

Aus dem Biochemischen Institut
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Paul Saftig)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION UND SUBSTRATIDENTIFIKATION DER
ALZHEIMER-RELEVANTEN BETA-SEKRETASE BACE-1**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

KATRIN DIERCKS
aus Hamburg

Kiel 2009

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Reiß

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Herdegen

Tag der mündlichen Prüfung:

11. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 11. August 2009

gez. Prof. Dr. Fickenscher

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

**Was man vergisst
hat man im Grunde nicht erlebt.**

Ernst R. Hauschka

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Morbus Alzheimer	1
1.2	Enzymatische Spaltung von Proteinen.....	3
1.3	Aspartatproteasen.....	3
1.4	APP und seine Proteolyse.....	4
1.5	Die Aspartatprotease BACE	5
1.6	Identifizierte Substrate der Protease BACE	7
1.7	Potentielle Substrate der Protease BACE	8
1.8	Fragestellung / Ziel der Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte.....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.3	Chemikalien	15
2.1.4	Verwendete <i>Kits</i>	16
2.1.5	Oligonukleotide	17
2.1.6	Verwendete Vektoren	18
2.1.7	Verwendete Standardplasmide	18
2.1.8	Verwendete Primärantikörper	19
2.1.9	Verwendete Sekundärantikörper.....	19
2.1.10	Verwendete Inhibitoren	19
2.1.11	Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
2.1.12	Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit Zellen	22
2.1.13	Zelllinien und Kulturmedien.....	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellbiologische Methoden	24
2.2.2	Biochemische Methoden.....	27
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	31
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Untersuchungen zur Proteolyse potentieller BACE-Substrate	38

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.1	Die Proteolyse der neuronalen Adhäsionsmoleküle NCAM 140/180 durch BACE kann nicht bestätigt werden	38
3.1.2	Untersuchungen von potenziellen BACE-Substraten mittels Alkalische-Phosphatase-Assay.....	41
3.2	Verifizierung der Microarray-Daten.....	55
3.2.1	Microarray-Daten	55
3.2.2	Nachweis der BACE-1-Defizienz	57
3.2.3	Standardplasmide	58
3.2.4	<i>Real-Time</i> -PCR mit Gewebe aus Maus-Gehirn	62
3.2.5	Berechnung der <i>Real-Time</i> -PCR-Ergebnisse	64
3.2.6	Ergebnisse der Berechnung.....	65
4	DISKUSSION	67
4.1	NCAM 140/180 als mögliches BACE-Substrat.....	67
4.2	Kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Proteolyse von TNF α , TGF α , L-Selektin, Amphiregulin und Betacellulin durch BACE-Überexpression	69
4.3	Die Überexpression von BACE führt zur erhöhten Freisetzung der TRANCE-Ektodomäne	70
4.4	Die Überexpression von BACE führt zur erhöhten Generierung der intrazellulären TRANCE-Domäne	72
4.5	Die Ergebnisse des Microarray-Vorversuchs konnten mit Hilfe der <i>Real-Time</i> -PCR nicht verifiziert werden.....	74
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
8	TABELLENVERZEICHNIS	86
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
10	DANKSAGUNG.....	93
11	LEBENS LAUF	94

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer (entdeckt 1906 von dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer) ist die häufigste Demenzerkrankung weltweit. Seine Inzidenz steigt proportional mit dem Lebensalter an. Heute sind 1-5% aller über 65jährigen und bereits 20-40% aller 85jährigen betroffen. Betrachtet man die immer höher werdende Lebenserwartung der Menschen, so wird deutlich, dass die Alzheimer-Demenz (AD) in Zukunft noch wesentlich an Bedeutung gewinnen wird. Dies gilt v.a. auch in wirtschaftlicher Hinsicht. Zur Zeit ist Morbus Alzheimer noch nicht heilbar und nur begrenzt symptomatisch therapierbar.

Gekennzeichnet ist die Alzheimer Demenz durch einen fortschreitenden Verlust von Neuronen und damit einem Abbau der Hirnsubstanz (Abb. 1) (Desikan et al., 2008).

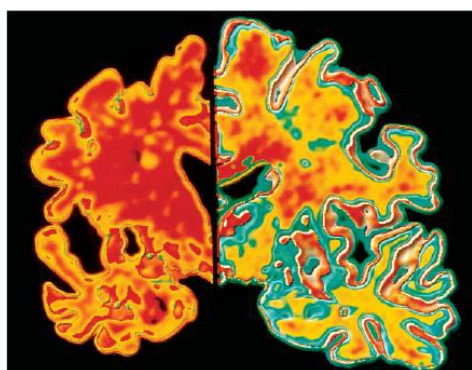


Abbildung 1: Zerebrale Atrophie

Der direkte Vergleich des Gehirnes eines gesunden Menschen (rechts) mit dem eines Alzheimer-Patienten (links) zeigt deutlich die zerebrale Atrophie sowie vergrößerte Liquorräume und eine verminderte Durchblutung (rote Färbung) bei Morbus Alzheimer.

Foto: Bayer / www.aerzteblatt.de

In den meisten Fällen tritt die Alzheimer Demenz idiopathisch auf. Es gibt aber auch Hinweise, dass die Erkrankung aufgrund eines genetischen Defekts auftreten kann. So besteht z.B. bei Personen mit Down-Syndrom im mittleren und fortgeschrittenen Lebensalter ein hohes Risiko an AD zu erkranken (Patterson et al., 1988; Head et al., 2007; Zigman and Lott, 2007). Dies ist durch die Tatsache erklärbar, dass das APP-Gen auf dem Chromosom 21 codiert wird, welches beim Down-Syndrom eine Trisomie aufweist.

Betrachtet man die Veränderungen auf der Ebene der Neuronen, so zeigen sich zwei für Morbus Alzheimer typische Prozesse: Es bilden sich innerhalb der Neurone vermehrt Bündel von Tau-Protein (Alzheimer-Neurofibrillenbündel oder Alzheimer-Degenerationsfibrillen). Das Tau-Protein ist ein normaler Bestandteil in der Zelle.

Durch den vermehrten Einbau von Phosphatgruppen in das Tau-Protein bei Alzheimerpatienten werden aber innerhalb der Zelle Transportprozesse gestört und die Stabilität der Zelle vermindert. Dadurch kommt es zum Untergang des betroffenen Neurons.

Des Weiteren ist die Pathologie dieser Erkrankung durch die Entstehung von charakteristischen Plaques im Gehirn der Patienten gekennzeichnet (Abb. 2), die auf eine Produktion des sogenannten β -amyloiden Peptids ($A\beta$) zurückzuführen sind (Kubis and Janusz, 2008). Bilden sich verstärkt Amyloid-Verklumpungen zwischen den Nervenzellen, so unterbrechen sie deren Kommunikation. Es kann auch vorkommen, dass sich Amyloid-Plaques in den Blutgefäßen ablagern, was zu einer verminderten Sauerstoffversorgung der betroffenen Gehirnareale führt (Thal et al., 2008).

$A\beta$ entsteht durch die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (Roberds et al., 2001) unter Beteiligung einer β -Sekretase, die als BACE-1 (*β -site APP cleaving enzyme*) identifiziert wurde. Die Inhibition von BACE-1 ist ein zur Zeit diskutiertes therapeutisches Ziel für die Behandlung des Morbus Alzheimer (Vassar et al., 1999); (Roberds et al., 2001). Allerdings ist dieses Enzym noch weitestgehend unerforscht und potentielle Nebenwirkungen seiner Inhibition können nicht abgeschätzt werden. Deshalb geht es in dieser Arbeit darum, durch verschiedene Ansätze Anhaltspunkte für mögliche physiologische Funktionen von BACE-1 zu ermitteln um damit mögliche Nebenwirkungen einer BACE-Inhibition besser absehen zu können.

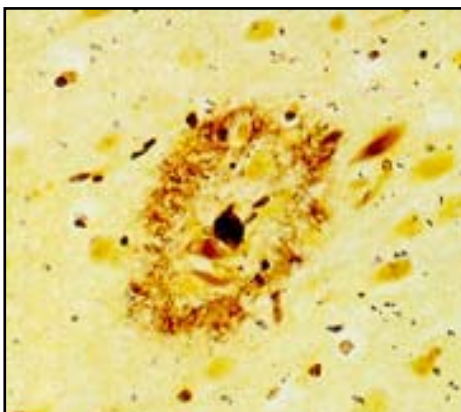


Abbildung 2: β -amyloider Plaque

Histologische Aufnahme einer Ablagerung im Gehirn eines Alzheimer-Kranken. Der Kern besteht aus verklumptem Amyloid-Proteinen und ist von Entzündungszellen umgeben.

Foto: www.alois.de/patienten/krankheit/ursachen.htm

1.2 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Proteasen sind Enzyme, die Proteine spalten können. Diese Spaltung (*Shedding*) erfolgt durch eine Hydrolysereaktion (Berg et al., 2003; Löffler and Petrides, 2003), bei welcher ein Wassermolekül an eine Peptidbindung addiert wird. Man unterscheidet intrazellulär und extrazellulär angreifende Proteasen sowie Endo- und Exopeptidasen. Endopeptidasen greifen zentral am Protein an, während Exopeptidasen Proteine peripher spalten. Die Endopeptidasen gliedern sich wiederum in Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen (Berg et al., 2003; Löffler and Petrides, 2003).

Bei den Serinproteasen übernimmt ein aktivierter Serinrest die Funktion der nukleophilen Gruppe und greift die Peptidbindung an (Berg et al., 2003). Durch Übertragung von Wasserstoffionen kommt es zu einer hydrolytischen Spaltung des Substrates.

Cysteinproteasen arbeiten im Wesentlichen wie Serinproteasen. Die Funktion der nukleophilen Gruppe wird hier durch einen aktivierten Cysteinrest ersetzt.

Metalloproteasen enthalten im aktiven Zentrum ein gebundenes Metallion, fast immer Zink. Dieses Metallion aktiviert ein Wassermolekül, welches wiederum die nukleophile Gruppe bildet und die Carbonylgruppe des Peptids angreift (Berg et al., 2003).

Bei den Aspartatproteasen wirken im aktiven Zentrum zwei Asparaginsäurereste zusammen, die durch Deprotonierung die Peptidcarbonylgruppe polarisieren. Ein Wassermolekül greift nun die Carbonylgruppe an, die durch die Polarisierung eine erhöhte Empfindlichkeit aufweist (Berg et al., 2003).

1.3 Aspartatproteasen

Bekannte Enzyme, die zu den Aspartatproteasen zählen, sind zum beispielsweise Renin oder Pepsin (Berg et al., 2003). Renin wird von Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet und bei Blutdruckabfall ausgeschüttet. Über die Reaktionskaskade des Renin-Angiotensin-Systems führt es zu einer Erhöhung des Blutdruckes (Lüllmann-Rauch, 2003). Pepsin ist ein Verdauungsenzym, dessen Vorstufe Pepsinogen von den Hauptzellen des Magens produziert wird (Lüllmann-Rauch, 2003). Bereits vorhandenes Pepsin spaltet im sauren pH-Milieu des Magens Pepsinogen und führt so zur Entstehung von Pepsin, welches nun die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine spaltet. Auch das Enzym

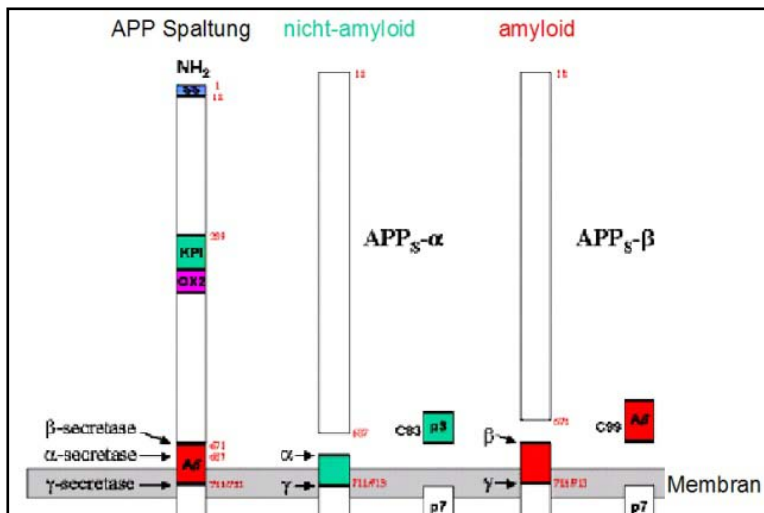
BACE, welches in dieser Arbeit untersucht werden soll, gehört zur Gruppe der Aspartatproteasen (Dingwall, 2001; Dominguez et al., 2001; Citron, 2004).

1.4 APP und seine Proteolyse

APP (*Amyloid Precursor Protein*) ist ein Typ-1-Transmembranprotein mit weitgehend unbekannter Funktion. Diskutiert wird, ob APP ein Rezeptor oder ein Verbindungsmolekül zwischen Kinesin und synaptischen Vesikeln sein könnte (Horiuchi et al., 2007). Auch eine Rolle als Adhäsionsprotein mit einer Funktion für das Wachstum von Neuronen wäre möglich (Hoareau et al., 2008).

Die physiologische Proteolyse von APP findet durch eine α - und eine γ -Sekretase statt. Als α -Sekretase, welche die Ektodomäne des Proteins angreift, wurden verschiedene Metalloproteasen identifiziert, vor allem Mitglieder der Familie der ADAM-Proteasen (ADAM 9, 10, 17). Der γ -Sekretase-Komplex wird von vier Komponenten gebildet: Einem Presenilin Heterodimer, einer hoch glykosylierten Form von Nicastrin sowie den beiden Proteinen Aph-1 (Aminoglykosid Phosphotransferase-1) und Pen-2 (Presenilin-Enhancer-Protein-2). Dieser Komplex greift APP in der Transmembran-Region an. Dies ist sehr ungewöhnlich, da eine enzymatische Spaltung immer in Form einer Hydrolyse stattfindet und innerhalb der Plasmamembran ein hydrophobes Milieu herrscht. Die intramembrane Proteolyse ist dadurch zu erklären, dass das große Molekül als Multienzymkomplex um die Schnittstelle herum selbst ein hydrophiles Milieu schafft.

Das Produkt der Proteolyse von α - und γ -Sekretase ist ein Peptid namens p3, welches keine pathologische Bedeutung aufweist (Abb. 3). Wird APP allerdings nicht von der α -, sondern zuerst von einer β -Sekretase gespalten, so entsteht das Amyloid- β -Spaltprodukt ($A\beta$). Dieses kann als $A\beta_{40}$ oder $A\beta_{42}$ vorliegen, je nachdem, an welcher Stelle die γ -Sekretase angegriffen hat (Abb. 3). $A\beta$ findet man in großen Mengen in den pathologischen Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Diese Beobachtung führte dazu, dass sowohl dem APP als auch der β -Sekretase eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung des Morbus Alzheimer zugesprochen wurde (Marcinkiewicz and Seidah, 2000; Dingwall, 2001).

**Abbildung 3: APP-Spaltung**

Dargestellt ist der Prozess der APP-Spaltung. Bei einer Prozessierung durch die α -Sekretase entsteht das nicht pathologische Spaltprodukt p3. Die Spaltung durch die β -Sekretase führt zur Entstehung des pathologischen Spaltprodukts A β .

Bild: <http://mayoresearch.mayo.edu>

1.5 Die Aspartatprotease BACE

BACE ist ein Typ-1-Transmembranprotein, das ein luminal gelegenes aktives Zentrum aufweist. Matures BACE (ca. 70 kDa) entsteht aus der immaturren Form (ca. 65 kDa) durch eine Serie von post-translationalen Modifizierungen und Glykosilierungen. Bisher sind zwei homologe Formen von BACE bekannt: BACE-1 und BACE-2. BACE-1 findet man vorwiegend in primären Neuronen des Gehirns, dagegen wird BACE-2 vor allem im peripheren Gewebe exprimiert. Während BACE-1 als β -Sekretase identifiziert werden konnte (Vassar et al., 1999; Vassar, 2005; Cole and Vassar, 2007; Cole and Vassar, 2008; Stockley and O'Neill, 2008), ist die Funktion von BACE-2 umstritten. BACE-2 scheint allerdings keine Schlüsselrolle bei der Spaltung von APP zu spielen (Citron, 2004). Als potentielle *Drug-Targets* für die Therapie der Alzheimer Demenz werden aufgrund dieser Fakten drei Varianten diskutiert: Die Inhibition der γ -Sekretase, die Stimulation der α -Sekretase, die mit der β -Sekretase um das Substrat konkurriert oder die Inhibition der β -Sekretase. Das Problem bei der Inhibition der γ -Sekretase besteht darin, dass für diese viele wichtige Substrate identifiziert sind, deren Prozessierungen essentiell sind und die nicht von anderen Proteasen übernommen werden können. Insbesondere ist hier das „Notch“-Protein zu nennen, ein Transmembran-Rezeptor, der einen wichtigen Transkriptionsfaktor bildet. Notch ist involviert in viele Differenzierungsprozesse und in die Erneuerung von Organen wie der Haut, des Gastrointestinaltrakts und des hämatopoetischen Systems.

Die Funktion der α -Sekretase wird von verschiedenen Proteasen übernommen. Noch ist nicht bekannt, welche davon eine besondere physiologische Relevanz besitzt. Es bleibt die Inhibition der β -Sekretase, deren physiologische Funktionen allerdings ebenfalls noch nicht ausreichend erforscht wurden.

Um Anhaltspunkte über die physiologische Funktion der β -Sekretase zu erhalten, wurden in Vorarbeiten bereits BACE defiziente Mäuse generiert, die folgenden Phänotyp aufwiesen: BACE-1-defiziente Mäuse waren kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister (Abb. 4) und wiesen eine neonatale Mortalität von 50% auf (Abb. 5). In ihrem Verhalten zeigten sie einen unsicheren und zurückhaltenden Charakter. Für BACE-2-defiziente Mäuse konnte kein Phänotyp festgestellt werden, der von dem des Wildtyps abwich. BACE-1/-2-doppeldefiziente Mäuse zeigten jedoch eine signifikant höhere neonatale Mortalität als BACE-1-defiziente Mäuse (Abb. 5). Auffällig war, dass BACE-1- und BACE-1/2-defiziente Mäuse drei unterschiedliche phänotypische Kohorten zeigten: Diejenigen mit neonataler Mortalität, diejenigen, die in der 4. bis 5. Lebenswoche verstarben und schließlich die dritte Kohorte, die das Erwachsenenalter erreichte und keinen auffälligen Phänotyp aufwies (Dominguez et al., 2005). Diese Beobachtungen lassen verschiedene Vermutungen zu: BACE-1 besitzt spezifische Aufgaben, die von keiner anderen Protease übernommen werden können. Es gibt allerdings auch einige Überschneidungen in den Funktionen von BACE-1 und BACE-2. Anscheinend kann BACE-1 den Verlust von BACE-2 kompensieren. Außerdem scheinen Umweltfaktoren eine Rolle für die Mortalität und die Verhaltensauffälligkeiten von BACE-1-defizienten Mäusen zu spielen. Die drei unterschiedlichen Kohorten könnten durch unterschiedliche Penetranz von BACE-1 zustandekommen, durch modifizierende Gene oder durch individuell verschiedene kompensatorische Fähigkeiten von verwandten Genen.

Um die Funktion von BACE-1 zu verstehen wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die zur Identifizierung von Substraten beigetragen haben. Zu diesen gehören die Glykosyltransferase ST6GAL 1 (Kitazume et al., 2004a; Kitazume et al., 2005), der p-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) (Lichtenthaler et al., 2003), die β 2-Untereinheit von Natriumkanälen (Wong et al., 2005) sowie Neuregulin 1 (Willem et al., 2006). Auch die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Untersuchungen von BACE-1, welches im Folgenden vereinfacht als BACE bezeichnet wird.



Abbildung 4: Wildtyp- vs. BACE-1-defiziente Maus

Gezeigt ist der direkte Vergleich einer Wildtyp-Maus (links) und einer BACE-1^{-/-} Maus (rechts). Auffällig ist der viel kleinere Körper der BACE-1-defizienten Maus.

Foto: (Dominguez et al., 2005)

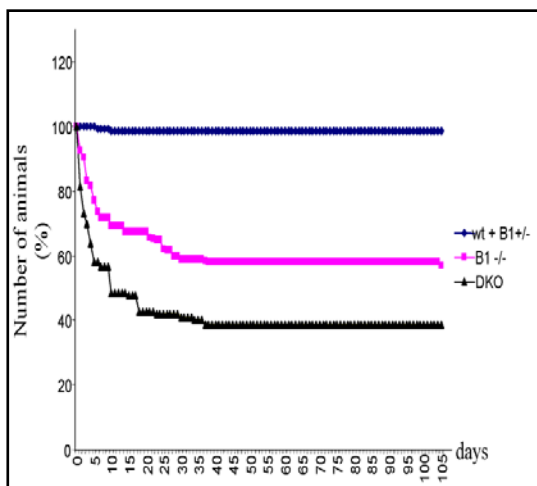


Abbildung 5: Mortalität

Die Grafik zeigt die Überlebensrate in Tagen von Wildtyp-Mäusen (blaue Linie), BACE-1-defizienten Mäusen (rosa Linie) und BACE-1/2-doppeldefizienten Mäusen (schwarze Linie). Deutlich ist die erhöhte neonatale Mortalität von BACE-1-defizienten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen, aber auch die nochmals erhöhte Mortalität der doppeldefizienten gegenüber den BACE-1-defizienten Mäusen.

Grafik: (Dominguez et al., 2005)

1.6 Identifizierte Substrate der Protease BACE

Neben APP und den eng verwandten APLPs (Li and Sudhof, 2004) konnten bislang erst wenige Substrate identifiziert werden. Dazu zählen die β -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle, die Glykosyltransferase ST6Gal 1, der PSGL-1 (P-Selectin Glykoprotein Ligand-1) sowie Neuregulin 1.

Spannungsabhängige Natriumkanäle gehören zu den wichtigsten Ionenkanälen, die eine unersetzbare Rolle für die Auslösung eines Aktionspotentials in primären Neuronen spielen (Isom, 2001). Bei den β -Subunits dieser Kanäle handelt es sich um Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, die als Typ-1-Transmembranproteine auch Zelladhäsion vermitteln. Die β -Subunits werden, wie auch APP, sowohl von

BACE-1 als auch von der γ -Sekretase gespalten (Wong et al., 2005). Ein weiterer Zusammenhang zwischen APP und den β -Subunits besteht darin, dass beide Proteine bekannte Substrate von Metalloproteasen sind. Es ist denkbar, dass die Spaltung dieser Untereinheit des Kanals die Auslösung eines Aktionspotentials verhindern und so zur Hemmung von neuronalen Aktivitäten führen kann. Die kürzliche Entdeckung der β -Subunit als BACE-1-Substrat könnte zum weiteren Verständnis der Pathologie von Morbus Alzheimer beitragen.

