden B-Zellpopulationen in Milzen von 24 Tage und 5 Monate alten Mäusen im FACS analysiert. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der FACS-Analysen von drei Altersstadien dargestellt. Der Anteil an B-Zellen war in den Milzen von 24 Tage, 10 Wochen und 5 Monate alten BACE1^{-/-} Mäusen deutlich geringer als in Wildtyp-Kontrolltieren. Mit 24 Tagen hatten BACE1-defiziente Mäuse ca. 30% weniger B220-positive B-Zellen in der Milz als Wildtyp-Tiere, bei den 10 Wochen und 5 Monate alten Tieren lag der Unterschied bei ca. 20%. Somit war der beobachtete B-Zellphänotyp altersunabhängig.

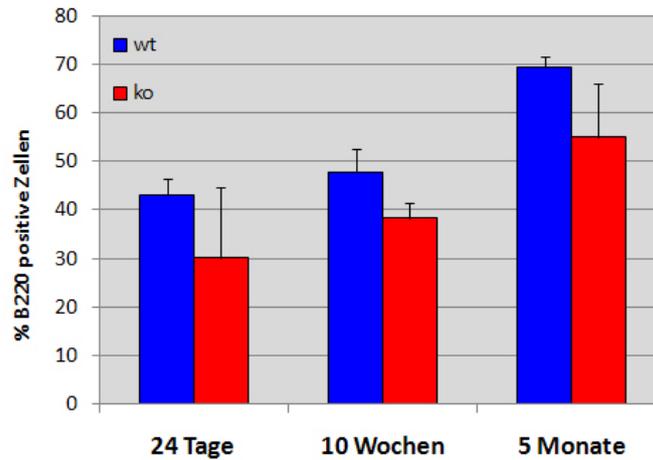


Abbildung 13: Anteil B220 positiver B-Zellen in der Milz von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen im Alter von 24 Tagen, 10 Wochen und 5 Monaten.

Milzzellen wurden im FACS auf die Expression des B-Zellmarkers B220 hin untersucht. In den Milzen der BACE1-defizienten Tiere war der Anteil der B220 positiven Zellen in allen untersuchten Alterstadien geringer als in den Kontrollen (n/s nicht signifikant, ** P<0,01, Berechnung nach Tukey)

4.1.5. Auswirkungen der geringeren Anzahl an B-Zellen in BACE1^{-/-} Milzen auf die Konzentration an Immunglobulinen im Serum

B-Zellen sind die verantwortlichen Zellen, die nach Differenzierung Antikörper bilden können und sind somit der wichtigste Bestandteil der humoralen Immunabwehr. B-Zellen durchlaufen, ausgehend von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen verschiedene Reifungs- und Differenzierungsstadien, die mit einer Veränderung der Expression von Immunglobulinklassen sowie von Oberflächenmarkerproteinen einhergeht. Um zu überprüfen, ob sich die verminderte Anzahl an B-Zellen in BACE1-defizienten Mäusen auf die Menge an Immunglobulinen im Serum der Mäuse auswirkt, wurden Serumproben von sieben BACE1^{+/+} und neun BACE1^{-/-} Tieren untersucht. Die Quantifizierung der Immunglobuline IgM, IgA, IgG3, IgG1 und IgG2b erfolgte im Labor von Professor Thure Adler (Helmholtz Zentrum München, *German Research Center for Environmental Health* (GmbH)). Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 tabellarisch zusammengefasst. In Seren von BACE1-defizienten Mäusen war die Konzentration der Immunglobuline IgM, IgA und IgG signifikant niedriger als in Kontrollseren. Die Immunglobuline IgG3 und IgG2b waren nicht signifikant verändert. Wildtyp-Tiere hatten durchschnittlich 590 µg/mL IgM, 633 µg/mL IgA, 165 µg/mL IgG3, 429 µg/mL IgG1 und 525 µg/mL IgG2b im Serum, während BACE1-defiziente Mäuse

Konzentrationen von 165 µg/mL IgM, 336 µg/mL IgA, 108 µg/mL IgG3, 246 µg/mL IgG1 und 586 µg/mL IgG2b im Serum aufwiesen.

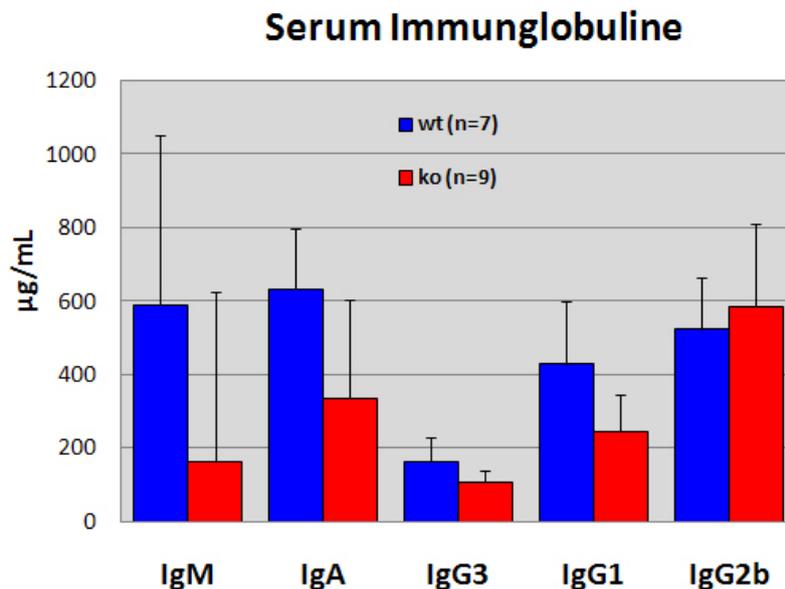


Abbildung 14: Serum Immunglobuline in BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Die Konzentration der Immunglobulinklassen IgM, IgA und IgG1 war in Seren von BACE1-defizienten Mäusen signifikant niedriger als in Kontrollseren, während sich die Konzentration von IgG3 und IgG2b nicht signifikant unterschieden. (n/s nicht signifikant, * P<0,05, Berechnung nach Tukey)

4.1.6. Untersuchungen mit dem Modellpathogen *Listeria monocytogenes* (LM) in vivo und in vitro

Die Auswirkungen der genetischen Deletion von BACE1 auf immunologische Prozesse oder Funktionen kann unter Umständen unter nicht pathogenen Bedingungen nicht oder nicht deutlich zu Vorschein treten. Es ist möglich Mäuse gezielt mit immunogenen Substanzen zu behandeln oder mit Pathogenen (Bakterien, Pilze, Viren) zu infizieren und die immunologischen Prozesse zu untersuchen.

4.1.6.1. BACE1-defiziente Mäuse sind anfälliger gegenüber LM Infektion als Wildtyp-Tiere

Um zu untersuchen, ob BACE1-defiziente Mäuse anfälliger für Infekte sind, wurden Mäuse intraperitoneal mit dem pathogenen Mikroorganismus *Listeria monocytogenes* (1.4.2) infiziert. Die Versuche wurden gemeinsam mit Carmen Alvarez Dominguez (Santander, Spanien) durchgeführt. Je fünf vier Monate alten BACE1^{+/+}, BACE1^{+/-} und BACE1^{-/-} Mäusen wurde die subletale Dosis von 3 x 10⁴ Listerien in die Bauchhöhle injiziert und der Zustand

der Mäuse über fünf Tage beobachtet. Alle Wildtyp-Mäuse überlebten die Infektion mit *Listerien* und von den heterozygoten verstarb ein Tier. Drei Tage nach den Infektion waren nur noch zwei der fünf BACE1-defizienten Tiere am Leben (Abb. 15, A). Nach fünf Tagen wurde der Zustand der Mäuse protokolliert. Zuerst erfolgte eine Begutachtung des allgemeinen Erscheinungsbildes. Anschließend wurden die Mäuse getötet und die Auswirkungen der LM-Infektion auf die inneren Organe untersucht. Die Einteilung der Symptome erfolgte in die drei Schweregrade keine, schwache und starke Symptome. Schwache Symptome wurden festgestellt, wenn die Maus vital wirkte, aber die Milz vergrößert war und vereinzelt Granuloma zu erkennen waren. Mäuse mit starken Symptomen wirkten krank, hatten struppiges, stumpfes Fell, eingeschränkte Lokomotion und waren teilweise erblindet. Die Milzen dieser Tiere wiesen ein starke Granulomatose auf. In Abbildung 15, B sind diese Daten tabellarisch zusammengefasst.

Von den infizierten BACE1^{+/+} und BACE1^{+/-} Tieren zeigten je zwei Mäuse keine und zwei schwache Symptome. Eine BACE1^{+/+} Maus hatte starke Symptome. Von den zwei überlebenden BACE1^{-/-} Tieren zeigte eine Maus schwache und eine starke Symptome, was auf eine höhere Empfindlichkeit der BACE1-defizienten Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren gegenüber LM Infektion hinwies.

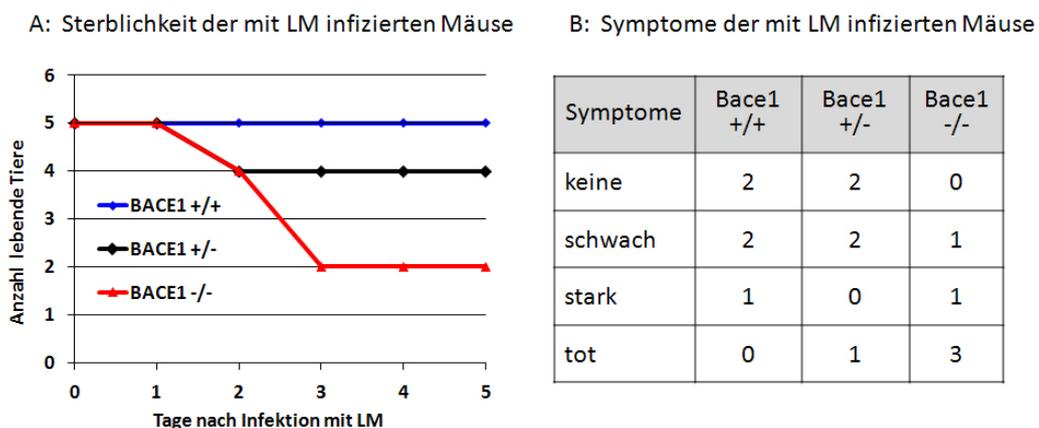


Abbildung 15: Reaktionen von BACE1^{+/+}, BACE1^{+/-} und BACE1^{-/-} Mäusen auf Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Je fünf BACE1^{+/+}, BACE1^{+/-} und BACE1^{-/-} Mäuse wurden intraperitoneal mit 3×10^4 *Listerien* infiziert und der Zustand sowie die Sterblichkeit der Mäuse protokolliert A) Zwei Tage nach der Infektion verstarben ein BACE1^{+/+} und ein BACE1^{-/-} Tier. Zwischen Tag zwei und drei verstarben zwei weitere BACE1^{-/-} Tiere. B) Tabellarische Auflistung der Symptome nach LM Infektion (Erklärung der Einteilung der Symptome im Text)

Für weitere Untersuchungen wurden die Mäuse am Tag fünf nach der Infektion getötet und den Tieren Blut, Leber und Milz entnommen. Da sich *Listerien* nach der Infektion vor allem in

der Leber und in den Makrophagen der Milz aufhalten (1.4.2) ist die Bakterienlast in diesen Organen ein Maß für die Schwere der Infektion. Dazu wurde ein Teil der Organe lysiert, von den Homogenaten eine Verdünnungsreihe angefertigt und die verdünnten Proben auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach etwa 24 h hat jedes lebende ausgestrichene *Listeria monocytogenes* Bakterium eine Kolonie gebildet. Anhand dieser kolonieformenden Einheiten (CFU = *colony forming unit*), deren Anzahl proportional zur Bakterienlast im jeweiligen Organ ist kann die Bakterienlast der Organe berechnet werden. Da nur von den überlebenden Tieren die Organe präpariert werden konnten, wurden nur zwei BACE1-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren untersucht. Die Bakterienlast der BACE1-defizienten Tiere war in der Milz ca. dreimal und in der Leber etwa viermal so hoch wie in den Wildtyp-Organen (Abb. 16).

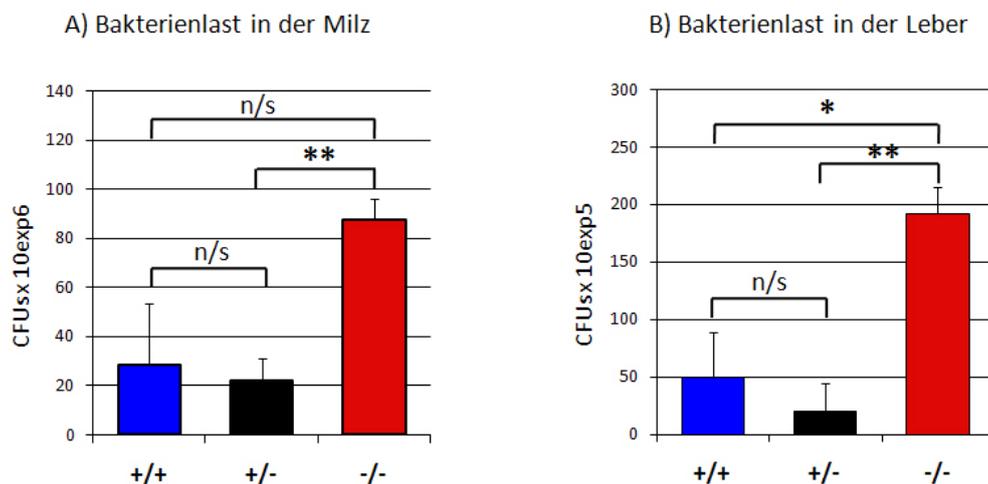


Abbildung 16: Bakterienlast in Leber und Milz nach LM Infektion

Die Milzen (A) und Lebern (B) der infizierten Tiere wurden homogenisiert und eine 1/10 Verdünnungsreihe angefertigt. Die verdünnten Proben wurden auf Blutagarplatten ausplattiert, nach ca. 24 h die kolonieformenden Einheiten (CFUs) gezählt und die Bakterienlast in den Organen berechnet. (n/s = nicht signifikant, *P<0,05, ** P<0,01, Berechnung nach Tukey)

Von den Teilen der Milzen, die nicht für die Bestimmung der CFUs verwendet wurden, wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt und diese dann im FACS untersucht. Besonderer Focus wurde dabei auf antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen gerichtet, da diese Zellen wichtig für die Abwehr der Listerien sind. Als allgemeiner T-Zell-Marker diente CD3, für die spezialisierten zytotoxischen T-Zellen CD8 und für die T-Helferzellen CD4. Weiterhin wurden antigenpräsentierende Zellen mittels eines Markers gegen MHCII (*major histocompatibility class II*) und natürliche Killerzellen mit dem Antikörper NK1.1 gefärbt. CD80, CD86 und CD54

(ICAM-1) sind wichtige kostimulatorische Proteine, für die Aktivierung von T-Zellen, die unter anderem auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. In Tabelle 14 sind die prozentualen Anteile der für den jeweiligen Marker positiven Zellen, die innerhalb des eingegrenzten Bereichs lagen zusammengestellt.

Auch hier konnten bisher nur die Werte von den zwei überlebenden BACE1-defizienten Mäusen und zwei Wildtyp-Tieren bestimmt werden. Für fast alle verwendeten Marker war der Unterschied zwischen BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} kleiner als 20%. Ein deutlicher Unterschied war lediglich bei den zytotoxischen T-Zellen und für den Marker CD80 zu erkennen. So hatten infizierte Wildtyp-Tiere ca. 37% weniger CD8 positive T-Zellen als BACE1-defiziente Tiere und etwa 40% weniger CD80 positive Milzzellen. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Mäusen, die für die FACS Analyse zur Verfügung standen, sind diese Werte aber nicht signifikant.

| Zelltyp | Marker | % lebender Zellen | |
|--|--------|-------------------|-------------|
| | | BACE1 +/+ | BACE1 -/- |
| T-Zellen | CD3 | 21,5 ± 5,3 | 25,7 ± 4,4 |
| T-Helfer-Zellen | CD4 | 9,7 ± 3,0 | 10,5 ± 1,6 |
| Zytotoxische T-Zellen | CD8 | 9,2 ± 2,9 | 12,6 ± 2,7 |
| Antigenpräsentierende Zellen (APC) | MHCII | 28,1 ± 5,2 | 31,4 ± 16,3 |
| Natürliche Killerzellen | NK1.1 | 4,8 ± 2,2 | 3,5 ± 0,9 |
| Aktivierte B-Zellen, Monozyten | CD80 | 3,9 ± 1,6 | 6,4 ± 4,0 |
| Aktivierte B-Zellen, Monozyten, Dendritische Zellen | CD86 | 17,6 ± 0,9 | 18,5 ± 5,8 |
| Hämatopoetische und nicht hämatopoetische Zellen | CD54 | 31,0 ± 10,1 | 33,4 ± 1,85 |

Tabelle 14: FACS-Analyse von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Milzen fünf Tage nach Infektion mit Listerien

Von zwei BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen, die fünf Tage zuvor mit Listerien infiziert wurden, wurde von einem Teil der Milzen Einzelzellsuspensionen angefertigt. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen für 30 Minuten, im Dunkeln, mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern anti-CD3-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti D^b (MHCII)-FITC, anti-NK1.1 (DX5)-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE sowie anti-CD54-FITC gefärbt. Durch eine Propidiumiodid-Färbung wurde die Population der lebenden, kernhaltigen Zellen bestimmt und für diese der Anteil an der für den jeweiligen Marker positiven Zellpopulation bestimmt.

4.1.6.2. Abtötung von *Listeria monocytogenes* in primären Makrophagen aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Da Makrophagen als phagozytierende Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen spielen, ist der Verlauf einer Infektion mit Listerien stark von der Effizienz dieser Zellen bei der Bakterienabtötung abhängig. Im Mausmodell ist die Aktivierung der Makrophagen, die wichtig für die Bakterienbekämpfung ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Um zu untersuchen, ob die erhöhte Anfälligkeit der BACE1-defizienten Tiere für eine Listerieninfektion und die erhöhte Bakterienlast in Leber und Milz auf eine geringere Effizienz der Makrophagen bei der Abtötung der Listerien zurückzuführen ist, wurde die Listerienabtötung in Makrophagen isoliert von Einflüssen des Immunsystems *in vitro* untersucht. Dafür wurden primäre knochenmarks Makrophagen aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen mit Listerien infiziert (3.2.4.6) und der LM-Replikationsindex (RI) bestimmt. Der Replikationsindex ist das Verhältnis von Listerien in den Makrophagen zu einem bestimmten Zeitpunkt ($t = X$) nach der Phagozytose zu der Anzahl an Listerien in den Makrophagen direkt nach der Phagozytose ($t = 0$). Bei einem RI größer eins, haben sich die Listerien in den Zellen vermehrt, bei einem RI kleiner eins konnten die Bakterien durch die Makrophagen abgetötet werden.

Makrophagenvoläufierzellen wurden aus dem Knochenmark isoliert, differenziert und mit Listerien infiziert (3.2.4.4 und 3.2.4.6). In Abbildung 17, A sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit differenzierten Knochenmark-Makrophagen (BM-DM = *bonemarrow differentiated macrophages*) dargestellt. In zwei Experimenten wurden die Listerien von BACE1^{-/-} Makrophagen schlechter bekämpft als von den Kontrollmakrophagen, was sich durch einen größeren Replikationsindex äußerte. In einem Experiment konnten die Listerien etwas besser von den BACE1-defizienten Makrophagen bekämpft werden. In einem vierten Versuch wurden für die LM-Abtötungsexperimente Makrophagen verwendet, die nach Stimulation mit Thioglykolat aus dem Peritoneum von Mäusen gewonnen wurden (3.2.4.5). In diesen Zellen führte die Defizienz von BACE1 ebenfalls zu einer schlechteren Bekämpfung der Listerien als in Wildtyp-Makrophagen (Abb. 17, B). Aufgrund der extrem hohen Standardabweichung und einem Experiment mit gegenteiligem Effekt, konnte bisher nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob die Defizienz von BACE1 einen Einfluss auf die Listerienabtötung in Makrophagen hat. Durch Stimulation der BM-DMs mit Interferon- γ (10

ng/mL, R&D System) 48 Stunden vor der Listerieninfektion konnten sich sowohl in $BACE1^{+/+}$ als auch in $BACE1^{-/-}$ Makrophagen um den Faktor fünf reduziert werden.

Weitere Experimente, in denen nach Stimulation der Makrophagen die Produktion, der für die Pathogenbekämpfung wichtigen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), untersucht wurden, ergaben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen $BACE1^{+/+}$ und $BACE1^{-/-}$ Makrophagen (Daten nicht abgebildet).

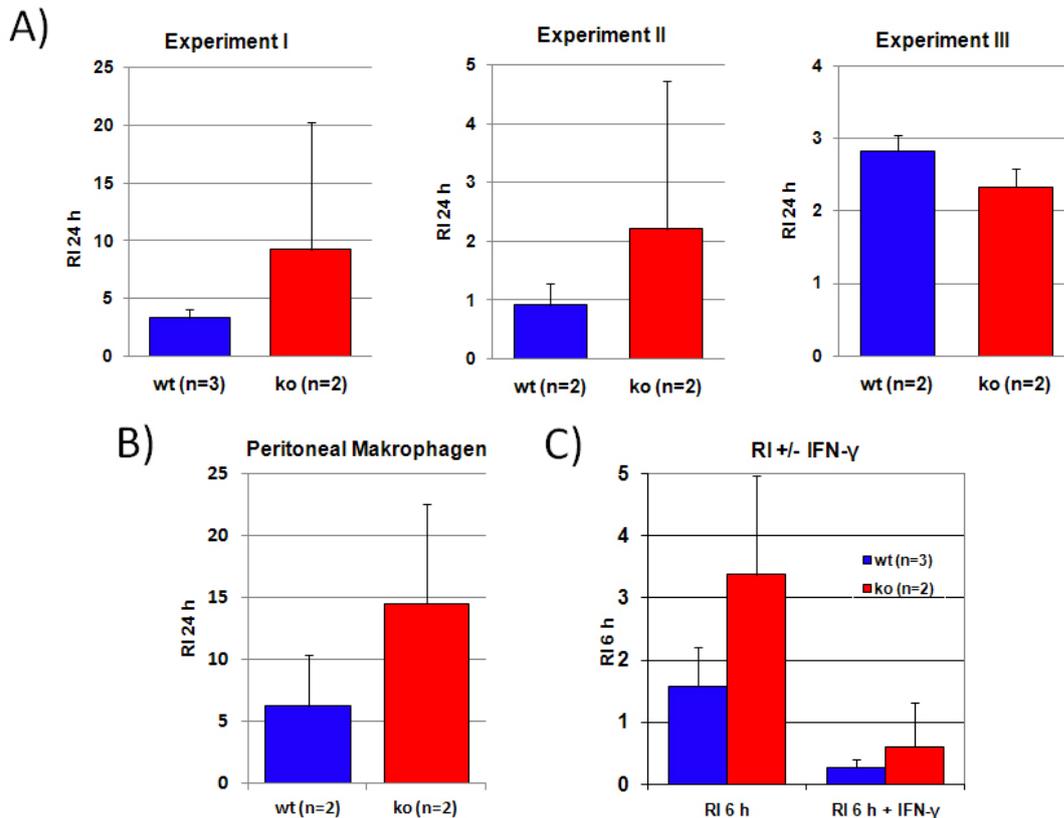


Abbildung 17: Listerien Replikation in primären Makrophagen aus $BACE1^{+/+}$ und $BACE1^{-/-}$ Mäusen

Zur Gewinnung von Makrophagen aus $BACE1^{+/+}$ und $BACE1^{-/-}$ Mäusen wurden entweder Makrophagenvorläuferzellen aus dem Knochenmark zu Makrophagen differenziert, oder nach intraperitonealer Injektion von Thyoglykolat aus dem Peritoneum der Mäuse gewonnen. Die Makrophagen wurden jeweils in Triplika auf zwei 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und Listerien in einem Verhältnis von 10 Listerien pro Makrophage auf die Zellen gegeben. Die Phagozytose wurde nach 25 Minuten gestoppt, extrazelluläre Bakterien durch Waschen der Zellen weitgehend entfernt und Listerien die nicht durch Waschen entfernt werden konnten wurden durch eine 45-minütige Inkubation der Zellen mit Gentamycin (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMEM) abgetötet. Nach erneutem Waschen wurde auf die Zellen jeweils 300 μL DMEM gegeben. Auf eine Platte, welche den Zeitpunkt $t=0$ darstellte wurden zusätzlich 300 μL Lysepuffer (0,005% Triton-X-100 in PBS) gegeben und die Platte bei -80°C eingefroren. Die zweite Platte wurde für 24 Stunden bei 37°C im CO_2 Inkubator belassen bevor sie wie die erste Platte behandelt und eingefroren wurde ($t=0$). Die Zellen wurden wieder aufgetaut, die Lysate auf Blutagarplatten ausplattiert, nach 24 bis 36 Stunden die CFUs gezählt und der Listerien Replikationsindex (RI) berechnet ($\text{RI} = \text{CFU}_{\text{t=x}} / \text{CFU}_{\text{t=0}}$). **A)** Listerien RI nach 24 Stunden in differenzierten Makrophagen aus dem Knochenmark von $BACE1^{+/+}$ (wt) und $BACE1^{-/-}$ (ko) Mäusen von drei unabhängigen Experimenten **B)** Listerien RI nach 24 Stunden in Peritonealmakrophagen **C)** Listerien RI nach 6 Stunden in unstimulierten und mit IFN- γ (10 ng/mL, R&D System) aktivierten BM-DMs.

4.2. Suche nach BACE1 Substraten

Seit langem war bekannt, dass A β aus der Prozessierung von β APP hervorgeht (Allsop *et al.*, 1983; Goldgaber *et al.*, 1987), die verantwortliche Protease BACE1 konnte jedoch erst 1999 identifiziert werden (Hussain *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Die Entdeckung weiterer Substrate für BACE1 führten zu der Theorie, dass β APP wahrscheinlich nicht zwangsläufig das physiologisch wichtigste BACE1 Substrat ist. Einige dieser neuen BACE1 Substrate werden in einem ersten Prozessierungsschritt von der α - oder β -Sekretase und anschließend durch den γ -Sekretasekomplex sequentiell geschnitten. Da bekannt ist, dass die α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 ein großes Substratspektrum abdecken (Reiss *et al.*, 2006), stellte sich die Frage, ob BACE1 ähnlich viele und heterogene Substrate spalten kann.

4.2.1. TRANCE (*tumor necrosis factor-related, activation-induced cytokine*)

4.2.1.1. Alkalische-Phosphatase (AP)-Aktivitätsversuch

Um mögliche weitere Substrate von BACE1 zu identifizieren, wurden verschiedene Proteine, von denen bekannt ist, dass sie sowohl von der α - als auch von der γ -Sekretase prozessiert werden, im Rahmen eines Alkalische-Phosphatase-(AP) Versuchs untersucht. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf Proteine gelegt, die an immunologischen Prozessen beteiligt sind, da BACE1 wie bereits erwähnt (1.3.4) einen Einfluss auf das Immunsystem haben könnte.

Für diese Versuche wurden Konstrukte von Transmembranproteinen verwendet, die an der extrazellulären Domäne mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) fusioniert wurden (Konstrukte freundlicher Weise von Dr. Carl Blobel, New York, USA, zur Verfügung gestellt). Bei Überexpression dieser Proteine zusammen mit BACE1, konnte anhand der AP Konzentration im Überstand der kultivierten, transient transfizierten Zellen, die nach Spaltung durch BACE1 sezernierte Ektodomäne des potentiellen Substrats nachgewiesen werden (3.2.2.10).

Unter den zahlreichen getesteten Proteinen konnte TRANCE (*tumor necrosis factor-related, activation-induced cytokine*) als potentielles Substrat für BACE1 identifiziert werden.

4.2.1.2. Prozessierung von TRANCE-AP durch BACE1

Cos7 Zellen wurden mit TRANCE-AP alleine und in Kombination mit aktivem BACE1 oder katalytisch inaktivem BACE1 transfiziert. Da TRANCE auch von der Metalloproteinase ADAM17 geschnitten werden kann, wurde zu einem Ansatz, der mit TRANCE und aktivem BACE1 transfiziert war, 16 Stunden vor Ernte der Zellen der Breitband-Metalloproteinase-Inhibitor GM6001 (10 μ M, Calbiochem) zugegeben.

In Abbildung 18, A sind die Ergebnisse des TRANCE-AP-Aktivitätstests in einem Diagramm dargestellt. Wurden die Zellen nur mit TRANCE-AP transfiziert lag der Anteil an löslichem TRANCE-AP im Überstand bei $17,1\% \pm 5,1\%$, bei gleichzeitiger Überexpression von BACE1 stieg dieser Anteil auf $20,7\% \pm 5,5\%$ wohingegen in Anwesenheit der katalytisch inaktiven BACE1 (D289N) Mutante nur $13,5\% \pm 0,9\%$ des TRANCE-AP sezerniert wurde. Durch die Zugabe des Metalloproteinase-Inhibitors GM6001 zu Cos7-Zellen, die mit TRANCE-AP und BACE1 kotransfiziert wurden, lag der Anteil an löslichem TRANCE-AP bei $15,9\% \pm 0,4\%$.

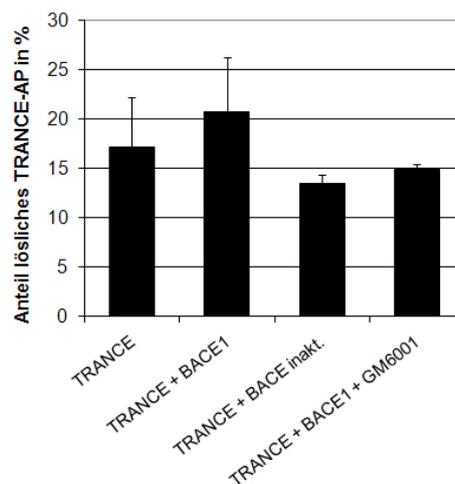


Abbildung 18: TRANCE-AP Aktivitätsversuch

Das Diagramm fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen TRANCE-AP Aktivitätstests zusammen. Cos7 Zellen wurden transient mit TRANCE-AP oder mit TRANCE1-AP in Kombination mit der aktiven bzw. der inaktiven BACE1 transfiziert. Nach 48 Stunden Expression wurden der Zellkulturüberstand und die Zellen geerntet und die Alkalische Phosphatase Aktivität bestimmt. Die Spaltungsrate für TRANCE-AP ist in Prozent angegeben und wurde anhand des Verhältnisses der AP-Aktivität im Zellkulturüberstand zur gesamten AP-Aktivität berechnet. Die gesamte AP-Aktivität setzte sich aus der Aktivität des löslichen TRANCE-AP und dem membranständigen unprozessierten zellulären TRANCE-AP zusammen.