Die Glykosyltransferase ST6Gal 1 ist eine Sialyltransferase, die Säurereste an Glykoketten transferiert. Hierbei entsteht Sialyl α 2,6galactose, welche mit CD22/Siglec-2 (*sialic acid binding Ig-like lectin-2*) mit B-Zell-spezifischem Lektin interagiert. Dies spielt eine Rolle bei der B-Zell-Differenzierung und Antikörperproduktion. BACE-1 schneidet ST6Gal 1 und kontrolliert so die Spiegel von Sialyl α 2,6galactose, was anhand von *in vitro* (Kitazume et al., 2004b) und *in vivo* Studien (Kitazume et al., 2005) bestätigt wurde.

PSGL-1 vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an die Membran von Endothelzellen und damit die Rekrutierung von Leukozyten. Dies ist wichtig für Entzündungsreaktionen sowohl im Gehirn als auch im peripheren Gewebe. Auch PSGL-1 wurde als BACE-1-Substrat identifiziert (Lichtenthaler et al., 2003).

PSGL-1 zeigt - wie auch APP und die β -Subunits - ein typisches Muster der sequentiellen Prozessierung: In der Ektodomäne wirkt unter physiologischen Bedingungen die α -Sekretase, gefolgt von der γ -Sekretase, die das Protein in der Transmembran-Region spaltet.

Neuregulin 1 ist ein axonales Signal-Protein, das für die Entwicklung von Schwann-Zellen und die Myelinisierung von Axonen verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Myelinisierung von Axonen hohe Spiegel von BACE-1 zu finden sind, und dass BACE-1-defiziente Mäuse eine Hypomyelinisierung der peripheren Nerven zeigen (Willem et al., 2006).

1.7 Potentielle Substrate der Protease BACE

Alle bisher identifizierten BACE-Substrate sind ebenfalls Substrate sowohl für die α - als auch für die γ -Sekretase. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es vielleicht noch weitere, bislang unbekannte BACE-Substrate gibt die ebenfalls von α - und γ -

Sekretase prozessiert werden. Erschwerend für die Analyse potentieller neuer Substrate ist, dass möglicherweise

- a) die Aktivität von BACE nur bei Ausfall der entsprechenden Metalloprotease sichtbar wird oder
- b) BACE nur zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung (z.B. im Embryonalstadium) aktiv ist.

Die beiden Substrate ST6Gal 1 und PSGL-1 lassen außerdem vermuten, dass BACE eine Rolle innerhalb des Immunsystems spielt. In dieser Arbeit wurden zudem weitere potentielle Substrate untersucht, die bisher noch nicht veröffentlicht wurden, wie NCAM 140/180, TRANCE (*Tumor Necrosis Factor Related Activation Induced Cytokine*), TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*), TNF Rezeptor II (Synonym: p75 oder CD120b), TGF α (*Transforming growth factor α*), L-Selektin (Synonym: LECAM-1 oder LAM-1), Amphiregulin und Betacellulin.

NCAM gehört – ebenso wie die β -Subunits – in die Ig-Superfamilie und enthält 5 Ig-Domänen und 2 Fibronectin (FN)-Domänen. Während der Embryonalentwicklung ist NCAM im gesamten Organismus weit verbreitet (Kolkova, 2008). Später kommt es vor allem im Nervensystem an der neuromuskulären Endplatte vor. Das NCAM-Molekül ist am Wachstum, an der Kommunikation sowie am Überleben von Neuronen beteiligt und beeinflusst Gedächtnisfunktionen und Lernfähigkeit (Hinkle et al., 2006; Kolkova, 2008). NCAM kann durch differentielles Spleißen in verschiedenen Isoformen vorliegen. In dieser Arbeit wurden die beiden transmembrangängigen Formen NCAM 140 und NCAM 180 untersucht. Diese unterscheiden sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne, da NCAM 180 ein zusätzliches Exon enthält.

TRANCE ist ein integrales Membranglykoprotein vom Typ 2 mit einer Größe von ca. 45 kDa und zählt zur TNF-Familie (*Tumor Necrosis Factor*). Es ist ein in der Plasmamembran verankertes Vorläufer-Protein, das durch Proteolyse freigesetzt wird. TRANCE wird in Osteoblasten und Stromazellen (induziert durch Vitamin D₃, Prostaglandin E₂, Interleukin-1 oder Glukokortikoiden) sowie in aktivierten T-Zellen exprimiert. TRANCE Rezeptoren kommen auf Osteoklasten (Aktivierung und Differenzierung) sowie auf dendritischen Zellen vor. Auf letzteren induzieren sie eine verlängerte Überlebenszeit der dendritischen Zellen, die Induktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen sowie T-Zell-Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Josien et al., 2000). Außerdem kommt es durch Bindung von TRANCE zur

Kooperation mit CD40-Ligand oder TNF α , was die Variabilität von dendritischen Zellen erhöht (Josien et al., 1999; Wong et al., 1999; Lam et al., 2001).

Für die Metalloprotease TACE (*TNF α -converting Enzyme-like Protease*) oder auch ADAM17 genannt, wurde TRANCE bereits als Substrat identifiziert (Lum et al., 1999). Gleichzeitig wurde beschrieben, dass TRANCE auch durch eine unbekannte „Nicht-Metalloprotease“ prozessiert wird. Aufgrund der Ähnlichkeit der TRANCE Proteolyse mit der APP-Prozessierung wurden in dieser Arbeit TRANCE und einige andere TACE Substrate auf eine eventuelle Spaltung durch BACE-1 untersucht.

TNF α ist ein potentes pleiotropes inflammatorisches Zytokin (Tracey and Cerami, 1994). Es kommt in den meisten Organen des Körpers vor und hat viele verschiedene Funktionen, von denen viele bis heute nicht verstanden sind. Es fungiert als Wachstumsstimulus, aber auch als –inhibitor und wirkt außerdem selbstregulierend. Spezifische Funktionen des TNF α sind unter anderem: Die Stimulation aktivierter T-Lymphozyten, die Induktion einer Proliferation von neutrophilen Granulozyten während eines inflammatorischen Prozesses (Murray et al., 1997), Funktionen in der Immunantwort bei Invasionen von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, die Induktion der Nekrose von spezifischen Tumorzellen und die Wirkung als Schlüsselmediator bei lokalen Entzündungsreaktionen. Durch TNF α als Akute-Phase-Protein wird hierbei eine Kaskade von Zytokinen initiiert. Somit wird die Permeabilität der Gefäße erhöht, so dass Makrophagen und neutrophile Granulozyten das Blutgefäß besser verlassen können um an den Ort der Entzündung zu gelangen (Janeway, 2005). Von Makrophagen gebildetes TNF α führt zu einer Verklumpung des Blutes, was eine Verschleppung der Keime über die Blutbahn verhindern soll. Im Tierversuch wurde festgestellt, dass TNF α -defiziente Mäuse nach einer Infektion mit gram-negativen Bakterien einen septischen Schock erlitten (Janeway, 2005).

Der TNF Rezeptor II ist ein 75 kDa großes Protein, welches auf allen somatischen Zellen exprimiert wird (Pfizenmaier, 1991). Das Molekül gehört zu einer Familie der Zell-Oberflächenmoleküle, der auch weitere Moleküle wie Fas/Apo1, CD30, OX40 und 4-1BB angehören. Diese Familie ist charakterisiert durch cystein-reiche Areale in der extrazellulären Domäne. Der TNF Rezeptor II ist verantwortlich für die Stimulation von aktivierten T-Lymphozyten durch TNF α (Scheurich et al., 1987). Andere Funktionen, die mit seinem Liganden TNF α zusammenhängen, werden noch diskutiert (Holtmann et al., 2002; Zha and Shu, 2002; Carpentier et al., 2004).

TGF α ist ein 50 Aminosäuren umfassendes Protein. 30% seiner Sequenz ist identisch mit der des EGF-Gens (*Epidermal Growth Factor*), mit dem es auch um dieselben membrangebundenen Rezeptoren konkurriert (Yamane et al., 1997; Guntinas-Lichius, 2002). Eine Rolle bei der Wundheilung (Cheng et al., 2008) und der Onkogenese (Booth and Smith, 2007; Wu et al., 2007; Perez-Torres et al., 2008; Zeren et al., 2008) wird darüber hinaus angenommen. Hierfür spricht auch, dass große Mengen von TGF α in einigen humanen Tumoren gefunden wurden (Zeren et al., 2008).

L-Selektin ist das kleinste der vaskulären Selektine mit einer Größe von 74 bis 100 kDa. Es wird auf Granulozyten, Monozyten und zirkulierenden Lymphozyten exprimiert und fungiert als Adhäsionsmolekül, indem es die Adhäsion von Lymphozyten an die hochendothelialen Venolen der Lymphknoten und damit das *Homing* der Lymphozyten in den Lymphknoten induziert (Guarda et al., 2007; Ganten and Ruckpaul, 2008). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in Entzündungsherde (Tedder et al., 1995; Fabre et al., 2008).

Amphiregulin ist ein 78 Aminosäuren großes Glykoprotein, das die Proliferation sowohl von gesunden Zellen als auch von diversen Tumorzellen stimulieren kann (McBryan et al., 2008; Willmarth and Ethier, 2008; Yamada et al., 2008). Es ist ein Mitglied der EGF-Familie der Zytokine. Diese sind Wachstumsfaktoren, die charakterisiert sind durch ihre Synthese als Transmembran-Vorläufer-Proteine und die Präsenz verschiedener EGF-Strukturen in ihrer extrazellulären Domäne.

Auch Betacellulin (BTC) gehört zur Familie der EGF-Zytokine. Es wird primär als Transmembran-Vorläufer-Protein synthetisiert und dann durch Proteolyse zum reifen Molekül gespalten, das als Ligand für den EGF Rezeptor fungiert. Eine hohe Expression von Betacellulin wird im Pankreas gefunden (Thowfeequ et al., 2007).

Die Funktionen von BTC sind vielfältig und noch nicht komplett verstanden. Es fungiert als Differenzierungsfaktor der pankreatischen Tumorzelllinie und wandelt mit Hilfe des Aktivin-A Amylase-sekretierende Zellen zu Insulin-sekretierenden Zellen um (Mashima et al., 1996), induziert Insulin- und Glukokinase-Expression in Glukagonom-Zellen (Watada et al., 1996) und vermittelt die Proliferation und Differenzierung in einer Insulinom-Zelllinie bei Ratten (Huotari et al., 1998). Als physiologische Funktion von BTC wird eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Differenzierung von Inselzellen des humanen Pankreas vermutet (Seno et al., 1996; Miyagawa et al., 1999; Tada et al., 1999). Im Tierversuch führte die Gabe von

rekombinantem humanem BTC zu einer Zunahme des Volumens von β -Zellen in den Inseln des Pankreas von Mäusen mit einer daraus resultierenden verbesserten Glukose-Toleranz (Yamamoto et al., 2000). Auf Grund dieser Entdeckungen wird intensiv an BTC als therapeutische Möglichkeit zur Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 1 geforscht.

1.8 Fragestellung / Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, potentielle BACE-Substrate zu identifizieren, die Hinweise auf die physiologische Funktion der Protease oder eine Erklärung für den Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse liefern könnten. Insbesondere war von Interesse, mögliche Ursachen der hohen neonatalen Mortalität aufzudecken, die eine Inhibition von BACE als Ansatz für die Therapie von Morbus Alzheimer ausschließen. Hierzu wurden Proteine untersucht, die einer APP-ähnlichen Proteolyse unterliegen, d.h. die durch eine ADAM-Protease in der Ektodomäne und durch die γ -Sekretase in der Transmembranregion prozessiert werden (Abb. 6). Hierzu sollten sowohl Mausgewebe als auch transfizierte COS7-Zellen und embryonale Fibroblasten (MEFs) untersucht werden.

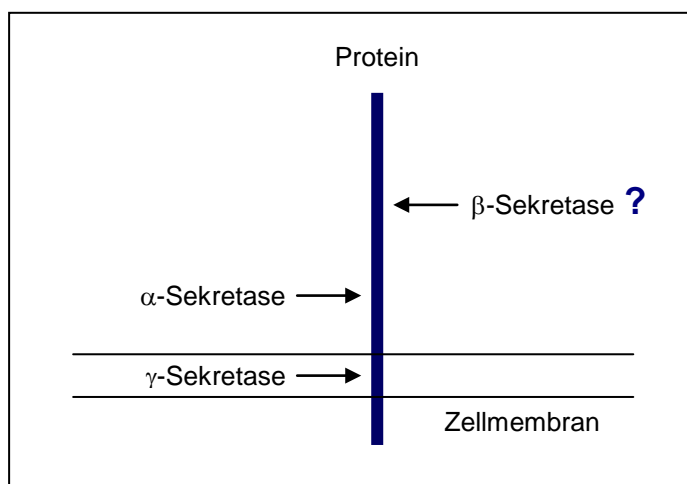


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteine, die einer APP-ähnlichen Proteolyse unterliegen.

In der Transmembran-Region wird das Protein von einer γ -Sekretase gespalten, extrazellulär von einer α -Sekretase. Ziel der Arbeit ist es zu untersuchen, ob diese Proteine auch – wie APP – von der β -Sekretase BACE gespalten werden können.

Des Weiteren wurde im Vorfeld bereits ein Microarray-Assay durchgeführt, mit dem einige hundert Gene auf unterschiedliche Regulation im Gehirn von BACE-1-defizienten und Wildtyp-Mäusen untersucht wurden. Bei vielen dieser Gene konnte ein Unterschied in der Regulation beobachtet werden. In dieser Arbeit sollten daher einige ausgewählte Gene, die aufgrund ihrer Relevanz im Immun- oder

Nervensystem interessant erschienen, durch *Real-Time-PCR* verifiziert werden. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Protein	Exprimiert	Physiologische Funktion	Referenz
CD8b	T-Zell Oberflächen-Glykoprotein	interagiert mit MHC-I, erkennt Fremdprotein und leitet ggf. Apoptose der infizierten Zelle ein	(Bosselut et al., 2000; Thakral et al., 2008)
CD44	Transmembranprotein auf der Oberfläche der meisten somatischen Zellen	ist involviert in die Morphogenese der Extremitäten, Wundheilung, Leukozyten-Migration und Tumor-Metastasierung	(Underhill, 1992; Sugahara et al., 2003; Murai et al., 2004; Sugahara et al., 2006)
Syntaxin 8 (Stx8)	v.a. im Herzen, aber auch im Gehirn, in Niere, Leber, Lunge, Plazenta, Skelettmuskel, Milz und Pankreas	Fusion späterer Endosomen	(Bogdanovic et al., 2002; Kasai et al., 2008)
Colony Stimulating Factor 1 Receptor (Csf1r)	v.a. im hämatopoetischen und lymphatischen Gewebe	Rezeptor für CSF-1, ein Zytokin, das die Produktion, die Differenzierung und die Funktion von Makrophagen kontrolliert	(Rosnet and Birnbaum, 1993)
Periaxin (Prx)	Schwann-Zellen	Myelinisierung	(Gillespie et al., 2000)
Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1 (Slc2a1)	Transmembranprotein v.a. im Endothel von Gefäßen und der Blut-Hirn-Schranke	Transport von Glukose in die Zelle	(Olson and Pessin, 1996; Suls et al., 2008)

Tabelle 1: Ausgewählte Gene Für die *Real-Time-PCR*

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

96-well-Mikrotiterplattenleser Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Agarose-Gelkammer Modell H5	Roth, Karlsruhe, D
Analysenwaage	Kern & Sohn, Dürrewangen, D
Chemilumineszenzkamera LAS-1000	Fujifilm, Carrollton, USA
CO ₂ -Inkubatoren / Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
DNA-Photometer GeneQuant pro	Biochrom, Cambridge, UK
Homogenisator Xenox	Roth, Karlsruhe, D
Horizontalschüttler RM 5	Assistent, Sondheim, D
Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System	BioRad, Hercules, USA
PCR-Cycler	Perkin Elmer, USA
Phasenkontrastmikroskop	Leika
pH-Meter	Krick, Langenselbold, D
Phosphoimager – BAS-1000 / LAS-1000	Fujifilm, Kanagawa, Japan
Photometer	Hitachi, Japan
<i>Real-Time</i> -PCR-Cycler ABI PRISM 7000	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Semi-Dry-Blot-System, Transblot SD	BioRad, München, D
Spannungsquellen PowerPack 200 / 300	BioRad, München, D
Sterilbank danLAF VFR 1806	Claus Damm A / S, Humlebaek, DK
Thermoblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
UV-Tisch, Video-Drucker, Video-Kamera	Intas UV-Systeme, Göttingen, D
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifugen:	
- Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D

- Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
- Zellzentrifuge Universal 32, Typ1605	Hettich, Tuttlingen, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6-Loch-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalkanülen Microlance	Becton Dickinson, Fraga, E
Handschuhe	Roth, Karlsruhe, D
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim, D
Parafilm M	American National Can, Greenwich, UK
pH-Indikatorstreifen	Macherei-Nagel Düren, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Präparationsbesteck	FST, Heidelberg, D
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpell Feather, Nr.10	pfm, Köln, D
Sterile Plastikröhrchen (15 & 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Whatman Papier	Roth, Karlsruhe, D
Zellkulturschalen 10cm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Roth, Karlsruhe, D
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, USA
BSA	Sigma, Steinheim, D
Calciumchlorid	Sigma, Steinheim, D
Complete Proteinaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
DMSO	Sigma, Steinheim, D
DNA-Marker 1kb	Roche, Mannheim, D

dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Riedel-de Haën, Seelze, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
Fugene 6	Roche, Mannheim, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
p-Nitrophenyl Phosphat	Sigma, Steinheim, D
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma, Steinheim, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma, Steinheim, D
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt, D

2.1.4 Verwendete Kits

- Auswertung der Immunodetektion von Proteinen auf Membranen:
ECL-Advanced Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences,
Little Chalfont, UK
- Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen:
Invisorb Spin Tissue Mini Kit (250), Invitex
- Proteinbestimmung:
Bradford-Reagenz, BioRad, München, D
- Transfektion von Zellen:
FuGene6, Roche, Basel, CH

- Plasmid-Midipräparation:
Plasmid-Midiprepkit, PureYield Plasmid Midiprep System, Promega
- *Real-Time-RT-PCR*:
qPCR™ Mastermix Plus for SYBR GREEN I, Eurogentec, Seraing, B

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von Sigma Genosys (Steinheim, D) erworben.

Primer für die Genotypisierung von Wildtyp- bzw. BACE-1-defizienten Mäusen:

BACE-1 Exon *Forward* – 5' ATG GCC CCA GCG CTG CAC TGG CTC C 3'

BACE-1 Exon *Reverse* – 5' CTG CCT ACG GTC ATC TCC ACA TAG TAG 3'

Neomycin *Forward* – 5' GTT GTC ACT GAA GCG GGA AGG GAC TGG CTG 3'

Neomycin *Reverse* – 5' GCG AAC AGT TCG GCT GGC GCG AGC CCC TGA 3'

Primer für den Nachweis von CD44, CD8b, Csf1r, Prx, Slc2a1, Stx8 und HPRT in der *Real-Time-RT-PCR*:

CD44 *Forward* – 5' GGA AAC CCA GTG AGC TCA AC 3'

CD44 *Reverse* – 5' TGT CCA CAC TCT GCA GAT TC 3'

CD8b *Forward* – 5' CTC AAG CTG CCT GCT TTG AA 3'

CD8b *Reverse* – 5' GTC CAA GGC CCA GTC CAA GA 3'

Csf1r *Forward* – 5' ATG CTT AGA CTA CAG GCT TC 3'

Csf1r *Reverse* – 5' CAG GGC ACT GGG TAG AAC AC 3'

Prx *Forward* – 5' GGA TTC AGG GTC CGA CTG CC 3'

Prx *Reverse* – 5' GGG GCT AGG CTG GGG AAT GG 3'

Slc2a1 *Forward* – 5' CTA GTC TCC TGT GCA CTG AG 3'

Slc2a1 *Reverse* – 5' CTG TAT TTA ATA TTG ACA AC 3'

Stx8 *Forward* – 5' TGA AGG ACT TAC TGC TAA GA 3'

Stx8 *Reverse* – 5' CTT TGC TTC TTC GCT CAT CA 3'

HPRT *Forward* – 5' CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT G 3'

HPRT *Reverse* – 5' GTC AAG GGC ATA GCC AAC AAC AAA C 3'

2.1.6 Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Verwendete cDNA	Referenz
pcDNA 3	NCAM 140; NCAM 180; m-BACE inaktiv	Invitrogen
pcDNA 3.1	mTace FL;	Invitrogen
pcDNA 3.1 Zeo (-) (B)	Mouse ADAM10, h-BACE Wildtyp; h-BACE inaktiv	Invitrogen
pAP Taq 5	TNF α ; TRANCE; Amphiregulin; Betacellulin	Gene Hunter
Peak 12 / SEAP	APP; L-Selectin; TNFR II	Stefan Lichtentaler, München
PSG5	m-BACE Wildtyp	Stratagene, USA

Tabelle 2: Verwendete Vektoren

2.1.7 Verwendete Standardplasmide

Gen	Vektor	Primer
Axcam	pBlueScribe Sal / Mlu	M13
Syntaxin 6	pT7T3D-Pacl	M13
Syntaxin 8	pT7T3D-Pacl	M13
Ramp 2	pME18S-FL3	Sugano F1 / R1
Tcrb-V8.2	pBluescript Lion	Lion FSP / RSP
Csf1r	pBluescript Lion	Lion FSP / RSP
Slc2a1	pBluescript Lion	Lion FSP / RSP
Periaxin	pBluescript Lion	Lion FSP / RSP
CD8b	pBluescript Lion	Lion FSP / RSP
CD44	pBluescript Lion	Lion FSP / RSP

Tabelle 3: Verwendete Standardplasmide

2.1.8 Verwendete Primärantikörper

Antigen	Immunisierte Spezies, Ig-Klasse, Bezeichnung	Verdünnung	Referenz
Anti CD56 (NCAM)	Ratte, IgG	1:5000	BD Biosciences Pharmingen
Anti BACE PAb	Kaninchen, IgG, PSC-2253	1:1000	Axxora, USA
Anti Flag	Maus, IgG, M2	1:500	Sigma, D
Anti APP	Kaninchen, A8717	1:1000	Sigma, D

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Alle Primärantikörper wurden für den Westernblot in 3% Magermilchpulver in TBS/T verdünnt.

2.1.9 Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Kopplung	Verdünnung	Herkunft
Esel α Kaninchen	HRP	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg, D
Ziege α Maus	HRP	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg, D
Ziege α Ratte	HRP	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg, D

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Alle Sekundärantikörper wurden für den Westernblot in TBS/T verdünnt.