Da das TRANCE-AP Konstrukt, zusätzlich zur extrazellulären Alkalischen-Phosphatase, am zytoplasmatischen Ende mit einem „Flag-Tag“ versehen war, war es möglich mit einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörper sowohl das ungeschnittene Protein, als auch

das N-terminale Fragment im Westernblot nachzuweisen (Abb. 19). Sowohl der anti-BACE1 Antikörper (EE17) als auch der anti-Flag Antikörper gaben in der untransfizierten Probe kein Signal. Der obere Blotausschnitt zeigt das ungeschnittene TRANCE-AP, welches aufgrund des 67 kDa großen AP-Tags ein Gesamtgewicht von ca. 110 kDa aufwies. Im unteren Blot ist das transfizierte aktive und inaktive BACE1-Protein zu erkennen, wobei das inaktive BACE1 hauptsächlich in seiner kleineren Pro-Form in den Zellen exprimiert wurde. Im Ausschnitt des anti-Flag Westernblots ist nach Koexpression der aktiven BACE1 bei 17 kDa eine zusätzliche Bande zu erkennen, bei der es sich wahrscheinlich um das N-terminale Spaltprodukt von TRANCE-AP handelt. In Anwesenheit des Metalloproteinase-Inhibitors GM6001 war diese Bande deutlich schwächer ausgeprägt.

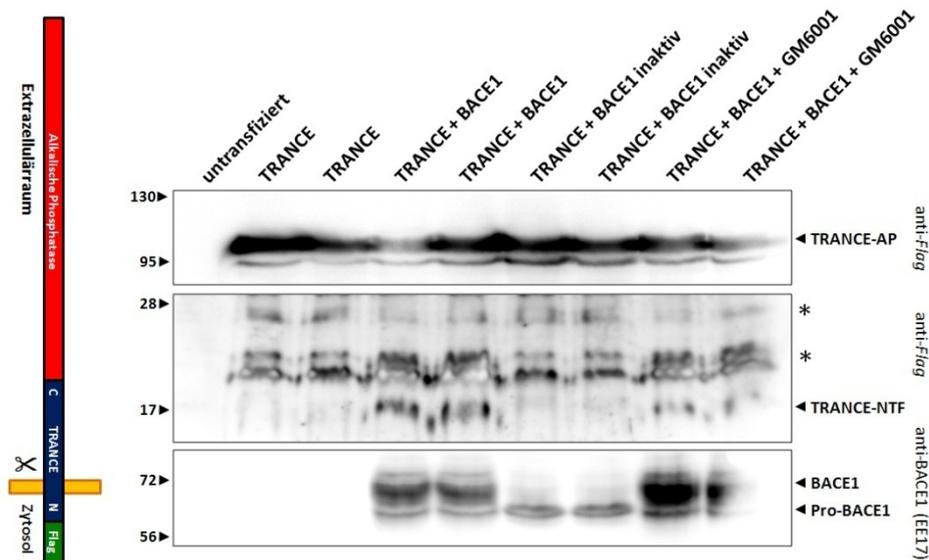


Abbildung 19: Westernblot von transient mit TRANCE-AP und BACE1 transfizierten Cos7-Zellen

Das Schema zeigt den Aufbau des TRANCE-AP Fusionsproteins. Am N-Terminus des TRANCE-AP-Proteins befindet sich die 67 kDa große Alkalische Phosphatase (rot). Die putative BACE1-Spaltstelle ist mit einer Schere symbolisiert und der N-terminale, zytosolische *Flag-Tag* ist in grün dargestellt. Lysate von transient mit TRANCE-AP und BACE1 transfizierten Cos7-Zellen wurden im Westernblot analysiert. Durch den N-terminalen Flag-Tag ließ sich mit einem anti-Flag Antikörper (Sigma, 1:1000) das unprozessierte ca. 110 kDa große TRANCE-AP (Oben) und das N-terminale Fragment (TRANCE-NTF) nachweisen (Mitte). Der Nachweis von BACE1 erfolgte mit dem anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) (Unten).

Eine wichtige Voraussetzung für die Prozessierung von TRANCE durch BACE1 ist die räumliche Nähe der beiden Proteine in der Zelle. Durch die immunzytochemische Färbung transfizierter Cos7-Zellen mit gegen den *Flag-Tag* von TRANCE-AP und den *Myc-Tag* von BACE1 gerichteten Antikörpern, konnte die subzelluläre Lokalisation und eine mögliche Kolo-kalisation der überexprimierten Proteine untersucht werden. Beide Proteine

kolokalisiert in der Zellen, zeigten aber von der subzellulären Verteilung der Signale eine starke ER-Lokalisation (Daten nicht gezeigt). Da beide Proteine endogen nicht, oder nur zu einem sehr geringen Anteil im ER vorkommen, könnte es sich bei der Prozessierung von TRANCE-AP durch BACE1 um Überexpressionsartefakte handeln.

4.2.1.3. Untersuchung der TRANCE Prozessierung durch BACE1 im endogenen System

Um mehr über die physiologische Bedeutung von BACE1 für die Prozessierung von TRANCE zu erfahren, wurde die Expression von TRANCE in verschiedenen Geweben von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen untersucht. TRANCE wird vor allem von aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und vaskulären Endothelzellen exprimiert. Aus diesem Grund wurden die Expression von TRANCE in den lymphatischen Organe Milz und Thymus untersucht. Weitere analysierte Organe waren die Lunge, die reich an Endothelzellen ist, sowie das Gehirn als Negativkontrolle, da in neuronalen Geweben TRANCE nur in sehr geringem Maße exprimiert wird (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>). Der gegen murines TRANCE gerichtete monoklonale Antikörper (Imgenex, San Diego, USA, Ktlg. Nr. IMG-185A) erkennt ein Epitop der Ektodomäne von humanem und murinem TRANCE. Mit diesem Antikörper konnte somit matures und lösliches TRANCE detektiert werden.

Im Gehirnlisat erkennt der Antikörper eine schwache, wahrscheinlich unspezifische Bande bei 36 kDa, die in allen untersuchten Geweben nachweisbar war (Abb. 20, markiert mit *). In der Literatur wird die Größe von membranständigem TRANCE mit ca. 35 kDa und von löslichem TRANCE mit ca. 21 kDa angegeben (Spohn *et al.*, 2005). In allen untersuchten nicht neuronalen Geweben wurden bei ca. 37 kDa und ca. 35 kDa zwei TRANCE-Banden detektiert, welche wahrscheinlich unterschiedlich glykosyliertes oder anderweitig posttranslational modifiziertes TRANCE darstellen. Der Antikörper erkannte auch ein ca. 21 kDa großes Protein, bei dem es sich vermutlich um das lösliche TRANCE handelt. Im Milzlysat war zwischen Wildtyp- und BACE1-defizienten Geweben kein Unterschied in der TRANCE Expression zu erkennen. Im Thymus von Wildtyp-Tieren war vor allem die 37 kDa TRANCE-Bande präsent, während im BACE1-defizienten Thymus nur die 35 kDa Form von TRANCE zu erkennen war. Die detektierbare lösliche Form war in Menge und Größe unverändert. In der Lunge waren beide unprozessierten TRANCE Formen erkennbar, wobei im BACE1^{-/-} Lysat die 35 kDa Form stark akkumulierte, während das lösliche TRANCE dagegen reduziert war.

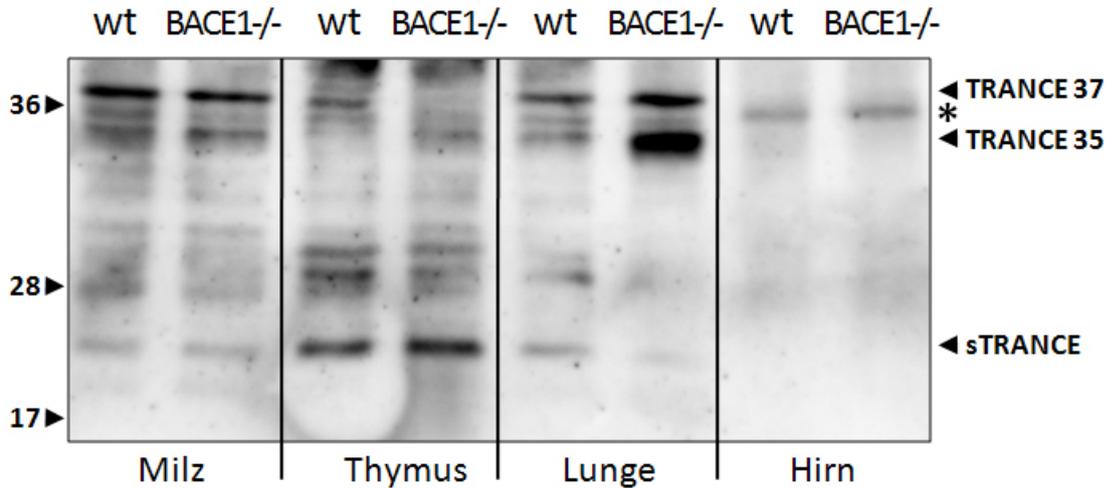


Abbildung 20: Westernblot Analyse der TRANCE Expression in verschiedenen Geweben von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Lysate von Milz, Thymus, Lunge und Hirn von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurden in 15%-igen Polyakrylamid Gelen aufgetrennt (je 20 µg) und die Proteine mittels SemiDry-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis von unprozessiertem (TRANCE37 und TRANCE35) und löslichem TRANCE (sTRANCE) erfolgte mit einem Maus monoklonalen anti-TRANCE Antikörper (1:1000, Imgenex, San Diego, USA) und dem Schaf anti-Maus-IgG POD-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10 000, Dianova).

Da sich Organe und Gewebe aus verschiedenen Zelltypen und extrazellulärer Matrix zusammensetzen, liegt eine weitaus komplexere Proteinzusammensetzung vor als in kultivierten Zelllinien. Dies kann bei der Untersuchung von Gewebelysaten im Westernblot, beispielsweise durch Zelltypen abhängige posttranslationale Modifikationen, eine eindeutige Zuordnung der Banden erschweren. Weiterhin ist es möglich, dass Effekte des BACE1 *Knockouts* nur in einzelnen Zelltypen auftreten, diese aber im Proteingemisch nicht zu erkennen sind.

Deshalb wurde die Expression von TRANCE in aktivierten und unaktivierten humanen T-Zellen, sowie Peritonealmakrophagen von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen im Westernblot analysiert (Abb. 21). Diese Zelltypen wurden gewählt, da TRANCE sehr stark von aktivierten T-Zellen und etwas schwächer von monozytären Zellen exprimiert wird. In den nicht aktivierten T-Zellen (Abb. 21, Spur 1) war keine TRANCE Expression detektierbar, wohingegen in den aktivierten T-Zellen eine deutliche Bande bei 37 kDa und eine schwächere Bande bei 35 kDa zu erkennen war. Die in nicht aktivierten T-Zellen auftretende Bande von ca. 27 kDa konnte nicht zugeordnet werden. In den aktivierten T-Zellen war bei ca. 21 kDa eine schwache Bande zu erkennen, bei der es sich eventuell um lösliches TRANCE

handelte. Im anti-BACE1 Blot detektiert der Antikörper in beiden Proben BACE1, welches in den aktivierten T-Zellen stärker exprimiert war.

In Wildtyp-Makrophagen war im Gegensatz zu BACE1-defizienten Makrophagen kaum membranständiges TRANCE zu erkennen. Lösliches 21 kDa großes TRANCE konnte weder in BACE1^{+/+} noch in BACE1^{-/-} Makrophagen nachgewiesen werden. Die BACE1 Expression in den Wildtyp-Peritonealmakrophagen war schwach nachweisbar.

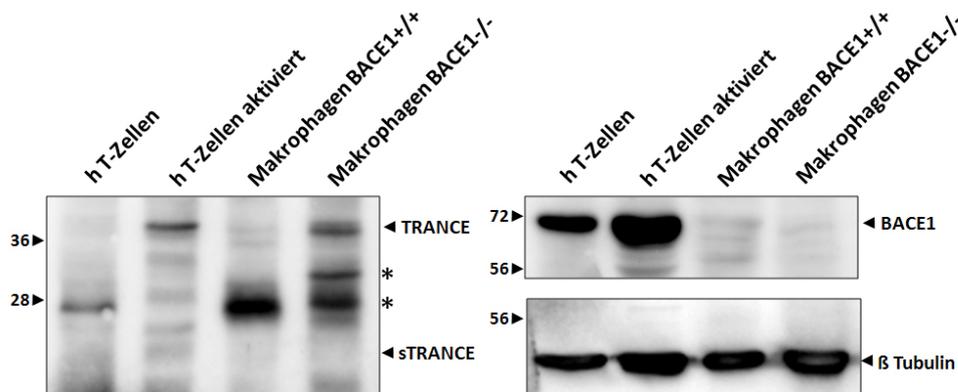


Abbildung 21: Expression von TRANCE und BACE1 in aktivierten und nicht aktivierten humanen T-Zellen und Peritonealmakrophagen aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Lysate von nicht aktivierten und aktivierten, aus humanem Blut aufgereinigten T-Zellen (h T-Zellen) (Zellen freundlicherweise von Dr. Christian Beck zur Verfügung gestellt) sowie Peritonealmakrophagen von adulten BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurden im Westernblot analysiert. Der Nachweis von TRANCE erfolgte mit einem Maus anti-TRANCE Antikörper (1:1000, Imgenex) und einem POD-gekoppelten Schaff anti-Maus-IgG Antikörper. Zum Nachweis von BACE1 wurden der Kaninchen anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) eingesetzt. β Tubulin wurde nach „Strippen“ der PVDF-Membran mit dem Maus anti-Tubulin Antikörper (1:500, DSHB) detektiert.

4.2.1.4. Nachweis der Tartrat-resistenten, sauren Phosphatase Form 5b (TRACP 5b) im Serum von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Die Bindung von TRANCE an seinen Rezeptor auf Osteoklasten-Vorläuferzellen, induziert die Ausdifferenzierung zu knochenresorbierenden Osteoklasten (Kong *et al.*, 1999). Bei Untersuchungen zur Proteolyse von TRANCE durch Metalloproteinasen konnte gezeigt werden, dass membranständiges TRANCE eine deutlich stärkere differenzierende Wirkung auf Osteoklasten hat als lösliches (Hikita *et al.*, 2006). Wenn BACE1 an der Abspaltung des löslichen TRANCE von der Membran beteiligt ist, könnte dies einen Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung *in vivo* haben. Osteoklasten sezernieren die Tartrat-resistente, saure Phosphatase Form 5b (TRACP 5b), welche im Serum von Mäusen nachweisbar ist und als Maß für die Knochenresorption und somit die relative Anzahl an Osteoklasten, dienen kann. Mit dem „MouseTRAP-Test“ (SBA Sciences, Turku, Finnland), einem Festphasen-

Enzymaktivitätsversuch, wurde die Konzentration von TRAPCP 5b im Serum von zwei Wildtyp- und zwei *Knockout*-Mäusen bestimmt. Im Serum der $BACE1^{-/-}$ Mäuse war die Konzentration an TRAPCP 5b mit 12,9 U/L ($\pm 0,26$) ca. 25% höher als in den Wildtyp-Seren mit 10,3 U/L ($\pm 0,09$) (Abb. 22).

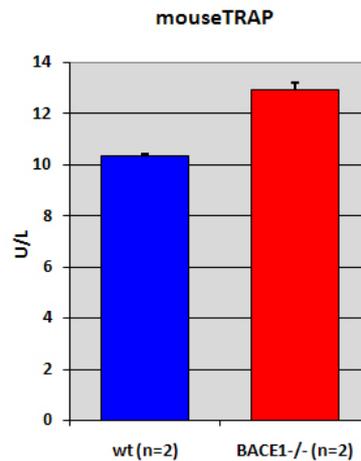


Abbildung 22: mouseTRAP-Assay (SBA Sciences, Turku, Finnland)

Der mouseTRAP-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Serum von je zwei acht Wochen alten $BACE1^{+/+}$ und $BACE1^{-/-}$ Mäusen wurde gewonnen, indem den Mäusen post mortem Blut aus dem Herzen entnommen und nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen wurde. Durch einen 30-minütigen Zentrifugationsschritt (4°C, 3 000 rpm) wurde das geronnene Blut vom Serum getrennt. Je Tier wurden drei Werte ermittelt (jeweils 50 μ L pro Wert) und gemittelt.

Da Osteoklasten neben den Osteoblasten für die Knochenhomöostase verantwortlich sind, war die nächste Frage, ob in $BACE1$ -defizienten Mäusen der Aufbau und die Struktur der Knochen sichtbar verändert war. Dazu wurden die Unterkiefer sowie die Knochen der hinteren Extremität von je zwei adulten und zwei 4 Wochen alten $BACE1^{+/+}$ und $BACE1^{-/-}$ Mäusen präpariert und von Dr. Vincent Everts (*Laboratory of Histology and Cell Biology, University of Amsterdam, Amsterdam, Niederlande*) untersucht. Die Knochen der $BACE1$ -defizienten Tiere wiesen in keinem der analysierten Parameter Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Proben auf (Daten nicht gezeigt).

4.2.2. BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*)

Wie in Kapitel 4.1.4 bereits beschrieben, wurde untersucht, ob sich in der Milz die Populationen der dort residenten Immunzellen in BACE1-defizienten Tieren von denen der Wildtyp-Tiere unterscheiden. Bei den vier BACE1^{+/+} und sechs BACE1^{-/-} Milzen konnte der einzige signifikante Unterschied in der B220 positiven B-Zellpopulation beobachtet werden. In den BACE1-defizienten Milzen war der Anteil an B-Zellen, je nach Alter der Mäuse, zwischen 20% und 30% niedriger als in Wildtyp-Milzen.

Da BAFF ein wichtiger Faktor für die Maturierung und das Überleben von B-Zellen ist (vgl. 1.4.6), wurde untersucht, ob BACE1 einen Einfluss auf die Prozessierung von BAFF haben könnte. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde, wie schon für TRANCE, ein BAFF Alkalische-Phosphatase-Versuch durchgeführt, in dem BAFF als potentielles BACE1 Substrat identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Obwohl das BAFF-AP-Protein intrazellulär zusätzlich mit einem *Flag-Tag* fusioniert war, konnte im Westernblot mit einem anti-*Flag* Antikörper weder das unprozessierte BAFF, noch spezifische Spaltprodukte detektiert werden. Da es keinen kommerziellen Antikörper gegen BAFF gibt, der gegen den intrazellulären N-Terminus des Proteins gerichtet ist, wurde die cDNA von humanem und murinem BAFF vom Ressourcen Zentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen und wie in 3.2.1.9 und 3.2.1.13 beschrieben N-terminal mit einem HA-Tag versehen.

293T HEK Zellen wurden in unterschiedlichen Kombinationen mit BAFF-HA, BACE1 und der inaktiven BACE1 Mutante transient transfiziert. Der anti-HA Antikörper detektierte bei ca. 37 und 39 kDa zwei spezifische Banden, die das ungeschnittene BAFF-HA Protein repräsentieren. Bei ca. 20 kDa konnten zwei Banden detektiert werden, bei denen es sich wahrscheinlich um die N-terminalen Fragmente (NTF) von BAFF-HA handelt. In Lysaten von Zellen, die mit BAFF-HA und BACE1 kotransfiziert wurden, waren diese Banden stärker als in Zellen die kein BACE1 überexprimierten. Dieser Effekt konnte durch den BACE1 Inhibitor C3 aufgehoben werden. Die Kotransfektion von BAFF-HA mit der inaktiven BACE1 Mutante bewirkte eine verminderte Generierung der NTFs (Abb. 23).

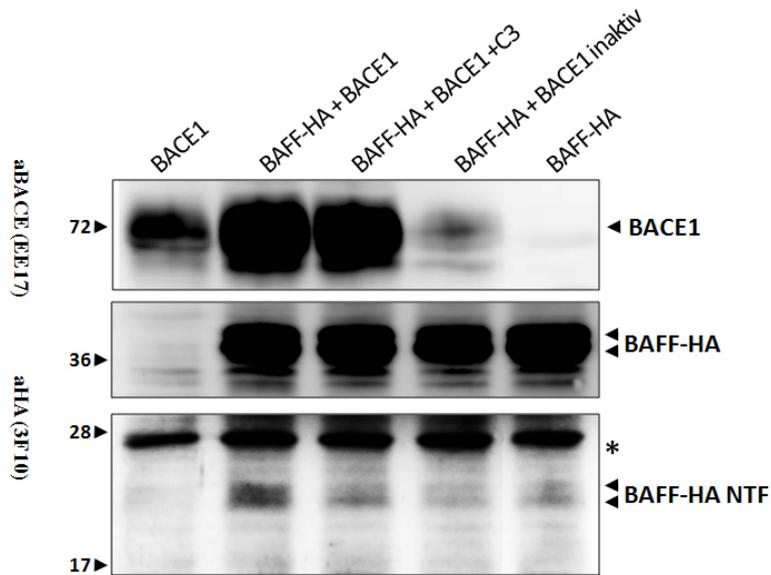


Abbildung 23: Prozessierung von BAFF-HA durch BACE1 in HEK293T Zellen

HEK293T-Zellen wurden transient mit BAFF-HA und mit BAFF-HA in Kombination mit aktivem oder inaktivem BACE1 transfiziert und im Westernblot analysiert. BACE1 wurde mit dem Kaninchen anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) und einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Antikörper (SantaCruz, 1:10 000) nachgewiesen. Der Nachweis von BAFF-HA erfolgte mit dem Ratte anti-HA-Antikörper 3F10 (Roche, 1:10 000) und mit einem Ziege anti-Ratte-IgG POD-gekoppelten Antikörper (Dianova, 1:10 000). Pro Spur wurden 40 µg Zelllysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Nachweis von BACE1 wurden 10%-ige und zum Nachweis von BAFF-HA und den BAFF-HA N-terminalen Fragmenten (BAFF-HA NTF) 15%-ige Polyakrylamid Gele verwendet.

Mit dem gleichen Versuchsansatz, in einer anderen Expressionszelllinie (Cos7, Daten nicht gezeigt), konnten diese Ergebnisse nicht eindeutig reproduziert werden. In mit BAFF-HA transfizierten Zellen waren die 20 kDa NTFs präsent, die Intensität der Banden wurde jedoch weder durch die Anwesenheit der aktiven noch der inaktiven BACE1 beeinflusst.

In immunzytochemischen Färbungen von Cos7-Zellen, die mit BAFF-HA und BACE1-myc kotransfiziert wurden, zeigten beide Proteine eine starke ER-Lokalisation. Nur eine geringe Menge des Proteins war an der Zellmembran nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Trotz der starken Expression der beiden Proteine im ER, kolokalisierten sie nur schwach. Da endogenes BACE1 nur zu einem geringen Anteil im ER lokalisiert und dort nur schwach aktiv ist (Benjannet *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2001), stellten Cos7-Zellen wahrscheinlich kein optimales System dar, um die Prozessierung von BAFF-HA durch BACE1 zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der HA-Tag eine Retention des BAFF-Proteins im ER bewirkte.

4.2.2.1. BAFF Expression und Prozessierung in der Makrophagen Vorläufer Zelllinie THP-1

BAFF wird unter anderem von Monozyten und Makrophagen exprimiert. Daher wurde, für die Untersuchung der BAFF-Prozessierung im endogenen System, die Makrophagen Vorläufer-Zelllinie THP1, mit dem BACE1 Inhibitor C3 (Merck, 10 μ M) und dem Breitband Metalloproteinase Inhibitor GM6001 (Calbiochem, 10 μ M) behandelt. Im Westernblot wurde untersucht, ob die eingesetzten Inhibitoren einen Einfluss auf die Prozessierung des endogenen BAFF Proteins hatten. Der verwendete anti-BAFF Antikörper (ProSci, Poway, USA) war gegen die Ektodomäne gerichtet und erkennt somit nur unprozessiertes und lösliches BAFF (sBAFF = *soluble* BAFF). Da viele Membranproteine auch in intrazellulären Kompartimenten wie zum Beispiel den Endosomen abgespalten werden und von der Zelloberfläche abgespaltene Proteine noch mit der Plasmamembran assoziiert bleiben, ist es teilweise möglich, lösliches Protein auch im Zelllysat nachzuweisen.

Die Lysate der THP1 Zellen, die über Nacht mit Inhibitor behandelt wurden, wurden im Westernblot analysiert (Abb. 24). Wie schon bei BAFF-HA Überexpression beobachtet, erkennt auch der anti-BAFF Antikörper zwei Banden, die das endogene BAFF repräsentieren. BAFF-HA migrierte aufgrund des zusätzlichen HA-Peptids bei etwas höheren Molekulargewichten als das endogene BAFF, welches Banden bei ca. 36 und 34 kDa erzeugt. Bei unbehandelten und zur Kontrolle mit DMSO (1:1000) behandelten THP-1-Zellen war die 34 kDa Form von BAFF deutlich stärker vertreten als die etwas größere 36 kDa Form. Bei Zellen die mit dem BACE1 Inhibitor C3 behandelt wurden, erschienen dagegen beide Formen gleich stark, während die Behandlung mit dem Metalloprotease Inhibitor GM6001 zu einer Akkumulation der 36 kDa Form und einer Reduktion der 34 kDa Form führte. Die Kombination von BACE1 und Metalloprotease Inhibitor zeigte keinen zusätzlichen Effekt des BACE1 Inhibitors im Vergleich zu Zellen, die nur mit GM6001 behandelt wurden. In der Literatur wird für lösliches humanes BAFF eine Größe von ca. 17 kDa angegeben (Daridon *et al.*, 2008). Mit dem verwendeten BAFF Antikörper konnte kein Protein bei 17 kDa detektiert werden. Dafür zeigten sich bei ca. 18 und 15 kDa Banden, bei denen es sich um die lösliche BAFF-Form handeln könnte. Die Intensität beider Banden wurde nicht wesentlich durch die verwendeten Inhibitoren beeinflusst.

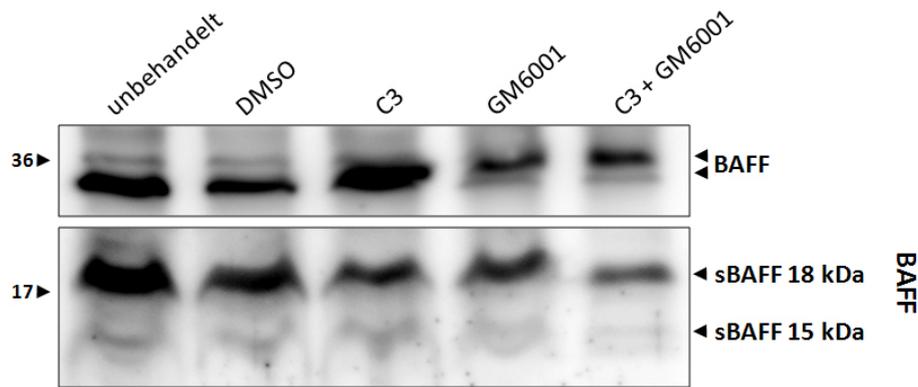


Abbildung 24: Einfluss von BACE1 und Metalloprotease Inhibitoren auf die Prozessierung von BAFF in THP-1-Zellen

THP-1-Zellen wurden für 16 Stunden mit dem BACE1 Inhibitor C3 (10 μ M), dem Breitband-Metalloprotease Inhibitor GM6001 (10 μ M) oder mit einer Kombination aus beiden Inhibitoren behandelt. Als Kontrolle wurde DMSO (1:500) eingesetzt. Die Lysate der Zellen wurden im Westernblot auf die Expression von unprozessiertem BAFF und löslichem BAFF (sBAFF) hin untersucht. Primärantikörper: anti-BAFF (CT) (ProSci, Poway, USA), 1:1000, Sekundärantikörper Esel anti-Kaninchen-IgG POD (SantaCruz) 1:10 000.

4.2.2.2. BAFF Expression und Prozessierung in primären differenzierten Makrophagen aus dem Knochenmark von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Da Makrophagen eine Quelle für lösliches und membrangebundenes BAFF sind, wurde aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen Knochenmark isoliert und die darin enthaltenen Makrophagenvorläuferzellen zu Makrophagen differenziert (3.2.4.4). Es ist beschrieben, dass die Expression von BAFF und die Freisetzung von löslichem BAFF durch Stimulation mit verschiedenen Agentien gesteigert werden kann (Nardelli *et al.*, 2001). Daher wurden die aus Knochenmark differenzierten Makrophagen (BM-DMs = *bone marrow derived differentiated macrophages*) zusätzlich über Nacht entweder mit bakteriellem Lipopolisaccharid (LPS, Sigma, 1 μ g/mL) oder für zwei Stunden mit dem Phorbolster PMA (Sigma, 200 ng/mL) stimuliert. Im Westernblot wurden die Zellen auf die Expression von BACE1 und BAFF, sowie den Einfluss der BACE1-Defizienz auf die löslichen BAFF Spaltprodukte hin untersucht (Abb. 25).

Der anti-BACE1 Antikörper EE17 detektierte in BM-DMs von Wildtyp-Tieren sowohl die Proform von BACE1 (pBACE1) bei ca. 60 kDa als auch die mature Form (mBACE1) bei ca. 75 kDa. Die Stimulation mit LPS und PMA hatte keinen Einfluss auf die BACE1 Expression.

In BM-DMs von BACE1^{-/-} Tieren konnte im Westernblot deutlich mehr BAFF-Protein detektiert werden als in Wildtyp-Makrophagen. Dies bezog sich nur auf die kleinere 34 kDa Form von BAFF. Die größere 36 kDa Form konnte nur sehr schwach oder gar nicht detektiert

werden. Ein deutlicher Unterschied zwischen BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Makrophagen konnte auch bei der Verteilung der löslichen Spaltprodukte beobachtet werden. Im Gegensatz zu der THP-1 Zelllinie konnte in BM-DMs neben den 18 und 15 kDa löslichen BAFF Formen auch die in der Literatur beschriebenen 17 kDa große Form detektiert werden, deren Konzentration nicht von BACE1 beeinflusst wurde. In BACE1-defizienten Makrophagen, konnte wesentlich mehr 18 kDa großes lösliches BAFF detektiert werden als 15 kDa lösliches BAFF. In Wildtyp-Makrophagen verhielt es sich genau entgegengesetzt. Hier wurde deutlich mehr von der kleineren löslichen BAFF Spezies als von der etwas größeren Form nachgewiesen. Die Stimulanzien zeigten keinen Einfluss auf die BAFF Expression und die Generierung der löslichen Spaltprodukte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Makrophagen während der Differenzierung bereits stark aktiviert wurden und somit eine zusätzliche Aktivierung keinen Effekt zeigte.

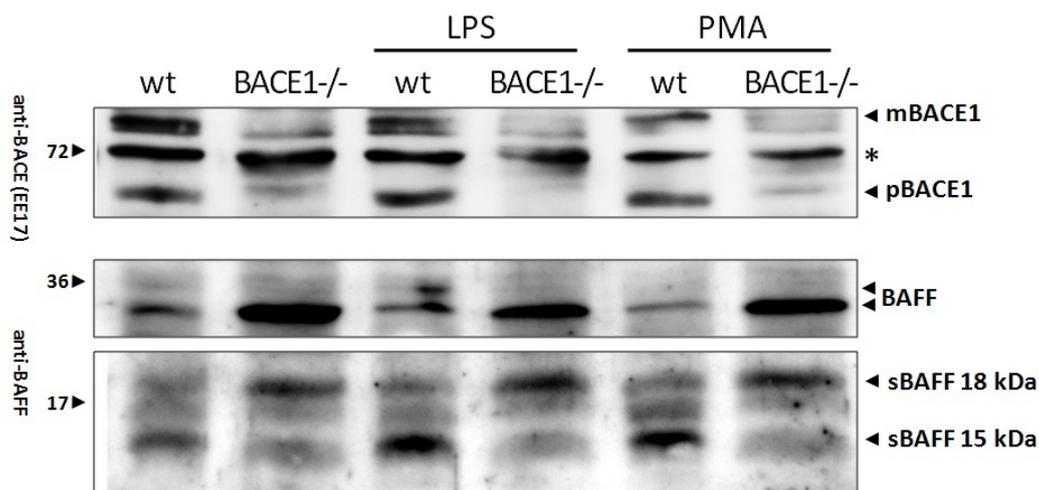


Abbildung 25: Expression von BAFF und BACE1 in BM-DMs

Makrophagenvorläuferzellen aus dem Knochenmark von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurden zu Makrophagen differenziert und diese für zwei Stunden mit LPS (1 µg/mL) oder PMA (200 ng/mL) stimuliert. Die Zelllysate wurden im Westernblot auf die Expression von BACE1 und BAFF hin untersucht. BACE1 wurde mit dem Kaninchen anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) und einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Antikörper (SantaCruz, 1:10 000) nachgewiesen. Es konnte sowohl die Pro-Form (pBACE1) als auch die mature Form (mBACE1) von BACE1 in den Wildtyp-Makrophagen nachgewiesen werden. Die unspezifische Bande ist mit * markiert. Der Nachweis von BAFF erfolgte mit dem Kaninchen anti-BAFF (CT)-Antikörper (ProSci, Poway, USA, 1:1000) und dem Sekundärantikörper Esel anti-Kaninchen-IgG POD (SantaCruz, 1:10 000).

Bei Wiederholungen des Versuchs mit Makrophagen aus anderen Präparationen, konnte die Akkumulation des BAFF Proteins in BACE1-defizienten Makrophagen gegenüber Wildtyp-Makrophagen ebenfalls beobachtet werden. Allerdings war es für die löslichen BAFF Formen, nicht möglich das beobachtete Bandenmuster zu reproduzieren.

4.2.2.3. BAFF Expression in Milz

Aufgrund des hohen Gehalts an Makrophagen und dendritischen Zellen, wurde die BAFF Expression und Prozessierung in Milzen von adulten BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen im Westernblot untersucht (Abb. 26). Während in Lysaten von Wildtyp-Milzen nur sehr wenig BAFF, sowohl von der 36 kDa als auch von der 34 kDa großen Form detektiert werden konnte, konnte in BACE1-defizienten Milzen eine starke Expression des 34 kDa großen BAFF beobachtet werden. Die etwas größere 36 kDa Form des unprozessierten BAFF Proteins wurde in den BACE1-defizienten Milzlysaten nicht nachgewiesen. Weder in den Wildtyp- noch in den BACE1-defizienten Milzlysaten konnte die 18 kDa große Form von BAFF nachgewiesen werden. Dafür wurde die 17 kDa Form detektiert, für die das Signal in den Wildtyp-Proben deutlich stärker als in den BACE1-defizienten Milzen war. Auch von der 15 kDa Form konnte in Wildtyp-Milzen mehr nachgewiesen werden als in Milzen von BACE1-defizienten Mäusen.

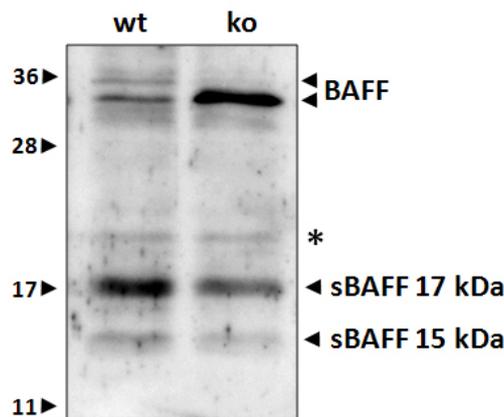


Abbildung 26: BAFF Expression und Prozessierung in der Milz von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Milzen von adulten BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wurden lysiert und die Proteine in einem 15%-igen SDS-Akrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch das SemiDry-Blot Verfahren wurde die Membran zunächst mit einem Kaninchen anti-BAFF (Sigma, 1:1000) inkubiert und anschließend mit einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Antikörper (SantaCruz, 1:10 000) inkubiert. sBAFF = lösliches BAFF, * = unspezifische Bande.

4.2.2.4. Untersuchung der BAFF Konzentration im Serum von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Lösliches BAFF (sBAFF) kann wie viele andere Zytokine im Serum mittels ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) nachgewiesen werden. In Patienten, die an einer Autoimmunerkrankung, wie Rheumatoider Arthritis, leiden, ist die Konzentration an löslichem BAFF im Serum deutlich erhöht (Cheema *et al.*, 2001; Mackay *et al.*, 2003). Sollte

BAFF durch BACE1 prozessiert werden, könnte dies Einfluss auf die Menge an löslichem BAFF im Serum von BACE1-defizienten Mäusen haben. Um diese Theorie zu untersuchen, wurde fünf BACE1^{+/+} und vier BACE1^{-/-} Mäusen Blut entnommen und die BAFF Konzentration im Serum mit einem ELISA (Apotech, Epalinges, Schweiz) bestimmt (Abb. 27). Die BAFF Konzentration im Serum von BACE1-defizienten Mäusen unterschied sich nicht von den in Wildtyp-Seren gemessenen Werten. Die Konzentration an löslichem BAFF lag in beiden Gruppen mit ca. 4,0 ng/mL etwas unter der vom Hersteller als Referenz angegebenen mittleren Konzentration von 4,6 ng/mL BAFF im Serum von Mäusen.

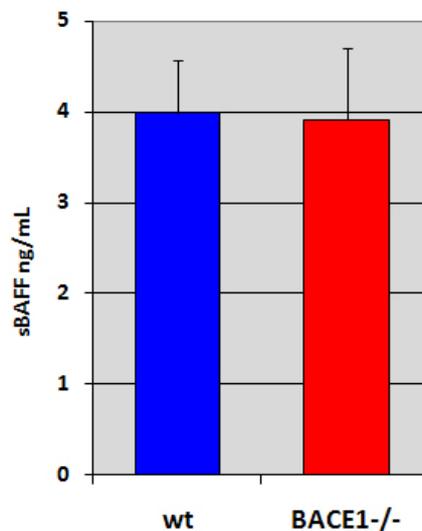


Abbildung 27: Konzentration an löslichem BAFF im Serum von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Fünf vier Monate alten BACE1^{+/+} und vier BACE1^{-/-} Mäusen wurde retrobulbär Blut entnommen, das Serum gewonnen und die Konzentration an löslichem BAFF (sBAFF) im ELISA (Apotech, Epalinges, Schweiz) bestimmt. Je Tier wurden zweimal 5 und 10 µL Serum im ELISA eingesetzt, die Werte gemittelt und anhand einer Eichkurve die Konzentration an sBAFF in ng/mL berechnet.

4.2.3. ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule 1)

Von je fünf, fünf Monate alten BACE1^{+/+} und vier BACE1^{-/-} Mäusen wurden Milzzellen isoliert um mittels Durchflusszytometrie (FACS) den Anteil an verschiedenen Zelltypen zu analysieren (3.2.4.2). Dabei wurde unter anderem auch die Expression von ICAM-1 untersucht.

ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule 1*), oft auch als CD54 (*Cluster of Differentiation 54*) bezeichnet, wird in der Milz von T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert. Auf antigenpräsentierenden Zellen wirkt es durch die Bindung an T-Zellen als wichtiges kostimulatorisches Protein. Auf Endothelzellen exprimiert unterstützt ICAM-1 die feste

Bindung der im Blutstrom patrouillierenden Leukozyten und deren Transmigration zum Entzündungsherd.

Im FACS kann nicht nur die Anzahl der für einen bestimmten Marker positiven Zellen bestimmt werden, sondern auch wie viel des untersuchten Proteins auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dies ist möglich, da die Fluoreszenzintensivität proportional zu der Menge an gebundenem fluoreszenzmarkierten Antikörper und somit zu dessen Antigen ist. Der Anteil der ICAM-1 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der Milz wies keinen signifikanten Unterschied zwischen BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen auf (Abb. 28, A). Bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensivität zeigte sich jedoch, dass die Expression von ICAM-1 auf den BACE1-defizienten Milzzellen signifikant gegenüber Wildtyp-Milzzellen erhöht war (Abb. 28, B).

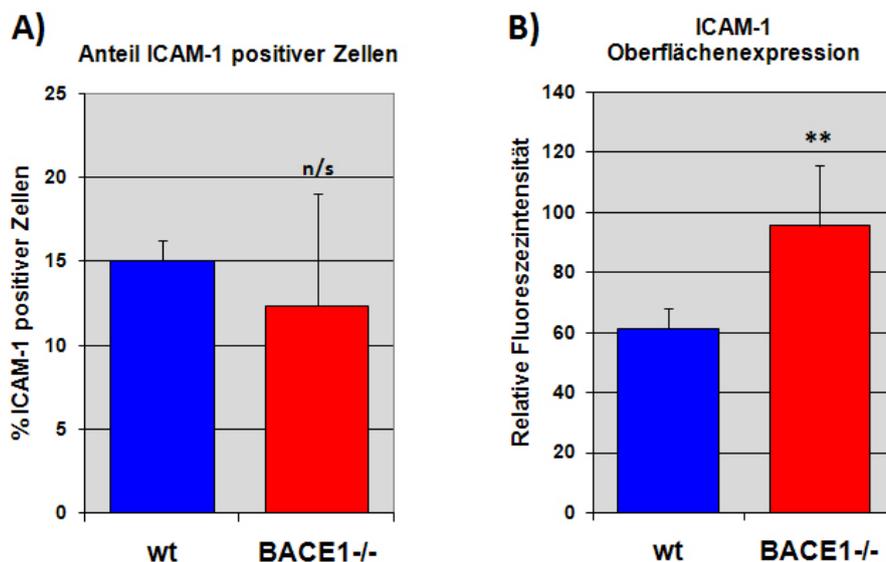


Abbildung 28: FACS Analyse der ICAM-1 Expression auf Milzzellen von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen

Die Milzen von fünf Monate alten BACE1^{+/+} (n = 5) und BACE1^{-/-} (n = 4) Mäusen wurden präpariert und die Zellen isoliert. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Milzzellen mit einem fluoreszenzgekoppelten anti-CD54 Antikörper (antiCD54-FITC, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) markiert und im FACS analysiert. Zur Identifizierung der lebenden, kernhaltigen Zellen, wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Dieser Farbstoff penetriert nur tote Zellen und färbt dort DNA an. Für die Auswertung wurden nur die Propidiumiodid negativen Zellen herangezogen. **A:** Anteil CD54-positiver Zellen **B:** Relative mittlere Fluoreszenzintensivität der CD54 positiven Zellen (n/s nicht signifikant, ** P<0,01, Berechnung nach Tukey)

Da die erhöhte Oberflächenexpression von ICAM-1 auf BACE1-defizienten Milzzellen auf eine verminderte Abspaltung von der Membran zurückzuführen sein könnte und ICAM-1 vor kurzem als Substrat für die α -Sekretase ADAM17 beschrieben wurde (Tsakadze *et al.*, 2006), stellte sich die Frage, ob ICAM-1 auch ein Substrat für BACE1 ist.

Es wurden zunächst HEK293T-Zellen mit ICAM-1 (freundlicher Weise von *Dr. Stanley E. D'Souza*, Department of Physiology, University of Louisville, School of Medicine Louisville, U.S.A) und BACE1 transient transfiziert und die Expression im Westernblot untersucht. Da der verwendete polyklonale anti-ICAM-1 Antikörper (R98, zur Verfügung gestellt von *Dr. Stanley E. D'Souza*, Louisville, USA (Tsakadze *et al.*, 2006)) gegen die zytoplasmatische Domäne gerichtet ist, konnten sowohl das unprozessierte Protein als auch die C-terminalen Spaltprodukte detektiert werden. In Abbildung 29, A ist zu erkennen, dass BACE1 und ICAM-1 von den Zellen exprimiert wurden. Neben den vermutlich unspezifischen Banden (Abb. 29, markiert mit *) sind bei ICAM-1 transfizierten Zellen zwei putative C-terminale Fragmente (CTF) zu erkennen, deren Intensität durch die Koexpression von BACE1 nicht beeinflusst wurde.

Die Abspaltung der Ektodomänen von vielen membranständigen Proteinen kann durch die Stimulation von Zellen mit dem Phorbolster PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) induziert werden. Dies geschieht vor allem über die Aktivierung von ADAM17. Um zu untersuchen, ob eine der detektierten CTF-Banden auf die Prozessierung von ICAM-1 durch ADAM17 zurückzuführen ist, wurden die transfizierten Zellen in einem zusätzlichen Ansatz für zwei Stunden mit PMA (200 ng/mL) stimuliert (Abb. 29, B). Im Lysat von Zellen, die nur mit ICAM-1 transfiziert und mit PMA stimuliert wurden, konnte nur noch das kleinere CTF detektiert werden. In Anwesenheit von BACE1 war das größere CTF schwach nachweisbar. Dies deutete darauf hin, dass das CTF mit dem höheren Molekulargewicht durch die Prozessierung von BACE1 entstanden ist, während das kleinere Spaltprodukt durch ADAM17 generiert wurde.

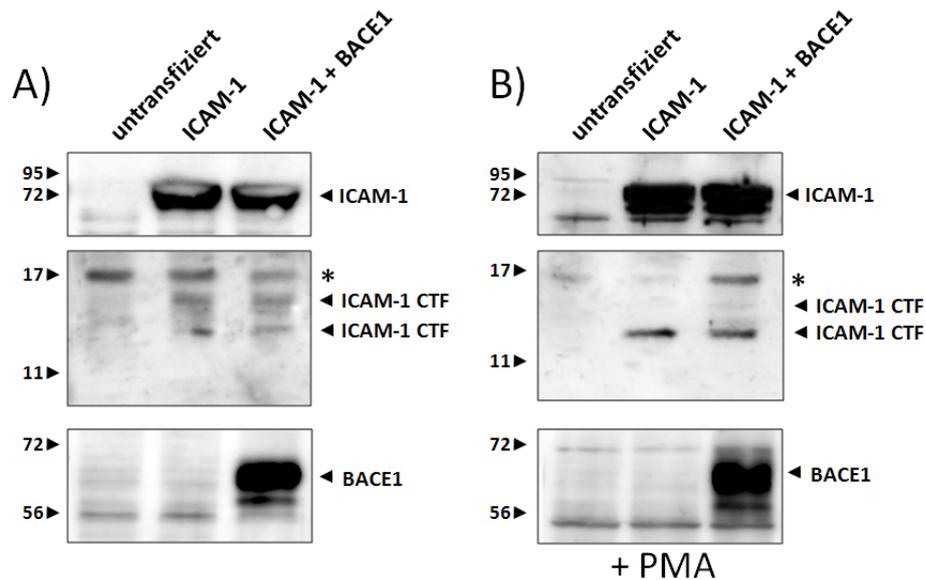


Abbildung 29: Überexpression von BACE1 und ICAM-1 in HEK 293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden transient mit ICAM-1 oder ICAM-1 und BACE1 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Lysate im Westernblot auf die Expression von ICAM-1 sowie auf ICAM-1 CTFs hin untersucht. Der Nachweis von ICAM-1 erfolgte mit einem Kaninchen anti-ICAM-1 Antikörper (R98, zur Verfügung gestellt von *Dr. Stanley E. D'Souza*, Louisville, USA, 1:50 000) und von BACE1 mit dem Kaninchen anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) und einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Sekundäntikörper (SantaCruz, 1:10 000). **A:** unbehandelte HEK293T-Zellen **B:** für zwei Stunden mit PMA (200 ng/mL) stimulierte HEK293T-Zellen. Unspezifische Banden sind mit * markiert.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurde der Versuch wiederholt und zusätzlich die inaktive BACE1 Mutante mit ICAM-1 kotransfiziert (Abb. 30). In Zellen, die nur mit ICAM-1 transfiziert wurden, konnten, auch nach Stimulation mit PMA, keine CTFs nachgewiesen werden. Obwohl BACE1 nur schwach exprimiert wurde, konnten in Anwesenheit der Protease beide CTFs detektiert werden. Die Stimulation der Zellen mit PMA führte zu einer vermehrten Produktion der kleineren CTFs, was wieder auf eine Beteiligung von ADAM17 hinweist. Die inaktive BACE1 Mutante hatte keinen Einfluss auf die Generierung der CTFs.

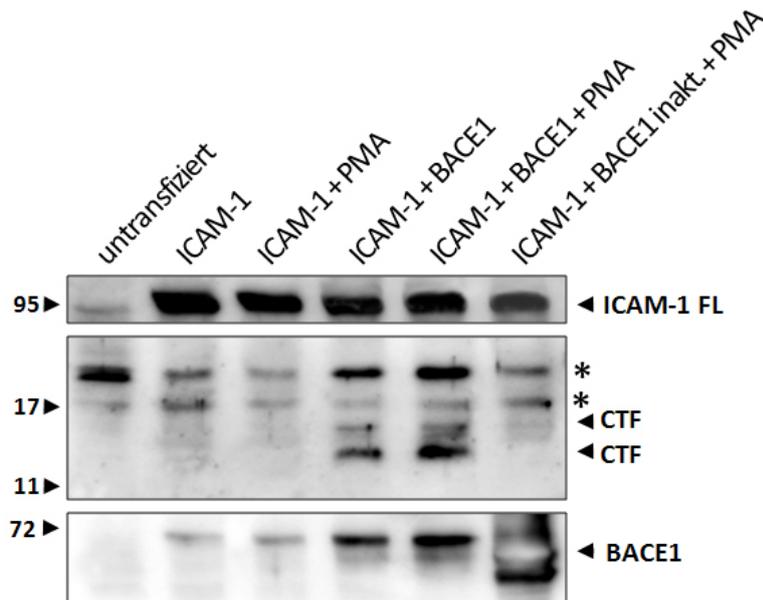


Abbildung 30: ICAM-1 Prozessierung in 293T-Zellen

Transient mit ICAM-1 oder ICAM-1 in Kombination mit der aktiven oder inaktiven BACE1 Form transfizierte HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet, lysiert und die Lysate im Westernblot auf die Expression von ICAM-1 sowie auf ICAM-1 CTFs hin untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen zwei Stunden vor der Ernte mit PMA (200 ng/mL) stimuliert. Der Nachweis von ICAM-1 erfolgte mit einem Kaninchen anti-ICAM-1 Antikörper (R98, zur Verfügung gestellt von *Dr. Stanley E. D'Souza*, Louisville, USA, 1:50 000) und von BACE1 mit dem Kaninchen anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) und einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Sekundärantikörper (SantaCruz, 1:10 000).

ICAM-1 wird auf Endothelzellen vieler Gewebe sowie auf Immunzellen exprimiert. Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Fehlen von BACE1 auf die Expression und Prozessierung des endogenen ICAM-1 Proteins hat, wurden verschiedene Gewebe im Westernblot mit einem gegen die Ektodomäne von ICAM-1 gerichteten Antikörper (R&D System, Wiesbaden-Nordenstadt) untersucht (Abb. 31). In den endothelreichen Organen Lunge und Niere sowie den lymphatischen Organen Thymus und Milz wird ICAM-1 sehr stark exprimiert, während in Herz und Pankreas nur wenig ICAM-1 detektiert wurde. Mit dem gegen den zytoplasmatischen Teil von ICAM-1 gerichteten Antikörper (anti-ICAM-1 (CT)) wurden mögliche Spaltprodukte nachgewiesen. In den Lysaten von Niere und Lunge konnten keine ICAM-1 CTFs detektiert werden. In Thymus und Milz, waren die schon bei Überexpression beobachteten CTFs nachweisbar. Während im Thymus der Unterschied der Bandenintensität der CTFs zwischen $BACE1^{+/+}$ und $BACE1^{-/-}$ nur marginal war, akkumulierten beide CTFs in Lysaten der BACE1-defizienten Milz stark. Im Pankreas konnte im Wildtyp-Gewebe das kleinere 15 kDa C-terminale Fragment, welches der Prozessierung durch ADAM17 zugeordnet wurde, detektiert werden. In BACE1-defizienten Pankreaslysat war dagegen

primär die bei einem höheren Molekulargewicht laufende Form des C-terminalen Fragments nachweisbar.

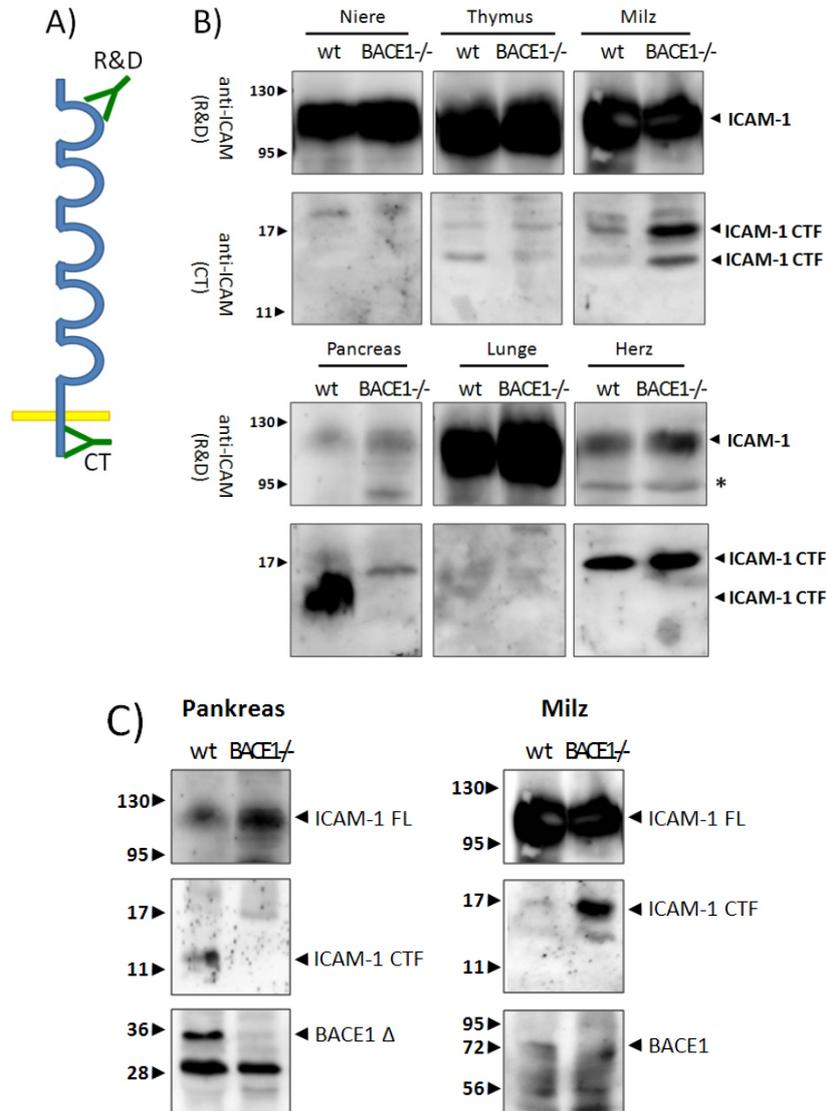


Abbildung 31: ICAM-1 Expression und Prozessierung in verschiedenen Geweben aus *BACE1*^{+/+} und *BACE1*^{-/-} Mäusen

A: Schema des ICAM-1 Proteins mit den Bindestellen für den Ektodomänen Antikörper von R&D (R&D) und dem gegen den C-Terminus von ICAM-1 gerichteten Antikörper (CT) (R98, zur Verfügung gestellt von *Dr. Stanley E. D'Souza*, Louisville, USA (Tsakadze *et al.*, 2006)). **B:** Untersuchung der Expression von ICAM-1 in Niere, Thymus, Milz, Pankreas, Lunge und Herz von zwei Monate alten *BACE1*^{+/+} und *BACE1*^{-/-} Mäusen im Westernblot. Für den Nachweis von unprozessiertem ICAM-1 (ICAM-1 FL) wurden die Proteine in einem 7,5%-igen SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot der Ziege anti-ICAM-1 Antikörper (R&D, 1:2000) eingesetzt. Für den Nachweis der C-Termini wurden die Proteine in einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot der Kaninchen anti-ICAM-1 (CT) (R98) Antikörper eingesetzt. Die Detektion erfolgte über die PODgekoppelten Sekundärantikörper Esel anti-Kaninchen-IgG (SantaCruz, 1:10 000) bzw. Kaninchen anti-Ziege-IgG (Dianova, 1:10 000). **C:** Wiederholung des Westernblots aus (B) mit anderen Proben für Pankreas und Milz. Zusätzlich wurde die Expression von BACE1 mit dem anti-BACE1 Antikörper EE17 (Sigma, 1:1000) im Westernblot untersucht. BACE1 Δ = Spleißvariante von BACE1

4.3. Einfluss von BACE1 auf die Maturierung und Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17

Das Spaltprodukt des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins β APP akkumuliert in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten. Bei der Prozessierung von β APP konkurrieren die α - und die β -Sekretase um das Substrat (Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Die Spaltung durch die α -Sekretase verhindert wahrscheinlich die Prozessierung von β APP durch BACE1 und umgekehrt. Dieser Mechanismus ist nicht auf β APP beschränkt. Für einige Substrate ist bereits beschrieben, dass sie sowohl von einer α - als auch von der β -Sekretase geschnitten werden und es wird vermutet, dass dies noch für einige andere Proteine der Fall sein könnte. Wenn die α - und die β -Schnittstellen sehr nah beieinander liegen erschwert dies wahrscheinlich eine eindeutige Zuordnung von Spaltprodukten zu einer der Sekretasen.

Die Untersuchungen, ob die Membranproteine TRANCE und ICAM Substrate von BACE1 sind, ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Wie bereits erwähnt, wird TRANCE von einer oder mehreren ADAM-Proteasen gespalten (Hikita *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2005) und für ICAM1 ist beschrieben, dass es von ADAM17 prozessiert wird (Tsakadze *et al.*, 2006). Da die beobachteten Effekte nicht eindeutig auf eine Prozessierung durch BACE1 zurückzuführen waren, sollte untersucht werden, ob die α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 durch BACE1 beeinflusst werden. Dazu wurden sowohl die Expression von ADAM10 und ADAM17 im Westernblot, als auch die Aktivität der Proteasen in einem Peptid-Spaltungs-Versuch in Abhängigkeit von BACE1 untersucht.

4.3.1. Untersuchung der Expression und Aktivität von ADAM10 und ADAM17 in Wildtyp- und BACE1^{-/-} Fibroblasten sowie in BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zellen

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) exprimieren sowohl ADAM10 als auch ADAM17. Beide Proteine liegen in den Zellen als unreife Pro-Form (p) und reife, proteolytisch aktive mature Form (m) vor. Die Pro-Form besitzt im Gegensatz zur maturen Form noch die Pro-Domäne und weist dadurch ein größeres Molekulargewicht als die mature Form auf.

Um die Expression von ADAM10 und ADAM17 in Wildtyp- und BACE1-defizienten MEFs zu untersuchen, wurden die Zellen lysiert und im Westernblot analysiert (Abb. 32). Als negativ Kontrolle für ADAM10 und ADAM17 wurden zusätzlich Lysate von ADAM10/ADAM17 doppeldefizienten MEFs (A10/17 dko) verwendet. Die Pro-Form von ADAM10 wurde bei ca.

90 kDa detektiert und die mature Form bei ca. 70 kDa. Für ADAM17 konnte die Pro-Form bei ca. 120 kDa und die mature Form bei ca. 100 kDa nachgewiesen werden. In BACE1-defizienten MEFs ist die Bande für die proteolytisch aktive, mature Form für ADAM10 und für ADAM17 weniger ausgeprägt als in Wildtyp-MEFs, wohingegen die Pro-Form von ADAM17 in beiden Zelllinien nahezu gleich stark exprimiert wurde.

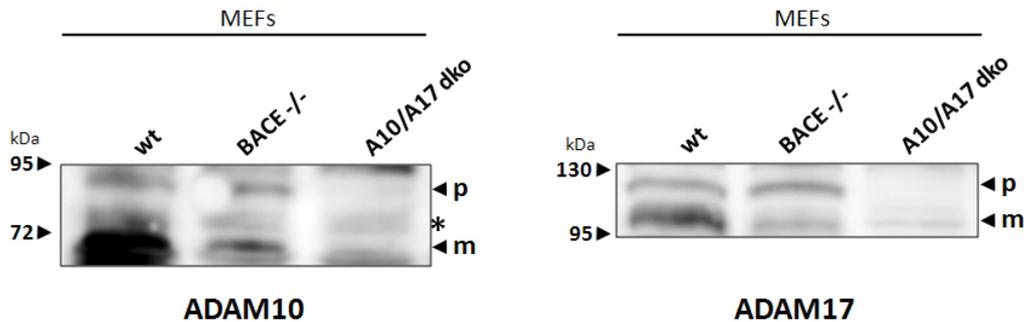


Abbildung 32: Proteinexpression von ADAM10 und ADAM17 in MEFs

Expression von ADAM10 und ADAM17 wurde in Wildtyp- und BACE1-defizienten embryonalen Fibroblasten mittels Westernblot untersucht. Als Negativkontrolle dienten ADAM10/ADAM17 doppeldefiziente MEFs. Die primären Antikörper gegen ADAM10 und ADAM17 (Chemicon) wurden 1:1000 eingesetzt und mit einem POD-gekoppelten Esel anti-Kaninchen-IgG Antikörper nachgewiesen. Beide Antikörper erkennen sowohl die Pro-Formen (p) als auch die maturen Formen (m) von ADAM10 und ADAM17; Unspezifische Banden sind mit * gekennzeichnet.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von BACE1 ebenfalls einen Effekt auf die Maturierung von ADAM10 und ADAM17 hat, wurden untransfizierte und humanes BACE1 (hBACE1) überexprimierende SHSY-5Y Zellen im Westernblot auf ADAM10 und ADAM17 Expression hin untersucht (Abb. 33). Pro-ADAM10 migrierte bei ca. 95 kDa und matures ADAM10 bei ca. 70 kDa. Die Pro-Form von ADAM10 wurde im Verhältnis zur maturen Form in beiden Zelllinien gleich stark exprimiert. Von ADAM17 konnte in den BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zellen deutlich mehr matures ADAM17 nachgewiesen werden als in den untransfizierten Zellen.