2.1.10 Verwendete Inhibitoren

Stimulus	Konz. / eingesetzt	Dauer der Stimulation	Herkunft
Compound 3 (C3)	10 mM / 10 μ M	24 h	Merck, Darmstadt, D
GM6001	13 mM / 10 μ M	24 h	Sigma, Steinheim, D
TAPI	20 mM / 10 μ M	24 h	Sigma, Steinheim, D

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren

2.1.11 Verwendete Puffer und Lösungen

ADAM10 Lysispuffer:	5mM Tris 1mM EGTA 250 mM Sucrose 1% TritonX-100 → pH 7,4
AP-SDS-Page-Gel-Puffer:	100 mM NaCl 20 mM MgCl ₂ 100 mM Tris x HCl (pH 9,5)
AP-Substratlösung:	0,1 M Glycin 1 mM MgCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ → pH 10,4 → pro 5 ml eine Tablette p-Nitrophenyl-Phosphat (Sigma N-9389) hinzugegeben.
Laufpuffer:	25 mM Tris / HCl pH 7,5 200 mM Glycin 3,5 mM SDS
LB-Medium:	10 g Bakto-Trypton 5 g Bakto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl → ad 1000 ml H ₂ O dest.; pH 7,0
Sammelgelpuffer:	30,28 g Tris / HCl pH 6,8 2 g SDS

	→ ad 500 ml H ₂ O bidest.
2x-Solubilisierungspuffer:	20% Glycin 4.5% SDS 125mM Tris / HCl pH 6.8 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<i>Strippingpuffer:</i>	62.5 mM Tris pH 6.8 2% SDS 100 mM β-Mercapto-Ethanol
1x TAE	40 mM Tris / HCl pH 8.0 25 mM EDTA
TBS/T	20mM Tris 1mM EDTA 140 mM NaCl 0,1% Tween-20 → pH 7,5
Transferpuffer:	25mM Tris 192mM Glycin 10% Methanol → pH 8,5
Trenngelpuffer:	90,85 g Tris / HCl pH 8,8 2 g SDS → ad 500 ml H ₂ O bidest.

2.1.12 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit Zellen

DMEM: Invitrogen, Karlsruhe, D und PAA Laboratories, Linz, A

FKS: 30 min hitze-inaktiviert bei 56°C
Biochrom und PAA (chargenabhängig)

PBS: 150 mM NaCl
120 mM KCl
10 nM Na₂HPO₄ / KH₂PO₄
→ pH 7,4

Penicillin / Streptomycin: 100 x konzentrierte Stammlösung (10.000 µg / ml)
PAA Laboratories, Linz, A

Trypsin-EDTA: Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.13 Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz
COS7	Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen / Strep	ATCC, etablierte Zelllinien
BACE-1 -/- MEF	Embryonale Mausfibroblasten, „BACE-1-defiziente Maus“, primär oder spontan transformiert	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen / Strep	eigene Herstellung
BACE-1/2 -/- MEF	Embryonale Mausfibroblasten, „BACE-1/2-defiziente Maus“, primär oder spontan transformiert	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen / Strep	Diana Dominguez, Belgien
BACE-2 -/- MEF	Embryonale Mausfibroblasten, „BACE-2-defiziente Maus“, primär oder spontan transformiert	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen / Strep	Diana Dominguez, Belgien
Wildtyp-MEF	Embryonale Mausfibroblasten, „Wildtyp-Maus“, primär oder spontan transformiert	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen / Strep	eigene Herstellung

Tabelle 7: Zelllinien und Kulturmedien

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 TIERMODELL

2.2.1.1.1 Mausstämme

In Vorarbeiten wurde mittels homologer Rekombination das murine BACE-1-Gen ausgeschaltet. Hierzu wurde eine exogene DNA-Sequenz, versehen mit einem Neomycinresistenzgen (neo) als Selektionsmarker, in den offenen Leserahmen des ersten kodierenden Exons im BACE-1-Gen integriert. Aufgrund der darin enthaltenen Stoppsignale konnte die Translation des BACE-1-Proteins verhindert werden. Ein Schema hierzu zeigt Abbildung 7.

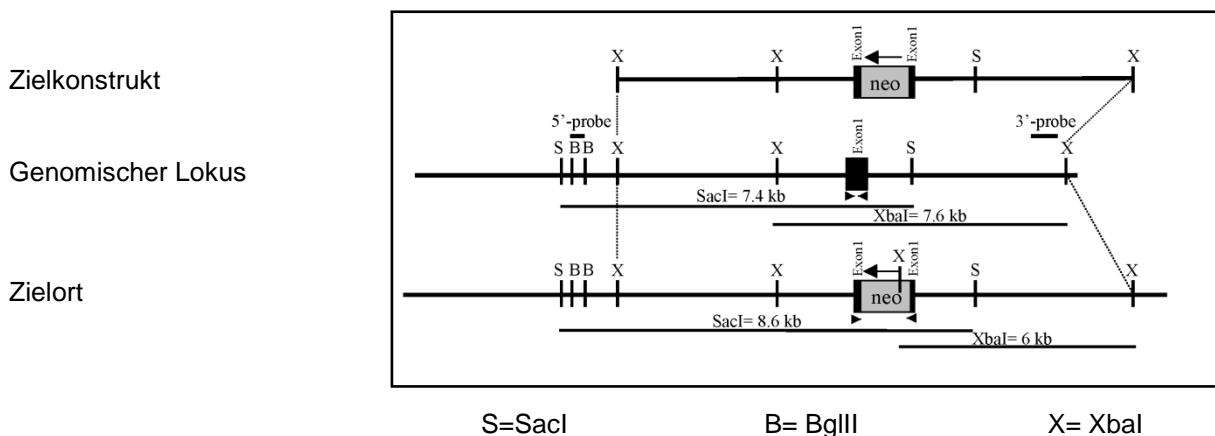
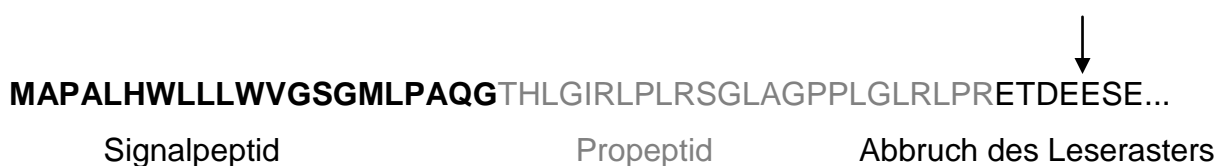


Abbildung 7: Ausschaltung des murinen BACE-1-Gens

Das Zielkonstrukt wurde produziert durch Subklonierung des XbaI-Fragments des BACE-1-Genes im pBluescript Vektor. Eine Neomycin-Resistenz-Kassette wurde in das erste kodierende Exon von BACE-1 eingefügt, wobei das Leseraster unterbrochen wurde. Die Pfeile zeigen die Primer an, die zur Genotypisierung verwendet wurden.

Schema: (Dominguez et al., 2005)



2.2.1.1.2 Maushaltung

Sowohl die BACE-1-defizienten – als auch die Wildtyp-Mäuse wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Helligkeit und 12 h Dunkelheit eingehalten. Die Temperatur in den Räumlichkeiten betrug 19-21°C, die Luftfeuchtigkeit 45-60%.

2.2.1.1.3 Präparation von Organen aus Mäusen

Die verwendeten Tiere (P1, P5 und adult) wurden durch Dekapitation bzw. nach Betäubung durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Nach Abtötung der äußerlich anhaftenden Bakterien durch 75% Ethanol wurde ihnen mit Hilfe von Schere, Pinzette und Skalpell der Schädel eröffnet und das Gehirn entfernt. Anschließend wurde das Cerebrum vom Cerebellum getrennt. Zur späteren Genotypisierung der Tiere wurde ihnen die Schwanzspitze abgeschnitten. Die Cerebri wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.2.1.2 ZELLPRÄPARATION UND KULTIVIERUNG VON ZELLEN

2.2.1.2.1 Subkultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Medien wurden vor Verwendung auf 37°C erwärmt.

Splitten, d.h. Aufteilen von Zellen auf mehrere Schalen, wurde dann vorgenommen, wenn die Zellen in einer Schale nahezu konfluent waren. Hierzu wurde das Nährmedium von den Zellen abgesogen und 1 ml Trypsin zur Ablösung der Zellen vom Untergrund auf die Schale gegeben. Nach einer 1-minütigen Inkubation wurden 5 ml des mit FKS und Penicillin / Streptomycin versetzten DMEM-Nährmediums dazugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Abspülen mit der Pipette vollständig vom Untergrund abgelöst. Jeweils 3 ml wurden in eine neue Schale (Ø 10 cm) gegeben und mit weiteren 7 ml des DMEM-Nährmediums aufgefüllt.

2.2.1.2.2 Transfektion von Zellen

Die Zellen wurden in ein Loch einer 6-Loch-Schale ausgesät. Es wurden 2 ml des mit FKS und Penicillin / Streptomycin versetzten DMEM-Nährmediums hinzugegeben und die Zellen bis zu einer Dichte von etwa 60% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fugene-Reagenz transfiziert. Für die Transfektion wurden 1 µg DNA mit 3 µl Fugene ad 100 µl DMEM ohne Serum in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. 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. Vor der Zugabe des Gemisches zu den Zellen wurde das Zellkulturmedium noch einmal gewechselt. Das Transfektionsreagenz blieb für 48 h auf den Zellen, die anschließend geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

Im Falle einer späteren Verwendung für die Messung der Aktivität von Alkalischer Phosphatase wurde das Transfektionreagenz nach 24 h abgesogen und es wurden 600 µl DMEM ohne Serum vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach weiteren 12 h wurden sowohl der Überstand als auch die Zellen getrennt voneinander geerntet.

2.2.1.2.3 Ernten von Zellen

Das Nährmedium wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Beseitigung der im Medium schwimmenden abgestorbenen Zellen wurde das Medium für 5 min. bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand nochmals in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Überstand bei -20°C gelagert. Zum Ernten der Zellen wurden diese zunächst 1 min. lang in 500 µl PBS für 1 min. gewaschen. Anschließend wurden erneut 500 µl PBS auf die Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber vollständig vom Untergrund abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min. bei 12000 rpm zentrifugiert, das PBS wurde abpipettiert und das Pellet bei -20°C gelagert.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG MIT HILFE DES BRADFORD-ASSAYS

Die Proteinmengen wurden mit Hilfe des „*Protein Assay Dye Reagent Konzentrats*“ (Bradford-Lösung) von „Bio-Rad Laboratories GmbH“ (München) bestimmt. Dieses basiert auf dem blauen Säurefarbstoff „Coomassie-Brillantblau“, dessen Absorptionsmaximum sich in Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu von 465 zu 595 nm verschiebt. Grund hierfür ist die Komplexbildung zwischen Protein und dem Farbstoff in seiner anionischen Sulfonat-Form. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Bevor die Proteinmenge bestimmt werden konnte, wurde die Zell- oder Gewebeprobe je nach Größe in 30 bis 500 µl ADAM10-Lysispuffer/Complete (40:1) vollständig lysiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min. zentrifugiert um nicht gelöste Zelltrümmer zu entfernen.

Zur Proteinbestimmung wurde 1 µl Überstand mit 200 µl 1:5 verdünnter Bradford-Lösung auf eine 96-Well-Platte gegeben. Auf einem *Well* wurde als Leerwert nur die verdünnte Bradford-Lösung aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt.

2.2.2.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAGE) wurde im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970) - bestehend aus einer Sammel- und einer Trennschicht - vorgenommen. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und die Trenngele waren 7-15%-ig. Die Elektrophorese erfolgte in einer großen Gelkammer von BioRad und wurde bei konstanten Voltstärken durchgeführt. Die Proteine wurden in reduzierendem 2 x Solubilisierungspuffer (enthält zusätzlich 10% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min. bei 95°C denaturiert. Eine Ausnahme bildete hierbei die Alkalische Phosphatase, die nicht aufgeköcht wurde, da sie durch die Denaturierung ihre Aktivität verlieren würde, die nach der Elektrophorese im Gel bestimmt werden sollte. Hier wurde auch ein nicht-reduzierender Solubilisierungspuffer verwendet. Der

verwendete Marker war der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus“ von Fermentas (St. Leon-Rot, D). Die Protein-Standard-Größen betragen 10, 15, 27, 35, 55, 70, 100, 130 und 250 kD.

2.2.2.3 IMMUNOBLOT

Zur Immunodetektion mit Hilfe des Semi-dry-Blots wurden die nach Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen, auf der sie dann fixiert und dargestellt werden können. Hierfür wurde *Whatman*-Papier ausgeschnitten und mit Transferpuffer befeuchtet. Anschließend wurde das Trenngel vom Sammelgel getrennt und mit der mit Methanol befeuchteten PVDF-Membran zwischen jeweils 2 Schichten *Whatman*-Papier gelegt. Der Elektro-Transfer der Proteine erfolgte bei 20 V.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurden 2 g Magermilchpulver in 40 ml TBS/T gelöst und die PVDF-Membran in diesem *Blotting*puffer für 60 min. unter kontinuierlichem Schütteln oder für mindestens 8 h im Kühlschrank inkubiert.

2.2.2.4 IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN AUF MEMBRANEN

Der erste Antikörper wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit dem *Blotting*puffer aus Magermilchpulver und TBS/T verdünnt. Die Membran mit den fixierten Proteinen wurde auf eine Glasplatte gelegt und 1-2 ml Antikörper-Lösung auf die Membran pipettiert. Die Membran wurde mit Parafilm abgedeckt und 60 min. inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min. in TBS/T gewaschen. Der 2. Antikörper wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit TBS/T verdünnt, die Membran auf eine Glasplatte gelegt und 1-2 ml Antikörper-Lösung auf die Membran pipettiert. Diese wurde mit Parafilm abgedeckt und wiederum für 60 min. inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min. in TBS/T gewaschen. Zur Auswertung der Immunodetektion wurde das „*ECL-Advanced Kit*“ von „*Amersham Biosciences*“ verwendet. Die Lösungen A und B wurden 1:1 vermischt, die Membran auf eine Glasplatte gelegt, 1 ml des Gemisches auf die Membran gegeben und 1 min. inkubiert. Die Membran wurde luftfrei in eine Folie

gelegt und die Restflüssigkeit komplett entfernt. Ein Marker wurde auf Bandenhöhe auf die Folie geklebt und die Membran im Phosphoimager fotografiert.

2.2.2.5 STRIPPEN DER PVDF-MEMBRANEN

Durch Strippen von Westernblot-Membranen können unterschiedliche Proteine nacheinander auf einer Membran detektiert werden. War die Membran bereits getrocknet, wurde sie zunächst 5 min. in Methanol equilibriert und anschließend zweimal 15 min. in *Stripping*-Puffer bei 70°C von Antikörpern freigesprochen. Um alle Reste des *Stripping*-Puffers zu entfernen, wurde die Membran mindestens 1 h unter kontinuierlicher Bewegung in TBS/T gewaschen. Dabei wurde der Puffer mehrfach gewechselt.

2.2.2.6 ALKALISCHE-PHOSPHATASE-ASSAY

Mit Hilfe des Alkalischen-Phosphatase-Assays wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen. Diese ist als *Tag* in das Plasmid eingebaut, welches das zu untersuchende Gen enthält. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass der Probe das Substrat *p*-Nitrophenyl-Phosphat zugegeben wird, welches unter Katalyse der Alkalischen Phosphatase zu *p*-Nitrophenol und anorganischem Phosphat reagiert (Abb. 8). Das *p*-Nitrophenol reagiert weiter unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms zum *p*-Nitrophenylen-Anion, das eine gelbe Färbung aufweist. Diese Färbung kann unter photometrisch bei 405 nm bestimmt werden. Durch mehrere Messungen in einem bestimmten zeitlichen Abstand kann die Enzymaktivität bestimmt werden.

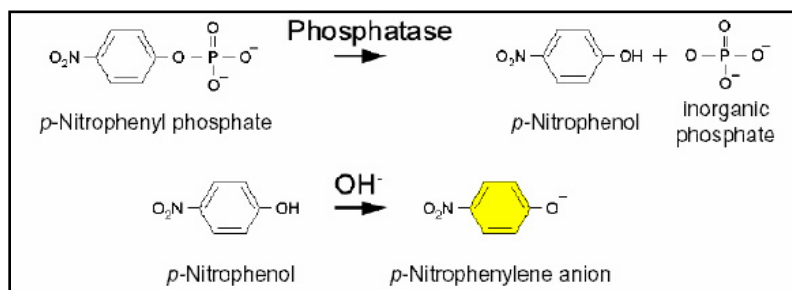


Abbildung 8: Das Prinzip der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion

Die Phosphatase spaltet ein inorganisches Phosphat vom *p*-Nitrophenyl-Phosphat ab. Durch Addition von Wasser wird das *p*-Nitrophenylen-Anion gebildet, das eine gelbe Färbung aufweist.

Hierzu wurde die Zellpellet-Probe je nach Größe in 30 bis 500 µl ADAM10 Lysispuffer / Complete (40:1) vollständig lysiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min. zentrifugiert.

Auf einer 96-Well-Platte wurden pro Well 5 - 10 µl des Zellpellet-Lysats mit 200 µl der Substratlösung bzw. 100 µl des Zellkultur Überstandes mit 100 µl der Substratlösung gegeben. Die Extinktion wurde im Abstand von 5 - 15 min. bei 405 nm gemessen. Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität in ml} = \frac{V_{G(W)} \cdot 1000 \cdot \Delta E \cdot V_{P(L)}}{\varepsilon \cdot V_{P(W)} \cdot \Delta t} \quad \text{in U / ml}$$

$V_{G(W)}$ = Gesamtvolumen / Well

$V_{P(L)}$ = Volumen, in dem das Zellpellet lysiert wurde bzw. Gesamtvolumen des Überstands in der Zellkultur

$V_{P(W)}$ = Probenvolumen / Well

ΔE = Änderung der Konzentration

Δt = Zeitabstand

ε = Extinktionskoeffizient (in diesem Falle 18,5)

2.2.2.7 AP-SDS-PAGE-GEL

Bei dieser Methode wird im Gegensatz zum AP-Assay die Enzymaktivität nicht photometrisch bestimmt. Es entstehen vielmehr sichtbar unterschiedlich starke Banden, die nach einer Trennung durch Elektrophorese Aufschluss über die Größe und damit über die Identität der mit dem AP-Tag versehenen Spaltprodukte liefern können.

Hierfür wurden zunächst die Überstände aus der Zellkultur auf ca. 20 µl aufkonzentriert. Dies geschah mit Hilfe der „Centrifugal Filter Devices“ von „Microcon/amicon bioseparations“. Die Proben wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit nicht reduzierendem 2x-Solubilisierungspuffer versehen. Die Suspensionen und ein Marker wurden in je eine Geltasche eines 10% SDS-Gels pipettiert und die Elektrophorese wurde bei 95 V gestartet. Um eine Überhitzung und damit eine Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase zu verhindern, wurde die Elektrophorese-Kammer in einen Behälter mit Eis gestellt. Die Elektrophorese wurde

gestoppt, wenn die blaue Linie des 2x-Solubilisierungspuffers am unteren Rand des Gels angekommen war. Das Gel wurde nun 2 x 10 min. in 2,5% Triton X – 100-Lösung und anschließend in AP-SDS-Page-Gel-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 5-10 ml NBT / BCIP *staining solution* (*Ready-to-use-tablets* von Roche) wurde das Gel in diesem Puffer für ca. 15 – 30 min. bei 37°C inkubiert, bis deutliche Banden darauf erkennbar waren. Dann wurde die Reaktion gestoppt, indem das Gel in einem 30%-igem Methanolbad 5 min. lang gewaschen wurde. Das Gel wurde fotografiert und getrocknet, um es langfristig haltbar zu machen.

2.2.2.8 TROCKNEN VON GEFÄRBTEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Das Trocknen der SDS-Gele erfolgte in Cellophanfolien mit dem Gel-Luft-Trockner. Die Gele wurden mindestens 5 min. lang gewässert, zwischen zwei Cellophanfolien gelegt und danach 3 h unter Luftzufuhr getrocknet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 DNA-ISOLIERUNG AUS SCHWANZSPITZEN

Die DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen diente der Genotypisierung der Versuchstiere. Hierzu wurde ca. 1 cm der Schwanzspitze abgetrennt. Zur Gewinnung der DNA wurde das „Invisorb Spin Tissue Mini Kit (250)“ der Firma „Invitex“ verwendet. Die Schwanzspitzen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 400µl „Lysis Buffer G“ und 40 µl Proteinkinase K enzymatisch zerkleinert. Anschließend wurde die Probe über mehrere h unter kontinuierlichem Schütteln bei 52°C inkubiert. Nach 2-minütigem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl „Binding-Buffer T“ gut vermischt. Zur Bindung der DNA wurde nun ein „Spin-Column“ auf ein 2 ml Reaktionsgefäß platziert und die Suspension auf das „Spin-Column“ transferiert. Dort wurde die Suspension für 1 min. inkubiert und bei 12000 rpm 2 min. lang zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das „Spin-Column“ auf das Reaktionsgefäß zurückgesetzt. Zum Waschen der DNA wurden 550

µl „Wash-Buffer“ hinzugegeben und die Suspension für 1 min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das „Spin-Column“ zurück auf das Reaktionsgefäß gesetzt. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das restliche Ethanol bei 12000 rpm für 2 min. abzentrifugiert. Für die Elution der DNA wurde das „Spin-Column“ auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 50 – 200 µl des auf 52°C vorgewärmten „Elution-Buffers D“ hinzugegeben. Nach 3-minütigem Inkubieren wurde 2 min. lang bei 10000 rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde die isolierte DNA photometrisch quantifiziert und per PCR vervielfältigt.

2.2.3.2 DNA-AMPLIFIKATION ÜBER DIE POLYMERASE-KETTEN-REAKTION VON DNA AUS MAUSSCHWÄNZEN

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können.