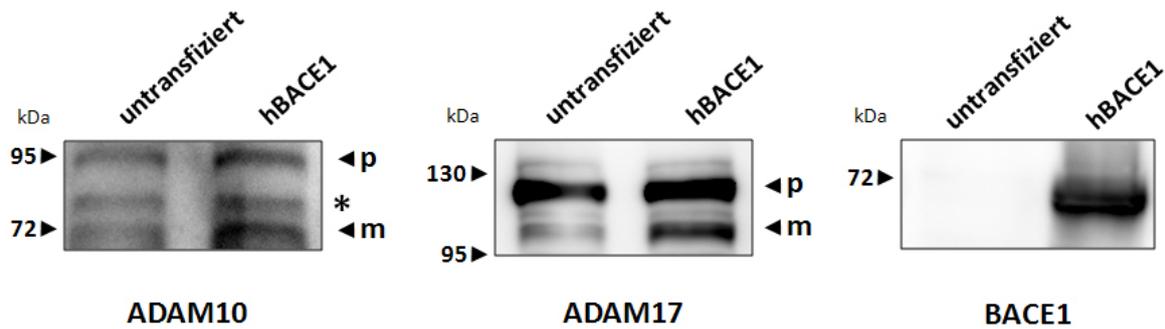


Abbildung 33: Expression von ADAM10 und ADAM17 in untransfizierten oder BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zellen

Lysate von untransfizierten und stabil mit humanem BACE1 transfizierten SHSY-5Y Zellen wurden im Westernblot auf die Expression von ADAM10 und ADAM17 hin untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem Primärantikörper, der entweder gegen ADAM10 oder gegen ADAM17 gerichtet war (Chemicon, 1:1000) und einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Zweitantikörper (1:10 000). Beide Antikörper erkennen sowohl die Pro-Formen (p) als auch die maturen Formen (m) von ADAM10 und ADAM17; Unspezifische Banden sind mit * gekennzeichnet. Die BACE1 Expression wurde mit dem Kaninchen anti-BACE1 (EE17) Antikörper (1:1000, Invitrogen) kontrolliert.

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von BACE1 auf die Maturierung von ADAM10 und ADAM17 sich auch auf die Aktivität der Proteasen auswirkt, wurde ein *in vitro* Aktivitätsversuch mit Zellextrakten von Wildtyp- und BACE1-defizienten MEFs sowie mit untransfizierten und BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zellen durchgeführt. Dazu wurde ein Peptid-Spaltungs-Versuch, der auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) basierte, verwendet. Das Peptid, welches die ADAM17 Spaltsequenz von TNF α (TACE Substrate II, Fluorogenic, Biomol, Hamburg) enthält, wird von ADAM17 ($K_{cat}/K_m = 9,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und ADAM10 ($K_{cat}/K_m = 1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und wahrscheinlich auch noch von anderen ADAMs und MMPs geschnitten. Da die Zunahme der relativen Fluoreszenz proportional zur Enzymaktivität ist, kann anhand der Steigung im linearen Bereich die relative Enzymaktivität bestimmt werden. Aufgrund der deutlich höheren Effizienz, mit der ADAM17 das Substrat im Vergleich zu ADAM10 umsetzt, bildet der Test vor allem die Aktivität von ADAM17 ab. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse aus zwei Experimenten dargestellt. In Lysaten von BACE1-defizienten MEFs wurde pro Zeiteinheit ca. 50% weniger Peptid umgesetzt als in Lysaten von Wildtyp-Zellen. In Lysaten von BACE1 überexprimierenden SHSY-5Y Zellen wurde ca. 40% mehr Peptid umgesetzt als in Lysaten von untransfizierten Zellen.

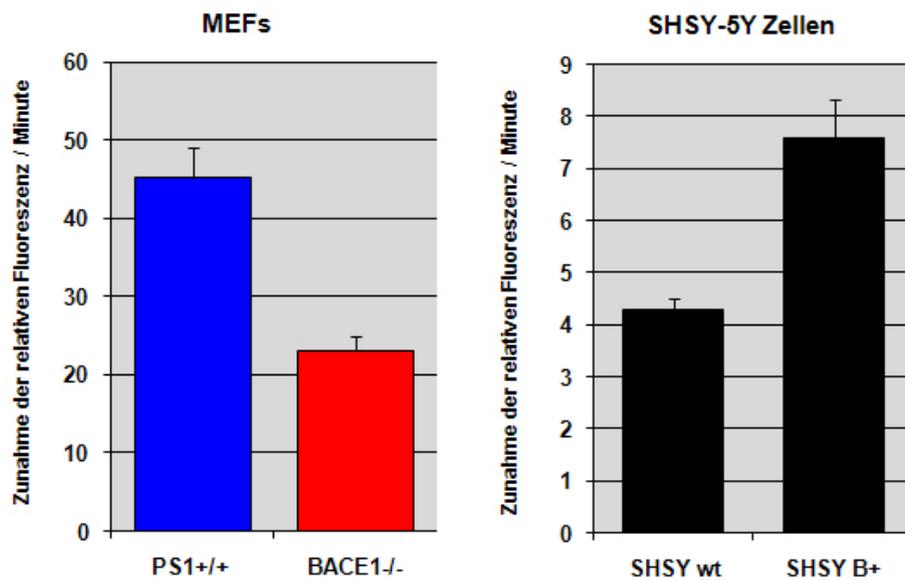


Abbildung 34: ADAM17 Aktivitätsversuch in BACE1-defizienten und BACE1 überexprimierenden Zelllinien

Lysate von Wildtyp- und BACE1-defizienten MEFs sowie von untransfizierten (SHSY wt) und stabil mit humanem BACE1 transfizierten (SHSY B+) SHSY-5Y Zellen wurden mit 5 μ M FAM-TAMRA-Peptid versetzt und der Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Als Maß für die Enzymaktivität wurde der Anstieg der relativen Fluoreszenz gegen die Zeit im linearen Bereich gemessen und auf 1 μ g eingesetztes Protein normiert. Proteinfreier Lysispuffer hatte keinen Einfluss auf die Fluoreszenz.

Um nachzuweisen, dass die Spaltung des Peptids auf die Aktivität von ADAM-Proteasen zurückzuführen ist, und das Peptid nicht von BACE1 prozessiert wird, wurde der Enzymaktivitätstest in Anwesenheit eines Breitband-Metalloprotease-Inhibitors sowie eines für BACE1 spezifischen Inhibitors mit Wildtyp- und BACE1-defizienten MEFs wiederholt.

Nach 150 Minuten wurde in Lysaten von BACE1-defizienten MEFs 21% weniger Substrat umgesetzt als in Wildtyp-Zelllysaten (Abb. 35). Der BACE1 spezifische Inhibitor C3 (β -Sekretase Inhibitor IV, Merk) hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Umsetzung des Substrates, wohingegen in Anwesenheit des Breitband-Metalloprotease-Inhibitors TAPI (Calbiochem) deutlich weniger Substrat gespalten wurde. Unter dem Einfluss von TAPI wurde in Wildtyp-MEFs nach 150 Minuten 67% weniger Peptid umgesetzt als in mit DMSO behandelten Zelllysaten und in BACE1-defizienten MEFs führte TAPI zu einer Reduktion von 63% gegenüber der DMSO Kontrolle.

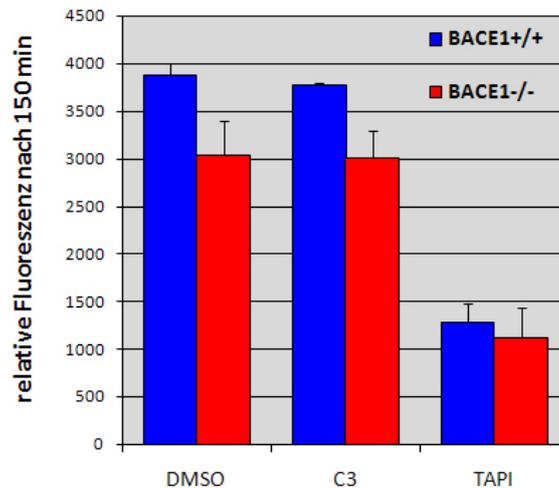


Abbildung 35: ADAM17 Aktivitätstest in MEFs in Anwesenheit von Inhibitoren

Lysate von Wildtyp- und BACE1-defizienten MEFs wurden mit DMSO (1:10000), dem BACE1 Inhibitor C3 (Merk, 10 μ M) sowie dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor TAPI (Calbiochem; 20 μ M) für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor das FAM-TAMRA Peptid (5 μ M) zugegeben und die Fluoreszenz über die Zeit gemessen wurde. Die relative Fluoreszenz nach 150 Minuten wurde auf 1 μ g eingesetztes Protein normiert.

4.3.2. Untersuchung der Expression und Aktivität von ADAM10 und ADAM17 in Leber und Gehirn von Wildtyp- und BACE1^{-/-} Mäusen

Nachdem erste Daten darauf hinwiesen, dass in BACE1-defizienten MEFs weniger matures ADAM10 und ADAM17 vorliegt als in Wildtyp-MEFs und in Lysaten von BACE1-defizienten MEFs weniger ADAM17 Aktivität in Wildtyp-Lysaten gemessen wurde, sollte untersucht werden, ob sich diese Beobachtung in Geweben BACE1-defizienter Mäuse bestätigen lässt.

Zunächst wurde in den Gewebelysaten von Leber und Gehirn von etwa drei Monate alten Wildtyp- und BACE1-defizienten Mäusen die Expression von Pro- und maturem ADAM10 und ADAM17 mittels Westernblot untersucht (Abb. 36). In Wildtyp-Gehirnen konnten die Pro- und die mature Form von ADAM10 detektiert werden, wobei die Bande bei etwa 60 kDa für die mature Form im Verhältnis zur Pro-Form von ca. 70 kDa nur sehr schwach nachweisbar war. Im BACE1-defizienten Gehirn war deutlich mehr Pro-ADAM10 nachweisbar als im Wildtyp, während die mature Form von ADAM10 dagegen kaum nachweisbar war. Im Gegensatz zu ADAM10 wurde in Gehirnllysaten vorwiegend die etwa 100 kDa große mature Form von ADAM17 und kaum Pro-ADAM17 (ca. 130 kDa) nachgewiesen. Wie bereits in MEFs beobachtet, war die mature Form in BACE1-defizienten Gehirnllysaten geringer exprimiert als

in den Wildtyp-Proben. Im Leberlysat von Wildtyp-Tieren war die Bande, die die Pro-Form von ADAM10 repräsentiert, deutlich schwächer ausgeprägt als die Bande für matures ADAM10. Im Leberlysat von BACE1^{-/-} Mäusen war das Verhältnis von Pro- zu maturer Form genau entgegengesetzt. Hier konnte mehr Pro- als matures ADAM10 nachgewiesen werden. Die mature Form von ADAM17 lag im Wildtyp- und BACE1-defizienten Leberlysat in etwa gleicher Menge vor, während in der BACE1^{-/-} Probe die Pro-Form von ADAM17 gegenüber der Wildtyp-Probe deutlich akkumulierte.

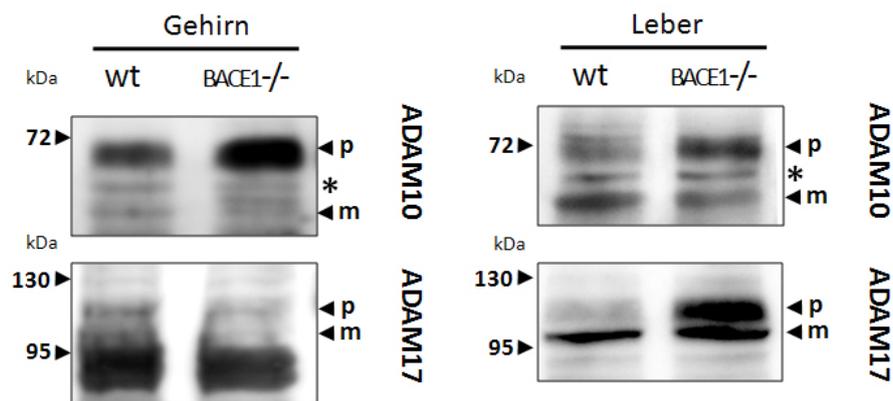


Abbildung 36: Expression von ADAM10 und ADAM17 in Gehirnen und Lebern von Wildtyp- und BACE1-defizienten Mäusen

Gewebelysate von Gehirn und Leber aus Wildtyp- und BACE1-defizienten Mäusen wurden im Westernblot auf die Expression von ADAM10 und ADAM17 hin untersucht. Der Nachweis von ADAM10 und ADAM17 erfolgte mit Primäantikörpern gegen ADAM10 bzw. ADAM17 (Chemicon, 1:1000) und einem Esel anti-Kaninchen-IgG POD-gekoppelten Zweitantikörper (1:10 000). Beide Antikörper erkennen sowohl die Pro-Formen (p) als auch die maturen Formen (m) von ADAM10 und ADAM17; Unspezifische Banden sind mit * gekennzeichnet.

Zur Überprüfung der Aktivität von ADAM17 *in situ*, wurden die Lysate von Leber und Gehirn wie schon für die MEFs beschrieben in einem Peptid-Spaltungs-Versuch eingesetzt. In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass in Gehirnllysaten von BACE1-defizienten Mäusen die Aktivität von ADAM17 etwa 14% und in Leberlysaten etwa 24% niedriger ist als in Wildtyp-Kontrollgeweben.

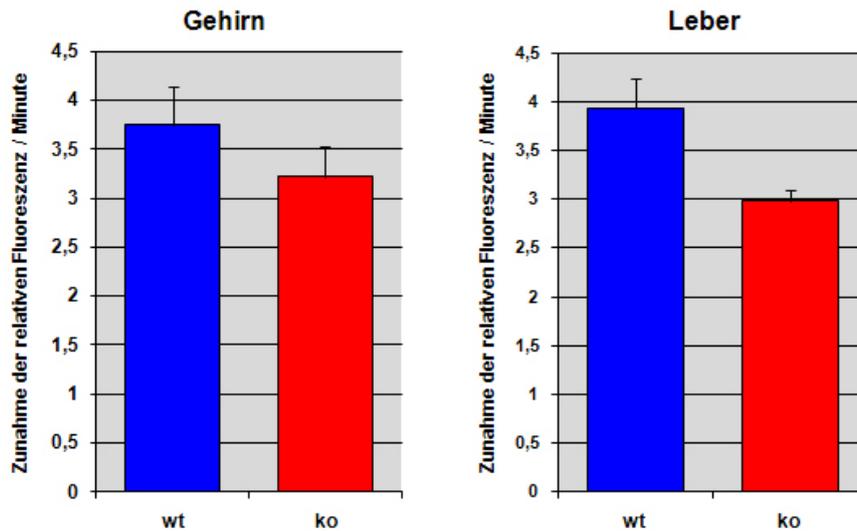


Abbildung 37: ADAM17 Aktivitätstest in Leber und Gehirn von BACE1+/+ und BACE1-/- Mäusen

Gewebelysate von Gehirn und Leber von Wildtyp- (wt) und BACE1-/- (ko) Mäusen wurden mit FAM-TAMRA-Peptid in einer Endkonzentration von 5 μM versetzt und der Anstieg der Fluoreszenz für zwei Stunden gemessen. Als Maß für die Enzymaktivität wurde der Anstieg der relativen Fluoreszenz gegen die Zeit im linearen Bereich bestimmt und auf 1 μg eingesetztes Protein normiert. Proteinfreier Lysispuffer führte über die gemessene Zeit zu keinem Anstieg der Fluoreszenz.

Da es sich bei den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses von BACE1 auf die Expression und Reifung von ADAM10 und ADAM17 nur um erste Vorversuche handelt, konnte aufgrund der niedrigen Anzahl an Experimenten noch keine eindeutige Aussage über die Signifikanz dieser Daten gemacht werden.

4.4. Prozessierung der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen durch BACE1 und der Einfluss von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α

Spannungsabhängige Natriumkanäle (im folgenden nur als Natriumkanäle bezeichnet) sind in elektrisch erregbaren Zellen (Neurone, Herz- und Skelettmuskelzellen) für den schnellen Anstieg des Aktionspotentials verantwortlich (Bean, 2007). Sie setzen sich aus einer ca. 260 kDa großen α -Untereinheit und ein bis zwei β -Untereinheiten zusammen (Catterall, 2000). Die α -Untereinheit besitzt vier relativ homologe Domänen, die jeweils sechsmal die Membran durchspannen (S_1 - S_6), wobei die Transmembrandomänen S_1 - S_4 den Spannungssensor bilden und S_5 - S_6 für die Selektivität der Pore für Na^+ Ionen verantwortlich sind (Catterall, 2000).

Die β -Untereinheiten modulieren das Schaltverhalten des Kanals, beeinflussen dessen Konzentration in der Plasmamembran und steuern dazu bei, dass die Natriumkanäle in bestimmte Regionen der Plasmamembran, wie die Ranvierschen Schnürringe, gelangen (Catterall, 2000; Chen *et al.*, 2002; Hanlon and Wallace, 2002; Isom, 2001; Isom *et al.*, 1995a; Yu *et al.*, 2003). Vor Kurzem wurden die β -Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals als BACE1 Substrate identifiziert (Wong *et al.*, 2005) (siehe 1.3.4.2).

Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass sowohl das Fehlen als auch die Überexpression von BACE1 zu signifikanten Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften und der Zelloberflächenexpression der Natriumkanäle führt. Dies weist auf eine wichtige Bedeutung der BACE1 abhängigen Prozessierung der β -Untereinheiten für die Funktion der Natriumkanäle hin (Dominguez *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde der Effekt von BACE1 auf das Schaltverhalten von Natriumkanälen näher untersucht. Dazu wurden in HEK293 Zellen die rNav1.2 α -Untereinheit, die β -Untereinheiten β 2 und β 4 und BACE1 in verschiedenen Kombinationen transient überexprimierten und elektrophysiologisch in der „whole-cell“ (Ganz-Zell) Konfiguration untersucht. Die Experimente erfolgten in Kooperation mit dem Physiologischen Institut der Universität Kiel, Arbeitsgruppe Prof. Christian Alzheimer. Die elektrophysiologischen Messungen an den von mir hergestellten cDNA-Konstrukten wurden von Dr. Tobias Huth und Karoline Neuenfeld durchgeführt.

4.4.1. Die β 2 und β 4 Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.2a sind BACE1 Substrate

Um die Auswirkungen von BACE1 auf die Eigenschaften des Natriumkanals rNav1.2a näher zu analysieren wurde zunächst die Prozessierung der β 2 und β 4 Untereinheiten durch BACE1 in HEK293 Zellen untersucht. HEK293 Zellen wurden gewählt, da sie sich gut transient transfizieren lassen und ein etabliertes System für elektrophysiologische Messungen darstellen.

Die Kofransfektion der C-terminal mit einem V5-Tag versehenen β 2 Untereinheit (β 2-V5) und BACE1 in HEK293 Zellen führte zum Auftreten eines ca. 18 kDa großen C-terminalen Spaltprodukts (CTF), welches mit einem gegen den V5-Tag gerichteten Antikörper im Westernblot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 38).

Die Kotransfektion von $\beta 2$ -V5 mit einer, durch den Austausch eines Aspartylrestes im aktiven Zentrum (D 289 -> N), proteolytisch inaktiven BACE1 Mutante (BACE1 inaktiv) führte nicht zu einer gesteigerten Generierung von $\beta 2$ -CTFs im Vergleich zu Zellen, die nur mit $\beta 2$ -V5 transfiziert wurden. Durch den BACE1 Inhibitor C3 (10 μ M, Merck, Darmstadt) konnte gezeigt werden, dass die Entstehung des ca. 18 kDa großen CTFs spezifisch auf die Aktivität von BACE1 zurückzuführen ist. In $\beta 2$ -V5 und BACE1 überexprimierenden HEK293 Zellen die für 24 Stunden mit C3 inkubiert wurden, entsprach der prozentuale Anteil an C-terminalen Fragmenten dem von Zellen, die nur $\beta 2$ -V5 exprimierten (Abb. 38)

Vergleichbare Ergebnisse wurden für die $\beta 4$ -Untereinheit erzielt. Die vermehrte Bildung des $\beta 4$ -CTFs durch BACE1 wurde durch C3 verhindert und die inaktive BACE1 Mutante bewirkte ebenfalls keine Zunahme an C-terminalen Fragmenten von $\beta 4$ -V5 (Abb. 38).

Im $\beta 2$ -V5 Westernblot war bei ca. 20 kDa eine zusätzliche Bande sichtbar, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte. Die Behandlung der Zellen mit BACE1, Metalloprotease- und γ -Skerektase Inhibitoren zeigte keine Auswirkungen auf die Intensität dieser Bande (Daten nicht gezeigt).

Durch densitometrische Auswertung der Bandenintensität für die unprozessierte $\beta 2$ und $\beta 4$ -Untereinheit sowie deren Spaltprodukte, konnte berechnet werden, wie hoch der Anteil an durch BACE1 prozessierten Untereinheiten an den gesamten zellulären V5-getaggten Untereinheiten (βX -V5-CTF / (βX -V5 + βX -V5-CTF)) war. In Abbildung 38 C und D sind die Ergebnisse aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Kotransfektion von $\beta 2$ -V5 oder $\beta 4$ -V5 mit der aktiven BACE1 führte zu einem signifikanten Anstieg an C-terminalem Spaltprodukt ($\beta 2$: 3,12% \pm 1,07, $\beta 2$ + BACE1: 9,44% \pm 2,81, $\beta 4$: 16,86% \pm 8,93, $\beta 4$ + BACE1: 32,58% \pm 6,68). Die Prozessierungsrate von $\beta 2$ und $\beta 4$ zeigte für durch C3 inhibiertes BACE1 und inaktives BACE1 keinen signifikanten Unterschied zu Zellen die nur mit $\beta 2$ oder $\beta 4$ transfiziert wurden ($\beta 2$ + BACE1 inakt.: 3,04% \pm 1,10, $\beta 2$ + BACE1 + C3: 3,19% \pm 1,42, $\beta 4$ + BACE1 inakt.: 14,94% \pm 5,97, $\beta 4$ + BACE1 + C3: 16,70% \pm 6,28).

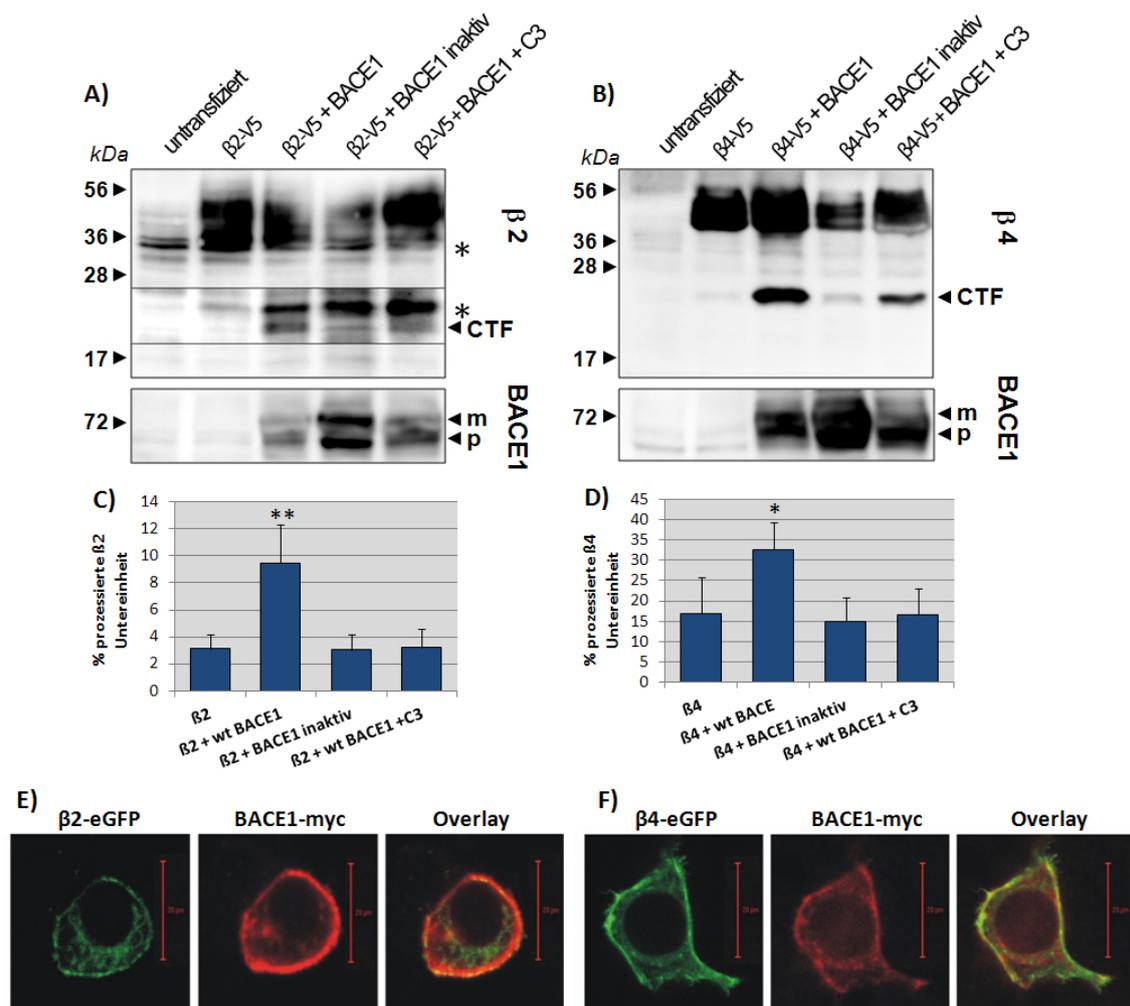


Abbildung 38: Enzymatische Prozessierung der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten durch BACE1

A, B: Hek293T Zellen wurden transient mit der mit einem V5-Tag fusionierten $\beta 2$ (A) oder $\beta 4$ (B) Untereinheit und mit einem Leervektor oder mit Wildtyp-BACE1 oder mit der inaktiven Mutante von BACE1 kotransfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und die Zellextrakte im Westernblot analysiert. Die Bildung von CTFs wurde mit einem anti-V5-Antikörper (Invitrogen, 1:5000), der gegen den C-terminalen V5-Tag der β -Untereinheiten gerichtet war, analysiert. Die Überexpression von BACE1 führte zu einer vermehrten Generierung der CTFs der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten, wogegen die Überexpression der inaktiven BACE1 Mutante keinen Effekt zeigte. Die Entstehung der CTFs in BACE1 überexprimierenden Zellen konnte durch 24 stündige Inkubation mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 (10 μ M, Merck) verhindert werden. Zur Kontrolle der BACE1 Expression wurden gleiche Proteinmengen auf ein separates 10%-iges Gel geladen und BACE1 im Westernblot mit einem anti-BACE1 Antikörper (EE17, Sigma, 1:1000) nachgewiesen. Unspezifische Banden sind mit * markiert. **C, D:** Statistische Auswertung des Anteils an prozessiertem $\beta 2/\beta 4$ an der gesamt Menge von $\beta 2/\beta 4$ aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit dem Program MultiGauge V3.0 (Fuji Film, Japan) (Signifikanzberechnung nach Tukey, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$). **E, F:** Konfokale mikroskopische Aufnahme von HEK293 Zellen, die mit Myc-getaggetem BACE1 (BACE1-myc) und mit den $\beta 2$ - oder $\beta 4$ -Untereinheiten, welche als GFP-Fusionsproteine exprimiert wurden, kotransfiziert. BACE1-myc wurde mit einem Kaninchen-anti-Myc Antikörper (Cell Signalling Technology, Danvers, USA) und einem Alexa 633 Ziege-anti Kaninchen-IgG Antikörper (1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) nachgewiesen. Im Overlay zeigt die gelbe Farbe die Kolokalisation von $\beta 2/\beta 4$ mit BACE1 an.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293 Zellen, die mit den GFP fusionierten β 2- oder β 4-Untereinheiten transfiziert wurden, zeigen die erfolgreiche Expression der Proteine, sowie den korrekten Transport der Untereinheiten an die Plasmamembran (Abb. 38, E, F, links). Die Kotransfektion mit der Myc-getaggten BACE1-Protein zeigte, dass die Protease vorwiegend in oder unterhalb der Plasmamembran lokalisiert war (Abb. 38, E, F, Mitte). Im *Overlay* der Aufnahmen ist anhand der Gelbfärbung die Kolo-kalisation der β -Untereinheiten und BACE1 zu erkennen (Abb. 38, E, F, rechts).

4.4.2. Einfluss der β 2 und β 4 Untereinheiten auf die Aktivierung von Nav1.2 α

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen BACE1 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Natriumkanäle hat, wurden zunächst die Natriumströme von HEK293-Zellen gemessen, die nur den Natriumkanal Nav1.2 α transient exprimierten.

Dazu wurden die Ströme der transfizierten HEK293-Zellen mit der „Ganzzell *Patch Clamp*“ Methode gemessen. Das Membranpotential der Zellen wurde zunächst konstant bei -70 mV gehalten, sprunghaft auf -40 mV erhöht und der Natriumstrom gemessen. Danach wurde das Membranpotential wieder auf -70 mV gebracht und der Vorgang wiederholt, wobei bei jedem Schritt das Potential um 10 mV erhöht wurde, bis zu einem Wert von +30 mV. In Abbildung 39, A ist eine exemplarische Messung abgebildet. Um die Aktivierung der Kanäle in Abhängigkeit der Spannung zu berechnen, wurde zunächst die Natriumleitfähigkeit zu jedem induzierten Membranpotential berechnet. Dies erfolgte nach der Formel $G = I / (V - E_{rev})$, wobei I die Amplitude des Natriumstroms bei vorgegebenem Membranpotential V und E_{rev} das Gleichgewichtspotential für Natriumionen unter den experimentellen Bedingungen (+83 mV) ist. G wurde dann auf die maximale Natriumleitfähigkeit normalisiert und die relative Natriumleitfähigkeit gegen das Membranpotential aufgetragen. Die Datenpunkte wurden mit einer sigmoiden (Boltzmann) Relation der Form $G/G_{max} = 1 / [1 + \exp((V_{mid} - V) / k)]$ angepasst, wobei V_{mid} den Mittelpunkt der Aktivierungskurve und k die Steigung darstellten (Abb. 39, B). Für HEK293-Zellen, die nur Nav1.2 α überexprimierten lag V_{mid} bei $-10,7 \text{ mV} \pm 0,8 \text{ mV}$.

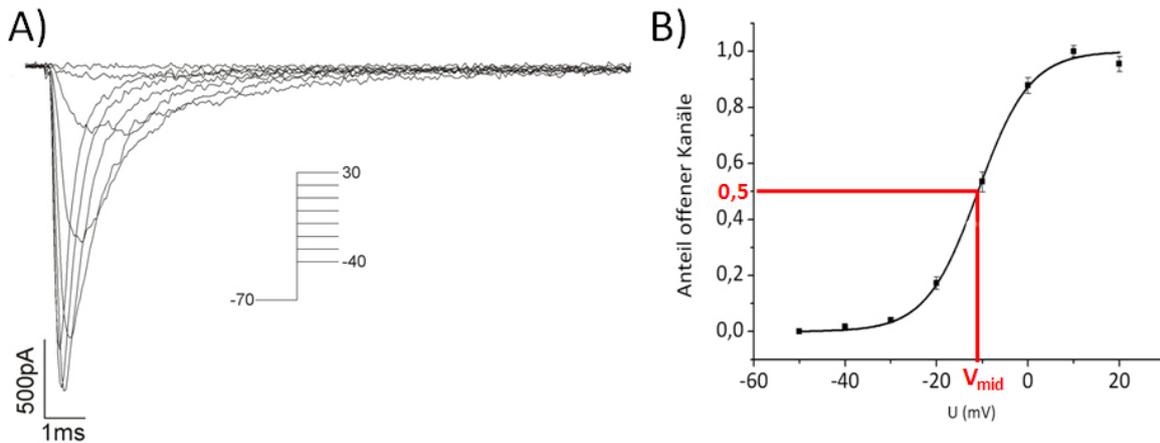


Abbildung 39: Aktivierung des Natriumkanals Nav1.2 α in HEK293-Zellen

A: Die Depolarisierung der Membran der transient mit Nav1.2 α transfizierten HEK293 Zellen führt bei schrittweiser Erhöhung des Membranpotentials zu steigenden Natriumströmen. Zusätzlich ist das Aktivierungsprotokoll abgebildet. Das Membranpotential wird bei -70 mV gehalten, sprunghaft erhöht und der resultierende Natriumstrom gemessen. **B:** Anhand der Amplituden lässt sich eine Aktivierungskurve berechnen. Diese zeigt an, wie groß der Anteil der aktivierbaren Kanäle bei einem bestimmten induzierten Membranpotential ist, wobei 0 bedeutet, dass kein Natriumkanal geöffnet ist und 1 für 100% offene Kanäle steht. Das Membranpotential, bei dem genau 50% der Kanäle geöffnet sind, wird auch als V_{mid} bezeichnet, und ist neben der Steigung ein wichtiger Parameter der die Aktivierbarkeit der Kanäle unter gegebenen Bedingungen repräsentiert.

Die Koexpression von Nav1.2 α mit der β 2-Untereinheit führte zu einer deutlichen Linksverschiebung von V_{mid} ($-21,5 \text{ mV} \pm 1,4 \text{ mV}$) gegenüber Zellen, die nur den Natriumkanal überexprimierten ($V_{mid} = -10,7 \text{ mV} \pm 0,8 \text{ mV}$ (Abb. 40, A, B, grün). Die Kotransfektion des Kanals mit den β 4-Untereinheiten führte zu einer geringer ausgeprägten Linksverschiebung der Aktivierungskurve (orange) im Vergleich zu β 2 Kotransfektion. Der Wert für V_{mid} lag in Gegenwart von β 4 bei $-17,1 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$. Die Koexpression beider β -Untereinheiten führte zu keiner weiteren Linksverschiebung der Aktivierungskurve ($V_{mid} = -22,2 \text{ mV} \pm 0,9 \text{ mV}$, blau) verglichen mit β 2 und Nav1.2 α ohne β 4.

Neben der Aktivierung des Natriumkanals wurde auch die Inaktivierung untersucht. Da bei diesen Messungen keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden, werden diese Daten hier nicht vorgestellt.

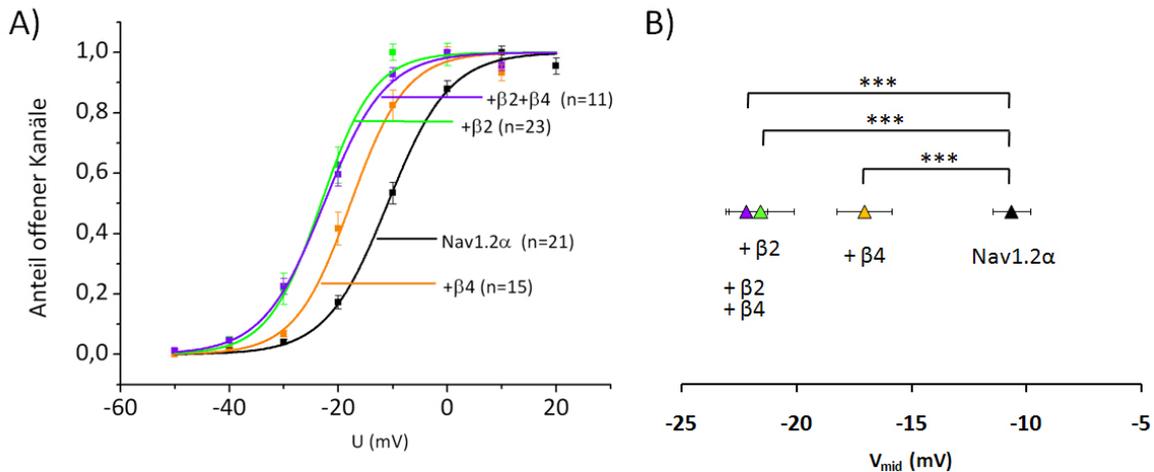


Abbildung 40: Einfluss der β -Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 4$ auf die Aktivierung des Natriumkanals Nav1.2 α in HEK293-Zellen

A: Mittels Spannungsklemme ermittelte Aktivierungskurven in transient Nav1.2 α in Kombination mit $\beta 2$ (grün), $\beta 4$ (orange) oder beiden β -Untereinheiten ($\beta 2 + \beta 4$, blau) exprimierenden HEK293-Zellen. Die elektrophysiologischen Messungen wurden zwei Tage nach der Transfektion der Zellen durchgeführt. **B:** Membranpotential, bei dem die Hälfte aller aktivierbaren Kanäle geöffnet sind (V_{mid}) (***) ($P < 0,001$).

4.4.3. Einfluss der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten auf die Aktivierung von Nav1.2a in Gegenwart von BACE1

Die Koexpression von Nav1.2 α mit der $\beta 2$ -Untereinheit bewirkte, wie bereits beschrieben eine deutliche Linksverschiebung der Aktivierungskurve des Natriumkanals im Vergleich zu Zellen, die nur Nav1.2 α exprimierten. Wurden die Zellen zusätzlich zu Nav1.2 α und der $\beta 2$ -Untereinheit mit BACE1 transfiziert, fiel die durch $\beta 2$ verursachte Linksverschiebung deutlich schwächer aus. Die Kotransfektion von BACE1 führte zu einer signifikanten Reduktion von V_{mid} um 6,3 mV ($V_{mid, Nav1.2\alpha + \beta 2} = -21,5 \text{ mV} \pm 1,4 \text{ mV}$; $V_{mid, Nav1.2\alpha + \beta 2 + BACE1} = -15,2 \text{ mV} \pm 0,7 \text{ mV}$) (Abbildung 41, A + B). Um zu zeigen, dass dieser Effekt auf die proteolytische Aktivität von BACE1 zurückzuführen war, wurde dieses Experiment in Zellen wiederholt, die vor der Messung für mindestens 24 Stunden mit dem BACE1 Inhibitor C3 (10 μM , Merck) behandelt wurden (Abb. 41, rote Kurve). Die Inhibition von BACE1 bewirkte die Verschiebung der halbmaximalen Aktivierbarkeit der Natriumkanäle auf $-19,6 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$, was nahezu dem Wert von Zellen entsprach, die nur Nav1.2 α und $\beta 2$ exprimierten.

Da auch die $\beta 4$ -Untereinheit ein BACE1 Substrat ist, wurden die Experimente mit $\beta 4$ anstelle von $\beta 2$ wiederholt. Die Koexpression von $\beta 4$ mit Nav1.2 α bewirkte wie beschrieben eine Verschiebung von V_{mid} um -6,4 mV (Abb. 41, C, D, orange Kurve). Die zusätzliche Expression von BACE1 in HEK293-Zellen die Nav1.2 α und $\beta 4$ exprimierten, führte nicht wie für die $\beta 2$ -

Untereinheit beobachtet zu einer Reduktion des $\beta 4$ Effekts auf die Aktivierbarkeit der Natriumkanäle, sondern führte zu einer zusätzlichen Linksverschiebung der Aktivierungskurve (Abb. 41, blaue Kurve). Während in Zellen, die nur Nav1.2 α und $\beta 4$ exprimierten ein V_{mid} von $-17,1 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$ ermittelt werden konnte, lag dieser Wert in Zellen die zusätzlich BACE1 exprimierten bei $-29,4 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$. Die Vorinkubation der Zellen mit dem BACE1 Inhibitor C3, welcher die proteolytische Prozessierung von $\beta 4$ inhibierte (Abbildung 41) konnte diesen unerwarteten Effekt von BACE1 nur teilweise aufheben ($V_{mid} = -23,1 \text{ mV} \pm 0,6 \text{ mV}$).

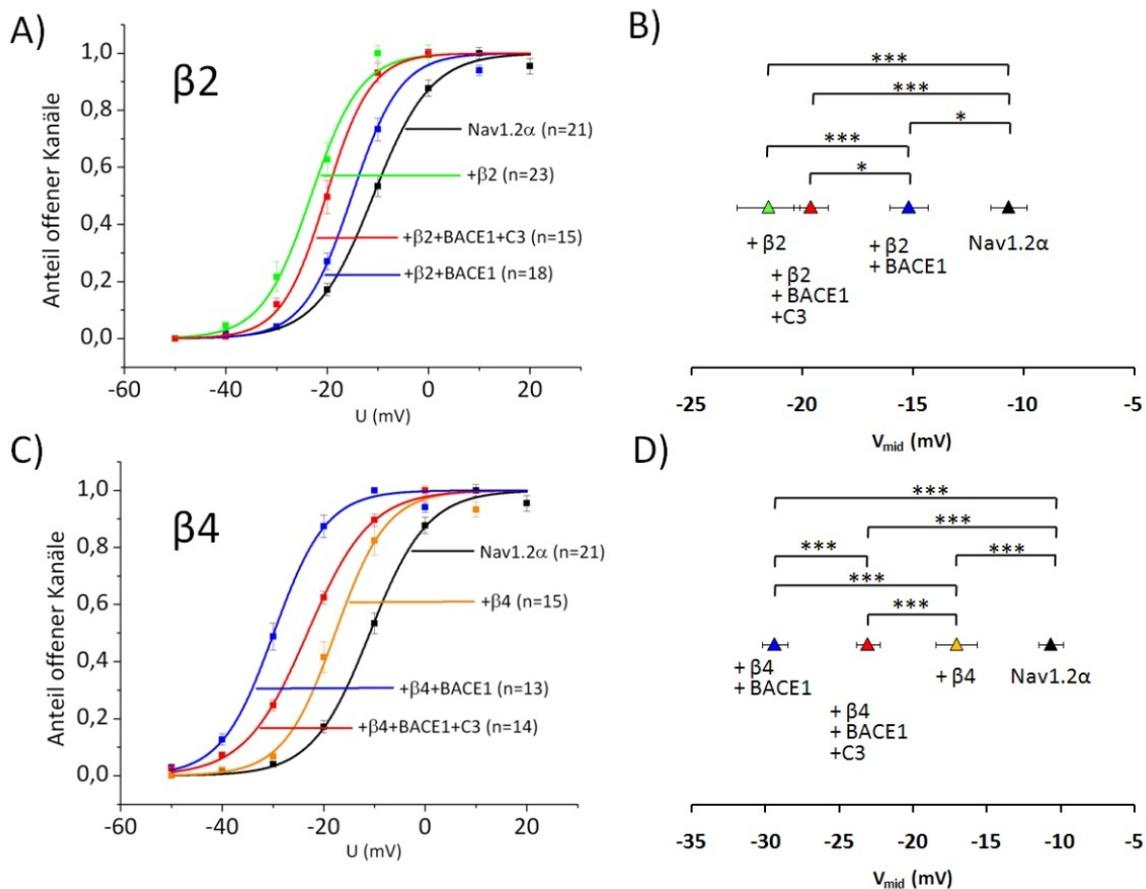


Abbildung 41: Einfluss von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α in HEK293-Zellen, die den Natriumkanal und die $\beta 2$ - oder $\beta 4$ -Untereinheiten koexprimieren

A: Normalisierte Aktivierungskurven des Natriumstroms von HEK293-Zellen, die nur den Natriumkanal (schwarze Kurve) oder Nav1.2 α in Kombination mit $\beta 2$ (grüne Kurve) oder in Kombination mit $\beta 2$ und BACE1 in Abwesenheit (blaue Kurve) oder in Gegenwart des BACE1 Inhibitors C3 (rote Kurve) exprimieren. **B:** Vergleich der halbmaximalen Aktivierungen (V_{mid}) der Natriumkanäle, berechnet nach den identisch gefärbten Aktivierungskurven (A) (* P<0,05, *** P<0,001). **C:** Normalisierte Aktivierungskurven des Natriumstroms von HEK293-Zellen, die nur den Natriumkanal (schwarze Kurve) oder Nav1.2 α in Kombination mit $\beta 4$ (orange Kurve) oder in Kombination mit $\beta 4$ und BACE1 in Abwesenheit (blaue Kurve) oder in Gegenwart des BACE1 Inhibitors C3 (rote Kurve) exprimieren. **D:** Vergleich der halbmaximalen Aktivierungen (V_{mid}) der Natriumkanäle, berechnet nach den identisch gefärbten Aktivierungskurven (C) (***) P<0,001).

4.4.4. Einfluss der Spaltprodukte der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten auf die Aktivierung von Nav1.2a

Die Beobachtung, dass BACE1 den Effekt von $\beta 2$ auf die Aktivierung von Nav1.2a zwar deutlich, aber nicht vollständig aufheben konnte, führte zu der Überlegung, ob die $\beta 2$ -Spaltprodukte, die durch die Proteolyse entstehen, ihrerseits Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften haben. Auch der unerwartete Effekt von BACE1 auf die Aktivierung der Natriumkanäle in HEK293-Zellen die Nav1.2a und die $\beta 4$ -Untereinheit exprimierten, könnte auf die Spaltprodukte von $\beta 4$, die durch die Proteolyse durch BACE1 entstehen, zurückzuführen sein.

Um den Einfluss der C- und N-terminalen Fragmente von $\beta 2$ und $\beta 4$ auf die Aktivierung von Nav1.2a gezielt untersuchen zu können, wurden die von Wong *et al.* (Wong *et al.*, 2005) beschriebenen Spaltprodukte in Expressionsvektoren inkloniert. Wong *et al.* konnte durch *in vitro* Spaltungs-Versuche die Schnittstellen von BACE1 identifizieren. Dafür wurden synthetische Peptide, mit den membranproximalen Sequenzen von $\beta 2$ und $\beta 4$ mit rekombinatem BACE1 inkubiert und mittels MALDI die Sequenzen der Spaltprodukte bestimmt. Die $\beta 2$ -Untereinheit wird demnach zwischen Aminosäure 144 und 145 und die $\beta 4$ -Untereinheit zwischen Aminosäure 149 und 150 durch BACE1 gespalten (Wong *et al.*, 2005).

Die N-terminalen Fragmente ($\beta 2$ -NTF und $\beta 4$ -NTF) wurden mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) erzeugt. Die verwendeten Oligonukleotide hybridisierten zum einem am 5'-Ende der DNA-Sequenz für $\beta 2$ oder $\beta 4$ und zum anderen an der revers-komplementären Sequenz, die am 3'-Ende der Sequenz hybridisierte, welche für das C-terminale Ende des löslichen Spaltproduktes kodiert. Durch Primerüberhänge wurden Restriktionsendonuklease-Schnittstellen angefügt, wodurch das erzeugte Konstrukt in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden konnte. Für die C-terminalen Fragmente wurde die Sequenz des Signalpeptids und die für die CTFs kodierende Sequenz mittels PCR amplifiziert und anschließend in einer Fusions-PCR (3.2.1.13.2) zusammengefügt. Dies war wichtig, da das Signalpeptid für die korrekte Insertion des CTFs in die Membran verantwortlich ist. Um die subzelluläre Lokalisation der Fragmente nachzuweisen, wurden zusätzlich Konstrukte erzeugt, die die Proteine mit einem eGFP-Tag versehen (Abbildung 42).

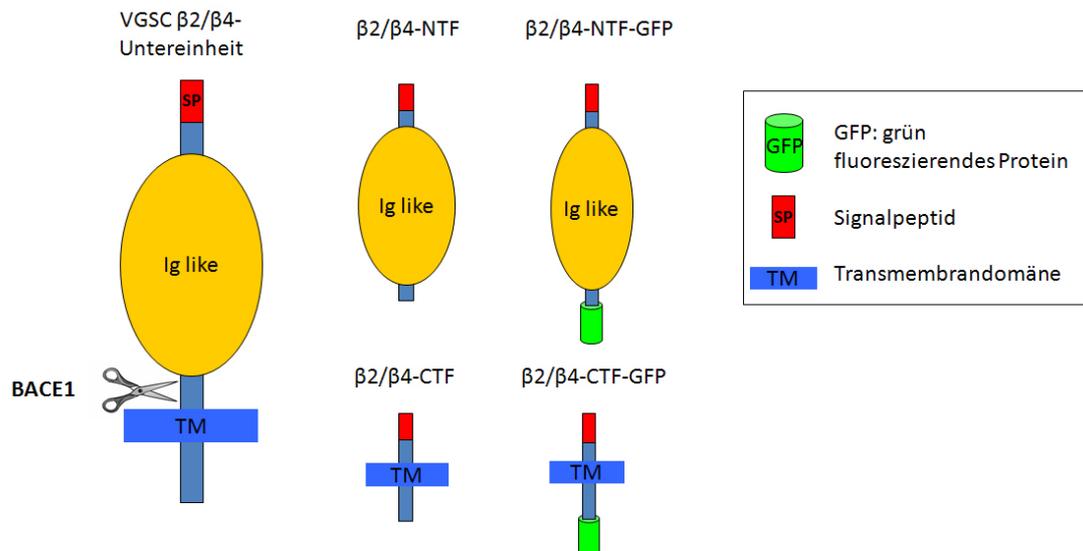


Abbildung 42: Schematische Darstellung der klonierten C- und N-terminalen Fragmente der β 2- und β 4-Untereinheiten.

Die β 2- und β 4-Untereinheiten setzen sich aus einem Signalpeptid (SP) einer großen Immunglobulin ähnlichen (Ig like) extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne (TM) und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz zusammen. BACE1 schneidet die Proteine membranproximal, wodurch ein lösliches N-terminales Fragment (NTF) und ein membranständiges C-terminales Fragment entsteht. Mittels PCR-basierter Methoden wurden die CTFs und NTFs von β 2 und β 4 kloniert. Für die korrekte Membraninsertion wurden die CTFs N-terminal mit dem proteineigenen Signalpeptid versehen. Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis wurden die Fragmente zusätzlich mit eGFP fusioniert.

In Abbildung 43 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen zu sehen, die mit den mit GFP fusionierten β 2- und β 4-Untereinheiten, sowie deren N- und C-terminalen Fragmenten transient transfiziert wurde. Sowohl die β 2- als auch die β 4-Untereinheiten waren vorwiegend plasmamembranständig und zu einem geringeren Anteil in zellulären Kompartimenten lokalisiert (Abb. 43, β 2, β 4). Die N-terminalen Fragmente wurden in intrazellulären Strukturen detektiert, die auf eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat schließen lassen (β 2-NTF, β 4-NTF). Das C-terminale Fragment von β 2, welches eine Transmembrandomäne besitzt, konnte in der Plasmamembran, im Zytosol sowie im Zellkern detektiert werden. Für das β 4-CTF konnten keine eGFP-Signale in der Plasmamembran beobachtet werden. Das exprimierte β 4-CTF war vorwiegend im Zytosol und im Zellkern nachweisbar. Da beide C-terminalen Fragmente durch den γ -Sekretasekomplex weiterprozessiert werden, wurden die Zellen, die mit dem β 2- oder dem β 4-CTF transfiziert wurden, ca. 16 Stunden vor der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme mit dem γ -Sekretase Inhibitor γ -X ($1\mu\text{M}$, Calbiochem) behandelt. In HEK293-Zellen die β 2-CTFs überexprimierten führte die Inhibition der γ -Sekretase zu einer starken Akkumulation der CTFs in der Plasmamembran sowie in vesikulären Strukturen, die sich

vornehmlich in der Nähe der Plasmamembran oder dem Zellkern befanden. Für β 4-CTF war der Effekt des γ -Sekretase Inhibitors weniger stark, führte aber auch zu einer Membranfärbung, die in Abwesenheit des Inhibitors nicht beobachtet wurde.

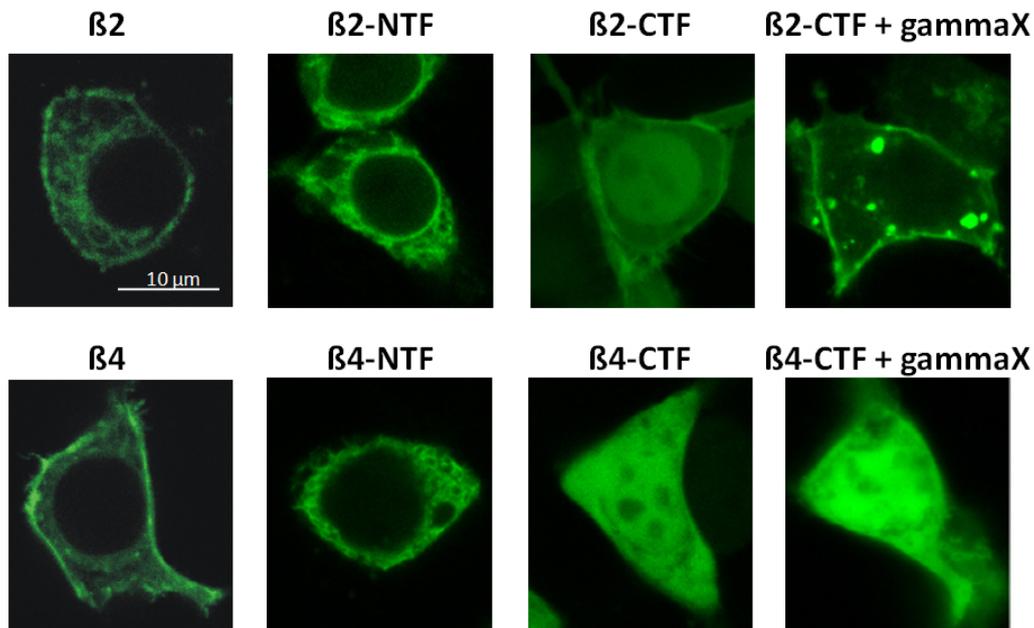


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit eGFP fusionierten β 2- und β 4-Untereinheiten sowie mit deren Spaltprodukten transfizierten HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen wurden transient mit β 2/ β 4-eGFP, β 2/ β 4-NTF-eGFP oder β 2/ β 4-CTF-eGFP transfiziert und nach 48 Stunden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zellen die mit β 2/ β 4-CTF-eGFP transfiziert wurden, wurden 16 Stunden vor der konfokalen Mikroskopie mit dem γ -Sekretase Inhibitor γ -X (1 μ M, Calbiochem, LaJolla, USA) behandelt.

Die Kotransfektion von Nav1.2 α mit den C- oder N-terminalen Fragmenten zeigte, dass auch die Spaltprodukte eine signifikante Linksverschiebung der Aktivierungskurve, verglichen mit Nav1.2 α alleine, bewirkten. Mit einem V_{mid} von $-16,6 \text{ mV} \pm 0,9 \text{ mV}$ für Nav1.2 α + β 2-CTF und $-18,7 \text{ mV} \pm 0,8 \text{ mV}$ für Nav1.2 α + β 2-NTF war die halbmaximale Aktivierungsspannung kleiner als bei Kotransfektion der intakten β 2-Untereinheit (Abb. 44, A + B). Die halbmaximale Aktivierungsspannung des Natriumkanals war bei Koexpression der β 4-Untereinheiten sowie deren Spaltprodukte nahezu identisch (Abb. 44, C + D)

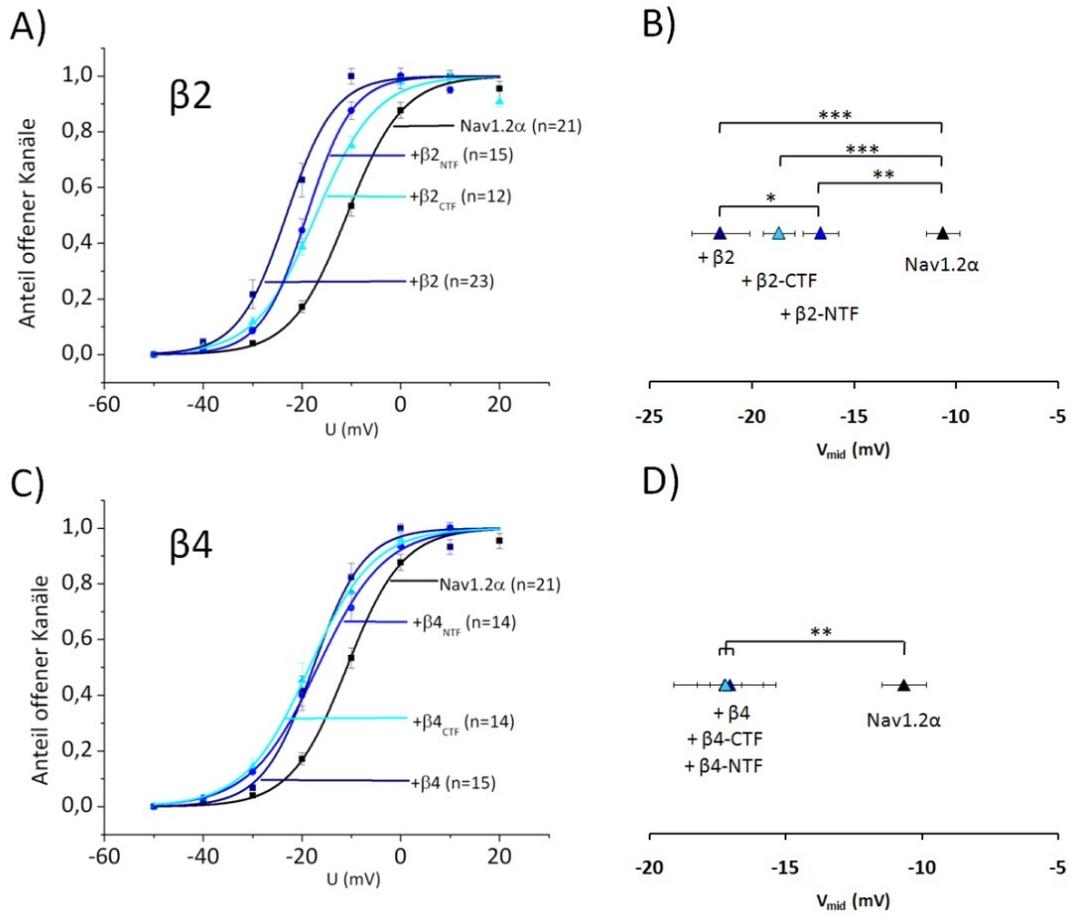


Abbildung 44: Einfluss der Fragmente von $\beta 2$ und $\beta 4$ auf die Aktivierung des Natriumkanals in HEK293-Zellen

A: Aktivierungskurven des Natriumstroms von HEK293-Zellen, die Nav1.2 α (schwarze Kurve), Nav1.2 α + $\beta 2$ (dunkel blaue Kurve), Nav1.2 α + $\beta 2$ -NTF (hellblaue Kurve) oder Nav1.2 α + $\beta 2$ -CTF (blaue Kurve) exprimierten. Die Messungen wurden 48 Stunden nach Transfektion der Zellen durchgeführt. **B:** Vergleich der halbmaximalen Aktivierungen (V_{mid}) der Natriumkanäle, berechnet nach den identisch gefärbten Aktivierungskurven (A). **C:** Normalisierte Aktivierungskurven des Natriumstroms von HEK293-Zellen, die nur den Natriumkanal (schwarze Kurve) oder Nav1.2 α in Kombination mit $\beta 4$ (dunkel blaue Kurve) oder in Kombination mit $\beta 4$ -NTF (hellblaue Kurve) oder $\beta 4$ -CTF (blaue Kurve) exprimierten. **D:** Vergleich der halbmaximalen Aktivierungen (V_{mid}) der Natriumkanäle, berechnet nach den identisch gefärbten Aktivierungskurven (C). (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$)

4.4.5. Proteolyse unabhängiger Effekt von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α

Die elektrophysiologischen Daten der HEK293 Zellen die, den Natriumkanal und je ein Fragment der $\beta 2$ - oder $\beta 4$ -Untereinheit exprimierten, zeigten, dass die Spaltprodukte ihrerseits eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkten. Dies erklärte jedoch nicht die starke Verschiebung von V_{mid} in Zellen die Nav1.2 α , die $\beta 4$ -Untereinheit und BACE1 exprimierten. Die Beobachtung, dass auch nach Inhibition von BACE1 die Aktivierungskurve

deutlich nach links verschoben war, führte zu der Überlegung, ob BACE1 einen proteolyse-unabhängigen Effekt auf die Aktivierung von Nav1.2 α haben könnte.