Die PCR basiert auf drei Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (*Template*) in Einzelstränge
2. Bindung von Oligonukleotidprimern an beide Einzelstränge (*Annealing*)
3. Synthese der DNA durch die Polymerase - ausgehend von den gebundenen Primern (*Extension*)

Zur Genotypisierung der DNA aus den Mausschwänzen wurden zwei Mastermixe für die jeweiligen zwei Primerpaare (Neomycin und BACE-Exon) angesetzt, die je Probe mit 1,5 µg DNA folgendes enthielten:

- je 1 µl Oligoprimer (*forward* und *reverse*)
- 5 µl 10x Puffer (+MgCl₂)
- 5 µl dNTP
- 35 µl H₂O
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl von Roche)

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Neomycin-PCR:

- Initialschritt: - 5 Minuten 95°C
30 Zyklen: - 15 Sekunden 96°C
- 30 Sekunden 58°C
- 2 Minuten 72°C
Elongation: - 3 Minuten 72°C
anschließend: - Kühlung auf 4°C

BACE-Exon-PCR:

- Initialschritt: - 5 Minuten 95°C
35 Zyklen: - 15 Sekunden 96°C
- 30 Sekunden 55°C
- 2 Minuten 72°C
Elongation: - 3 Minuten 72°C
anschließend: - Kühlung auf 4°C

Anschließend wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

2.2.3.3 RNA-ISOLIERUNG AUS GEWEBE

Die RNA-Isolierung aus Mausgehirnen erfolgte mit dem „TRIzol™“-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe). Zuerst wurde das Gehirn in 1ml Trizol zerstampft und für 10 min. in der Kühlzentrifuge bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Restgewebes wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, das Lysat kurz geschüttelt, für 2-3 min. bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 min. bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Es bildeten sich 3 Phasen: Eine untere rote Phase mit Phenol und Chloroform, eine weiße Trennschicht und eine obere wässrige Phase, die die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut für 10 min. bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Die RNA befand sich nun als gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen, kurz gevortext und abermals bei 4°C und 12000

rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet getrocknet, anschließend je nach Pelletgröße in 50-100 µl RNase-freiem Wasser lysiert. Um die RNA vollständig zu lösen, wurde das Lysat für 10 min. bei 55-60°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

2.2.3.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren aus den DNA- oder RNA-Isolierungen erfolgte photometrisch. Die Messung der Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O in einer 10 mm Quarzküvette mittels eines UV-Detektors mit automatischer Quantifizierung durchgeführt. Die OD 260 = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

2.2.3.5 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA (cDNA-SYNTHESE)

Zur weiteren Analyse wurde die aus dem Gewebe isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird das Enzym Reverse Transkriptase genutzt, das aus einer RNA-Vorlage eine komplementäre DNA synthetisieren kann.

Für einen Reaktionsansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurde mit 1 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase 15 min. bei 37°C inkubiert und mit 1 µl EDTA (25 mM) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C zur Aufhebung der Sekundärstruktur der RNA und anschließender Lagerung auf Eis wurden 0,5 µg Oligo(dT)Primer (Firma Fermentas GmbH) hinzugegeben und auf 11 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min. bei 70°C inkubiert und wiederum auf Eis gelagert. Nun wurden 4µl des *5x-Reaction-Buffers* und 2 µl dNTP-Mix hinzugegeben, der Ansatz 5 min. lang bei 25°C inkubiert und danach 1 µl der Reversen Transkriptase hinzugegeben. Anschließend wurde 10 min. lang bei 25°C inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 60 min.. Danach wurde die Reverse Transkriptase 10 min. bei 70°C inaktiviert. Pro 1 µg eingesetzter RNA wurde die Probe auf 100 µl mit Wasser verdünnt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.6 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1%-ige Agarose-Gele verwendet. Diese eignen sich für einen Trennbereich von 0,5 bis 7 kb. 1 g Agarosepulver wurde in 100 ml 1x TAE gegeben und unter gelegentlichem Schwenken so lange erhitzt, bis das Pulver vollständig gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurde die Flüssigkeit luftblasenfrei in die Form gegossen und bis zur vollständigen Aushärtung des Gels nicht bewegt. Der Kamm wurde dann aus dem Gel entfernt und dieses in eine mit 1x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. 12 µl der Proben wurden mit 2 µl 6x DNA *Loading-Dye* versetzt und die Proben sowie ein Marker in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V gestartet und nach 35 min. beendet. Das Gel wurde für 20 min. in einem Ethidiumbromidbad (2,5 µg / ml) gefärbt und in H_2O gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und per Ausdruck auf einem Thermopapier dokumentiert.

2.2.3.7 REAL-TIME-RT-PCR

Verglichen mit der RT-PCR ist das Besondere an der Methode der *Real-Time*-RT-PCR, dass die *Real-Time*-RT-PCR - oder Echtzeit RT-PCR - eine Quantifizierung der Gen-Regulation ermöglicht. In dieser Arbeit wurde die SYBR-Green-I-Methode verwendet. Bei dieser Variante binden die SYBR-Green-I-Moleküle unspezifisch an Doppelstrang-DNA und geben durch die Bindung ein fluoreszierendes Signal ab, das dann quantitativ erfasst werden kann. Mit jedem Zyklus verstärkt sich das fluoreszierende Signal, bis es sich einem Sättigungspunkt nähert. Am Ende eines jeden Zyklus' wird das SYBR-Green-I-Signal gemessen. Hieraus resultiert eine Kurve, die einer Parabel mit der Grundfunktionsgleichung $f(x)=\sqrt{x}$ ähnelt. Der Zyklus, bei dem ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird, bezeichnet man als „*threshold cycle*“ (Ct) oder „*Crossing Point*“ (CP). Je mehr cDNA in der Probe enthalten ist, desto kleiner ist der Ct-Wert. Führt man gleichzeitig eine Messung mit einem Referenzgewebe durch - im Falle dieser Arbeit das Gehirn einer Wildtypmaus - so können quantitative Vergleiche angestellt werden.

Um PCR-Reaktionen chromosomaler DNA zu verhindern, die aus der unspezifischen DNA-Bindung des SYBR-Green-Farbstoffes resultieren können, wurden Intron-überspannende Primer ausgewählt.

Die aus der Reversen Transkription gewonnene cDNA wurde in einer PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Primern amplifiziert. Als interner Standard wurden Primer verwendet, die ein spezifisches Fragment des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gens (HPRT) amplifizieren, welches erwiesenermaßen nicht durch BACE beeinflusst wird. Es wurden 5 µl cDNA in folgendem Reaktionsansatz eingesetzt:

- 25 µl 2x Master Mix
- 10 µl H₂O
- 5 µl Forward Primer (3mM)
- 5 µl Reverse Primer (3mM)

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initialschritt:	50°C – 2 Minuten
„Hot GoldStar“ Aktivierungsschritt:	95°C – 10 Minuten
40 Zyklen:	95°C – 15 Sekunden
	60°C – 1 Minute

Durch eine Schmelzkurven-Analyse wurde die Spezifität der jeweiligen PCR-Produkte überprüft. Es wurden Standardkurven für jedes Primerpaar erstellt, indem verschiedene Verdünnungen von Plasmiden mit inserierten Genen gemessen wurden. Die relative mRNA-Expression der spezifischen Gene wurde durch Division mit dem entsprechenden HPRT-Transkriptionslevel errechnet.

2.2.3.8 TRANSFORMATION

Zum Transformieren von Plasmiden in *E.coli* wurde 1 µl des Plasmids in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer Bakteriensuspension gegeben. Die Bakterien wurden für 60 min. auf Eis – und anschließend für 40 sek. bei 42°C inkubiert. 300 µl einer Soc-Lösung wurden hinzugegeben und die Probe für 45 min. unter kontinuierlichem Schütteln bei 37°C inkubiert.

In einen Kolben mit 300 ml Lb-Medium wurden 300 µl Ampicillin gegeben und das Bakterien-Reaktionsgefäß komplett in den Kolben pipettiert. Anschließend wurde der Kolben für 8 bis 12 h unter kontinuierlichem Schütteln bei 37°C inkubiert.

2.2.3.9 MIDI-PRÄPARATION

Für die Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde das „Pure Yield™ Plasmid Midiprep System“ verwendet.

Die Bakterienkultur wurde in zwei 50 ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und für 10 min. bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zentrifugiervorgang zwei Mal wiederholt, bis kein Bakterienmedium mehr übrig war.

Zur Lyse und Fällung wurde das Zellpellet mit 6 ml „*Cell-Resuspension-Solution*“ vollständig resuspendiert und mit 6 ml „*Cell-Lysis-Solution*“ gründlich gemischt. Die Probe wurde 3 min. inkubiert. Anschließend wurden 10 ml „*Neutralization-Buffer*“ hinzugefügt und nach gründlichem Mischen erfolgte eine erneute Inkubation für 3 min.. Die Probe wurde nun für 10 min. bei 15000 g zentrifugiert.

Zur DNA-Aufreinigung wurde das „*Clearing-Column*“ auf das „*Binding-Column*“ gesteckt und diese Säulenkombination auf der Vakuumstation angebracht. Der Überstand des Lysats wurde in das „*Clearing-Column*“ gegeben und ein Vakuum angelegt, bis das Lysat vollständig durch die Säulenkombination gesaugt worden war. Das „*Clearing-Column*“ wurde abgezogen und verworfen. Mit erneutem Anlegen des Vakuums wurden 5 ml „*Endotoxin-Removal-Wash*“ und anschließend 20 ml „*Column-Wash-Solution*“ durch das „*Binding-Column*“ gesogen. Nach 30 bis 60 sek. wurde das Vakuum abgestellt und das „*Binding-Column*“ auf ein neues Sarstedt-Röhrchen gesteckt. Es wurden 750 µl Nuklease-freies Wasser auf das „*Binding-Column*“ gegeben, 5 min. inkubiert und anschließend 5 min. lang bei 2000 g zentrifugiert. Die gewonnenen Plasmide wurden nun in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, ihre Konzentration photometrisch bestimmt und zur Kontrolle das Plasmid neben dem Ausgangsplasmid auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Proteolyse potentieller BACE-Substrate

In den folgenden Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob es weitere bisher unbekannte BACE-Substrate gibt, die den Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse erklären könnten. Das Augenmerk lag dabei u.a. auf NCAM, da bereits bekannt ist, dass es von einer Metalloprotease prozessiert wird (Hinkle et al., 2006; Kalus et al., 2006). Außerdem wurde beobachtet, dass die Inhibition der Metalloprotease nicht zu einer vollständigen Inhibition des *Sheddings* führt. Es gibt also noch mindestens eine andere Protease, die einen Effekt auf NCAM ausübt. Da sowohl BACE als auch NCAM vor allem im ZNS vorkommen, wurde NCAM als potentiell BACE-Substrat in dieser Arbeit untersucht.

Außerdem wurden weitere Proteine untersucht, die bekanntermaßen – wie auch die bekannten BACE-1-Substrate APP und PSGL-1 – sowohl von einer α -, als auch von einer γ -Sekretase prozessiert werden.

3.1.1 Die Proteolyse der neuronalen Adhäsionsmoleküle NCAM 140/180 durch BACE kann nicht bestätigt werden

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob NCAM ein Substrat von BACE sein könnte. Die Analyse erfolgte mittels Immunoblots, die nach den Protokollen in 2.2.2.1 bis 2.2.2.4 durchgeführt wurden. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis eines Vorversuches, der den Verdacht weckte, dass NCAM ein BACE-Substrat sein könnte. Analysiert wurden 50 μ g Gehirnlisat von Mäusen unterschiedlichen Alters im Vergleich zwischen Wildtyp- und BACE-defizienten Mäusen. Es wurde ein Antikörper verwendet, der C-terminal an NCAM 140 / 180 bindet. Außer dem Volllängen-Protein bei 140 bzw. 180 kD sind potentielle Spaltprodukte zu erkennen.

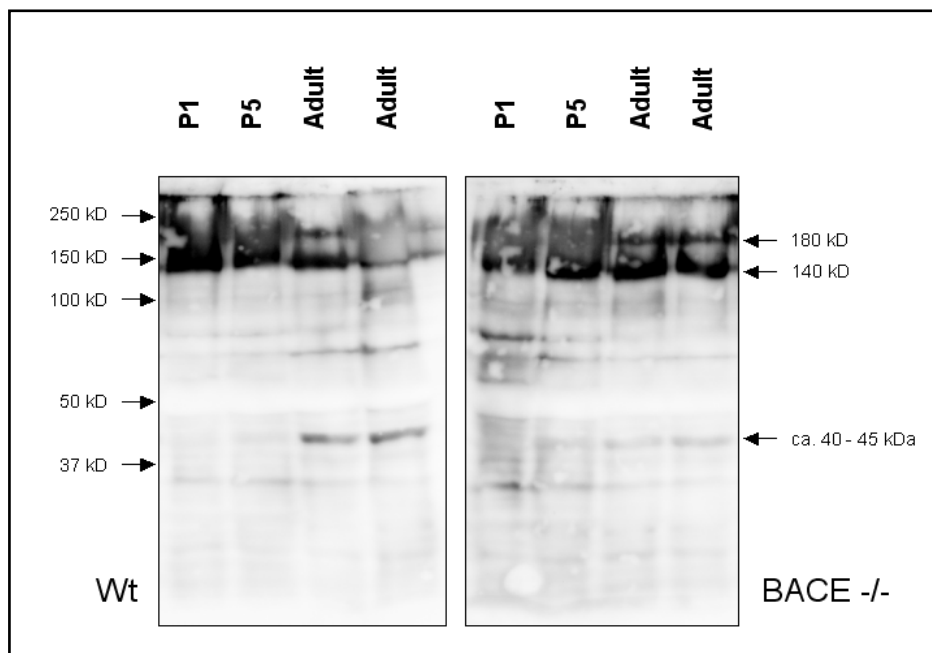


Abbildung 9: Anti-NCAM-Immunoblot mit Maus-Gehirn-Lysat

Untersucht wurden Gehirne von Mäusen (1. Tag postnatal, 5. Tag postnatal bzw. adult). Gefärbt wurde anti NCAM. Sowohl in BACE-defizienten Mäusen (rechts) als auch im Wildtyp (links) lässt sich das Volllängen-Protein (140 bzw. 180 kD) gut sichtbar anfärben. Bei adulten Wildtyp-Tieren sieht man außerdem deutliche Banden mit der Größe von ca. 40 – 45 kD, welche bei den BACE-defizienten Mäusen wesentlich schwächer ausfallen.

Die Tatsache, dass die Proben aus Wildtyp-Gehirnen eine Bande bei ca. 40 – 45 kD aufweisen, die bei den BACE-defizienten Gehirnen nicht zu sehen ist, spricht dafür, dass BACE hier an der Proteolyse von NCAM beteiligt sein könnte. Allerdings fällt auf, dass dieser Effekt nur bei den adulten Tieren, nicht aber bei P1 oder P5-Tieren zu erkennen ist, was den Verdacht unterstreicht, dass BACE nur in bestimmten Entwicklungsstadien im Organismus aktiv ist. Um weitere Klarheit über die Rolle von BACE bei der Proteolyse von NCAM zu gewinnen, wurden Überexpressionsstudien in COS7-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde NCAM mit verschiedenen potentiellen NCAM-Proteasen ko-transfiziert. Abbildung 10 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines solchen Versuches.

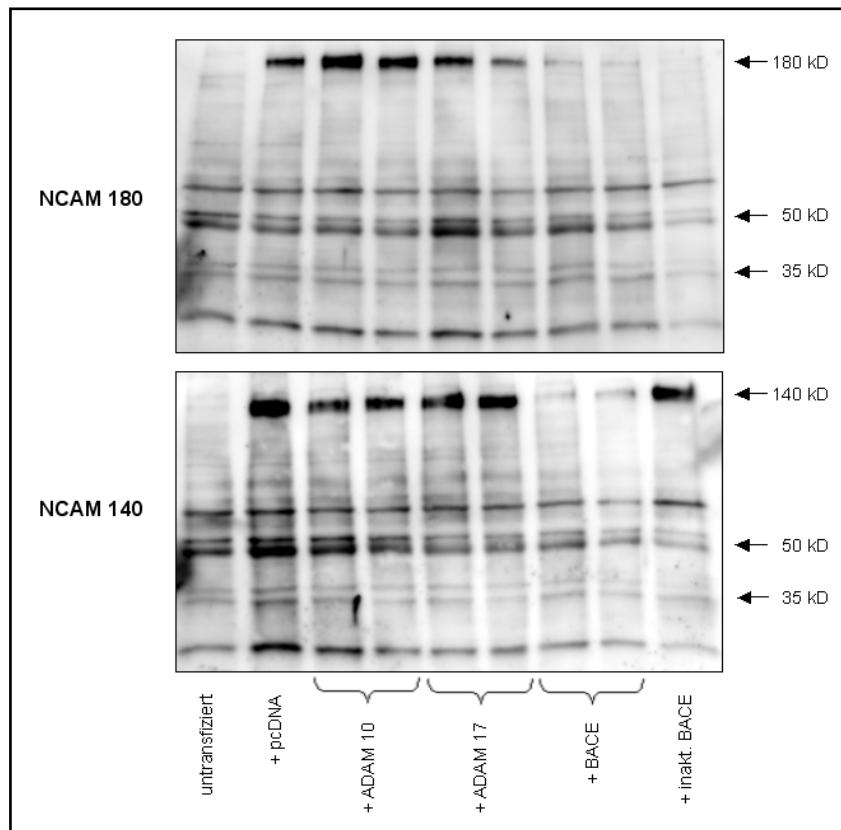


Abbildung 10: Immunoblot nach Überexpression mit NCAM und BACE

COS7-Zellen, ko-transfiziert mit NCAM 180 (oben) bzw. NCAM 140 (unten) und der jeweils unter der Bande aufgeführten cDNA. Das Volllängen-Protein weist eine Größe von etwa 180 (oben) bzw. 140 (unten) kD auf. Es wurde der Primärantikörper Anti CD56 (NCAM) verwendet.

Sowohl NCAM 140 als auch NCAM 180 lassen sich gut mit pcDNA, ADAM10 und ADAM17 ko-transfizieren, denn man sieht deutliche Banden auf Höhe des Volllängen-Proteins, bei 140 bzw. 180 kD. NCAM 140 lässt sich auch gut mit inaktiver BACE-DNA ko-transfizieren. Mit ADAM17 transfizierte Zellen wurden als Doppelwert aufgetragen, da bereits beschrieben wurde, dass ADAM17 NCAM schneiden kann. Erwartet wurden hier die beschriebenen Spaltprodukte mit einer Größe von ca. 25 – 30 kD (110 – 115 kDa N-terminal) (Hinkle et al., 2006). Für ADAM10 ist eine Proteolyse von NCAM noch nicht gesichert, so dass die Analyse dieser Protease in dem Blot als Nebenversuch angesehen werden kann. Anhand der Ko-Transfektion mit dem Leervektor pcDNA, bei dem es sich um eine Negativkontrolle ohne Transfektionseffekt handelt, kann beurteilt werden, ob es sich bei einer kleinen Bande um ein spezifisches Spaltprodukt der jeweiligen Protease handelt oder nicht: Wäre diese Bande nur bei der mit der Protease ko-transfizierten Probe anzutreffen, nicht aber bei der mit pcDNA ko-transfizierten, so wäre dies ein

Hinweis darauf, dass es sich um einen Effekt dieser Protease handelt. Die obere Abbildung zeigt Banden bei 50 und ca. 70 kD, die allerdings auch in den untransfizierten Zellen zu sehen sind und daher als unspezifisch angesehen werden müssen. Auffällig ist in diesem Blot allerdings vor allem, dass in den mit BACE ko-transfizierten Zellen kaum NCAM vorhanden ist. Dies weist auf ein methodisches Problem hin, welches eine Auswertung schwierig gestaltet. Es scheint, dass sich NCAM und BACE nicht gut ko-transfizieren lassen. Ein ähnliches Ergebnis zeigten auch die anderen Immunoblots, so dass aus diesem Grunde von einer weiteren Untersuchung von NCAM als mögliches BACE-Substrat abgesehen wurde.

3.1.2 Untersuchungen von potenziellen BACE-Substraten mittels Alkalische-Phosphatase-Assay

Der Alkalische Phosphatase (AP) Assay (2.2.2.6) ist eine gute Methode für ein *Screening* auf der Suche nach Substraten. Die in dieser Arbeit untersuchten potentiellen Substrate wurden deswegen ausgewählt, weil sie bekanntermaßen – wie die bekannten BACE-1-Substrate APP und PSGL-1 – sowohl von einer α -, als auch von einer γ -Sekretase geschnitten werden. Die verwendeten Plasmide wiesen einen AP-Tag auf, der sich am extrazellulären Ende des Proteins befand (Abb. 11).

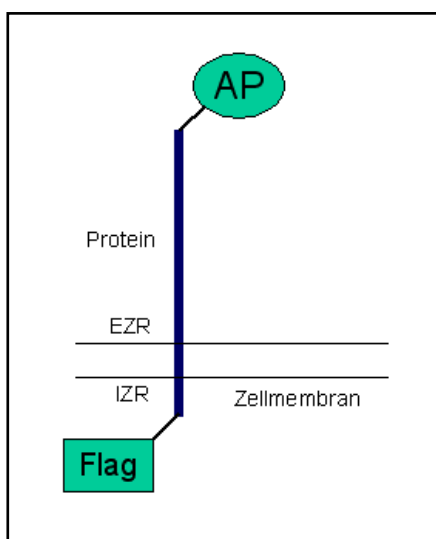


Abbildung 11 : Darstellung eines Proteins mit AP- und Flag-Tag

Das Transmembranprotein weist z.T. einen Flag-Tag am intrazellulären Ende und einen AP-Tag am extrazellulären Ende auf. Wird das Protein durch die Protease gespalten, so wird der AP-Tag in den Zellüberstand freigegeben. Seine Aktivität im Zellpellet und im Überstand ist durch den Alkalische Phosphatase Assay messbar.

Der Flag-Tag erleichtert spätere Untersuchungen mittels Immunoblot.

IZR = Intrazellulärraum; EZR = Extrazellulärraum

Durch Proteolyse gelangt die Ektodomäne mit dem AP-Tag in den Überstand, wo sie mittels AP-Assay messbar ist. Geschieht dies vermehrt durch Ko-Transfektion von BACE, so wäre die Schlussfolgerung, dass BACE in der Lage ist die Proteolyse

durchzuführen. Andererseits würde eine hohe Enzymaktivität im Pellet zusammen mit einer geringen Aktivität im Überstand darauf hindeuten, dass BACE nicht an der Proteolyse beteiligt ist. Die Enzymaktivitäten, die mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet wurden (2.2.2.6), wurden prozentual miteinander verglichen. Der Prozentsatz der Aktivität im Überstand im Verhältnis zur gesamten Aktivität (Zellpellet + Überstand) entspricht dem Prozentsatz an *Shedding*. Die Abbildungen 12 bis 18 zeigen die Ergebnisse der Messungen.

3.1.2.1 ÜBERPRÜFUNG DER VALIDITÄT DER AP-ASSAY-METHODE

Zunächst wurde der AP-Assay mittels einer Positiv-Kontrolle auf seine Gültigkeit getestet. Hierzu wurden Zellen mit BACE und PSGL-1 ko-transfiziert (Abb. 12). PSGL-1 ist ein bereits identifiziertes BACE-Substrat. In Gegenwart von BACE erhöht sich das *Shedding* um 30% im Vergleich zur Transfektion mit dem Kontrollvektor pcDNA. Bei Ko-Transfektion mit inaktivem BACE werden nahezu dieselben Werte erreicht wie ohne BACE. Diese Ergebnisse verifizieren die bereits veröffentlichte Annahme, dass es sich bei PSGL-1 um ein BACE-Substrat handelt (Lichtenthaler et al., 2003). Für diese Arbeit bedeutet dieses Ergebnis, dass es sich bei dem AP-Assay um eine verlässliche Methode handelt.

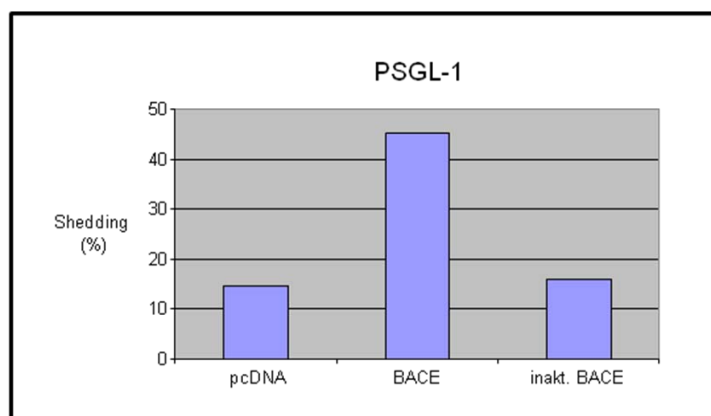


Abbildung 12: Screening-Versuch mit PSGL-1

Gezeigt ist ein Versuch, der als methodische Positivkontrolle zu verstehen ist. Die Zellen wurden mit PSGL-1, einem bekannten BACE-Substrat, und BACE ko-transfiziert. Zu sehen ist ein signifikanter Anstieg der *Sheddingrate* in Gegenwart von BACE, die bei Ko-Transfektion mit inaktivem BACE nicht zu beobachten ist.

3.1.2.2 KEIN HINWEIS AUF EINE BEEINFLUSSUNG DER PROTEOLYSE VON TNF α , TGF α , L-SELEKTIN, AMPHIREGULIN UND BETACELLULIN DURCH BACE-ÜBEREXPRESSION

Anschließend wurde ein *Screening* durchgeführt, das erste Anhaltspunkte über mögliche BACE-Substrate liefern sollte. Hierzu wurden verschiedene Plasmide untersucht, die – ähnlich wie bereits bekannte BACE-Substrate, z.B. APP – sowohl von einer α - als auch von einer γ -Sekretase gespalten werden.

TNF α und TGF α zeigen in Anwesenheit von BACE eine um 5% erhöhte *Shedding*-Aktivität (Abb. 13), ein Ergebnis, das als nicht signifikant betrachtet werden kann. Es spricht also nach Durchführung der hier zusammengefassten Versuche nichts für einen Effekt von BACE auf eines dieser beiden Proteine. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Zusammenfassung in Abbildung 14: L-Selektin, Amphiregulin und Betacellulin zeigen in Anwesenheit von und ohne BACE nahezu identische *Shedding*-Aktivitäten. Auch hier zeigte sich kein Hinweis auf ein BACE-Substrat.

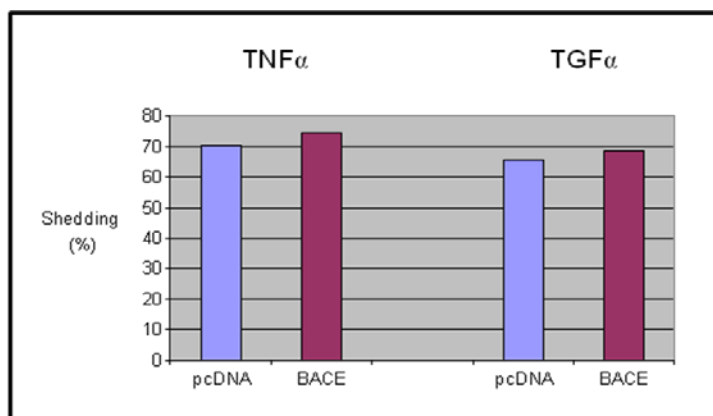


Abbildung 13: *Screening*-Versuch mit TNF α und TGF α

Dargestellt sind die Ergebnisse für die Plasmide TNF α (links) und TGF α (rechts). Die blauen Balken zeigen die Werte für die Ko-Transfektion mit dem Leervektor pcDNA, die roten Balken die für die Ko-Transfektion mit BACE. Es ist kein signifikanter Unterschied im *Shedding* zu sehen.

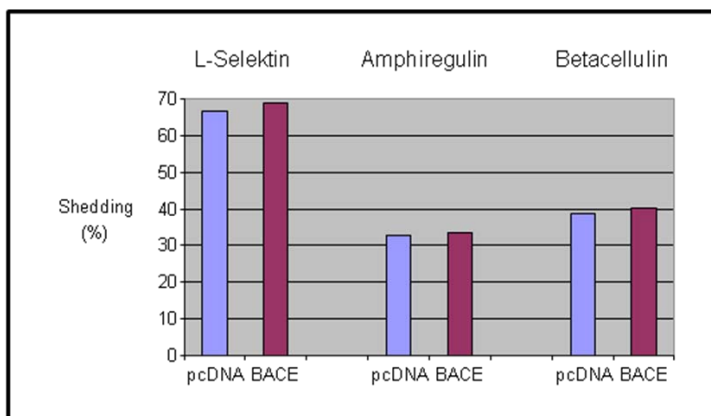


Abbildung 14: Screening-Versuch mit L-Selektin, Amphiregulin und Betacellulin

Farbenverteilung siehe Abb. 13. Die linken Balken zeigen die Ergebnisse für die Plasmide L-Selektin, die in der Mitte für Amphiregulin und die rechten Balken die Ergebnisse für Betacellulin. Auch in dieser Abbildung ist kein signifikanter Unterschied im *Shedding* erkennbar.

3.1.2.3 DIE ÜBEREXPRESSION VON BACE FÜHRT ZUR ERHÖHTEN FREISETZUNG DER TRANCE-EKTODOMÄNE

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse für TRANCE. In diesem Fall wurden die Ergebnisse nicht zusammengefasst, sondern die einzelnen Versuche aufgeführt und mit unterschiedlichen Farben dargestellt. Die obere Graphik zeigt die absoluten Prozentzahlen mit und ohne Ko-Transfektion von BACE. Unten ist zu sehen, um wieviel Prozent höher die *Shedding*-Aktivität in Anwesenheit von BACE ist. Es wird deutlich, dass sich die absoluten Zahlen von Versuch zu Versuch sehr unterscheiden. Der prozentuale Unterschied bleibt jedoch relativ konstant zwischen 13 und 17%. Verglichen mit den bereits untersuchten Konstrukten erscheint dieser Unterschied signifikant und lässt den Verdacht aufkommen, dass es sich bei TRANCE um ein BACE-Substrat handeln könnte. Der Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse zeigt eine sehr hohe Infektanfälligkeit, was weiter die Annahme unterstützt, dass TRANCE ein BACE-Substrat sein könnte, denn TRANCE übernimmt wichtige Funktionen im Immunsystem (1.7.2). Diese Überlegungen führten zu dem Entschluss, sich in den Folgeversuchen auf TRANCE zu konzentrieren um den Verdacht ggf. verifizieren zu können.

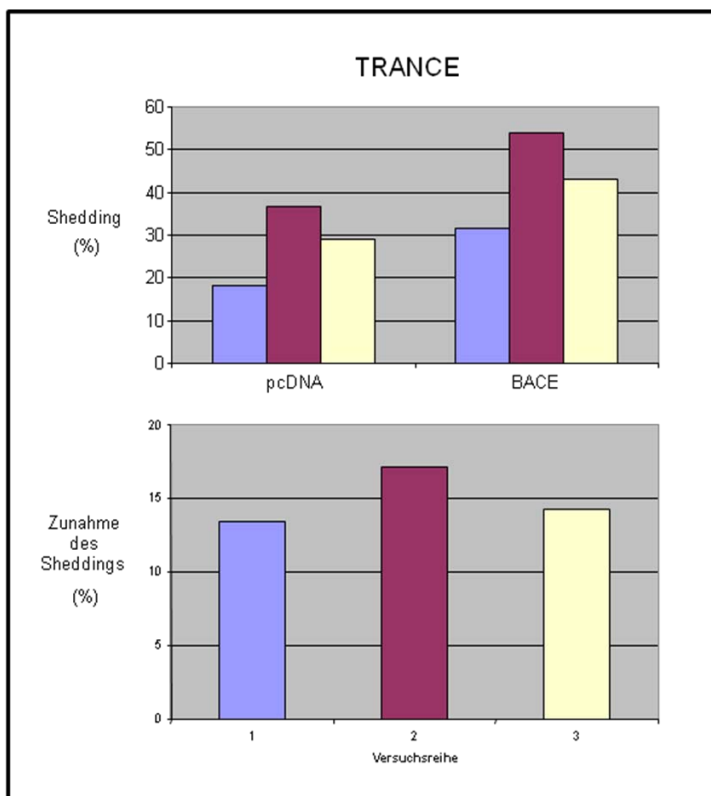


Abbildung 15: Screening-Versuch mit TRANCE

Gezeigt ist das Ergebnis für TRANCE. Die unterschiedlichen Farben stehen für die einzelnen Versuchsreihen. Obere Graphik: Links ist die Ko-Transfektion mit pcDNA gezeigt, rechts die mit BACE. Untere Graphik: Prozentuale Zunahme gegenüber dem Leervektor pcDNA. Es ist erkennbar, dass trotz der erheblichen Unterschiede in der absoluten Prozentzahl (oben) zwischen den einzelnen Versuchsreihen die relative Zahl relativ konstant bleibt. Die mit BACE ko-transfizierten Zellen zeigen ein um ca. 15% höheres Shedding als die mit pcDNA ko-transfizierten Zellen.

Zunächst folgte ein Versuch, der ähnlich konzipiert war wie der Anfangsversuch mit PSGL-1. Es wurden Zellen mit TRANCE überexprimiert und mit dem Leervektor pcDNA, BACE, ADAM17 bzw. inaktivem BACE ko-transfiziert (Abb. 16). Für ADAM17 wurde bereits ein Effekt auf TRANCE beschrieben, so dass dieser Ansatz als Positivkontrolle diente. Es wurde die gleiche Darstellungsform gewählt wie in Abbildung 15: In der oberen Graphik sind die absoluten Prozentzahlen aufgeführt, die untere zeigt die prozentuale Zunahme gegenüber dem Leervektor pcDNA. Erwartet wurde eine signifikante Zunahme in Gegenwart von ADAM17 und BACE, während es in Gegenwart von inaktivem BACE zu keiner Zunahme kommen sollte. Diese Erwartungen wurden weitestgehend bestätigt. Nach Ko-Transfektion mit ADAM17 ist eine Zunahme von knapp 30%, mit BACE von 10% zu sehen. Durch die Ko-Transfektion mit inaktivem BACE ist keine Zunahme der *Shedding*-Aktivität

erkennbar. Der Effekt von ADAM17 auf TRANCE scheint ca. drei mal höher zu sein als der von BACE, beide Ergebnisse waren aber gut reproduzierbar. Die *Shedding*-Aktivität der mit BACE ko-transfizierten Zellen war immer deutlich höher als die aller übrigen untersuchten Konstrukte.

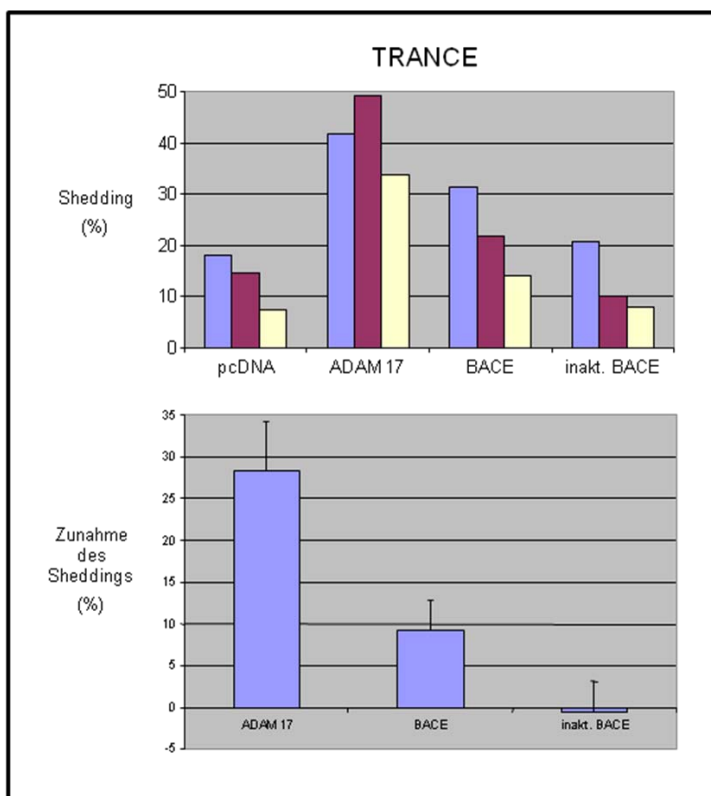


Abbildung 16: AP-Assay zur Verifizierung von TRANCE als BACE-Substrat (1)

Untersucht wurden Zellen, die jeweils mit TRANCE ko-transfiziert wurden. Die unterschiedlichen Farben stehen für die einzelnen Versuchsreihen, die in der unteren Graphik quantitativ zusammengefasst sind. Oben ist die absolute Prozentzahl des *Sheddings* dargestellt, während die untere Graphik die prozentuale Zunahme gegenüber der mit dem Leervektor ko-transfizierten Zellen zeigt. Bei der Ko-Transfektion mit ADAM17 zeigt sich wie erwartet ein massiver Anstieg in der *Sheddingrate* gegenüber den Zellen mit pcDNA. BACE zeigt ebenfalls einen signifikanten Anstieg, wenn auch nicht in dem hohen Maße wie ADAM17. Bei der Ko-Transfektion mit inaktivem BACE wurden die gleichen Werte erreicht wie mit pcDNA.

Durch diesen Versuch wurde hiermit der Verdacht erhärtet, dass BACE einen Effekt auf TRANCE hat. Als nächstes wurde nun untersucht, ob durch Zugabe des spezifischen BACE-Inhibitors Compound3 (C3) ein reduzierender Effekt auf das konstitutive *Shedding* ohne BACE-Überexpression zu beobachten ist (Abb. 17). Hierzu wurden wiederum Zellen mit TRANCE transfiziert und mit BACE bzw. dem Leervektor pcDNA ko-transfiziert. 24 h vor dem Ernten wurde den mit pcDNA ko-

transfizierten Zellen der Inhibitor C3 zugegeben. Neben einer prozentualen Zunahme des *Sheddings* um ca. 13% in Gegenwart von BACE ist hier zu beobachten, dass C3 zu einer Abnahme des *Sheddings* unter den Ausgangswert führt. Dies ist dadurch zu erklären, dass in COS7-Zellen anscheinend eine gewisse Menge an endogenem BACE vorhanden ist, das durch den Inhibitor gehemmt wird. Auch dieser Versuch spricht dafür, dass TRANCE ein Substrat von BACE ist oder dass BACE durch Prozessierung einer TRANCE-Protease am *Shedding* vom TRANCE beteiligt sein könnte.

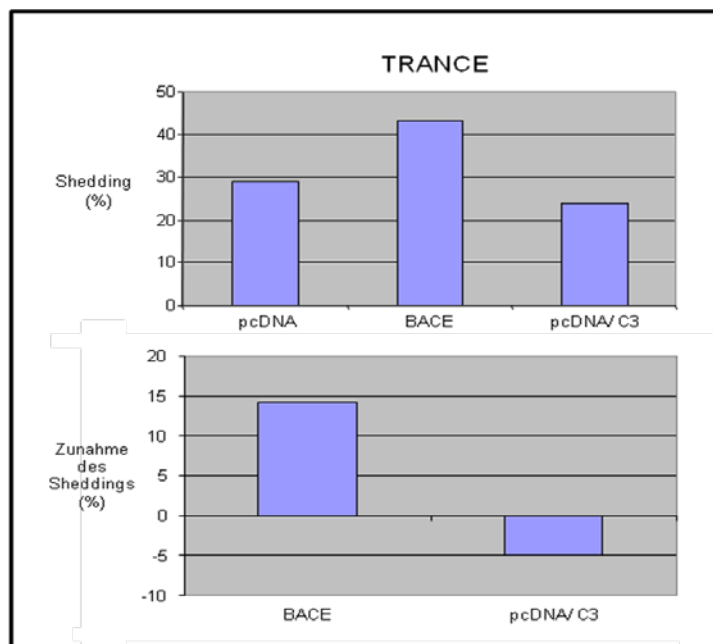


Abbildung 17: AP-Assay zur Verifizierung von TRANCE als BACE-Substrat (2)

In diesem Versuch wurde mit TRANCE ko-transfizierten Zellen z. T. der spezifische BACE-Inhibitor Compound 3 (C3) zugegeben. Es ist zu erkennen, dass die Sheddingrate bei Zellen mit C3 unter den Wert der ohne C3 mit pcDNA ko-transfizierten Zellen sinkt.

Abschließend wurde untersucht, welchen Effekt die Zugabe eines Metalloprotease-Inhibitors auf die *Shedding*-Aktivität hat (Abb. 18). Es sollte geklärt werden, ob die Inhibition der Metalloprotease die BACE-Aktivität besser sichtbar machen bzw. verstärken könnte, da die Metalloprotease evtl. mit BACE um das Substrat TRANCE konkurrieren könnte. Die vier linken Graphiken (beschriftet mit pcDNA, 1, 2 und 3) spiegeln das schon bekannte Ergebnis aus den zuvor beschriebenen Versuchen wieder, in denen noch kein Metalloprotease-Inhibitor verwendet wurde. Die Ko-Transfektion von TRANCE mit ADAM17 führt zu einem etwa 30%-igen Anstieg des *Sheddings* gegenüber den mit dem Leervektor pcDNA ko-transfizierten Zellen. Bei

Anwesenheit von BACE kommt es zu einer *Shedding*-Zunahme von ca. 10%, das Vorhandensein von inaktivem BACE hat dagegen keinen Effekt. Die beiden rechten unteren Balken zeigen den Effekt einer Ko-Transfektion von BACE (4) bzw. inaktivem BACE (5) unter Zugabe eines Metalloprotease-Inhibitors. Es ist zu sehen, dass es in beiden Fällen zu einer Abnahme der *Shedding*-Aktivität im Vergleich zu den mit pcDNA ko-transfizierten Zellen kommt: Ca. 5% Abnahme bei den mit BACE und ca. 10% bei den mit inaktivem BACE ko-transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis scheint überraschend, denn durch die Inhibition der Metalloproteasen wurde ein stärkerer Effekt durch BACE erwartet. Eine mögliche Hypothese, die diesen Effekt erklären könnte ist die, dass BACE nicht direkt auf TRANCE wirkt, sondern dass BACE vielmehr als Aktivator auf eine Metalloprotease, z.B. ADAM17, wirkt, die dann den direkten Effekt an TRANCE bewirkt. Die Sicherung dieser Hypothese bedarf allerdings noch weiterer Überprüfungen. Bei Verwendung eines anderen Metalloprotease-Inhibitors konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Abb. 18). Dies bestätigt, dass beide Inhibitoren funktionieren und unterstützt die Validität von Versuchen, in denen diese Inhibitoren verwendet wurden oder in Zukunft noch verwendet werden.

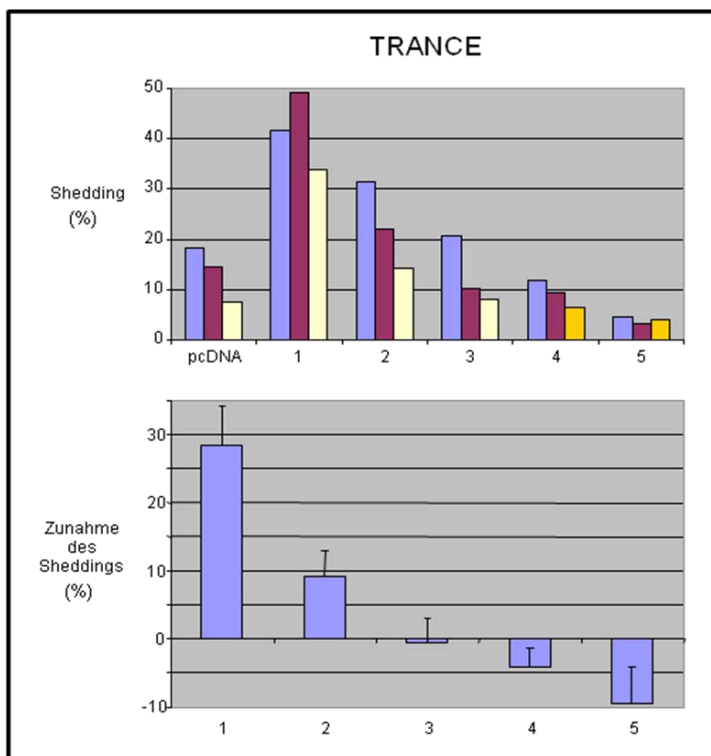


Abbildung 18: AP-Assay zur Verifizierung von TRANCE als BACE-Substrat (3)

1 = ADAM17, 2 = BACE, 3 = inakt. BACE, 4 = BACE / GM6001 oder TAPI, 5 = inakt. BACE / GM6001 oder TAPI

Dargestellt sind die Messwerte für Zellen, die mit TRANCE ko-transfiziert wurden. Zu diesen Zellen wurden wie im Text beschrieben Metalloprotease-Inhibitoren (GM6001 oder TAPI) hinzugegeben. Die unterschiedlichen Farben stehen für die einzelnen Versuchsreihen. Gelb und orange zeigen denselben Versuch, hier wurde allerdings statt des Metalloprotease-Inhibitors GM6001 der Inhibitor TAPI verwendet. Wiederum ist ein hoher Anstieg des Sheddings in Gegenwart von ADAM17 sowie ein weniger hoher Anstieg (10%) in Gegenwart von BACE zu beobachten. Bei Ko-Transfektion mit inaktivem BACE werden ähnliche Werte wie mit pcDNA erreicht. In Gegenwart von Metalloprotease-Inhibitoren sinkt die *Sheddingrate* trotz Gegenwart von BACE signifikant ab. Außerdem wird deutlich, dass kein Unterschied bei Verwendung eines anderen Metalloprotease-Inhibitors beobachtet werden kann.