HEK293-Zellen wurden daher mit Nav1.2 α und BACE1 oder der inaktiven BACE1 Mutante (BACE1 inaktiv) kotransfiziert und die Aktivierung der Natriumkanäle untersucht. Hier zeigte sich, dass sowohl das aktive, als auch das inaktive BACE1 in Abwesenheit der β 2- oder β 4-Untereinheit eine signifikante Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkten. In Zellen, die nur mit Nav1.2 α transfiziert wurden (schwarze Kurve, Abb. 45) lag V_{mid} bei $-10,7 \text{ mV} \pm 0,8 \text{ mV}$. Durch die Kotransfektion von BACE1 wurde V_{mid} auf $-20,0 \text{ mV} \pm 0,9 \text{ mV}$ und bei Koexpression der inaktiven BACE1 wurde V_{mid} auf $-21,0 \text{ mV} \pm 1,0 \text{ mV}$ vermindert. Dies entsprach nahezu dem Effekt, den die β 2-Untereinheit alleine beziehungsweise beide β -Untereinheiten gemeinsam auf die Aktivierung der Natriumkanäle hatten.

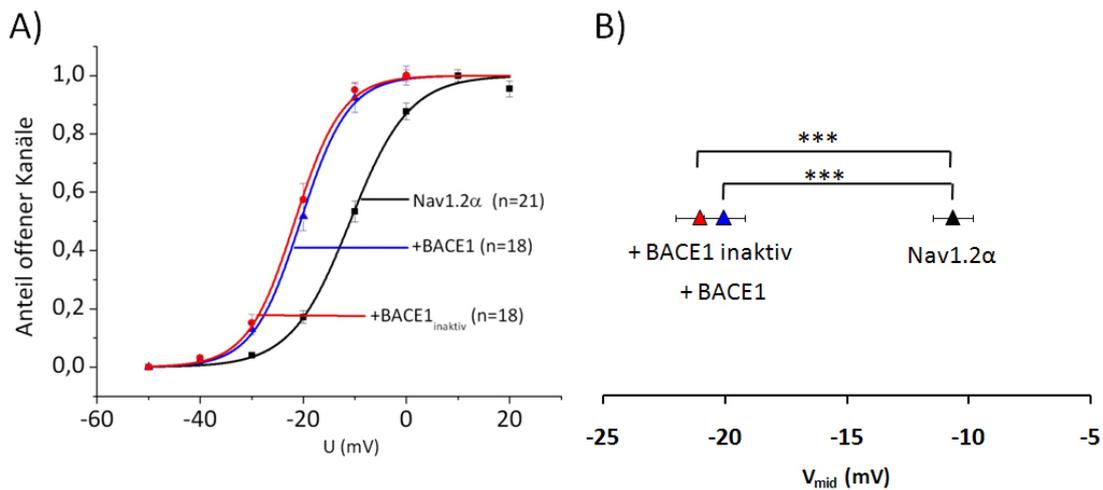


Abbildung 45: Einfluss der aktiven und inaktiven BACE1 auf die Aktivierbarkeit von Nav1.2 α in HEK293-Zellen

A: Die aktive (blau) und die inaktive (rot) BACE1 bewirkten eine nahezu identische Linksverschiebung der Aktivierungskurve von Nav1.2 α . **B:** Vergleich der halbmaximalen Aktivierungen (V_{mid}) der Natriumkanäle, berechnet nach den identisch gefärbten Aktivierungskurven (A) (***) $P < 0,001$.

5. Diskussion

Die Alzheimersche Erkrankung ist eine sich langsam entwickelnde, neurodegenerative Erkrankung und die am häufigsten auftretende Form von Demenz bei alten Menschen. Eine der größten Herausforderungen der Alzheimer-Forschung ist die Entschlüsselung der Mechanismen, die der Neurodegeneration zugrunde liegen. Ein Meilenstein stellte dabei die Identifizierung der für die Entstehung des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) verantwortlichen β -Sekretase BACE1 dar (Hussain *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). $A\beta$ entsteht durch die Prozessierung des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die β - und die γ -Sekretase. $A\beta$ akkumuliert in Gehirnen von Alzheimer-Patienten in den amyloiden-Plaques, welche die sogenannte Amyloidkaskade auslösen (Chiang *et al.*, 2008).

Ein wichtiges Ziel bei der Erforschung der molekularen Prozesse, die bei der Entstehung und der Progression der Alzheimer-Krankheit stattfinden, ist die Entwicklung von therapeutischen Strategien zur Bekämpfung der Krankheit. Eine dieser Strategien besteht darin, die Produktion des $A\beta$ -Peptids zu reduzieren oder vollständig zu verhindern. Da die γ -Sekretase ein sehr großes Substratspektrum besitzt (Lleo, 2008) und Mäuse, die keinen proteolytisch aktiven γ -Sekretasekomplex (Presenilin-defizient) exprimieren, embryonal letal sind (De Strooper *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1997), erscheint die Inhibition der β -Sekretaseaktivität ein weitaus vielversprechenderer Ansatz.

Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Funktionen von BACE1 näher zu charakterisieren. Dies erfolgte zum einen durch die Untersuchung von Mäusen, die defizient für BACE1 sind. Mit diesem Modell lassen sich auch mögliche Auswirkungen, die eine therapeutische Inhibition der β -Sekretase BACE1 auf den Organismus haben könnten, untersuchen.

5.1. Charakterisierung der BACE1-defizienten Maus

Die ersten Beschreibungen von BACE1-defizienten Mäusen deuteten an, dass das Fehlen von BACE1 keinen Einfluss auf die Vitalität und Fertilität hat und die Mäuse phänotypisch keine offensichtlichen Auffälligkeiten zeigen (Cai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001).

Genauere Verhaltenstests offenbarten jedoch, dass BACE1-defiziente Mäuse ängstlicher und weniger neugierig als Kontrolltiere sind (Harrison *et al.*, 2003). Weiterhin wurden veränderte

Serotonin- und Dopaminkonzentrationen beschrieben (Harrison *et al.*, 2003). Andere BACE1-defiziente Mauslinien zeigten verringerte Fähigkeiten beim räumlichen Lernen und bei der Gedächtnisleistung (Ohno *et al.*, 2004). Für die BACE1-defiziente Mauslinie, mit der in dieser Arbeit gearbeitet wurde, wurde eine erhöhte neonatale Sterblichkeit beschrieben. Innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt verstarben ca. 40% der BACE1^{-/-} Tiere, während keine erhöhte Sterblichkeit der Kontrolltiere in diesem Zeitraum zu beobachten war. Darüber hinaus waren BACE1-defiziente Mäuse kleiner als Kontrolltiere und zeigten hyperaktive Verhaltensmuster (Dominguez *et al.*, 2005).

Bei der eigenen Zucht dieser BACE1-defizienten Mauslinie, wurde die geringere Größe der Tiere gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern reproduziert. Ein möglicher Grund für den Größenunterschied könnte in einer gestörten Insulin-Homöostase liegen. In einer Kollaboration mit Hoffmeister *et al.* (*Universitätsklinikum, Leipzig*) konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von BACE1 in der Insulinoma-Zelllinie INS-1E zu einer Reduktion der Expression der Insulin-mRNA sowie der Insulinsekretion führte. Weiterhin wurde gezeigt, dass in pankreatischen β -Zellen von BACE1-defizienten Mäusen die Insulin-mRNA-Expression signifikant niedriger als in Wildtyp-Tieren war und die Insulinkonzentration im Serum von BACE1^{-/-} Mäusen ebenfalls geringer als in Kontrollseren war (Hoffmeister *et al.*, eingereicht zur Veröffentlichung). Das geringere Körpergewicht der BACE1-defizienten Mäuse könnte daher eine Folge des verminderten Insulinspiegels während der postnatalen Entwicklung sein.

Die erhöhte *post natale* Sterblichkeit BACE1-defizienter Mäuse, die von Dominguez *et al.* beschrieben wurde, konnte in der eigenen Zucht nicht beobachtet werden. Eine mögliche Ursache könnte der niedrigere Hygienestandard der Tierhaltung an der *Katholischen Universität Leuven*, wo die ersten Daten erhoben wurden, im Vergleich zu den Tierhaltungsräumen der *Universität Kiel* sein. Dies führte zu der Überlegung, ob das Fehlen von BACE1 einen Einfluss auf immunologische Funktionen hat, die für die Bekämpfung von Pathogenen wichtig sind. Unterstützt wurde diese Theorie durch die Beteiligung der bisher identifizierten BACE1-Substrate PSGL-1 (Lichtenthaler *et al.*, 2003), ST6Gal-1 (Kitazume *et al.*, 2001) und IL-1RII (Kuhn *et al.*, 2007) an verschiedenen immunologischen Prozessen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Auswirkungen der BACE1-Defizienz auf das Immunsystem im Mausmodell zu untersuchen.

Auf Transkriptionsebene wurde die Expression von BACE1 in zahlreichen Geweben, darunter Herz, Plazenta, Leber und Lunge, beschrieben. Die stärkste Expression wurde dabei in Gehirn und Pankreas beobachtet (Yan *et al.*, 1999). Zur Überprüfung der Antikörperspezifität gegenüber endogenem murinem BACE1 wurden daher die neuronalen Gewebe Großhirn, Kleinhirn (Cerebellum), Rückenmark und die olfaktorischen Bulben (Riechkolben) im Westernblot untersucht. Als Negativkontrollen dienten dabei Gewebe von BACE1-defizienten Mäusen, die kein BACE1-Protein exprimieren. Die verwendeten Antikörper (anti-BACE1 (EE17) und anti-BACE/Asp2-(CT) erkannten das endogene BACE1, allerdings mit deutlich geringerer Intensität als nach Überexpression des BACE1-Proteins. Durch eine Membranpräparation von Kleinhirngewebe konnten unspezifische Signale im Westernblot reduziert werden.

5.1.1. Expression von BACE1 in lymphatischen Geweben

Die Expression von BACE1 in den immunologisch relevanten Organen Milz, Thymus und Lymphknoten konnte auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse gezeigt werden. In Thymuslysaten wurde zusätzlich zum 70 kDa großen BACE1-Protein ein Protein von ca. 45 kDa detektiert, bei dem es sich um ein Spaltprodukt oder eine Spleißvariante von BACE1 handeln könnte. Für Gehirn und Pankreas wurden bereits Spleißvarianten von BACE1 beschrieben (Bodendorf *et al.*, 2001). Im Gehirn ist das aus 501 Aminosäuren bestehende proteolytisch aktive BACE1 (BACE501) die dominierende Form, während im Pankreas ausschließlich die verkürzte, 457 Aminosäure lange Form (BACE457) vorliegt. BACE457, dem ein Drittel von Exon 3 fehlt, ist nicht in der Lage, β APP zu prozessieren (Bodendorf *et al.*, 2001). Es wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt, ob dies auch für andere BACE1-Substrate zutrifft.

5.1.2. Einfluss der BACE1-Defizienz auf die Zellpopulationen der Milz

Die FACS-Analyse der Milzzellpopulationen von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Anteils an T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten. Ein Unterschied konnte für B-Zellen beobachtet werden, deren Anteil an der Gesamtzellzahl in Milzen von BACE1-defizienten Mäusen signifikant gegenüber Wildtyp-Tieren reduziert erschien.

Der geringere Anteil an B-Zellen spiegelte sich auch in den Serum-Immunglobulinkonzentrationen der BACE1^{-/-} Tiere wider. Die Serumkonzentrationen von IgM, IgA und IgD waren in BACE1-defizienten Mäusen signifikant niedriger als in Kontrolltieren. Für IgG3 und IgG2b konnte kein Unterschied beobachtet werden.

Sowohl die Ergebnisse der FACS-Analyse, als auch die Werte der Serum-Immunglobulinkonzentrationen wiesen sehr große Schwankungen innerhalb der BACE1^{+/+}, als auch der BACE1^{-/-} Proben auf. Die untersuchten Mäuse besaßen einen gemischten genetischen Hintergrund (126SV x C57BL/6), was sich besonders bei immunologischen Fragestellungen negativ auf die Verlässlichkeit der Daten auswirken kann (Ridgway *et al.*, 2007). Trotz dieser eher ungünstigen Bedingungen waren die Unterschiede bei der B-Zellzahl und den Serum-Immunglobulinen signifikant.

Von allen bisher bekannten BACE1-Substraten ist nur für ST6Gall ein Einfluss auf die Funktion von B-Zellen beschrieben. Durch ST6Gall wird eine endständige α 2,6 verknüpfte Sialinsäure erzeugt, die auf diversen Glykoproteinen im Serum und auf der Zelloberfläche, zum Beispiel von Leukozyten, exprimiert wird und spezifisch an CD22 bindet (Crocker and Varki, 2001; Hanasaki *et al.*, 1995a; Hanasaki *et al.*, 1995b). CD22 verhindert als inhibitorischer Korezeptor auf B-Zellen eine Überaktivierung dieser Zellen (Doody *et al.*, 1995). Während beschrieben ist, dass die B-Zellentwicklung in ST6Gall-defizienten Mäusen normal ist (Hennet *et al.*, 1998), gibt es noch keine Daten, die den Effekt einer ST6Gall-Überexpression *in vivo* beschreiben. Zwar konnte gezeigt werden, dass BACE1-defiziente Mäuse eine niedrigere und BACE1-transgene Mäuse eine höhere Konzentration an löslichem ST6Gall im Serum haben als Wildtyp-Tiere, es wurde jedoch nicht gezeigt, ob dies einen direkten Einfluss auf die Glykosylierung der Proteine hat, die durch ST6Gall modifiziert werden (Kitazume *et al.*, 2005). Daher ist es fraglich, ob die Unterschiede bei der Anzahl der B-Zellen und den Serum-Immunglobulinkonzentrationen zwischen BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen auf ST6Gall zurückzuführen ist.

Bevor zukünftig Versuche zur Aufklärung der Ursachen für den beobachteten B-Zellphänotyp der BACE1-defizienten Maus durchgeführt werden, sollten die Daten mit den nun zur Verfügung stehenden Auszuchtmäusen (C57BL/6) verifiziert werden. Dabei sollten auch die Zelltypen, bei denen kein Unterschied beobachtet werden konnte, wiederholt untersucht werden, da die Möglichkeit besteht, dass auch für diese Zelltypen Unterschiede bestehen, die jedoch erst bei Mäusen mit einem einheitlichen genetischen Hintergrund zu Tage treten.

5.1.3. Einfluss der BACE1-Defizienz auf die Immunabwehr gegen *Listeria monocytogenes* (LM)

Zur Untersuchung der Immunabwehr der BACE1-defizienten Mäuse wurden diese, sowie Kontrolltiere, mit einer subletalen Dosis des Erregers *Listeria monocytogenes* peritoneal infiziert. Bei diesem Versuch zeigte sich, dass BACE1-defiziente Mäuse deutlich anfälliger gegenüber einer systemischen Infektion mit dem Pathogen als Wildtyp-Tiere waren. Während von den Wildtyp-Mäusen fünf Tage nach der Infektion alle Tiere noch lebten und nur ein Tier starke Symptome einer Listeriose zeigte, starben von den BACE1-defizienten Tieren drei von fünf innerhalb der ersten drei Tage nach der Infektion und beide überlebenden Tiere zeigten Symptome einer Listeriose.

Bei der Untersuchung der Milzen und Lebern der überlebenden Tiere zeigte sich, dass die Bakterienlast in den Organen bei den BACE1-defizienten Tieren signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht war.

Eine Infektion mit LM löst sehr schnell eine Antwort des angeborenen Immunsystems aus. Diese schnelle Reaktion des Immunsystems auf Pathogene ist essentiell für das Überleben des Wirtsorganismus (Unanue, 1997). Innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nach einer Erstinfektion erfolgt die Bekämpfung der Listerien ausschließlich durch Komponenten des angeborenen Immunsystems. Dass die BACE1-defizienten Mäuse innerhalb dieses Zeitraumes verstarben, könnte daher auf einen oder mehrere Defekte der angeborenen Immunabwehr zurückzuführen sein. Da Listerien vor allem innerhalb von Zellen vorkommen, spielt die von B-Zellen abhängige Antikörper vermittelte Immunabwehr für die Listerienbekämpfung nur eine untergeordnete Rolle und der beschriebene B-Zellphänotyp ist wahrscheinlich nicht die Ursache für die höhere Anfälligkeit der BACE1-defizienten Mäuse.

Die FACS-Analyse der Milzen der mit Listerien infizierten Mäuse (fünf Tage nach Infektion) zeigten keine signifikanten Unterschiede für die untersuchten Zelltypen (T-Zellen, antigenpräsentierende Zellen (APC), Natürliche Killerzellen, aktivierte B-Zellen, Monozyten) zwischen BACE1^{-/-} und BACE1^{+/+} Tieren. Die größten, aber statistisch nicht signifikanten, Unterschiede zwischen BACE1^{-/-} und BACE1^{+/+} wurden für CD8 positive T-Zellen und CD80-positive Zellen beobachtet, deren Anteil in BACE1-defizienten Mäusen um ca. 40% gegenüber infizierten Wildtyp-Tieren erhöht war. Die fehlende Signifikanz der Daten ist auf die noch niedrige Anzahl an Tieren, die für die FACS-Analyse zur Verfügung standen,

zurückzuführen, da nur von den überlebenden zwei BACE1-defizienten Mäusen die Milzen präpariert werden konnten. Anhand der bisher erhaltenen Daten kann daher noch keine Aussage über eine veränderte zelluläre Zusammensetzung der Milzen in BACE1-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren nach LM-Infektion gemacht werden. Die Wiederholung dieser Experimente, idealerweise mit Auszuchtmäusen, könnte diese Daten verifizieren. Aufgrund der wichtigen Rolle, die Makrophagen bei der frühen Immunantwort spielen, wurden primäre Makrophagenvorläuferzellen aus dem Knochenmark von BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen gewonnen und zu Makrophagen differenziert. Diese Makrophagen wurden mit Listerien infiziert und die Replikation des Erregers in den Zellen untersucht. Der ermittelte Replikationsindex ist ein Maß für die Fähigkeit der Makrophagen, die phagozytierten Listerien abzutöten.

Bei den Versuchen zur Abtötung der Listerien konnte ein Unterschied für die Replikationsindizes der Listerien für BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Makrophagen festgestellt werden. In drei von vier unabhängigen Experimenten war der Replikationsindex der Listerien in BACE1-defizienten Makrophagen etwa um den Faktor zwei höher als in Wildtyp-Makrophagen. Dies zeigt eine Tendenz, dass das Fehlen von BACE1 einen Einfluss auf die Effizienz der Makrophagen bei der Abtötung der phagozytierten Listerien haben könnte. In Wildtyp- und BACE1-defizienten Makrophagen, konnte durch Stimulation der Zellen mit IFN- γ vor der Infektion mit Listerien der Replikationsindex um den Faktor fünf reduziert werden. Dies zeigt, dass BACE1^{-/-} Makrophagen in gleichem Maße durch IFN- γ aktiviert werden wie die Wildtyp-Zellen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen innerhalb und zwischen den einzelnen Experimenten kann noch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob das Fehlen von BACE1 zu einer schlechteren Abtötung der Listerien in Makrophagen führt.

Listeria monocytogenes ist aufgrund seiner sehr genauen Charakterisierung und der guten Handhabbarkeit im Mausmodell ein bevorzugtes Modell für die Analyse des Immunsystems von Säugetieren. Daher wurden bereits zahlreiche Faktoren identifiziert, die an der Abwehr des Pathogenes beteiligt sind. In der frühen Phase der Immunantwort sind die wichtigsten Zelltypen, die die Vermehrung des Erregers limitieren, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, sowie die erst kürzlich entdeckten TNF (Tumor Necrose Faktor) und iNOS (induzierbare NO Synthese) produzierenden, dendritischen Zellen (TipDCs) (Conlan and North, 1994; Czuprynski *et al.*, 1994; Kurihara *et al.*, 1997; Rogers and

Unanue, 1993; Serbina *et al.*, 2003). Die Listerien werden von residenten Makrophagen und Monozyten, die in das infizierte Gewebe einwandern, phagozytiert und nach Aktivierung der Makrophagen abgetötet (Alvarez-Dominguez *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 1997).

Makrophagen, die Listerien aufgenommen haben, sezernieren TNF α , Interleukin-1 und Interleukin-12. Diese Zytokine regen die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) durch NK-Zellen an, was wiederum entscheidend für die Aktivierung der Makrophagen ist (Ladel *et al.*, 1996; Tripp *et al.*, 1995; Tripp and Unanue, 1995). Erst nach ihrer Aktivierung produzieren Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie H₂O₂ und Stickstoffmonoxid (NO), die zytotoxisch auf die Listerien wirken (Endres *et al.*, 1997; Shiloh *et al.*, 1999).

Die genaue Charakterisierung der angeborenen Immunantwort auf *Listeria monocytogens* könnte die Erforschung der Ursachen für die erhöhte Anfälligkeit der BACE1-defizienten Mäuse gegenüber einer Infektion mit dem Pathogen erleichtern. Beispielsweise könnte die gestörte Prozessierung noch unbekannter BACE1-Substrate in BACE1^{-/-} Mäusen Einfluss auf die Aktivierung der Makrophagen haben. Konzentrationsbestimmungen der an der Makrophagenaktivierung beteiligten Zytokine in Seren von infizierten Wildtyp- und BACE1-defizienten Mäusen könnten darüber Aufschluss geben. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Untersuchung der bakteriziden Eigenschaften der BACE1-defizienten Makrophagen. BACE1 könnte beispielsweise über noch unbekannte Mechanismen die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies beeinflussen.

5.2. Suche nach BACE1-Substraten

Trotz intensiver Forschung konnte noch nicht aufgeklärt werden, welche physiologische Rolle BACE1 hat. Eine weithin akzeptierte Theorie ist, dass β APP nicht das einzige Substrat von BACE1 ist. Gegen β APP als physiologisches Substrat spricht die geringe Effizienz, mit der Wildtyp- β APP von BACE1 prozessiert wird (Liu and Lu, 2002). So führt bei der sogenannten „Schwedischen FAD (*familial alzheimer disease*) Mutante“ von β APP der Austausch der Aminosäuren Methionin gegen Leucin an Position P1 und Lysin gegen Asparagin an Position P2 der BACE1-Schnittstelle von β APP, zu einer verstärkten Prozessierung des Vorläuferproteins durch BACE1. Weiterhin zeigten Peptidspaltungsversuche, dass der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der acht Aminosäuren, die die Schnittstelle von BACE1 flankieren (P4-P4'), teilweise zu einer effizienteren Prozessierung durch BACE1 führt, als es für die Wildtyp-Sequenz der Fall ist (Turner *et al.*, 2001).

Neben β APP wurden einige andere Substrate für BACE1 identifiziert. Die Diversität dieser Substrate bezüglich ihrer Expression und ihres Wirkungsbereichs spricht dafür, dass BACE1 ein weitaus größeres Substratspektrum besitzt als bisher angenommen. Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand daher darin, nach noch nicht identifizierten Substraten für BACE1 zu suchen. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf Transmembranproteine gelegt, die an immunologischen Prozessen beteiligt sind.

5.2.1. TRANCE (tumor necrosis factor –related, activation induced cytokine)

In einem ersten Versuchsansatz wurden zahlreiche Proteine, die extrazellulär mit einer alkalischen Phosphatase (AP) fusioniert waren, auf eine Prozessierung durch BACE1 untersucht (Daten nicht gezeigt) (3.2.2.10). Dabei konnte TRANCE (*tumor necrosis factor –related, activation induced cytokine*) als potentielles BACE1 Substrat identifiziert werden. Die Überexpression von TRANCE-AP und BACE1 in Cos7-Zellen bewirkte zwar nur eine geringe Zunahme der TRANCE-AP Prozessierung. Dieser Effekt wurde jedoch durch die gleichzeitige Expression von TRANCE-AP mit der inaktiven BACE1-Mutante, die durch den Austausch des katalytisch wirksamen Aspartats gegen Asparagin (D289N) erzeugt wurde, nicht beobachtet. In Zellen, die TRANCE-AP und die inaktive BACE1-Mutante exprimierten, wurde weniger lösliches TRANCE-AP in den Überstand abgegeben als in Zellen, die nur TRANCE-AP exprimierten, was auf eine Verdrängung des endogenen BACE1 durch die Überexpression der inaktiven BACE1-Mutante zurückzuführen sein könnte. Wurden Zellen, die TRANCE-AP und BACE1 überexprimierten mit dem Breitband Metalloproteaseinhibitor GM6001 behandelt, wurde ebenfalls weniger lösliches TRANCE-AP in den Überstand abgegeben. Dies zeigt, dass neben BACE1 auch Metalloproteasen an der Prozessierung von TRANCE beteiligt sind. Dies bestätigt Berichte, dass TRANCE ein Substrat von ADAM-Proteasen und Matrixmetalloproteasen ist (Hikita *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2005).

Da TRANCE-AP zusätzlich intrazellulär mit einem *Flag-Tag* versehen war, konnte zusätzlich die Generierung der N-terminalen Fragmente (NTF) im Westernblot gezeigt werden. Die Überexpression von BACE1 führte zu einer starken Zunahme an N-terminalem Fragment von TRANCE, während die inaktive Mutante keinen Effekt zeigte. In TRANCE-AP- und BACE1-überexprimierenden Zellen, in denen die Metalloproteasen inhibiert wurden, konnte mehr NTF detektiert werden als in Zellen, die nur TRANCE exprimierten, aber weniger als in

TRANCE- und BACE1-exprimierenden Zellen. Der Effekt von BACE1 auf die Generierung der N-terminalen Fragmente von TRANCE war deutlich stärker, als es die niedrige Konzentration der C-terminalen, löslichen Ektodomäne im Überstand hätten vermuten lassen. Eine mögliche Erklärung ist die subzelluläre Lokalisation von BACE1. Da BACE1 zum größten Teil in endosomalen Kompartimenten und im Golgi Apparat lokalisiert ist und nur zu einem geringen Anteil an der Plasmamembran aktiv ist (Koo and Squazzo, 1994; Vassar *et al.*, 1999), findet die Prozessierung von TRANCE-AP wahrscheinlich hauptsächlich intrazellulär statt und das lösliche Spaltprodukt gelangt nicht in den Zellkulturüberstand und kann dadurch im AP-Versuch nicht nachgewiesen werden. Dies würde auch erklären, warum die Inhibition der Metalloproteasen, die TRANCE vor allem an der Plasmamembran schneiden, einen stärkeren Effekt auf den Anteil an löslichem TRANCE-AP im Überstand als auf die Generierung der NTFs hat. Diese Befunde deuten an, dass ein AP-Versuch wahrscheinlich keine optimale Methode für die Identifizierung neuer BACE1-Substrate ist.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TRANCE-AP im relativ artifiziellen Zellkultursystem nach Überexpression durch BACE1 prozessiert wird, wurde der Einfluss von BACE1 auf TRANCE im endogenen System untersucht. Wenn TRANCE *in vivo* ein Substrat für BACE1 ist, könnte das Fehlen von BACE1 zu einer veränderten Prozessierung und eventuell zu einer Akkumulation des Proteins in Zellen und Geweben führen. Da nur ein Antikörper, der gegen die Ektodomäne von TRANCE gerichtet war, zu Verfügung stand, konnte nur die Expression des unprozessierten TRANCE in Zellen und Geweben aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen analysiert werden.

In Thymus und Milz konnte kein Unterschied bezüglich der Proteinexpression von TRANCE zwischen Wildtyp- und BACE1-defizientem Gewebe beobachtet werden, während in BACE1-defizienten Lungen und Peritonealmakrophagen mehr TRANCE als in den Kontrollen detektiert wurde.

TRANCE ist zusammen mit dem Wachstumsfaktor CSF-1 (colony-stimulating factor-1) für die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen zu Osteoklasten verantwortlich (Lacey *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998). Reife Osteoklasten werden konzentrationsabhängig durch die Bindung von TRANCE an seinen Rezeptor aktiviert und resorbieren Knochenmasse, indem sie Protonen (H⁺), Kathepsin K und die Tartrat-resistente saure Phosphatase TRAP sezernieren (Burgess *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 2002). Die

Konzentration an TRAP im Serum dient daher auch als ein Maß für die Osteoklasten-Aktivität *in vivo*.

Bisher konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, welchen Anteil lösliches und membrangebundenes TRANCE auf die Remodulierung der Knochen hat. Studien weisen darauf hin, dass lösliches TRANCE eine stärkere Wirkung auf die Osteoklastengnese hat als membrangebundenes TRANCE (Nakashima *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 1998). Andere Studien sehen in den erhöhten Konzentrationen an löslichem TRANCE einen Zusammenhang mit dem Verlust von Knochenmasse im Tiermodell und bei bestimmten humanen Erkrankungen wie entzündlicher und rheumatoider Arthritis (Geusens *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Stolina *et al.*, 2005).

Um den Einfluss von BACE1 auf die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten zu untersuchen, wurde die TRAP-Konzentration in Seren von adulten Wildtyp- und BACE1-defizienten Mäusen bestimmt. In den Seren von BACE1-defizienten Mäusen war die Konzentration an TRAP etwa 25% höher als in Seren von Wildtyp-Tieren. Dies deutet auf eine leicht erhöhte Osteoklastenaktivität in BACE1^{-/-} Tieren hin. Untersuchungen der Knochen von Wildtyp- und BACE1^{-/-} Tieren (in Kollaboration mit Dr. V. Everts, Universität Amsterdam) offenbarten jedoch keine signifikanten Veränderungen bezüglich Knochenaufbau und -dichte. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt, den die BACE1-Defizienz auf die Prozessierung von TRANCE haben könnte, zu gering für eine phänotypische Veränderung der Knochenhomöostase ist.

Da es keine kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von TRANCE gibt, kann die Prozessierung von TRANCE durch BACE1 im Moment nur über die Generierung des C-terminalen löslichen Fragments verfolgt werden. Da TRANCE durch BACE1 wahrscheinlich vorwiegend intrazellulär geschnitten wird und das C-terminale Fragment schnell degradiert werden könnte, erschwert das den Nachweis der Prozessierung von TRANCE durch BACE1. Die Herstellung eines gegen die intrazelluläre Domäne von TRANCE gerichteten Antikörpers könnte den Nachweis der Prozessierung von endogenem TRANCE durch BACE1 ermöglichen.

5.2.2. BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family)

Wie schon für TRANCE beschrieben, wurde auch die Prozessierung von BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*) durch BACE1 im AP-Versuch untersucht.