Mit Hilfe des AP Assays wurde bereits nachgewiesen, dass sich bei Überexpression von BACE vermehrt Spaltprodukte der Ektodomäne von TRANCE im Überstand transfizierter Zellen befinden. Dies spricht dafür, dass BACE an der Ektodomäne von TRANCE angreifen könnte. Allerdings kann mit der AP-Assay-Methode nicht gezeigt werden, an welcher Stelle des Proteins die Protease angreift, wie groß die Spaltprodukte sind oder ob TRANCE evtl. sogar mehrere Angriffsstellen besitzt. Um diese Fragen zu klären, wurden weitere Methoden angewendet. Im AP-SDS-Page-Gel (2.2.2.7) werden die Proteinfragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach AP-

Substratzugabe werden Banden sichtbar, die eine Bestimmung der Proteingrößen ermöglichen. Sichtbar gemacht werden all diejenigen Proteine, die einen AP-Tag enthalten. Im Zellpellet kann das Volllängen-Protein, im Überstand können eventuelle Spaltprodukte der Ektodomäne sichtbar gemacht werden.

3.1.2.4 DIE ÜBEREXPRESSION VON BACE FÜHRT ZUR ERHÖHTEN FREISETZUNG VON TRANCE-SPALTPRODUKTEN MIT EINER GRÖSSE VON CA. 100 kD

Für diese Versuche wurden ebenfalls überexprimierte COS7-Zellen verwendet, die mit TRANCE und dem Leervektor pcDNA bzw. einer Protease ko-transfiziert wurden. Die Ergebnisse der Versuche zeigen die Abbildungen 19 und 20.

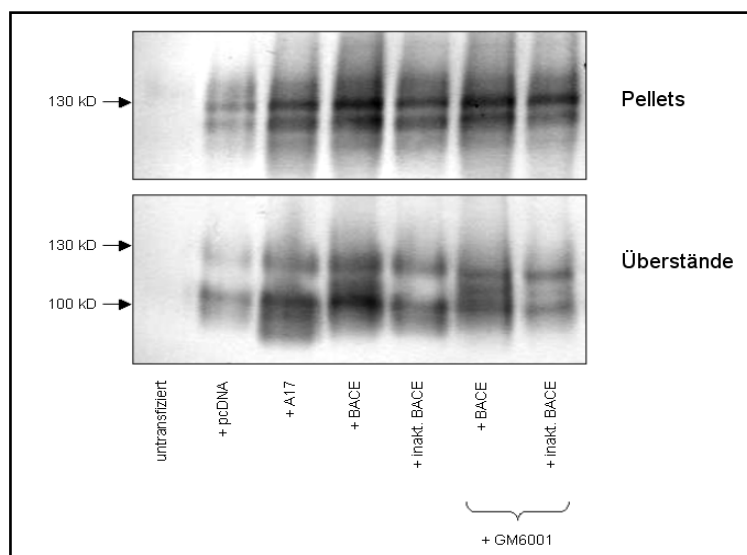


Abbildung 19: Untersuchung zur Größe von TRANCE-Spaltprodukten (1)

COS7-Zellen, ko-transfiziert mit TRANCE und dem jeweils unter der Bande aufgeführten Konstrukt. Das obere Gel zeigt die Alkalische-Phosphatase-Aktivität im Zellpellet, das untere die Aktivität im Überstand. Die auf den letzten zwei Spuren aufgetragenen Zellen wurden zusätzlich 24 h lang mit dem Metalloproteaseinhibitor GM6001 inkubiert.

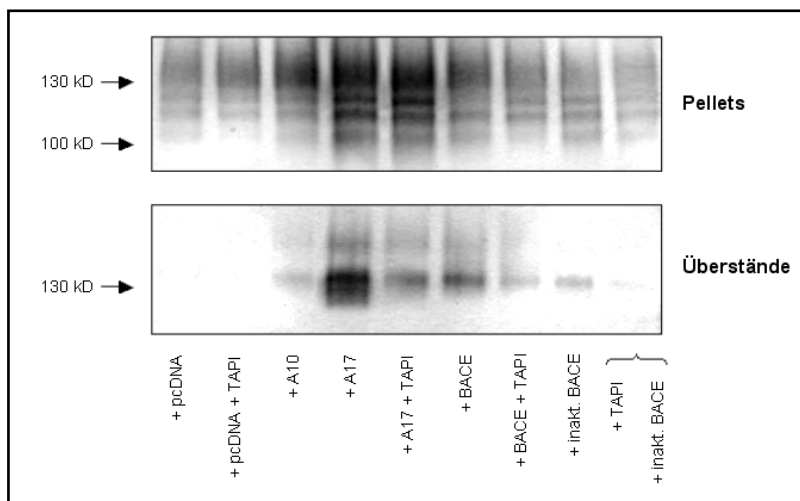


Abbildung 20: Untersuchung zur Größe von TRANCE-Spaltprodukten (2)

COS7-Zellen, ko-transfiziert mit TRANCE und dem jeweils unter der Bande aufgeführten Gen. Das obere Gel zeigt die Alkalische-Phosphatase-Aktivität im Zellpellet, das untere die Aktivität im Überstand. Statt mit GM6001 wurden diese Zellen wie angegeben 24 h mit dem Metalloproteaseinhibitor TAPI inkubiert.

In den Zellpellets ist eine relativ gleichmäßige Transfektionsrate des TRANCE-AP-Proteins erkennbar. Lediglich die mit ADAM17 ko-transfizierten Zellen des in Abbildung 20 dargestellten Versuches zeigen eine etwas höhere Aktivität als die restlichen in diesem Versuch verwendeten Zellen. Die Tatsache, dass das Zellpellet-Lysat durchweg mehrere Banden zeigt, scheint überraschend. Wahrscheinlich ist, dass TRANCE in unterschiedlichen Glykosilierungsformen vorkommt oder dass es Pro-Peptide von TRANCE gibt. Die Banden aus den Überstand-Proben zeigen im Vergleich zur Menge an transfiziertem Gesamtprotein, ob und in welchem Maße ein *Shedding* durch eine Protease stattgefunden hat, da in diesem Falle der Alkalische-Phosphatase-Tag mit dem Spaltprodukt in den Überstand freigegeben wird. Auch die Proben aus den Überständen zeigen mehrere Banden, was eigentlich bedeutet, dass es mehrere Schnittstellen der Protease an dem Protein gibt, was zu unterschiedlich großen Spaltprodukten führen würde. Betrachtet man aber die Größe der Banden, so ist es doch eher wahrscheinlich, dass es sich bei der größeren Bande um das Volllängen-Protein handelt. Dieses sollte im Überstand nicht vorkommen. Allerdings ist es möglich, dass beim Ernten der Zellen nicht alle Zellreste sauber aus dem Überstand entfernt werden konnten.

Abbildung 19 zeigt eine hohe Alkalische-Phosphatase-Aktivität bei den mit ADAM17 ko-transfizierten Zellen mit zwei starken Banden: Eine bei 100 kD und eine etwas

kleinere, die schwierig von einander abzugrenzen sind. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da TRANCE bereits als ADAM17-Substrat identifiziert wurde (Lum et al., 1999). Die Ko-Transfektion von BACE führt ebenfalls zur verstärkten Generierung eines löslichen TRANCE-Spaltprodukts im Vergleich zur Kontrolle und zur Transfektion mit inaktivem BACE. Durch Inkubation der Zellen in Gegenwart eines Metalloprotease-Inhibitors konnte die BACE-abhängige Proteolyse wieder reduziert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen des AP-Assays überein, was den Verdacht erhärtet, dass es sich um einen komplizierteren Reaktionsweg handeln könnte als ursprünglich angenommen. Denkbar wäre, dass BACE nicht direkt auf das Protein wirkt, sondern eine andere Protease, z.B. ADAM17, aktiviert, welche dann die Proteolyse durchführt.

Auch in Abbildung 20 ist zu sehen, dass die Ko-Transfektion von ADAM17 und BACE (ADAM17 in wesentlich stärkerem Rahmen als BACE) zur vermehrten Generierung eines löslichen TRANCE-Spaltprodukts führten, die durch Zugabe des Metalloprotease-Inhibitors zurückging. Im Wesentlichen bestätigt das Ergebnis dieses Versuches die vorangegangenen Resultate. Allerdings zeigt hier auch inaktives BACE eine – wenn auch schwache – Aktivität, die unter Verwendung von TAPI ganz verschwindet.

3.1.2.5 BACE-ÜBEREXPRESSION FÜHRT ZUR VERMEHRTEN FREISETZUNG VON SPALTPRODUKTEN DER INTRAZELLULÄREN DOMÄNE VON TRANCE

Die Ergebnisse der bisher in 3.1.2 beschriebenen Versuche sollten anschließend mittels Westernblots verifiziert werden. Das in dieser Arbeit verwendete TRANCE-Plasmid weist einen *Flag-Tag* auf, der sich am C-terminalen Ende des Proteins befindet. Nachdem TRANCE mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase bereits auf ein *Shedding* der Ektodomäne untersucht wurde, kann mit Hilfe des *Flag-Tags* überprüft werden, ob die BACE-abhängige Proteolyse von TRANCE zur Entstehung zytoplasmatischer Spaltprodukte führt. Die Ergebnisse der Immunoblots sind in Abbildung 21 und 22 aufgeführt.

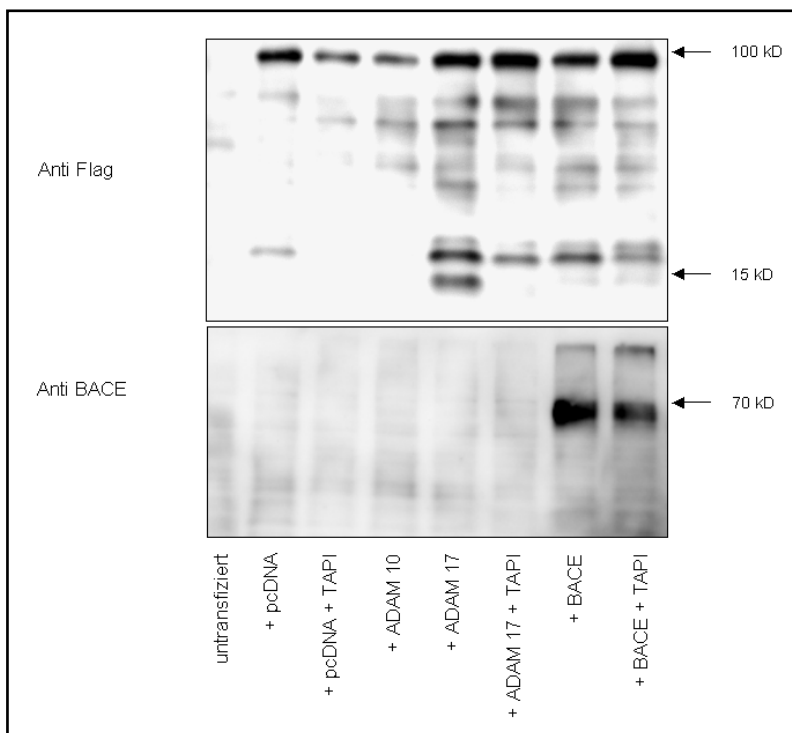


Abbildung 21: Immunoblot zur Untersuchung von intrazellulären TRANCE-Spaltprodukten (1)

COS7-Zellen, ko-transfiziert mit TRANCE und der jeweils unter der Bande aufgeführten cDNA.

Das obere Bild zeigt die mit anti-Flag gefärbte Membran, für das untere Bild wurde die PVDF-Membran gestrippt und anti-BACE gefärbt. Das Volllängen-Protein weist eine Größe von etwa 100 kD auf. Es ist zu sehen, dass – abgesehen von den mit ADAM10 ko-transfizierten und den mit pcDNA ko-transfizierten und mit TAPI inkubierten Zellen – eine gleichmäßige Transfektionsrate vorliegt. Bei einer Größe von 10, 20 und 25 kD sind bei den mit ADAM17 ko-transfizierten Zellen drei Banden zu sehen. In Anwesenheit von TAPI verschwindet die 10 kD-Bande und die 20- und 25 kD-Banden werden wesentlich schwächer. Bei Ko-Transfektion mit BACE ist ebenfalls eine deutliche Bande bei 20 kD erkennbar sowie zwei sehr schwache Banden bei 10 und 25 kD. In Anwesenheit von TAPI wird die 20 kD Bande deutlich schwächer, die anderen beiden Banden verändern sich nicht signifikant. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse, die bereits die AP-Assays und die AP-SDS-Gele gezeigt haben. Das untere Bild zeigt, dass die Transfektion von BACE funktioniert hat und die Transfektionsrate nicht deutlich unterschiedlich ist.

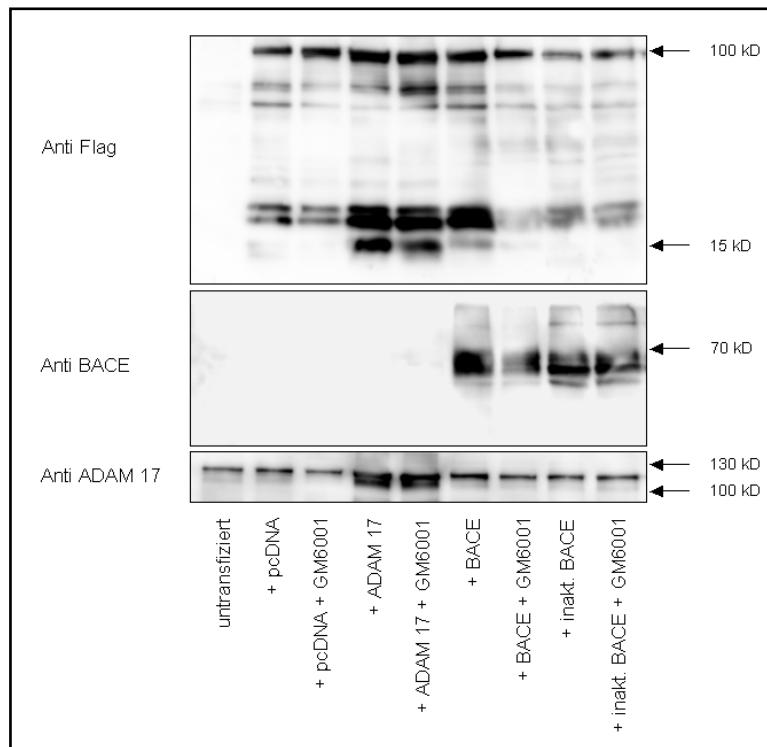


Abbildung 22: Immunoblot zur Untersuchung von intrazellulären TRANCE-Spaltprodukten (2)

COS7-Zellen, ko-transfiziert mit TRANCE und dem jeweils unter der Bande aufgeführten Gen.

Das obere Bild zeigt die mit anti-Flag gefärbte Membran, für das mittlere und untere Bild wurde die PVDF-Membran gestrippt und anti-BACE (Mitte) bzw. anti-ADAM17 (unten) gefärbt. Die 100 kD-Bande zeigt das Volllängen-Protein. Es ist zu sehen, dass die mit inaktivem BACE ko-transfizierten Zellen eine geringere Transfektionsrate aufweisen als die restlichen Zellen. Wieder sind bei Ko-Transfektion mit ADAM17 drei kleine Banden zu sehen, die das *Shedding*-Produkt zeigen. In diesem Fall wird aber in Anwesenheit von Metalloprotease-Inhibitor (GM6001) nur die Kleinste der drei Banden signifikant schwächer. Die mit BACE ko-transfizierten Zellen zeigen zwei sehr starke Banden bei 20 und 25 kD sowie eine etwas schwächere bei 10 kD. Alle drei Banden werden in Anwesenheit von GM6001 signifikant schwächer. Die Stärke der Banden des inaktiven BACE unterscheiden sich nicht signifikant von denen der mit pcDNA ko-transfizierten Zellen. Die in der Mitte bzw. unten abgebildeten Membranen bestätigen eine fehlerlose Transfektion von BACE bzw. ADAM17.

Für die Westernblots wurden ebenfalls überexprimierte ko-transfizierte COS7-Zellen verwendet. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen beide den Blot jeweils anti-Flag- (oben) und anti-BACE gefärbt (unten bzw. Mitte). In Abbildung 22 wurde außerdem anti-ADAM17 (unten) gefärbt.

Abbildung 21 zeigt – mit Ausnahme der mit ADAM10 transfizierten Zellen – eine relativ gleichmäßige TRANCE-Volllängen-Bande und weist damit auf eine ähnliche Transfektionsrate hin. Auffällig sind drei Banden mit der Größe von ca. 10, 20 und 25 kD bei den mit ADAM17 ko-transfizierten Zellen, die in Anwesenheit des

Metalloprotease-Inhibitors TAPI verschwinden (10 kD-Bande) bzw. schwächer werden (20- und 25 kD-Bande). Diese Banden bestätigen die Ergebnisse, die bereits mit Hilfe der anderen Methoden erzielt wurden und auch die veröffentlichten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass TRANCE ein ADAM17-Substrat mit mehreren Schnittstellen ist (Lum et al., 1999). Die mit BACE ko-transfizierten Zellen zeigen ebenfalls eine deutliche Bande bei ca. 20 kD. Die 10- und 25 kD-Banden sind schwach erkennbar. Nach Inkubation mit TAPI verändert sich hier deutlich nur die 20 kD-Bande, die schwächer wird.

In Abbildung 22 ist zu sehen, dass die Ko-Transfektion mit inaktivem BACE nicht gut funktioniert hat. Es ist weniger TRANCE-Volllängen-Protein enthalten als in den anderen Proben. Die mit ADAM17 ko-transfizierten Zellen zeigen wieder 3 Banden, die sich diesmal aber durch Inkubation mit dem Metalloprotease-Inhibitor nicht wesentlich verändern, lediglich die kleinste der 3 Banden wird schwächer. Auch bei BACE sind wieder 3 Banden zu sehen, zwei starke bei ca. 20 und 25 kD und eine schwächere bei ca. 10 kD. Diese Banden werden nach Inkubation mit dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 schwächer.

Insgesamt weisen die hier erhobenen Untersuchungen darauf hin, dass BACE nicht nur an der extrazellulären, sondern auch an der intrazellulären Domäne von TRANCE an Prozessierungen beteiligt ist. Dass die Zunahme der Spaltprodukte unter Zugabe von Metalloprotease-Inhibitor wieder reduzierbar ist, weist darauf hin, dass BACE auch an der intrazellulären Domäne von TRANCE eher indirekt durch Aktivierung der Metalloprotease am *Shedding* beteiligt sein könnte.

3.2 Verifizierung der Microarray-Daten

3.2.1 Microarray-Daten

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von BACE-Substraten und -Funktionen bestand darin, mittels Microarray-Assay ein *Screening* durchzuführen, mit dem viele verschiedene Gene auf eine veränderte Regulation durch die BACE-1-Defizienz überprüft wurden. Diese Analyse zeigte, dass zahlreiche Gene von BACE-1 reguliert werden (Abb. 23). 10 bekannte Gene, die aufgrund ihrer Relevanz für das Immunsystem oder ihrer Bedeutung für das Nervensystem interessant erschienen,

wurden für diese Arbeit ausgewählt, um die Änderung der Regulation in BACE-1-defizienten Mäusen mittels *Real-Time-PCR* zu verifizieren und zu quantifizieren. Einen Überblick über die Ergebnisse des Microarray-Chips für die betroffenen Gene zeigt die folgende Tabelle. Das Microarray-Ergebnis zeigt die Regulation in BACE-1-defizienten (KO) Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, an.

Name des Gens	Expression	Microarray-Ergebnis	
CD8b	Immunsystem	in KO herunter-reguliert	-1,77
CD44	Immunsystem	in KO herunter-reguliert	-1,08
Syntaxin 8	ZNS + diffus	in KO herunter-reguliert	-1,11
Csf1r	Immunsystem	in KO hoch-reguliert	+0,77
Periaxin	Peripheres Nervensystem	in KO hoch-reguliert	+1,31
Syntaxin 6	Immunsystem + diffus	in KO herunter-reguliert	-0,89
Axcam	Neuronal	in KO herunter-reguliert	-1,25
Slc2a1	Gehirn (Glukose-Transporter)	in KO hoch-reguliert	+0,75
Ramp2	Diffus, v.a. Herz + Nebenniere	in KO herunter-reguliert	-1,37
Tcrβ-V8.2	Immunsystem	in KO hoch-reguliert	+1,17

Tabelle 8: Microarray-Ergebnis

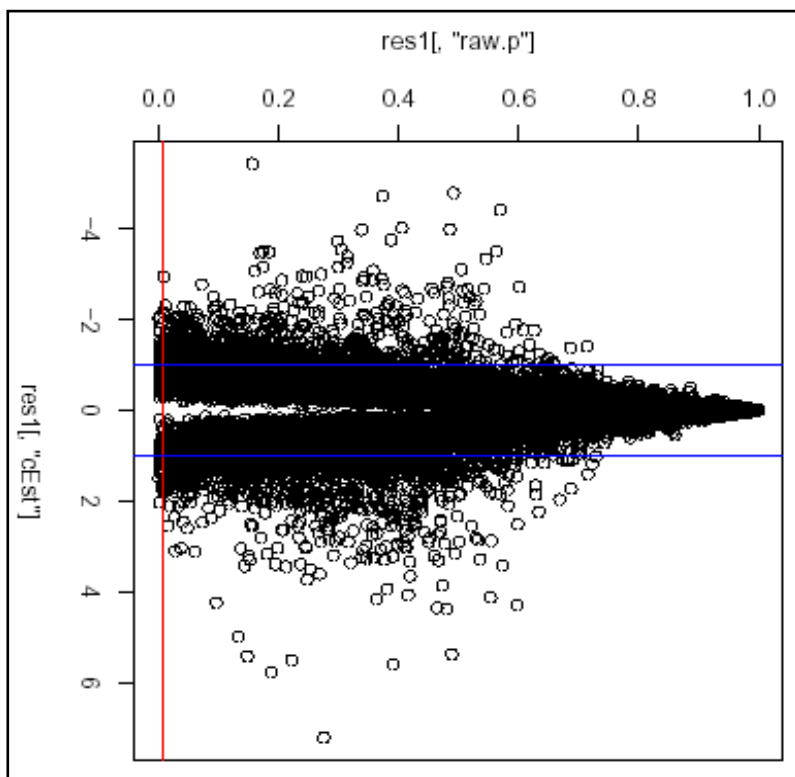


Abbildung 23: Ergebnisse des Microarray-Chips

Jeder Kreis zeigt ein Gen an. Gene außerhalb der blauen Linien weisen eine differentielle Regulation in BACE-1-defizienten Mäusen verglichen mit dem Wildtyp auf.

3.2.2 Nachweis der BACE-1-Defizienz

Um die Microarray-Daten verifizieren zu können, musste zunächst RNA aus dem Gehirn von Wildtyp- und BACE-*Knockout*-Tieren gewonnen werden. Hierfür wurde zuvor der Genotyp der Tiere festgestellt. Es wurden zunächst die Schwanzspitzen der Mäuse abgetrennt und die DNA isoliert (2.2.3.1). Zur Genotypisierung wurden parallel zwei PCRs durchgeführt (2.2.3.2). Um die Anwesenheit der Neomycin-DNA-Kassette nachzuweisen, wurden Primer gewählt, die innerhalb dieser Kassette ansetzen. Das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von ca. 280 bp und war sowohl bei BACE-1^{-/-}, als auch bei BACE-1^{+/-} heterozygoten Tieren zu sehen, nicht aber bei Wildtypmäusen. In einer weiteren PCR wurden Primer verwendet, die am Exon 1 des BACE-1 Gens ansetzen. Ein amplifiziertes Genfragment mit einer Länge von ca. 250 bp war sowohl bei Wildtyp- als auch bei heterozygoten Tieren sichtbar, nicht aber bei homozygot BACE-1-defizienten Mäusen. Betrachtet man beide Ergebnisse gemeinsam, so kann zwischen Wildtyp, heterozygot und homozygot BACE-1-defizienten Mäusen unterschieden werden. Die heterozygoten Mäuse weisen immer eine Bande auf, während diese Bande bei Wildtyp-Mäusen nur in der Exon-PCR und bei BACE-1-defizienten Mäusen nur in der Neo-PCR zu sehen ist. Abbildung 24 stellt das Ergebnis der PCR dar, die zur Genotypisierung der Mäuse durchgeführt wurde.

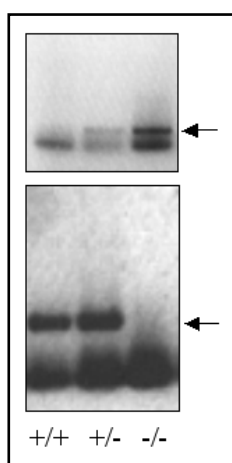


Abbildung 24: Genotypisierung

Auftrennung der PCR-Produkte, die bei der Genotypisierung amplifiziert wurden. Der obere Pfeil weist auf die Amplifikation der neoRKassette (280 bp) bei BACE-1 hetero- oder homozygot defizienten Mäusen hin, der untere Pfeil auf das Exon des Wildtyp-BACE-1 (250 bp). Je Spur wurden 10 μ l der PCR auf das 2%-ige Agarose-Gel aufgetragen.

Nach Sicherstellung des Genotyps konnte die RNA, wie in 2.2.3.3 beschrieben, isoliert und anschließend auf ihre Reinheit getestet werden. Dieser Schritt wurde sowohl mit einer photometrischen als auch mit einer elektrophoretischen Kontrolle (Abb. 25) durchgeführt. Am Photometer wurde die Reinheit der RNA bei 280 nm,

dem Absorptionsmaximum für Proteine, und bei 260 nm überprüft. Der Mittelwert der Quotienten OD 260/280 zeigte bei Werten von 1,9 – 2,0 eine gute Qualität der präparierten RNA an. Die Synthese von cDNA aus der zuvor gewonnenen RNA wurde nach dem Protokoll in 2.2.3.5 durchgeführt.

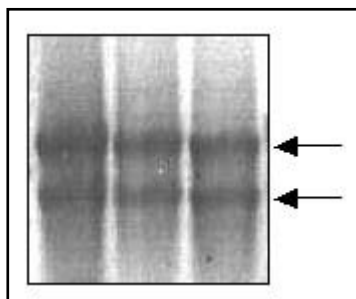


Abbildung 25: RNA-Qualitätsprüfung

Die auf einem Agarose-Gel aufgetragenen RNA-Proben zeigen eine 18S- und eine 28S-Bande der RNA.

3.2.3 Standardplasmide

Die Standard-Plasmide (2.1.7) wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Jobst Landgrafes aus Göttingen, wo der Microarray-Vorversuch stattfand, zur Verfügung gestellt.

3.2.3.1 ÜBERPRÜFUNG DER PLASMIDE UND PRIMER-DESIGN

Die Midipräparation der Standardplasmide wurde nach dem Protokoll in 2.2.3.9 durchgeführt. Anschließend wurde die Probe auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die erfolgreiche Replikation der DNA zu überprüfen (Abb. 26).

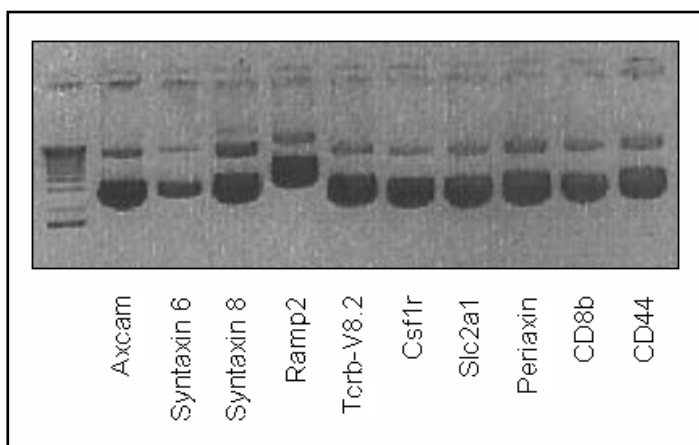


Abbildung 26: Überprüfung der Standardplasmide

Die Proben wurden auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Banden stellen die unterschiedlich großen Plasmide dar.

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma MWG vorgenommen. Bei einem nachfolgenden Abgleich mit der offiziellen Gensequenz und der Vektorkarte mit der resultierenden Plasmidsequenz wurde festgestellt, dass von den 10

ausgewählten Genen nur 5 in den Plasmiden zu finden waren. Die Sequenz, die in den Plasmiden vorkam, wurde im Internet unter „www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/“ eingegeben. Es wurde festgestellt, dass zwei der Sequenzen (Syntaxin 6 und Slc2a1) sich direkt neben oder in der Nähe des Genlokus befanden, während die 3 anderen fehlerhaften Plasmide (Tcrb-v8.2, Axcam und Ramp2) eine Sequenz enthielten, die an einer sehr entfernten Stelle des Genoms zu finden ist. Somit konnte in der Arbeit nur mit den übrigen 5 Genen, beschrieben unter 1.8, weitergearbeitet werden.

Beim Design der Primer wurde darauf geachtet, dass diese nach Möglichkeit zu 20 - 80% aus G/C-Basen bestehen. Eine Aneinanderkettung von mehr als 3 Guanin-Basen wurden vermieden, ebenso wie eine Thymin-Base am 3' Ende oder mehr als 2 Guanin- oder Cytosin-Basen unter den letzten 5 Basen am 3' Ende. Eine Liste mit den Sequenzen der verwendeten Primer ist in 2.1.5 aufgeführt.

Für die Auswertung der später erfolgten Messungen mit Gewebe aus Mausgehirn wurden zunächst eine Standard-Eichgerade erstellt. Hierzu wurden die Standardplasmide in verschiedenen Verdünnungen nach dem Protokoll in 2.2.3.7 gemessen. Die Konzentration der einzelnen Plasmide wurde nach erfolgter Midi-Präparation (3.2.5.1) photometrisch bestimmt. Aus der Konzentration wurde die Anzahl der in der Probe enthaltenen Kopien mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Anzahl der Moleküle } / \mu\text{l} = \frac{\text{Konzentration (g / } \mu\text{l)}}{\text{Anzahl der Basenpaare} \cdot 660} \cdot 6,022 \cdot 10^{23}$$

Das Ergebnis der Messungen ergibt optimalerweise eine Gerade, bei der der Ct-Wert mit steigender Verdünnung der Probe ansteigt. Wird unter denselben Bedingungen das zu untersuchende Gewebe vermessen, so kann anhand der Gerade die resultierende Anzahl der Kopien in der Probe ablesen werden. Die Standardkurven der in dieser Arbeit untersuchten Gene sind in den Abbildungen 27 – 32 dargestellt.

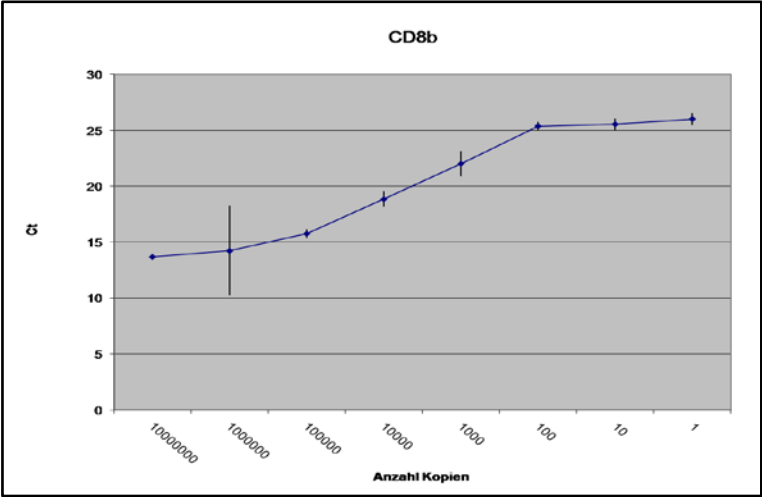


Abbildung 27: Standardkurve für CD8b

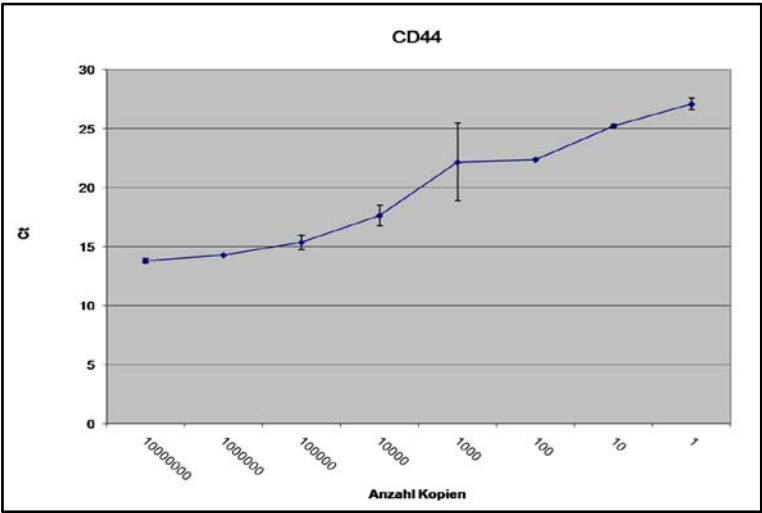


Abbildung 28: Standardkurve für CD44

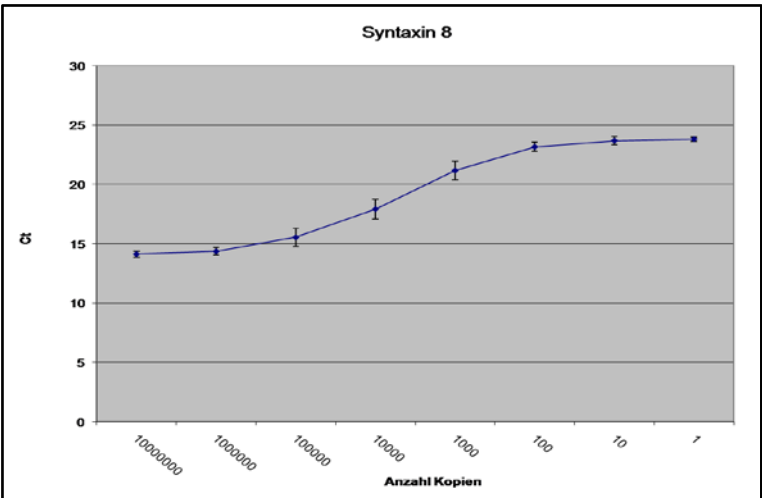


Abbildung 29: Standardkurve für Syntaxin 8

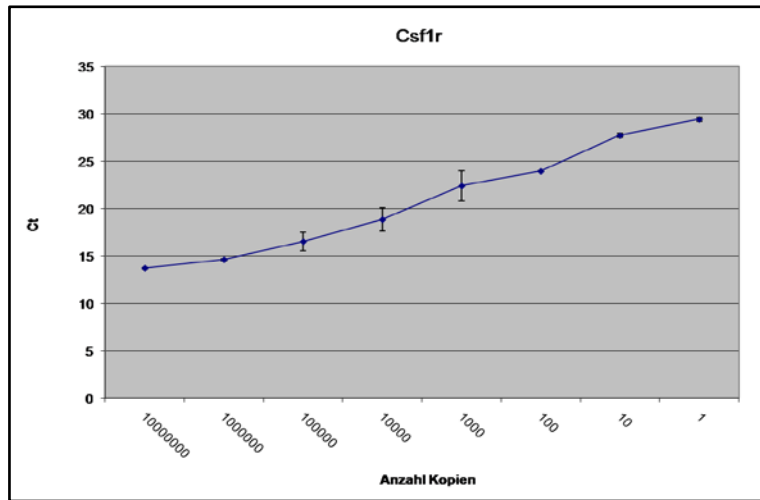


Abbildung 30: Standardkurve für Csfr1

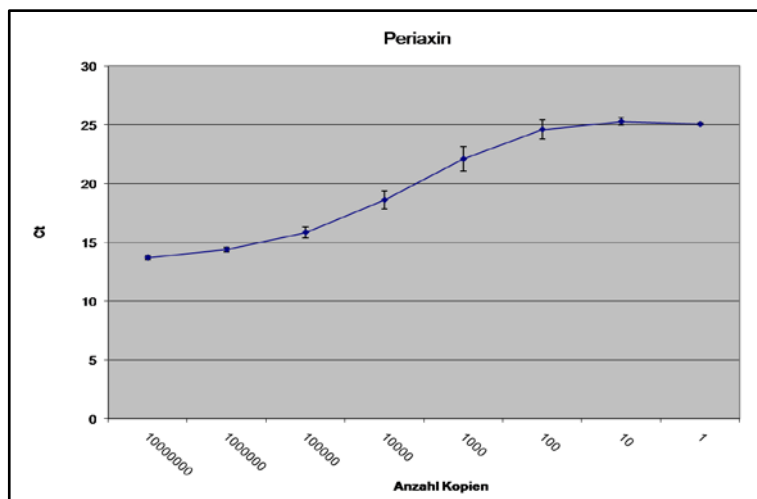


Abbildung 31: Standardkurve für Periaxin

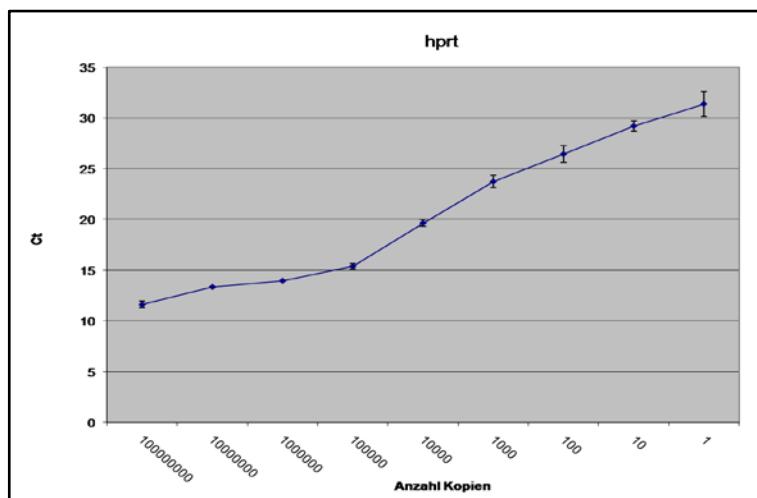


Abbildung 32: Standardkurve für das Kontrollgen HPRT

3.2.4 Real-Time-PCR mit Gewebe aus Maus-Gehirn

Nach Erstellung der Standard-Eichgeraden wurde nach demselben Prinzip (2.2.3.7) die gewonnene cDNA aus dem Gehirn von adulten BACE-1-defizienten und Wildtyp-Mäusen gemessen. Die aus den Messungen resultierenden Ct-Werte sind aus den Abbildungen 33 – 38 ersichtlich.

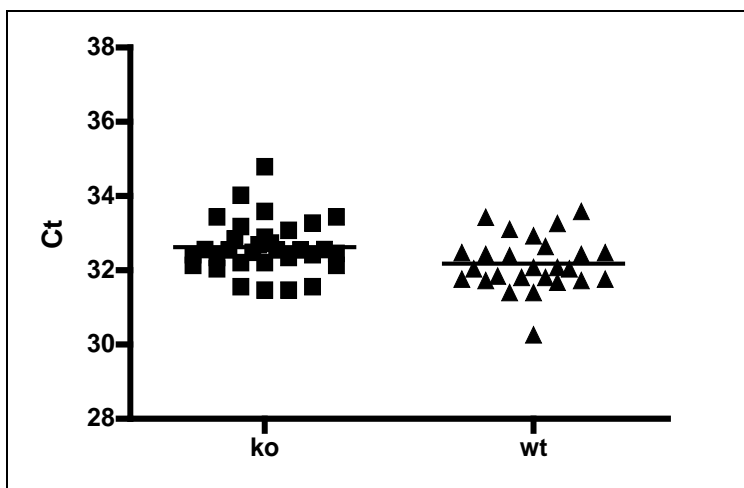


Abbildung 33: Ergebnisse aus den Messungen für CD8b

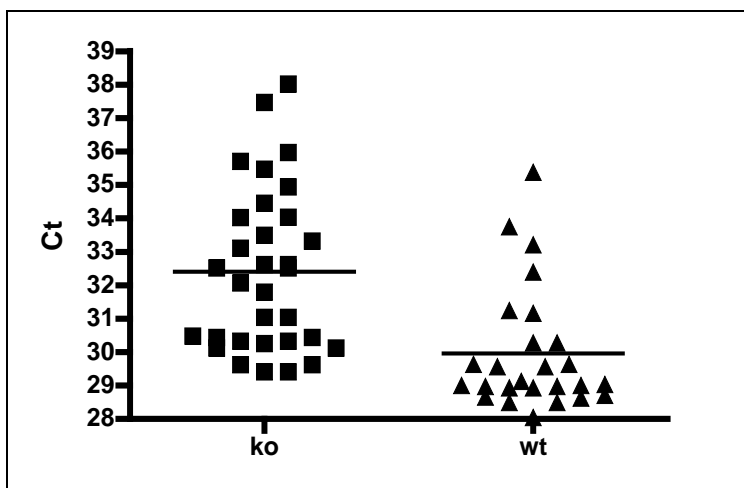


Abbildung 34: Ergebnisse aus den Messungen für CD44

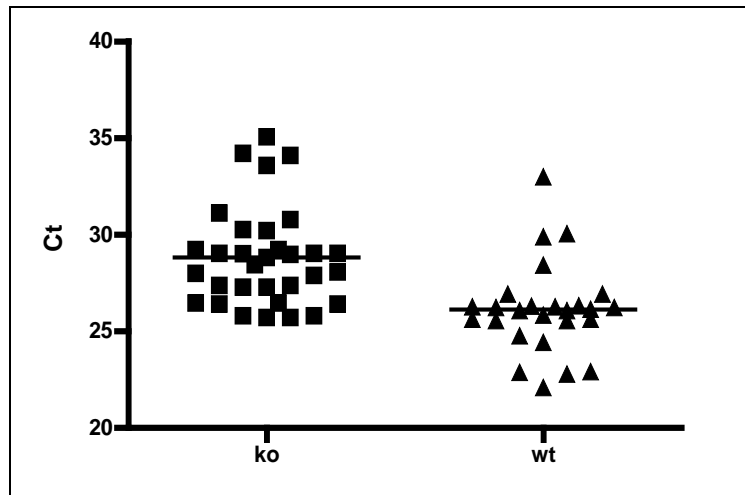


Abbildung 35: Ergebnisse aus den Messungen für Syntaxin 8

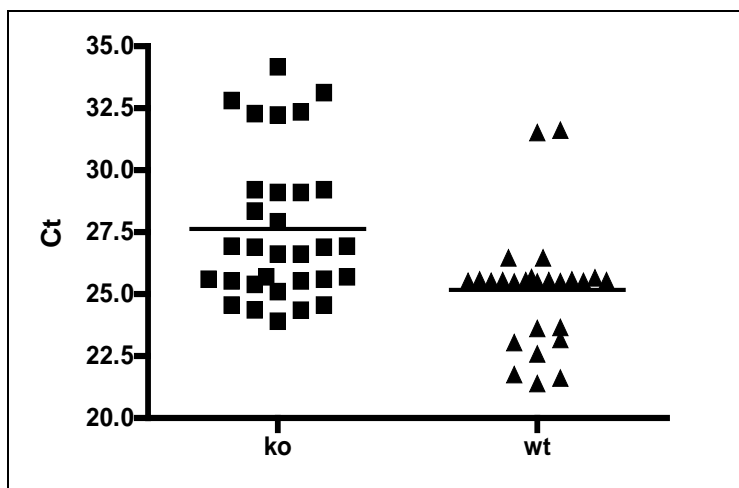


Abbildung 36: Ergebnisse aus den Messungen für Csf1r

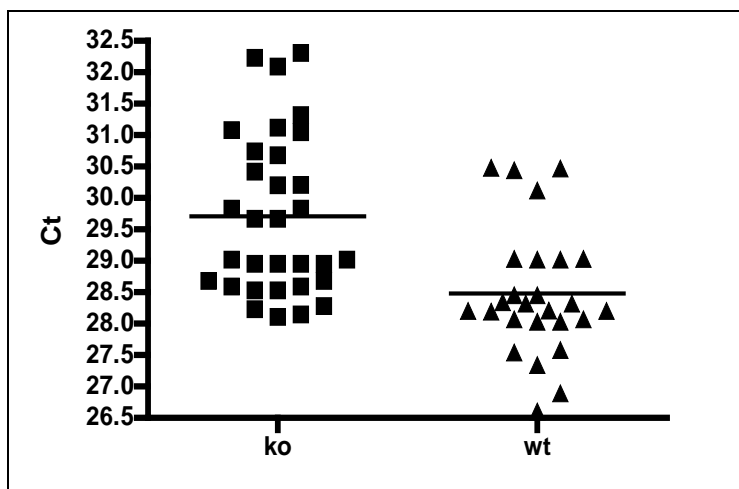


Abbildung 37: Ergebnisse aus den Messungen für Periaxin

3.2.6 Ergebnisse der Berechnung

Die Berechnung der Ratio führte für die in dieser Arbeit untersuchten Gene zu folgendem Ergebnis:

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Gesamtratio
CD8b	2,02	0,82	1,56	4,77
CD44	0,84	2,16	0,07	0,96
Syntaxin 8	1,56	0,76	0,11	1,62
Csf1r	1,71	23,79	0,90	1,89
Periaxin	1,51	0,48	2,00	2,20

Tabelle 9: Ergebnisse der *Real-Time*-PCR-Berechnung

Wird anschließend die Gesamtratio betrachtet, würde diese Tabelle zeigen, dass CD8b im *Knockout* 4,77-fach hochreguliert ist, während es beim CD44-Gen kaum eine Änderung in der Regulation gibt. Csf1r und Periaxin sind etwa 2-fach hochreguliert, Syntaxin 8 ca. 1,6-fach. Deutlich wird aber auch, dass die Ergebnisse der einzelnen Messungen nicht miteinander und auch nicht mit der Gesamtratio aller Messungen korrelieren. Dies weist auf einen Fehler bei der Durchführung der Messungen oder im Kontrollgen HPRT hin und macht eine objektive Auswertung der *Real-Time*-PCR-Daten unmöglich.