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von BAFF-AP mit BACE1 die Abgabe von löslichem BAFF-AP in den Überständen erhöhte, jedoch korrelierte diese Freisetzung nicht mit der vermehrten Generierung des membrangebundenem N-terminalen Fragments. Obwohl die Ergebnisse aus den AP-Versuch nicht eindeutig waren, wurde BAFF dennoch als potentiellles BACE1-Substrat in Betracht gezogen. Dies geschah aufgrund der Beobachtung, dass in Milzen von BACE1-defizienten Mäusen der Anteil an B-Zellen ca. 30% niedriger war als in Wildtyp-Milzen und BAFF ein wichtiger Faktor für die Differenzierung und das Überleben von B-Zellen ist (Mackay *et al.*, 2003; Rolink *et al.*, 2002).

Da für BAFF keine Antikörper, die gegen die intrazelluläre N-terminale Domäne gerichtet sind, zur Verfügung standen, wurde ein N-terminal mit einem HA-Tag fusioniertem BAFF-Konstrukt (BAFF-HA) erzeugt. Dieses Konstrukt wurde eingesetzt, um die Prozessierung von BAFF durch BACE1 nach Überexpression in HEK293T-Zellen zu untersuchen. Es konnte beobachtet werden, dass BACE1 zu einer vermehrten Generierung des N-terminalen Fragments führte. Dieses Ergebnis könnte jedoch zelltypabhängig sein, da es in einer anderen Zelllinie (Cos7) nicht bestätigt werden konnte.

Da BAFF auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Craxton *et al.*, 2003; Huard *et al.*, 2004), wurden für weitere Experimente die humane Monozytenzelllinie THP-1 verwendet. Dabei wurde der Einfluss des BACE1-Inhibitors C3, sowie des Breitband Metalloproteaseinhibitors GM6001 auf endogenes BAFF untersucht. BAFF besitzt zwei putative N-Glykosylierungsstellen und durch die Behandlung mit PNGaseF erhält man die ca. 2 kDa kleinere, unglykosylierte Form von BAFF (Schneider *et al.*, 1999). In Lysaten von THP-1-Zellen, wurde mehr unglykosyliertes als glykosyliertes BAFF detektiert. Die Behandlung mit C3 führte zu einer Akkumulation der unglykosylierten Form während in mit GM6001 behandelten Zellen mehr glykosyliertes BAFF nachgewiesen wurde. Auf das zellassoziierte lösliche BAFF hatten die Inhibitoren keinen Einfluss. In primären, aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten, differenzierten Makrophagen (BM-DMs) konnte in BACE1-defizienten Zellen eine Akkumulation des unglykosylierten BAFF beobachtet werden. Von dem etwas größeren, glykosylierten BAFF wurde in Wildtyp- und BACE1^{-/-} Makrophagen nur sehr wenig Protein detektiert werden. Eine mögliche Ursache für das beobachtete Phänomen könnte

auf eine gestörte Glykosylierung durch die Inhibition von BACE1 hindeuten. Eine andere Ursache könnte die präferentielle Spaltung von glykosyliertem BAFF durch eine Metalloprotease und von unglykosyliertem BAFF durch BACE1 sein. Die Inhibition einer dieser Proteasen würde dann zur Akkumulation der jeweiligen Form von BAFF führen.

Die Größe von löslichem BAFF liegt bei ca. 18 kDa (Schneider *et al.*, 1999). In dem Makrophagen konnte zusätzlich zu 18 kDa löslichem BAFF eine zusätzliche Bande bei 15 kDa detektiert werden. In Wildtyp-Makrophagen war die 18 kDa Bande schwächer und die 15 kDa Bande stärker als in BACE1^{-/-} Makrophagen. Da von Schneider *et al.* beschrieben wurde, dass PNGaseF keinen Einfluss auf die Größe von löslichem BAFF hat, ist der Größenunterschied wahrscheinlich nicht auf unterschiedliche Glykosylierung des BAFF-Fragments zurückzuführen.

Ein Grund für die unterschiedlichen Konzentrationen an 15 und 18 kDa großem, löslichem BAFF in Wildtyp- und BACE1^{-/-} Makrophagen könnte die Beteiligung von zwei verschiedenen Proteasen an der Prozessierung von BAFF sein. Bisher konnte die für die *in vivo* Prozessierung von BAFF zuständige Protease nicht identifiziert werden. Da BAFF membranproximal eine zu Furinspaltungsstellen homologe Sequenz besitzt (Schneider *et al.*, 1999), wird angenommen, dass eine Furinprotease für die Prozessierung von BAFF verantwortlich ist. Da in BACE1-defizienten Makrophagen die kleinere 15 kDa Form von löslichem BAFF zwar reduziert, aber dennoch präsent war, ist eine direkte Prozessierung von BAFF durch BACE1 fraglich. In Milzlysaten von BACE1-defizienten Mäusen konnte ebenfalls eine Akkumulation von BAFF im Vergleich zu Wildtyp-Milzen beobachtet werden. In Wildtyp-Milzen lagen beide Formen von löslichem BAFF in höherer Konzentration vor als in BACE1^{-/-} Milzen.

Ein Grund für die unterschiedlichen Einflüsse der BACE1-Defizienz auf die löslichen BAFF-Formen könnte sein, dass im Gegensatz zu den isolierten Makrophagen die Milz aus einer Vielzahl von Zelltypen besteht, darunter auch dendritische Zellen, die eine weitere Quelle für BAFF darstellen. Weiterhin waren die Makrophagen bedingt durch die Präparation und Differenzierung in einem stark aktivierten Zustand, was für die Milzzellen nicht der Fall war.

Die BAFF-Konzentration im Serum von BACE1-defizienten Mäusen unterschied sich nicht von Wildtyp-Seren. Das Fehlen von BACE1 hat im Mausmodell somit keinen Einfluss auf die Menge an löslichem BAFF im Blut und die proteolytische Prozessierung von BAFF durch

BACE1 ist wahrscheinlich nicht die Ursache für den beobachteten B-Phänotyp der BACE1-defizienten Maus.

5.2.3. ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)

Bei der FACS-Analyse von Milzzellen fiel auf, dass ICAM-1 positive Zellen aus Milzen von BACE1-defizienten Milzen signifikant mehr ICAM-1 auf der Zelloberfläche exprimierten als Wildtyp-Zellen. Dies führte zu der Theorie, dass BACE1 eventuell ICAM-1 von der Zelloberfläche abspalten kann und daher auf BACE1-defizienten Zellen mehr ICAM-1 zu finden ist. In Überexpressionsversuchen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Auch bei der Untersuchung der ICAM-1-Proteinexpression und -Prozessierung in verschiedenen Geweben aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen konnten keine eindeutigen Belege für Prozessierung von ICAM-1 durch BACE1 gefunden werden. In Niere, Thymus und Herz konnte kein Unterschied in der Menge an exprimiertem ICAM-1 zwischen Wildtyp- und BACE1^{-/-} Organen beobachtet werden. In Lunge und Pankreas von BACE1^{-/-} Mäusen wurde etwas mehr, in der Milz dagegen etwas weniger ICAM-1 detektiert als in Wildtyp-Organen. Widersprüche in den erhaltenen Ergebnissen zwischen den einzelnen Organen zeigten sich auch für die C-terminalen Spaltprodukte (CTF) von ICAM-1; In Lysaten von BACE1-defizienten Mäusen konnte mehr ICAM-1-CTF nachgewiesen werden als in Wildtyp-Milzen, wogegen im Pankreas, das kein aktives BACE1-Protein exprimiert (Bodendorf *et al.*, 2001), im Wildtyp ein C-terminales Fragment detektiert wurde, im BACE1^{-/-} Organ jedoch nicht.

Da nach Überexpression von ICAM-1 und BACE1 die Bildung von C-terminalen Fragmenten nicht beobachtet werden konnte und die *in situ* Ergebnisse sehr widersprüchlich waren, wurde ICAM-1 als BACE1-Substrat ausgeschlossen.

5.3. Einfluss von BACE1 auf die Maturierung und Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17

An der Prozessierung von β APP sind die β -Sekretase BACE1, mehrere α -Sekretasen, sowie der γ -Sekretase-Komplex beteiligt. Die α - und β -Sekretase konkurrieren um β APP als Substrat, da der Schnitt der einen Protease den der anderen ausschließt (siehe 1.2). In Gehirnen von Alzheimer-Patienten ist das Gleichgewicht der α - und β -Sekretase zu Gunsten von BACE1 verschoben, was zu einer vermehrten Prozessierung von β APP über den amyloidogenen, A β -produzierenden Weg führt. Die Inhibition der α -Skretase begünstigt die

Prozessierung von β APP durch BACE1 und umgekehrt (Zacchetti *et al.*, 2007). Aufgrund des komplexen Zusammenspiels der α - und β -Sekretase wurde untersucht, ob BACE1 die Expression und Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 beeinflussen kann. So konnte für TRANCE zwar ein Einfluss von BACE1 auf dessen Prozessierung beobachtet werden, die direkte Prozessierung von TRANCE durch BACE1 konnte jedoch nicht eindeutig belegt werden.

TRANCE wird von einer oder mehreren ADAM-Proteasen gespalten (Hikita *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2005). Dies führte zu der Überlegung, ob der beobachtete Effekt auf die Expression und Prozessierung von TRANCE durch BACE1 indirekt über eine Beeinflussung der Expression und Aktivität von ADAM17 erfolgte.

Zur Überprüfung dieser Theorie wurde die Expression von ADAM10 und ADAM17 im Westernblot, als auch die Aktivität der Proteasen in einem Peptid-Spaltungs-Versuch, in Abhängigkeit oder Abwesenheit von BACE1 untersucht. Da in diesem Zusammenhang bisher erst einzelne Versuche durchgeführt wurden, die teilweise noch nicht reproduziert wurden, sollten die bisher erhaltenen Daten unter Vorbehalt betrachtet werden.

In BACE1-defizienten murinen, embryonalen Fibroblasten konnte auf Proteinebene eine geringere Expression der maturen, proteolytisch aktiven Formen von ADAM10 und ADAM17 beobachtet werden. In SHS-5Y Zellen, die stabil humanes BACE1 überexprimierten, wurde mehr matures ADAM17 detektiert als in untransfizierten Zellen; die Expression von maturem ADAM10 war nicht verändert. Diese ersten Ergebnisse deuten an, dass BACE1 einen Einfluss auf die Reifung von ADAM17 und eventuell auch von ADAM10 haben könnte.

ADAM-Proteasen werden als Zymogene exprimiert, die erst nach der Abspaltung der Pro-Domäne proteolytisch aktiv sind (Nagase, 1997). Wenn das Fehlen von BACE1 zu weniger und die Überexpression zu mehr maturem ADAM17 führt, müsste sich dies in einer veränderten ADAM17 Aktivität in den entsprechenden Zellen widerspiegeln. In einem Peptid-Spaltungs-Versuch, der eine hohe Spezifität für ADAM17 besitzt, konnten die Beobachtungen, die für die Proteinexpression von ADAM17 in Abhängigkeit von BACE1 gemacht wurden, bestätigt werden. In Lysaten von BACE1-defizienten MEFs wurde etwa 50% weniger Peptid gespalten als in Lysaten von Wildtyp-MEFs. Die Überexpression von BACE1 in SHS-5Y Zellen führte dagegen zu einer 40%-igen Zunahme der Peptidumsetzung. Um auszuschließen, dass BACE1 an der Peptidspaltung beteiligt ist, wurde der Versuch mit einem BACE1-Inhibitor wiederholt. Während die Inhibition von BACE1 keinen Einfluss auf die

Peptidspaltung hatte, konnte diese durch einen Breitband-Metalloprotease-Inhibitor stark reduziert werden.

Um zu überprüfen, ob die Defizienz von BACE1 auch *in vivo* einen Einfluss auf die Maturierung von ADAM10 und ADAM17 und die Aktivität von ADAM17 hat, wurden die Versuche mit Lysaten von Gehirn und Leber aus BACE1^{+/+} und BACE1^{-/-} Mäusen wiederholt.

In Lysat von BACE1-defizientem Gehirn wurde insgesamt weniger ADAM17 detektiert als in Wildtyp-Lysaten. Die Expression von Pro-ADAM10 war gegenüber Wildtyp-Gehirnlysaten leicht erhöht. In der Leber war der Effekt der BACE1-Defizienz auf die Expression von ADAM10 und ADAM17 ausgeprägter. In Leberlysaten von Wildtyp-Tieren konnte deutlich mehr matures und weniger immatures ADAM10 als in BACE1-defizienten Lysaten detektiert werden. Pro-ADAM17 war in den BACE1^{-/-} Leberlysaten stark akkumuliert. In Gehirnllysaten von BACE1-defizienten Mäusen war die Aktivität von ADAM17 etwa 14% und in Leberlysaten etwa 24% niedriger ist als in Wildtyp-Kontrollgeweben. Eine Beeinflussung der ADAM10- und ADAM17-Expression auf Transkriptionsebene konnte ausgeschlossen werden. Weder in BACE1 überexprimierenden SHS-5Y Zellen, noch in BACE1-defizienten MEFs und Gehirnproben, konnte eine veränderte Transkription von ADAM10 und ADAM17 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein wichtiger Prozess für die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 ist die Abspaltung der Pro-Domäne, durch eine Pro-Protein-Konvertase (Nagase, 1997). Pro-Protein-Konvertasen sind Serin-Proteasen, die durch die Abspaltung der Pro-Domänen zahlreicher Vorläuferproteine diese in ihre biologisch aktive Form umwandeln. Für die Maturierung von ADAM17 ist hauptsächlich Furin verantwortlich (Peiretti *et al.*, 2003). Es wurde aber auch für zahlreiche andere Pro-Protein-Konvertasen eine Prozessierung von ADAM17 beschrieben (Srouf *et al.*, 2003). Die Abspaltung der Pro-Domäne durch Furin geschieht vorwiegend intrazellulär auf dem sekretorischen Weg, im Trans-Golgi Netzwerk und den Endosomen (Endres *et al.*, 2003; Seals and Courtneidge, 2003). Da auch BACE1 über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran gelangt und in Endosomen internalisiert wird, besteht die Möglichkeit einer direkten Interaktion von ADAM10, ADAM17 oder Furin mit BACE1. Durch Proteininteraktions-Studien, wie Koimmunopräzipitation, Yeast-Two-Hybrid oder Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer- (FRET) Mikroskopie, könnte eine direkte Interaktion der Proteine nachgewiesen werden. BACE1 könnte dabei entweder selbst an der Abspaltung

der Pro-Domäne beteiligt sein oder die Prozessierung indirekt beeinflussen, indem es über noch unbekannte Mechanismen die Aktivität der Pro-Protein-Konvertase reguliert.

Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Expression und Aktivität der ADAM Proteasen haben, sind die subzelluläre Lokalisation, die Aktivierung der Protease-Aktivität nach Stimulation der Zellen, die anschließende Internalisation der aktiven Protease und deren Degradierung (Endres *et al.*, 2003; Seals and Courtneidge, 2003). Wie BACE1 ist auch ADAM17 in cholesterolreichen Mikrodomänen der Plasmamembran (auch als Lipid Rafts oder detergentresistente Mikrodomänen bezeichnet) angereichert (Eehalt *et al.*, 2003; Tellier *et al.*, 2006; Wakatsuki *et al.*, 2004). Die Anreicherung von verschiedenen Proteinen in Mikrodomänen der Plasmamembran ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus. So wird die Proteolyse vieler ADAM17-Substrate durch die „Sortierung“ von Protease und Substrat in unterschiedliche Domänen limitiert. Die Prozessierung einiger ADAM17-Substrate, wie β APP (Kojro *et al.*, 2001) oder $\text{TNF}\alpha$, wurde durch cholesterolsenkende Substanzen und die Auflösung der „Raft“ Struktur erhöht (Tellier *et al.*, 2006).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Abspaltung der Pro-Domäne von ADAM17 durch die Furinprotease in cholesterolreichen Mikrodomänen stattfindet (Tellier *et al.*, 2006). Eine Beeinflussung der Membranfluidität, über die Cholesterol-Homöostase, durch BACE1 hätte somit direkten Einfluss auf die Maturierung von ADAM17.

Ein wichtiger Regulator der Membranfluidität ist Cholesterol. Neue Studien zeigen, dass Cholesterol die Produktion von $\text{A}\beta$ beeinflusst. Bei Kaninchen und β APP-transgenen Mäusen führte eine cholesterolangereicherte Diät zu einer verstärkten Bildung von $\text{A}\beta$, während eine Reduktion der Cholesterolkonzentration *in vitro* und *in vivo* zur verminderten Generierung von $\text{A}\beta$ führt (Fassbender *et al.*, 2001; Refolo *et al.*, 2000; Refolo *et al.*, 2001; Shie *et al.*, 2002).

Umgekehrt führten erhöhte $\text{A}\beta$ Konzentrationen in mehr zellulärem Cholesterol (Grimm *et al.*, 2005). Bisher wurde die Wirkung von Cholesterol auf die gesteigerte Generierung von $\text{A}\beta$ und umgekehrt der Einfluss von $\text{A}\beta$ auf die Cholesterol Homöostase, nur in Bezug auf die γ -Sekretase, welche durch die Prozessierung von β APP in der Membran für die Abspaltung von $\text{A}\beta$ von der Membran verantwortlich ist, untersucht. Welche Rolle BACE1 bei diesen Prozessen spielt, wurde bisher noch nicht diskutiert, obwohl der Schnitt der β -Sekretase essentiell für die Entstehung des $\text{A}\beta$ -Peptids ist.

Wenn sich die Beobachtungen, dass BACE1 einen Einfluss auf die Maturierung von ADAM17 hat, bestätigen lassen, würde dies eine neue, noch unbekannt Funktion von BACE1 beschreiben.

5.4. Prozessierung der $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen durch BACE1 und der Einfluss von BACE1 auf die Aktivierung von Nav1.2 α

Anlass für die Untersuchung der Auswirkungen von BACE1 auf die Aktivierung des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.2 α waren Berichte, wonach die $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten der Natriumkanäle Substrate von BACE1 darstellen (Kim *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2005). Eigene Versuche im Zellkultursystem konnten dies bestätigen.

In HEK293-Zellen bewirkte die transiente Koexpression von Nav1.2 α mit $\beta 2$ und/oder $\beta 4$ eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve in Richtung Hyperpolarisation verglichen mit Zellen, die nur den Natriumkanal exprimierten. Für die Aktivierung der Kanäle bedeutet eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve, dass sich die Kanäle früher, das heißt bei niedrigerem Membranpotential, öffnen und bei einem konstanten Membranpotential mehr Kanäle geöffnet sind.

Der Verlust oder die Reduktion der funktionalen $\beta 2$ -Untereinheit durch die proteolytische Prozessierung durch BACE1 resultierte wie erwartet in einer deutlich geringeren Linksverschiebung der Aktivierungskurve und die Inhibition von BACE1 hob diesen Effekt teilweise wieder auf. In Kontrast dazu standen die Ergebnisse, die für die $\beta 4$ -Untereinheit und BACE1 erzielt wurden: Die Kotransfektion von Nav1.2 α , $\beta 4$ und BACE1 führte zu einer stärkeren Linksverschiebung der Aktivierungskurve, als es in Zellen, die nur Nav1.2 α und $\beta 2$ überexprimierten, beobachtet wurde. Die Inhibition von BACE1 konnte diese starke Hyperpolarisierung zwar reduzieren, jedoch nicht vollständig aufheben.

Durch die Koexpression der Spaltprodukte der β -Untereinheiten mit Nav1.2 α , konnte ausgeschlossen werden, dass der unerwartete Effekt von BACE1 auf die Aktivierung des Kanals direkt durch die Prozessierung der β -Untereinheiten durch BACE1 hervorgerufen wird.

Diese Beobachtungen führten zu der Theorie, dass BACE1 einen von der Proteolyse der β -Untereinheiten unabhängigen Effekt auf die Aktivierung von Nav1.2 α haben könnte. Dies konnte durch die Koexpression von Nav1.2 α mit BACE1 bestätigt werden. Dass sowohl die

aktive, als auch die inaktive BACE1-Mutante eine signifikante Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkte, führte zusätzlich zu der Überlegung, dass der Effekt von BACE1 auf die Aktivierung des Natriumkanals unabhängig von der enzymatischen Aktivität von BACE1 ist.

Unter Einbeziehung aller gewonnenen Daten wird ein Modell postuliert, nach dem BACE1 ebenfalls, wie die klassischen β -Untereinheiten, modulatorisch auf Nav1.2 α wirken kann. Es wird vermutet, dass BACE1 mit derselben Domäne des Natriumkanals interagiert wie $\beta 2$ oder durch die Bindung von BACE1 an den Natriumkanal die Interaktion von $\beta 2$ mit dem Kanal gestört wird (Abb. 46). Für dieses Modell spricht, dass sowohl das Wildtyp-BACE1 als auch die katalytisch inaktive Mutante denselben Effekt auf die Aktivierung des Natriumkanals hatte wie $\beta 2$. Ein weiteres Indiz ist, dass inaktives BACE1 in Gegenwart von $\beta 2$ keinen zusätzlichen Effekt auf die Aktivierung des Natriumkanals hatte, während es in Kombination mit $\beta 4$, welches eine andere Domäne von Nav1.2 α als $\beta 2$ besetzt, eine zusätzliche Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkte.

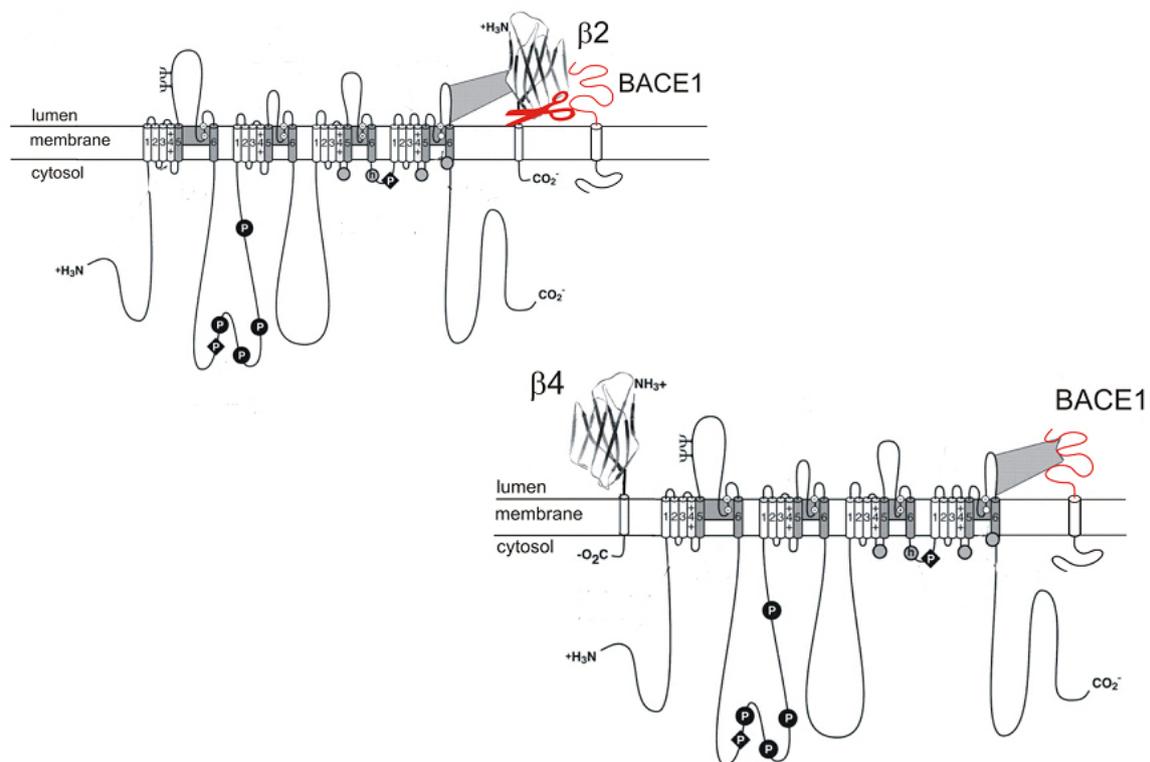


Abbildung 46: Modell zur Interaktion von BACE1 mit Nav1.2 α

Oben: In Gegenwart der $\beta 2$ -Untereinheit konkurrieren BACE1 und $\beta 2$ um dieselbe Bindungsstelle des Natriumkanals. Unten: Die $\beta 4$ -Untereinheit besetzt eine andere Stelle des Natriumkanals als BACE1, wodurch beide Proteine modulatorisch auf den Kanal wirken können (Graphik modifiziert nach Catterall, 2000)

Mittels Koimmunopräzipitation (Daten nicht gezeigt) wurde versucht, die Interaktion von BACE1 und Nav1.2 α nachzuweisen. In ersten Versuchen konnten Nav1.2 α und BACE1 nach Überexpression in HEK293T-Zellen und endogen aus Gehirnllysat koimmunopräzipitiert werden, es war jedoch nicht möglich dies in weiteren Versuchen zu reproduzieren. Der Natriumkanal besitzt mit 260 kDa ein sehr hohes Molekulargewicht und ist durch seine 24 Transmembrandomänen stark hydrophob. Dadurch eignen sich die gängigen Protokolle für biochemische Interaktionsstudien nicht für dieses System. Als eine Alternative zur Koimmunopräzipitation zum Nachweis der Interaktion von Nav1.2 α und BACE1, wurde daher eine auf Fluoreszenzmikroskopie basierende Methode gewählt, in der die potentiellen Interaktionspartner mit je einer Hälfte des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) fusioniert werden. Erst wenn die halben YFP-Moleküle Kontakt zu einander haben, bilden sie ein funktionales Fluorophor (Hu and Kerppola, 2003). Da die Klonierung zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen war, konnten noch keine Daten gewonnen werden.

Strukturanalysen könnten erste Hinweise geben, wie und zwischen welchen Domänen die Interaktion von BACE1 und Nav1.2 α stattfindet. Durch die Erzeugung von Mutationen innerhalb der potentiellen Interaktionsdomänen von BACE1 oder Nav1.2 α und die Untersuchung der Auswirkungen auf die Aktivierungskurve des Kanals, könnten Aufschluss über die Art der Interaktion geben.

Kim *et al.* hat beschrieben, dass eine vermehrte Generierung des C-terminale Fragments von β 2 zu einer intrazellulären Akkumulation und zu einer reduzierten Oberflächenexpression des Natriumkanals Nav1.1 α führt (Kim *et al.*, 2007). Die verstärkte Prozessierung der β 2-Untereinheit in Gehirnen von Alzheimer-Patienten und die dadurch veränderte Expression an Natriumkanälen legt die Vermutung nahe, dass die subzelluläre Lokalisation und Aktivität der Natriumkanäle durch die Krankheit beeinflusst werden. Mutationen von Natriumkanälen stehen in Zusammenhang mit epileptischen Erkrankungen und Alzheimer-Patienten besitzen ein erhöhtes Risiko für epileptische Anfälle (Amatniek *et al.*, 2006; Spanpanato *et al.*, 2001). Eine Ursache für das vermehrte Auftreten von Epilepsien bei Alzheimer-Patienten könnte daher auf die gesteigerte Prozessierung der β 2-Untereinheit zurückzuführen sein. Welche Rolle dabei der hier beschriebene direkte Einfluss von BACE1 auf die Aktivierung von

Nav1.2 α spielt, muss noch geklärt werden. Weiterhin muss gezeigt werden, ob BACE1 auch auf andere Natriumkanäle modulatorisch wirken kann.

6. Zusammenfassung

Die Alzheimersche Erkrankung ist die häufigste altersbedingte Form der Demenz. Bisher gibt es keine wirksame Therapie, die den Ausbruch und die Progression der Krankheit verhindern kann. Einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie stellt zur Zeit die Inhibition der β -Sekretase BACE1 dar. Die Aspartat-Protease BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme*) ist an der Generierung des neurotoxischen Amyloid β -Peptids beteiligt und trägt somit maßgeblich zur molekularen Pathogenese der Alzheimer-Krankheit bei.

Neben dem β -Amyloid-Vorläufer-Protein β APP konnten zahlreiche weitere Substrate von BACE1 identifiziert werden. Diese Substrate sind unter anderem an immunologischen Prozessen (PSGL-1, St6Gall, IL1-RII) und an der Erregbarkeit von Neuronen (Untereinheiten der spannungsabhängigen Natriumkanäle $\beta 2/\beta 4$) beteiligt. Über die genaue physiologische Funktion von BACE1 ist bisher jedoch wenig bekannt.

Die phänotypischen und biochemischen Untersuchungen eines BACE1-defizienten Mausmodells sollten näheren Einblick für die Bedeutung von BACE1 *in vivo* geben. Ein wichtiger Ansatz waren dabei Studien zur Funktion und Regulation des Immunsystems. Es zeigte sich, dass der Verlust von BACE1 in Mäusen zu einer Reduktion der B-Zellen in der Milz, sowie zu niedrigeren Immunglobulinkonzentrationen im Serum führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BACE1-defiziente Mäuse anfälliger auf eine Infektion mit dem pathogenen Mikroorganismus *Listeria monocytogenes* reagierten als Wildtyp-Tiere.

Eine mögliche Erklärung für diese immunologischen Defekte der BACE1-defizienten Mäuse könnte eine gestörte proteolytische Prozessierung von immunologisch relevanten Substraten darstellen. Deshalb stand die Identifizierung noch unbekannter Substrate von BACE1 im Vordergrund. Untersucht wurden der B-Zell aktivierende Faktor BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*), TRANCE (*tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine*) und ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*). Es konnte gezeigt werden, dass BACE1 TRANCE nach Überexpression im Zellkulturmodell proteolytisch spaltet. Allerdings konnte eine auf das Mausmodell übertragene Relevanz *in vivo* bisher nicht gezeigt werden. Für BAFF und ICAM-1 konnte eine proteolytische Prozessierung durch BACE1 nicht eindeutig belegt werden.

Die gezielte Proteolyse der Ektodomäne von β APP erfolgt entweder durch BACE1, das den N-Terminus von A β generiert, oder durch eine α -Sekretase, welche innerhalb der A β Sequenz

schneidet und somit die Erzeugung von A β verhindert. Da die beiden Sekretasen um β APP als Substrat konkurrieren, führt die Inhibition der einen Protease zu einer vermehrten Prozessierung durch die andere Protease. In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob BACE1 die Expression und Aktivität der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 beeinflusst. Erste Daten deuten an, dass BACE1 die Reifung und Aktivität der α -Sekretase ADAM17 beeinflussen könnte. In BACE1-defizienten Zellen und Geweben wurde eine Akkumulation der proteolytisch inaktiven Pro-Form sowie eine geringere proteolytische Aktivität von ADAM17 beobachtet. Die Überexpression von BACE1 resultierte dagegen in einer erhöhten ADAM17-Aktivität.

Eine völlig neue, proteolyse-unabhängige Funktion von BACE1 konnte bei elektro-physiologischen Analysen des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.2 α beobachtet werden. BACE1 beeinflusst die Aktivierung von Nav1.2 α über die Proteolyse seiner modulatorischen Untereinheiten β 2 und β 4, bewirkt aber auch unabhängig von den β -Untereinheiten eine erhöhte Aktivierbarkeit des Kanals.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass BACE1 im Gegensatz zu bisherigen Annahmen, an vielen weiteren und komplexeren zellulären und systemischen Prozessen beteiligt ist. Intensivere Studien des Immunsystems von BACE1-defizienten Mäusen, insbesondere der B-Zellreifung und der Listerienabwehr, sowie die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen bezüglich der Reifung von ADAM17 und der Modulation der Natriumkanäle durch BACE1 könnten diese Hypothese bestätigen.

7. Summary

Alzheimer disease is the most common form of dementia in elderly people. Until now no potent therapy against the onset and progression of the disease is available. As a promising basic approach for such therapy, the inhibition of the β -secretase BACE1 (β APP cleaving enzyme 1) is discussed. The aspartyl protease BACE1 initiates the generation of the neurotoxic amyloid β peptide ($A\beta$) and is therefore one of the key players in the molecular pathogenesis of Alzheimer disease.

In addition to the amyloid precursor protein (β APP) several other substrates for BACE1 could be identified. Those substrates are involved in immunity (PSGL-1, St6Gall, IL1-RII) and in neuronal excitability (VGSC β 2/ β 4) among other functions. However the exact physiological function of BACE1 remains elusive.

To gain further insight into the *in vivo* function of BACE1, BACE1 deficient mice were analyzed with regard to the role of this protease in the immune system. Loss of BACE1 *in vivo* led to a decreased number of splenic B-cells as well as reduced levels of serum immunoglobulin. Furthermore, the fact that BACE1 deficient mice are more susceptible to infection with *Listeria monocytogenes* when compared with wildtype mice could be conveyed. A possible explanation for the observed immunological defects may be the impaired proteolysis of immunological relevant BACE1 substrates. Therefore, the identification of novel substrates for BACE1 was another emphasis of this work.

The transmembrane proteins BAFF (*B cell-activating factor belonging to the TNF family*), TRANCE (*tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine*) and ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) were analyzed. TRANCE was shown to be processed by BACE1 after over-expression in cultured cells, however, no *in vivo* relevance could be proven. BAFF and ICAM-1 could not be identified as physiological substrates for BACE1.

The targeted proteolysis of the β APP ectodomain occurs either by BACE1, which generates the N-terminus of $A\beta$ or by an α -secretase that cleaves inside the $A\beta$ sequence of β APP and therefore prevents the generation of $A\beta$. Since both enzymes compete for their substrate, the inhibition of one of the secretases leads to increased processing of β APP by the other secretase. Thus, another approach of this work was to investigate whether BACE1 affects the expression and activity of the α -secretases ADAM10 and ADAM17. Preliminary results indicate that BACE1 impairs the maturation and activity of ADAM17. In BACE1 deficient cells

and tissues the accumulation of pro-ADAM17 and reduced ADAM17 proteolytic activity was observed. In contrast, the over-expression of BACE1 led to increased ADAM17 activity.

A completely new non-proteolytic function of BACE1 could be observed when the electrophysiological properties of the voltage gated sodium channel, Nav1.2 α were analyzed. BACE1 produced complex effects on the sodium channel gating that could be only partially explained by the cleavage of the auxiliary β -subunits of the channel, which are substrates for BACE1. Co-expression of Nav1.2 α with BACE1 led to increased excitability independent from the β -subunits and BACE1 proteolytic activity.

Results from this work indicate that BACE1 is involved in much more complex cellular and systemic processes than previously assumed. Intensive studies of the immune system in BACE1 deficient mice, especially of B-cell development and host defense against *Listeria monocytogenes*, the investigation of the mechanisms of impaired ADAM17 maturation and the modulatory effects of BACE1 on channel gating could support this hypothesis.

Literaturverzeichnis

- Acquati, F., et al., 2000. The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett.* 468, 59-64.
- Allsop, D., et al., 1983. The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res.* 259, 348-52.
- Alvarez-Dominguez, C., et al., 2000. The contribution of both oxygen and nitrogen intermediates to the intracellular killing mechanisms of C1q-opsonized *Listeria monocytogenes* by the macrophage-like IC-21 cell line. *Immunology.* 101, 83-9.
- Alvarez-Iglesias, M., et al., 2005. Continuous real-time measurement of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme activity on live cells. *Lab Invest.* 85, 1440-8.
- Alzheimer, A., 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med.* 64, 146-148.
- Amatniek, J. C., et al., 2006. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia.* 47, 867-72.
- Apelt, J., et al., 2003. Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci Lett.* 339, 183-6.
- Arispe, N., et al., 1993. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 10573-7.
- Baker, K. P., 2004. BLyS--an essential survival factor for B cells: basic biology, links to pathology and therapeutic target. *Autoimmun Rev.* 3, 368-75.
- Basi, G., et al., 2003. Antagonistic effects of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzymes 1 and 2 on beta-amyloid peptide production in cells. *J Biol Chem.* 278, 31512-20.
- Bean, B. P., 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci.* 8, 451-65.
- Benjannet, S., et al., 2001. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem.* 276, 10879-87.
- Bennett, B. D., et al., 2000. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem.* 275, 37712-7.
- Bentahir, M., et al., 2006. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem.* 96, 732-42.
- Black, R. A., et al., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 385, 729-33.
- Bodendorf, U., et al., 2001. A splice variant of beta-secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 276, 12019-23.
- Braak, H., et al., 1996. Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 210, 87-90.
- Brown, M. S., et al., 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 100, 391-8.

- Burgess, T. L., et al., 1999. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 145, 527-38.
- Buxbaum, J. D., et al., 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, 27765-7.
- Cai, H., et al., 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 4, 233-4.
- Capell, A., et al., 2000. Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem.* 275, 30849-54.
- Catterall, W. A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 26, 13-25.
- Charlwood, J., et al., 2001. Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta-secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. *J Biol Chem.* 276, 16739-48.
- Cheema, G. S., et al., 2001. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 44, 1313-9.
- Chen, C., et al., 2002. Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 17072-7.
- Chiang, P. K., et al., 2008. The many faces of amyloid beta in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med.* 8, 580-4.
- Citron, M., et al., 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature.* 360, 672-4.
- Cole, S. L., Vassar, R., 2007. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener.* 2, 22.
- Conlan, J. W., 1996. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J Med Microbiol.* 44, 295-302.
- Conlan, J. W., North, R. J., 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J Exp Med.* 174, 741-4.
- Conlan, J. W., North, R. J., 1994. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med.* 179, 259-68.
- Craxton, A., et al., 2003. Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood.* 101, 4464-71.
- Creemers, J. W., et al., 2001. Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem.* 276, 4211-7.
- Crocker, P. R., Varki, A., 2001. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.* 22, 337-42.
- Czuprynski, C. J., et al., 1994. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 152, 1836-46.
- Dai, W. J., et al., 1997. Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of *Listeria monocytogenes*-infected IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol.* 158, 5297-304.
- Daridon, C., et al., 2008. BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who? *Autoimmun Rev.* 7, 267-71.
- De Strooper, B., et al., 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 391, 387-90.

- Dickson, T. C., et al., 1997. Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 23, 483-91.
- Domann, E., et al., 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo J.* 11, 1981-90.
- Dominguez, D., et al., 2005. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem.* 280, 30797-806.
- Doody, G. M., et al., 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science.* 269, 242-4.
- Dramsai, S., et al., 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol.* 16, 251-61.
- Drevets, D. A., et al., 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun.* 63, 4268-76.
- Dustin, M. L., et al., 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 137, 245-54.
- Ehehalt, R., et al., 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 160, 113-23.
- El Khoury, J. B., et al., 2003. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med.* 197, 1657-66.
- Endres, K., et al., 2003. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem.* 270, 2386-93.
- Endres, R., et al., 1997. Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity.* 7, 419-32.
- Esch, F. S., et al., 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248, 1122-4.
- Essick, E., et al., 2008. Pervanadate-induced shedding of the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ectodomain is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Mol Cell Biochem.* 314, 151-9.
- Fassbender, K., et al., 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5856-61.
- Fischer, F., et al., 2002. The disulphide bonds in the catalytic domain of BACE are critical but not essential for amyloid precursor protein processing activity. *J Neurochem.* 80, 1079-88.
- Friedhoff, P., et al., 2000. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta.* 1502, 122-32.
- Fuller, K., et al., 2002. TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology.* 143, 1108-18.
- Garlind, A., et al., 1999. Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 826, 112-6.
- Gavin, A. L., et al., 2003. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. *J Biol Chem.* 278, 38220-8.

- Geusens, P. P., et al., 2006. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum.* 54, 1772-7.
- Goldgaber, D., et al., 1987. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science.* 235, 877-80.
- Grimm, M. O., et al., 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol.* 7, 1118-23.
- Gross, J. A., et al., 2000. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature.* 404, 995-9.
- Grundke-Iqbal, I., et al., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4913-7.
- Haass, C., 2004. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J.* 23, 483-8.
- Hanasaki, K., et al., 1995a. Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. *J Biol Chem.* 270, 7543-50.
- Hanasaki, K., et al., 1995b. CD22-mediated cell adhesion to cytokine-activated human endothelial cells. Positive and negative regulation by alpha 2-6-sialylation of cellular glycoproteins. *J Biol Chem.* 270, 7533-42.
- Haniu, M., et al., 2000. Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem.* 275, 21099-106.
- Hanlon, M. R., Wallace, B. A., 2002. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry.* 41, 2886-94.
- Harrison, S. M., et al., 2003. BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol Cell Neurosci.* 24, 646-55.
- He, X., et al., 2002. Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS Lett.* 524, 183-7.
- He, X., et al., 2005. GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem.* 280, 11696-703.
- Hennet, T., et al., 1998. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4504-9.
- Hikita, A., et al., 2006. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem.* 281, 36846-55.
- Hong, L., et al., 2000. Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science.* 290, 150-3.
- Hsu, B. L., et al., 2002. Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol.* 168, 5993-6.
- Hu, C. D., Kerppola, T. K., 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol.* 21, 539-45.
- Hu, X., et al., 2008. Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *Faseb J.*
- Hu, X., et al., 2006. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci.* 9, 1520-5.
- Huard, B., et al., 2004. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol.* 16, 467-75.

- Huse, J. T., et al., 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem.* 275, 33729-37.
- Hussain, I., et al., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14, 419-27.
- Isom, L. L., 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist.* 7, 42-54.
- Isom, L. L., 2002. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci.* 7, 12-23.
- Isom, L. L., et al., 1995a. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell.* 83, 433-42.
- Isom, L. L., et al., 1995b. Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line. *J Biol Chem.* 270, 3306-12.
- Jarrett, J. T., et al., 1993. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 32, 4693-7.
- Khare, S. D., et al., 2000. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 3370-5.
- Kim, D. Y., et al., 2007. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol.* 9, 755-64.
- Kim, D. Y., et al., 2005. Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration. *J Biol Chem.* 280, 23251-61.
- Kim, H. R., et al., 2006. Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappaB ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology (Oxford).* 45, 1197-200.
- Kitazume, S., et al., 2005. In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *J Biol Chem.* 280, 8589-95.
- Kitazume, S., et al., 2001. Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 13554-9.
- Kojro, E., et al., 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5815-20.
- Kong, Y. Y., et al., 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 397, 315-23.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 269, 17386-9.
- Kuhn, P. H., et al., 2007. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem.* 282, 11982-95.
- Kumar-Singh, S., et al., 2006. Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat.* 27, 686-95.
- Kurihara, T., et al., 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 186, 1757-62.
- Lacey, D. L., et al., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93, 165-76.
- Ladel, C. H., et al., 1996. Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes. *Infect Immun.* 64, 1744-9.

- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-5.
- LaFerla, F. M., et al., 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 8, 499-509.
- Laird, F. M., et al., 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci*. 25, 11693-709.
- Lammich, S., et al., 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, 3922-7.
- Lazarov, V. K., et al., 2006. Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 6889-94.
- Lee, W., et al., 2004. Amyloid beta peptide directly inhibits PKC activation. *Mol Cell Neurosci*. 26, 222-31.
- Levy-Lahad, E., et al., 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269, 973-7.
- Levy, E., et al., 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 248, 1124-6.
- Li, Q., Sudhof, T. C., 2004. Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem*. 279, 10542-50.
- Lichtenthaler, S. F., et al., 2003. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem*. 278, 48713-9.
- Lin, X., et al., 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 1456-60.
- Liu, W., Lu, G., 2002. [Construction and expression of APP(SWE) transgenic mice model]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 19, 104-7.
- Lleo, A., 2008. Activity of gamma-secretase on substrates other than APP. *Curr Top Med Chem*. 8, 9-16.
- Luo, Y., et al., 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*. 4, 231-2.
- Lynch, C. C., et al., 2005. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell*. 7, 485-96.
- Mackaness, G. B., 1962. Cellular resistance to infection. *J Exp Med*. 116, 381-406.
- Mackay, F., et al., 2003. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*. 21, 231-64.
- Mackay, F., et al., 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*. 190, 1697-710.
- Malhotra, J. D., et al., 2000. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem*. 275, 11383-8.
- Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 8, 425-7.
- Marsters, S. A., et al., 2000. Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol*. 10, 785-8.
- Mengaud, J., et al., 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol*. 5, 367-72.

- Mengaud, J., et al., 1987. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun.* 55, 3225-7.
- Moore, P. A., et al., 1999. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science.* 285, 260-3.
- Moss, M. L., et al., 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature.* 385, 733-6.
- Mukhopadhyay, A., et al., 1999. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem.* 274, 15978-81.
- Nagase, H., 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 378, 151-60.
- Nakashima, T., et al., 2000. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 275, 768-75.
- Nardelli, B., et al., 2001. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 97, 198-204.
- Neve, R. L., et al., 1988. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron.* 1, 669-77.
- Norstedt, C., et al., 1994. Alzheimer's disease: a molecular perspective. *J Intern Med.* 235, 195-8.
- North, R. J., 1970. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J Exp Med.* 132, 521-34.
- Octave, J. N., 1995. The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg.* 95, 197-209.
- Ohno, M., et al., 2004. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 41, 27-33.
- Ostermann, N., et al., 2006. Crystal structure of human BACE2 in complex with a hydroxyethylamine transition-state inhibitor. *J Mol Biol.* 355, 249-61.
- Pardossi-Piquard, R., et al., 2005. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron.* 46, 541-54.
- Pastorino, L., et al., 2004. BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 25, 642-9.
- Pastorino, L., et al., 2002. The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(beta). *Mol Cell Neurosci.* 19, 175-85.
- Peiretti, F., et al., 2003. Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp Cell Res.* 285, 278-85.
- Perlmutter, L. S., et al., 1992. MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res.* 33, 549-58.
- Petkova, A. T., et al., 2002. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 16742-7.
- Petri, B., et al., 2008. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol.* 180, 6439-46.
- Portnoy, D. A., et al., 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun.* 60, 1263-7.

- Portnoy, D. A., et al., 1989. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med.* 170, 2141-6.
- Postina, R., et al., 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 113, 1456-64.
- Qiu, W. Q., et al., 1997. Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem.* 272, 6641-6.
- Refolo, L. M., et al., 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 7, 321-31.
- Refolo, L. M., et al., 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 8, 890-9.
- Reiss, K., et al., 2006. Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther.* 111, 985-1006.
- Ridgway, W. M., et al., 2007. New tools for defining the 'genetic background' of inbred mouse strains. *Nat Immunol.* 8, 669-73.
- Rieckmann, P., et al., 1994. Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology.* 44, 2367-72.
- Roberds, S. L., et al., 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet.* 10, 1317-24.
- Rogaev, E. I., et al., 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, 775-8.
- Rogers, H. W., Unanue, E. R., 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun.* 61, 5090-6.
- Rolink, A. G., et al., 2002. BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells. *Eur J Immunol.* 32, 2004-10.
- Rovelet-Lecrux, A., et al., 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* 38, 24-6.
- Rudelli, R. D., et al., 1984. Morphology and distribution of Alzheimer neuritic (senile) and amyloid plaques in striatum and diencephalon. *Acta Neuropathol.* 64, 273-81.
- Russell, W. C., et al., 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature.* 253, 461-2.
- Saiki, R. K., et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-91.
- Scheinfeld, M. H., et al., 2002. Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription. *J Biol Chem.* 277, 44195-201.
- Schett, G., et al., 2005. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 1, 47-54.
- Schiemann, B., et al., 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science.* 293, 2111-4.
- Schmechel, A., et al., 2004. Human BACE forms dimers and colocalizes with APP. *J Biol Chem.* 279, 39710-7.
- Schneider, P., et al., 1999. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med.* 189, 1747-56.
- Seals, D. F., Courtneidge, S. A., 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7-30.

- Serbina, N. V., et al., 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 19, 59-70.
- Seth, R., et al., 1991. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet*. 338, 83-4.
- Shen, J., et al., 1997. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*. 89, 629-39.
- Sherrington, R., et al., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375, 754-60.
- Shi, X. P., et al., 2001. The pro domain of beta-secretase does not confer strict zymogen-like properties but does assist proper folding of the protease domain. *J Biol Chem*. 276, 10366-73.
- Shie, F. S., et al., 2002. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport*. 13, 455-9.
- Shiloh, M. U., et al., 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity*. 10, 29-38.
- Shu, H. B., et al., 1999. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol*. 65, 680-3.
- Simard, A. R., et al., 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 49, 489-502.
- Sinha, S., et al., 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*. 402, 537-40.
- Sleegers, K., et al., 2006. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 129, 2977-83.
- Snow, A. D., et al., 1988. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 133, 456-63.
- Spampanato, J., et al., 2001. Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci*. 21, 7481-90.
- Spohn, G., et al., 2005. Protection against osteoporosis by active immunization with TRANCE/RANKL displayed on virus-like particles. *J Immunol*. 175, 6211-8.
- Srour, N., et al., 2003. TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett*. 554, 275-83.
- Stalder, M., et al., 1999. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol*. 154, 1673-84.
- Stolina, M., et al., 2005. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*. 20, 1756-65.
- Tellier, E., et al., 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res*. 312, 3969-80.
- Terry, R. D., et al., 1964. Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *Am J Pathol*. 44, 269-97.
- Thompson, J. S., et al., 2001. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*. 293, 2108-11.
- Tripp, C. S., et al., 1995. Secondary response to *Listeria* infection requires IFN-gamma but is partially independent of IL-12. *J Immunol*. 155, 3427-32.
- Tripp, C. S., Unanue, E. R., 1995. Macrophage production of IL12 is a critical link between the innate and specific immune responses to *Listeria*. *Res Immunol*. 146, 515-20.
- Tsakadze, N. L., et al., 2006. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem*. 281, 3157-64.

- Turner, R. T., 3rd, et al., 2001. Subsite specificity of memapsin 2 (beta-secretase): implications for inhibitor design. *Biochemistry*. 40, 10001-6.
- Unanue, E. R., 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev*. 158, 11-25.
- van Dissel, J. T., et al., 1987. Divergent changes in antimicrobial activity after immunologic activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 139, 1665-72.
- Van Seventer, G. A., et al., 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol*. 144, 4579-86.
- Van Uden, E., et al., 2002. Increased extracellular amyloid deposition and neurodegeneration in human amyloid precursor protein transgenic mice deficient in receptor-associated protein. *J Neurosci*. 22, 9298-304.
- Van Zee, K. J., et al., 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 4845-9.
- Vassar, R., et al., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 286, 735-41.
- von Arnim, C. A., et al., 2005. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem*. 280, 17777-85.
- Wada, T., et al., 2006. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 12, 17-25.
- Wahle, T., et al., 2005. GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol Cell Neurosci*. 29, 453-61.
- Wakatsuki, S., et al., 2004. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19. *J Neurochem*. 89, 119-23.
- Walcheck, B., et al., 1996. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature*. 380, 720-3.
- Walter, J., et al., 2001. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem*. 276, 14634-41.
- Weidemann, A., et al., 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. 57, 115-26.
- Westmeyer, G. G., et al., 2004. Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem*. 279, 53205-12.
- Willem, M., et al., 2006. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*. 314, 664-6.
- Wolfe, M. S., et al., 1999. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 38, 11223-30.
- Wong, H. K., et al., 2005. beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem*. 280, 23009-17.
- Yan, R., et al., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*. 402, 533-7.
- Yan, R., et al., 2001. The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem*. 276, 36788-96.
- Yasuda, H., et al., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 3597-602.

- Yu, F. H., et al., 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci.* 23, 7577-85.
- Zacchetti, D., et al., 2007. BACE1 expression and activity: relevance in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 4, 117-26.
- Zhao, J., et al., 2007. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.* 27, 3639-49.
- Zhukovsky, E. A., et al., 2004. TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster? *Nature.* 427, 413-4; discussion 414.

Anhang

Geräte

| | |
|---|---|
| Agarosegeldokumentationsanlage | Gel Jet Imager, Intas, Göttingen, D |
| Agarosegelkammer | Modell H5, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA |
| Analysenwaage | Kern & Sohn, Dürrwangen |
| Autoklav | Modell H5, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA |
| Brutschrank | Heraeus, Hanau |
| Chemoluminiszenzkamera | LAS-000, Fujifilm, Carrollton, USA |
| DNA-Photometer | GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK |
| Durchflusszytometer | FACS Quanto, Becton Dickinson, Heidelberg |
| Elektrophoresekammer für Agarosegele | HU13W Wide Format Midi horizontal gel unit, SCIE-PLAS, Warwickshire, UK Modell H5, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA |
| Elektroporationsgerät | Gene Pulser™, BioRad, München |
| Fluoreszenzmikroskop | Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen |
| Fluoreszenzmikrotiterplattenleser | Fluorolite 1000, Dynatech, Dynex, Denkendorf |
| Homogenisator Precellys | PeqLab, Erlangen |
| Horizontalschüttler | RM 5 Assistent, Sondheim |
| Inkubatoren | Heraeus, Hanau SalvisLab, Renggli AG, Rotkreuz, CH |
| Mikropipetten | Gilson, Middleton, USA Eppendorf, Hamburg |
| 96-Well-Mikrotiterplattenleser | Sunrise, Tecan, Crailsheim |
| Mikrowellenherd | Panasonic, Japan |
| Multipette | Eppendorf, Hamburg |
| Neubauer Zählkammer | Assistent, Sondheim |
| PCR-Cycler | GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, |

Anhang

| | |
|----------------------------------|---|
| | Wellesley, MA, USA |
| pH-Meter | Krick, Langelselbold |
| SDS-PAGE Kammer | Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System BioRad, Hercules, USA |
| Semi-dry-Blot-Apparatur | Model Twin L, PeqLab Biotechnology, Erlangen TransblotSD, BioRad, München |
| Spannungsquelle | PowerPac 200/300, BioRad, München |
| Sterilbänke | danLAF VFR 1806, Claus Damm A/S, Humlebæk, Dk; danLAF VFR 1206 GS, Claus Damm A/S, Humlebæk, Dk |
| Tank-Blot-Apparatur | BioRad, Hercules, USA |
| Thermoblock | Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge 5415C | Eppendorf, Hamburg |
| Transmissionselektronenmikroskop | Zeiss EM-900, Leo Elektronen-mikroskopie, Oberkochen |
| UV-Tisch, Kamera und Drucker | Intas UV-Systeme, Göttingen |
| Waage | Sartorius, Göttingen |
| Wärmeschrank | Memmert, Schwabach |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Zentrifugen | Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg CS-6KR Zentrifuge, Beckman, Fullerton, CA, USA (GH3.8-Rotor) Optima LE-80K-Ultrazentrifuge, Beckman Fullerton, USA (SW41 Ti- und 70.1 Ti-Rotor) Optima TLX-Ultrazentrifuge, Beckman Fullerton, USA (TLA 55-Rotor) Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen |

Chemikalien, Reagenzien und Medien

| | |
|----------------------------|---|
| Acrylamid | Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Ultra-Qualität, Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Melford Laboratories, Chelsworth, UK |
| APS | p. a., Roth, Karlsruhe |
| BHI Broth | BD Biosciences, Heidelberg |
| Blutagarplatten | Oxoid, Wesel |
| BSA | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Ciprobay100 | Bayer, Leverkusen |
| Complete Proteaseinhibitor | Roche, Mannheim |
| Coomassie-Brilliant-Blau | Sigma Aldrich, Steinheim |
| L-Cystein | Merck, Darmstadt |
| DABCO | Sigma Aldrich, Steinheim |
| DAPI | Sigma Aldrich, Steinheim |
| DC Protein Assay | BioRad, München |
| DNA-Polymerasen | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| dNTPs | Fermentas, St. Leon-Rot |
| DMSO | Serva, Heidelberg |
| DMEM High Glucose | PAA Laboratories, Linz, A |
| DNA 1kb Marker | Roche, Mannheim |
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| Enzyme | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Ethanol (99,8% p. a.) | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromidlösung | 1%ig, Roth, Karlsruhe |
| FKS | PAA Laboratories, Linz, A |
| Fugene6 | Roche, Mannheim |
| Gentamicin | 200 mM (100x) PAA Laboratories, Linz, A |
| D-Glukose | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Glycerol | 99,9% ACS Reagent, Sigma Aldrich, Steinheim |
| Glycin p. a. | Roth, Karlsruhe |

Anhang

| | |
|---|---|
| Hefeextrakt | pulv., f.d. Bakteriologie, Roth, Karlsruhe, D |
| HEPES | Biomol GmbH, Hamburg |
| Isopropanol (p. a.) | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Kanamycin | Sigma Aldrich, Steinheim |
| 2-Mercaptoethanol | (p. a.) Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Ladepuffer für Agarosegele | (6x) Fermentas, St. Leon-Rot |
| Magermilchpulver | Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Mowiol | Calbiochem, Bad Soden |
| Natriumcarbonat | Riedel-de Haën, Seelze |
| Natriumazid | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogenphosphat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid-Plätzchen | (p.a.) Merck, Darmstadt |
| NP-40 | Calbiochem, La Jolla, USA |
| Paraformaldehyd reinst | Merck, Darmstadt |
| Pen/Strep | 100x PAA Laboratories, Linz, A |
| Ponceau S-Lösung | 0,1%ig in 5% HAc Sigma Aldrich, Steinheim |
| Precision Plus Protein Standard All Blue | BioRad, München |
| Proteaseinhibitor | Roche, Mannheim |
| Protein-G-Sepharose | Amersham Biosciences, Uppsala, S |
| RPMI-1640, high Glucose, with L-Glutamine | PAA Laboratories, Linz, A |
| Salzsäure | 37%ig reinst Riedel-de Haën, Seelze |
| SDS | Roth, Karlsruhe |
| Temed | 99% für SDS-PAGE, p.a. Roth, Karlsruhe |
| Tetrazyklin | Merck, Darmsadt |
| Thioglycollate Medium without Dextrose | DifcoTM, BD, Heidelberg |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich, Steinheim |

Anhang

| | |
|--------------|--|
| Trypanblau | 0,4%ig Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA | 1x PAA Laboratories, Linz, A |
| Tween-20 | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Zymosan | Sigma Aldrich, Steinheim |

Labormaterialien

| | |
|---------------------------------|--|
| Deckgläschen | Rund, Durchmesser d=13 mm Assistent, Sondheim |
| Einmalspritzen | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Einmalkanülen | Microlace (20G, 23G, 27G) Becton Dickinson, Heidelberg |
| Kunststoffverbrauchsmaterial | Sarstedt, Nümbrecht |
| Objektträger | Assistent, Sondheim |
| Parafilm M | American National Can, Greenwich, UK |
| Pasteurpipetten | Assistent, Sondheim |
| Polystyrenröhrchen (5ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| PVDF-Membranen | Roth, Karlsruhe |
| Western Blot Filterpapiere | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Zellschaber | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zentrifugenröhrchen + Adaptoren | Kontron, Zürich, CH |

Kits

- Agarosegeleextraktionskit High Pure PCR Product Purification Kit: Roche, Mannheim
- InnuPrep DNA Mini Kit, AJ Innuscreen, Jena
- Jet Star - The Novel Plasmid Purification Kit (Midi), Genomed, Löhne
- Plasmid Miniprep Kit I (Classic Line) E.Z.N.A, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Pure Yield Plasmid Midiprep System, Promega, Mannheim
- Western Blotting Detektionskit ECLplus WB Detection System, Amersham, Little Chalfont, UK
- Western Blotting Detektionskit ECLadvanced WB Detection System, Amersham, Little Chalfont, UK

Lebenslauf

Name: Rittger

Vorname: Andrea

Anschrift: Samwerstr. 2
24118 Kiel

Geburtsdatum: 02.01.1978

Geburtsort: Berlin

Vater: Edgar Rittger

Mutter: Gisela Rittger, geb. Leuch

Schulbildung: 1984 – 1988
Joseph-Anton-Rohe Grundschule
Kleinwallstadt
1988 – 1989
Joseph-Anton-Rohe Hauptschule
Kleinwallstadt
1989 – 1998
Julius-Echter Gymnasium Elsenfeld

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife (26.06.1998)

Studium: WS 1999/2000 bis WS 2004/2005 Studium
der Molekularen Biotechnologie an der
Universität Bielefeld

Studienabschluss: 27.10.2004, Diplom Biotechnologin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Paul Saftig danke ich für die Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Prof. Karina Reiss danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Ich möchte Herrn Prof. Thomas Roeder recht herzlich danken für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Dr. Tobias Huth gilt mein Dank für die sehr fruchtbare und interessante Zusammenarbeit und das offene Ohr in schlechten Zeiten.

Für die Hilfe bei unzähligen Genotypisierungen und Blots danke ich Tobias Lehman.

Carmen Alvarez-Dominguez danke ich für die herzliche Aufnahme in Spanien und die vielen hilfreichen Methoden die ich von ihr gelernt habe.

Bei der Crew der AG Saftig muss ich mich für die gute Laboratmosphäre bedanken, ganz besonders allen aus der 122.

Fürs Korrekturlesen gilt mein besonderer Dank Maike, Jenny, Kathi, Judith, Alex und ganz besonders Athena.

Hiermit erkläre ich,

- dass ich diese Abhandlung selbständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe.

- dass diese Abhandlung noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

- dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden.

- dass es keine Promotionsversuche in der gleichen Fakultät oder vergleichbaren Fachbereichen gab.

- dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

Kiel, den 21.10.08

Andrea Rittger