Zur Bestimmung der Fehlerquelle wurden Messungen mit Kontrollgenen durchgeführt, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden. Die Positivkontrolle (PK PM1) sollte hierbei gegenüber der Negativkontrolle (PK unstimuliert) bei der Berechnung der Ratio Werte um 100 erreichen. Diese Werte wurden auch bei den Messungen mit dem für diese Arbeit verwendeten Gerät erreicht (Tab. 10).

Probe	Primer	Ct (MW)	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Ratio
PK PM1	r7s2 33	14,45	- 4,84	- 6,745	107,26
PK PM1	GAPDH	19,29			
PK unstimuliert	r7s2 33	20,575	1,905		
PK unstimuliert	GAPDH	18,67			

Tabelle 10: Bestimmung der Fehlerquelle bei der *Real-Time*-PCR

Dieses lässt den Schluss zu, dass der Fehler in diesem Versuch keine methodische Ursache hatte. Vielmehr führt es zu der Überlegung, dass die betreffenden Proteine,

v.a. das Kontrollgen HPRT, in zu niedriger Konzentration in dem untersuchten Gewebe exprimiert wird um repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass die erreichten Ct-Werte oft bei über 40 lagen, einem – verglichen mit Werten aus vorangegangenen Versuchen der Kooperationspartner und den hier durchgeführten Messungen mit deren Kontrollgenen – sehr hohen Wert, der für eine sehr niedrige Anzahl von Molekülen in der Probe spricht. Eine weitere mögliche Erklärung ist das Versagen der Primer für HPRT. Da aber sowohl das Plasmid als auch die Primer im Vorwege sequenziert wurden, ist diese Möglichkeit wenig wahrscheinlich.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der hier durchgeführte Versuch aufgrund der fehlenden Korrelation der einzelnen Messungen untereinander sowie mit der Gesamtratio nicht auswertbar ist. Nachdem eine methodische Ursache des Fehlers bei der *Real-Time*-PCR ausgeschlossen wurde, Primer und Plasmide im Vorwege des Versuchs sequenziert wurden, konnte die Fehlerquelle abschließend nicht festgestellt werden.

4 DISKUSSION

Die Alzheimer Demenz ist weltweit die häufigste Demenz und nach der Depression die zweithäufigste psychiatrische Erkrankung. Sie zeigt einen Abbau von Hirnsubstanz durch fortschreitenden Untergang von Neuronen und ist bis heute nicht heilbar und nur bedingt symptomatisch therapierbar. Auf Ebene der Neurone ist Morbus Alzheimer neben der Bildung von Tau-Protein-Bündeln, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird, durch die Entstehung von Plaques gekennzeichnet, die auf eine Produktion des β -amyloiden Peptids ($A\beta$) zurückzuführen sind, welches durch enzymatische Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP) entsteht. Eine der entscheidend beteiligten Sekretasen ist die Aspartatprotease BACE, deren physiologische Funktion bisher nur unzureichend geklärt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion dieser Protease untersucht. Neben der Identifikation der von BACE prozessierten Moleküle war auch die Frage nach der biologischen Funktion dieser Prozessierung von Interesse.

Zu Beginn dieser Arbeit waren einige wenige Substrate für BACE bekannt. Über den genauen Zusammenhang dieser Substrate mit dem Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse lieferten diese aber noch keine genauen Erkenntnisse. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nach weiteren Substraten für BACE gesucht. Dies geschah über drei unterschiedliche Ansätze. Zunächst sollten potentielle Substrate von BACE untersucht werden, die einer APP-ähnlichen Prozessierung unterliegen.

4.1 NCAM 140/180 als mögliches BACE-Substrat

Als erstes Substrat wurde NCAM gewählt, das bekanntermaßen von einer Metalloprotease gespalten wird, die hierfür aber nicht allein verantwortlich ist (Hinkle et al., 2006; Kalus et al., 2006). Um herauszufinden, ob BACE an der Proteolyse von NCAM beteiligt sein könnte, wurden Proben aus Wildtyp- und BACE-defizienten Mausgehirnen mit Hilfe eines Immunoblots untersucht (Abb. 9). Die Untersuchung zeigte bei den Proben aus Wildtyp-Gehirnen eine Bande, die bei den BACE-defizienten Gehirnen nicht zu beobachten war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass BACE hier als Protease für die Entstehung dieser Peptide verantwortlich sein könnte. Dabei fällt auf, dass dieser Effekt nur bei den adulten Tieren, nicht aber bei

P1- oder P5-Tieren zu verzeichnen war. Dies deutet darauf hin, dass BACE nur in bestimmten Entwicklungsstadien im Organismus aktiv sein könnte. Allerdings zeigen v.a. BACE-defiziente Mäuse im frühen Lebensalter einen abweichenden Phänotyp, so dass diese Annahme eher unwahrscheinlich ist. Im adulten Alter zeigen die BACE-defizienten Mäuse kaum Auffälligkeiten. Wäre BACE ausschließlich im adulten Organismus aktiv, so dürften pathologische Veränderungen der BACE-defizienten Mäuse erst im Erwachsenenalter auffällig werden. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass BACE mit zunehmendem Lebensalter eine höhere Aktivität im Gehirn aufweist (Fukumoto et al., 2004). Die Beobachtungen von Fukumoto und seinen Kollegen stimmen daher mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, liefern aber keine Erklärung für den Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse.

Um weitere Klarheit über die Bedeutung von BACE bei der Proteolyse von NCAM zu gewinnen, wurden Überexpressionsstudien in COS7-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde NCAM mit verschiedenen potentiellen NCAM-Proteasen ko-transfiziert (Abb. 10). Die Untersuchungen zeigten, dass in den mit BACE ko-transfizierten Zellen kaum NCAM vorhanden ist. Auch bei mehrfachen Wiederholungen des Versuches war es nicht möglich, BACE und NCAM zu ko-transfizieren. Dieses methodische Problem, führte dazu, dass zunächst von einer weiteren Untersuchung von NCAM als potentielles BACE-Substrat abgesehen wurde. Um das Ergebnis des Westernblots zu verifizieren könnten in folgenden Untersuchungen andere Methoden angewendet werden. Mögliche Varianten, bei denen auf eine Ko-Transfektion von NCAM und BACE verzichtet werden kann, sind ein *In-Vitro-Cleavage-Assay* oder ein Peptid-Spaltungs-Assay in Form eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Beim *In-Vitro-Cleavage-Assay* werden einem künstlich hergestellten Peptid aus dem Protein NCAM, in dem die Schnittstelle von BACE vermutet wird, rekombinantes BACE zugegeben. Anschließend wird ein Immunoblot durchgeführt, bei dem eventuelle Spaltprodukte sichtbar gemacht werden können. Beim Peptid-Spaltungs-Assay werden beide Enden des Peptids mit einem jeweils unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff-Molekül versehen, die miteinander in einer entfernungsabhängigen Wechselwirkung stehen. Die Anregung wird vom Donor- auf den Quencher- oder das Akzeptormolekül übertragen. Der sogenannte FRET-Effekt, d.h. eine abgeschwächte oder gelöschte (gequenchte) Donoraktivität tritt ein, wenn beide Moleküle eng benachbart sind, so dass sich beide Aktivitäten gegenseitig

aufheben. Würde eine Proteolyse von NCAM durch BACE stattfinden, würden sich die beiden Farbstoff-markierten Enden von NCAM voneinander entfernen und die Fluoreszenz des Donors könnte photometrisch detektiert werden.

NCAM erscheint v.a. deshalb als Substrat von BACE plausibel, da es maßgeblich Gedächtnisfunktionen und Lernfähigkeit beeinflusst und somit den Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse (Unsicherheit und Zurückhaltung) teilweise erklären könnte. Ungeklärt würden allerdings weiterhin die neonatale Mortalität und das reduzierte Körperwachstum bleiben.

4.2 Kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Proteolyse von $TNF\alpha$, $TGF\alpha$, L-Selektin, Amphiregulin und Betacellulin durch BACE-Überexpression

Um eine größere Anzahl potentieller Substrate untersuchen zu können, wurde mit Hilfe eines AP-Assays ein *Screening* durchgeführt, das erste Anhaltspunkte über mögliche BACE-Substrate liefern sollte. Hierzu wurden verschiedene Proteine untersucht, die – ähnlich wie bereits bekannte BACE-Substrate, z.B. APP – sowohl von einer α - als auch von einer γ -Sekretase gespalten werden.

Im *Screening* zeigte sich kein Hinweis darauf, dass $TNF\alpha$, $TGF\alpha$, L-Selektin, Amphiregulin oder Betacellulin Substrate von BACE sein könnten, da sowohl die Konstrukte mit- als auch ohne BACE-Überexpression nahezu identische *Shedding*-Aktivitäten zeigen. Dies lässt allerdings nicht den Umkehrschluss zu, dass es sich bei keinem der Konstrukte um ein BACE-Substrat handeln kann. Denn bei vielen Proteinen führt der Zusatz von einem *Tag* zu einer Konformationsänderung, so dass die beobachteten Effekte nicht mit der *in vivo*-Situation übereinstimmen (Dr. Marc Schulte, *personal communication*). $TNF\alpha$, $TGF\alpha$, L-Selektin, Amphiregulin und Betacellulin scheiden daher für ein weiteres *Screening* in einem Folgeversuch keineswegs aus, sollten aber mit anderen Methoden untersucht werden, die den Gebrauch des AP-Tags umgehen. Hierfür würde sich zum Beispiel der Immunoblot mit einem ungetaggteten Konstrukt anbieten. Jedoch sollte mittels eines Immunoblots ebenfalls überprüft werden, ob die Ko-Transfektion des Konstrukts mit BACE funktioniert, um ein ähnliches Problem wie bei der Untersuchung von NCAM (4.1) auszuschließen.

$TNF\alpha$ (1.7.3), $TGF\alpha$ (1.7.5) und L-Selektin (1.7.6) erfüllen vielseitige und langfristig lebensnotwendige Funktionen für das Immunsystem (Pfizenmaier, 1991; Tracey and

Cerami, 1994; Tedder et al., 1995; Murray et al., 1997; Janeway, 2005; Booth and Smith, 2007; Guarda et al., 2007; Cheng et al., 2008; Ganten and Ruckpaul, 2008). Hätte BACE einen Effekt auf diese Proteine, so könnte dies zur Infektanfälligkeit sowie die hohe neonatale Mortalität der BACE-defizienten Mäuse beitragen. Die physiologischen Funktionen von Amphiregulin (1.7.7) (McBryan et al., 2008; Willmarth and Ethier, 2008; Yamada et al., 2008) und Betacellulin (1.7.8) (Thowfeequ et al., 2007) würden dagegen keinen Hinweis auf die Ursache des BACE-defizienten Phänotyps liefern.

4.3 Die Überexpression von BACE führt zur erhöhten Freisetzung der TRANCE-Ektodomäne

Auch TRANCE gehört zu den Proteinen, die aufgrund ihrer APP-ähnlichen Prozessierung für den *Screening*-Versuch mit Hilfe des AP-Assays ausgesucht wurden. Die Untersuchungen (Abb. 15) zeigten eine Zunahme der Proteolyse von TRANCE durch BACE gegenüber der mitgeführten Kontrolle. Obwohl sich die absoluten Zahlen von Versuch zu Versuch sehr unterschieden, war die prozentuale Abweichung relativ konstant zwischen 13 und 17% und somit wesentlich höher, als die der anderen bereits untersuchten Konstrukte (immer unter 5%). Dies lässt den Verdacht aufkommen, dass es sich bei TRANCE um ein BACE-Substrat handeln könnte. Der Phänotyp der BACE-defizienten Mäuse zeigt eine sehr hohe Infektanfälligkeit, was die Annahme von TRANCE als BACE-Substrat befürwortet. TRANCE übernimmt wichtige Funktionen im Immunsystem (1.7.2), wie beispielsweise die Induktion der Expression von T-Zell-Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen. Des Weiteren ist TRANCE ein bereits bekanntes Substrat der Metalloprotease ADAM17 und es wurde beschrieben, dass TRANCE auch von einer unbekanntenen „Nicht-Metalloprotease“ geschnitten wird (Lum et al., 1999). Zusammengenommen führten diese Hinweise dazu, dass TRANCE als potentiell BACE-Substrat weiterhin untersucht wurde.

Zunächst wurde COS7-Zellen zusätzlich mit ADAM17 bzw. einer inaktiven BACE-Variante ko-transfiziert (Abb. 16). Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigten weitestgehend die Erwartungen: Es zeigte sich eine deutliche Zunahme des *Shedding*-Produkts in Gegenwart von ADAM17 (28% Zunahme gegenüber der

Kontrolle) und BACE (9% Zunahme), während es in Gegenwart von inaktivem BACE zu keiner Zunahme kam.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde als nächstes der Effekt eines spezifischen BACE-Inhibitors (Compound3 / C3) untersucht. Unter der Wirkung von C3 zeigte sich eine Reduzierung des konstitutiven *Sheddings* um 5% im Vergleich zu Zellen ohne BACE-Überexpression. Dieser Befund spricht dafür, dass natives BACE in der Zelle durch den Inhibitor C3 gehemmt wird und so das potentielle Substrat TRANCE nicht mehr angreifen kann.

Abschließend sollte geklärt werden, ob die Zugabe des Metalloprotease-Inhibitors GM6001 bzw. TAPI die BACE-Aktivität besser sichtbar machen bzw. verstärken könnte, indem die möglicherweise bestehende Konkurrenz von Metalloprotease und BACE um TRANCE ausbleibt. Hierzu wurde wiederum TRANCE in COS7-Zellen überexprimiert und mit ADAM17, BACE bzw. inaktivem BACE ko-transfiziert. Die Zellen, denen ein Metalloprotease-Inhibitor zugegeben wurde, zeigten eine Abnahme des *Sheddings* um ca. 5% (mit BACE ko-transfizierte Zellen) bzw. 10% (mit inaktivem BACE ko-transfizierte Zellen). Dieses den Erwartungen entgegengesetzte Ergebnis könnte durch die Hypothese erklärt werden, dass BACE TRANCE nicht direkt angreift, sondern vielmehr als Aktivator auf eine Metalloprotease, z.B. ADAM17, wirkt, die dann den direkten Effekt an TRANCE bewirkt. Die Verifizierung dieser Hypothese bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen, die in einer Folgearbeit durchgeführt werden könnten.

Die Ergebnisse der bisher diskutierten Versuche bestätigen, dass BACE ein *Shedding* von TRANCE an dessen Ektodomäne auf noch ungeklärte Weise zu bewirken scheint. Keiner der bisher durchgeführten Versuche konnte Auskunft über die genaue Angriffsstelle geben. Um die Spaltprodukte und die Größe/Anzahl der Spaltprodukte zu klären, wurden Versuche mit Hilfe der AP-SDS-Page-Gel-Methode durchgeführt. Hierzu wurden Zellen mit TRANCE überexprimiert und mit dem Leervektor pcDNA, ADAM10, ADAM17, BACE bzw. inaktivem BACE ko-transfiziert. Teilweise wurde die Zellen zusätzlich mit dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 bzw. TAPI inkubiert.

Die Versuche zeigten wie erwartet eine hohe AP-Aktivität bei den mit ADAM17 und den mit BACE ko-transfizierten Zellen. Der Metalloprotease-Inhibitor hemmte sowohl den Effekt von ADAM17 als auch den von BACE. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten der AP-Assays überein, was den Verdacht erhärtet, dass es sich bei der

Proteolyse von TRANCE durch BACE um einen komplizierteren Reaktionsweg handeln könnte als ursprünglich angenommen. Denkbar ist, dass BACE nicht direkt auf das Protein wirkt, sondern eine andere Protease, z.B. ADAM17, aktiviert, welche dann die Proteolyse durchführt.

In diesen Versuchen zeigen erstmals auch die mit inaktivem BACE ko-transfizierten Zellen eine Aktivität, wenn auch nur eine sehr schwache. Dieser Effekt ist wohl am ehesten durch einen Fehler in der Versuchsdurchführung zu erklären: Es könnte sein, dass beim Pipettieren in die Geltasche eine kleine Menge der Probe übergelaufen ist. Ebenfalls möglich wäre, dass eine in der Zelllinie nativ vorkommende Protease, z.B. ADAM17, für die hier sichtbare Aktivität verantwortlich ist oder dass das für diesen Versuch verwendete Plasmid fehlerhaft war, so dass das exprimierte BACE doch nicht ganz inaktiv war. Überprüfbar wäre die Fehlerquelle durch Wiederholung des Versuches mit einer ADAM17-defizienten Zelllinie, wobei eine Geltasche zwischen den Proben mit dem aktiven und dem inaktiven BACE mit einer Leervektor-Probe gefüllt werden sollte, um ein Überlaufen beim Pipettieren auszuschließen.

4.4 Die Überexpression von BACE führt zur erhöhten Generierung der intrazellulären TRANCE-Domäne

Nachdem TRANCE mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase bereits auf ein *Shedding* der Ektodomäne untersucht wurde, konnte mit Hilfe des Flag-Tags am C-terminalen Ende des TRANCE-Proteins die BACE-abhängige Proteolyse mittels Immunoblot-Analysen untersucht werden. Für die Westernblot-Analysen wurden ebenfalls Zellen verwendet, in denen TRANCE überexprimiert war und die nach demselben Muster ko-transfiziert wurden wie die Zellen für das AP-SDS-Page-Gel. Die Ko-Transfektion von TRANCE mit ADAM17 führte zur Entstehung von 3 C-terminalen Spaltfragmenten im Immunoblot (Abb. 21), die bei Zugabe eines Metalloprotease-Inhibitors deutlich schwächer wurden bzw. ganz verschwanden. Mit diesem Ergebnis wurden die bereits mit Hilfe der anderen Methoden erzielten bzw. von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Ergebnisse, dass TRANCE ein ADAM17-Substrat mit mehreren Schnittstellen sei (Lum et al., 1999), bestätigt. Die mit BACE ko-transfizierten Zellen zeigten nur eine deutliche Bande (20 kD), die anderen beiden Banden (10 und 25 kD) waren nur schwach ausgeprägt. Die Zugabe des Inhibitors

TAPI veränderte hier deutlich die 20 kD-Bande, die schwächer wurde. Eine mögliche Ursache für diesen Befund wäre, dass die Aktivität von BACE zu einer Proteolyse von TRANCE mit C-terminalen Spaltprodukten der Größen 10, 20 und 25 kD führt, wobei die 20 kD-Spaltprodukte am häufigsten vorkommen. Möglich wäre aber auch, dass das Spaltprodukt mit der Größe von 20 kD nicht – oder nicht ausschließlich – von BACE alleine produziert wird, sondern dass BACE eine andere Protease aktiviert. Diese Theorien werden durch die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche gestützt.

Die Resultate des zweiten Blots (Abb. 22) sind anders zu deuten als die des ersten: Neben der Tatsache, dass die Ko-Transfektion mit inaktivem BACE in diesem Versuch nicht gut funktionierte, veränderte sich das *Shedding* der mit ADAM17 ko-transfizierten Zellen diesmal durch Zugabe des Metalloprotease-Inhibitors nicht wesentlich. Die Ko-Transfektion von TRANCE mit BACE führte zur Entstehung von 3 C-terminalen Spaltfragmenten der Größen 10, 20 und 25 kD, von denen in diesem Fall aber die beiden größeren stärker ausgeprägt waren als das Kleinste. Der Metalloprotease-Inhibitor wirkte auf alle 3 Spaltprodukte reduzierend. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden ähnlich aufgebauten Versuche führen zu zwei Überlegungen: Einerseits wäre es möglich, dass die beiden unterschiedlichen Metalloprotease-Inhibitoren TAPI (Abb. 21) und GM6001 (Abb. 22) nicht denselben hemmenden Effekt auf alle Metalloproteasen haben oder andererseits, dass einer der beiden Inhibitoren neben Metalloproteasen auch andere Proteasen hemmt – wie z.B. BACE. Vielleicht unterliegt die Inhibition der Proteolyse aber auch anderen unbekanntem Faktoren, die variabel sind und noch nicht bedacht wurden (Abb. 39).

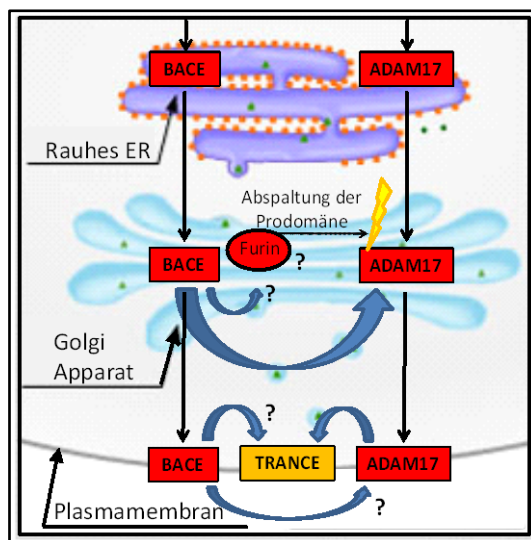


Abbildung 39: Hypothesen über die Wirkung von BACE auf TRANCE

Gezeigt ist der Weg von BACE bzw. ADAM17 durch die Zelle. Beide Proteine gelangen nach ihrer Synthese ins raue Endoplasmatische Retikulum und von dort in den Golgi-Apparat. Hier kommt es zur Abspaltung der Prodomäne von ADAM17. Zur Zeit wird innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht, ob das Enzym Furin an dieser Proteolyse beteiligt sein könnte. Sollte dies der Fall sein, so wäre weiterhin zu prüfen, ob der hier beschriebene Verdacht, dass BACE ADAM17 indirekt aktiviert, tatsächlich zutrifft und ob Furin durch BACE aktiviert wird. Denkbar wäre aber auch, dass nicht Furin, sondern ein anderes, noch unbekanntes Enzym als Signalprotein zwischen BACE und ADAM17 wirkt oder dass BACE ADAM17 direkt angreift. Dies könnte ebenfalls bereits im Golgi-Apparat stattfinden oder aber erst, nachdem beide Proteine die Plasmamembran und ihren aktiven Zustand erreicht haben.

4.5 Die Ergebnisse des Microarray-Vorversuchs konnten mit Hilfe der *Real-Time-PCR* nicht verifiziert werden

Zuletzt wurden einige Ergebnisse eines bereits im Vorversuch durchgeführten Microarray-Versuchs mit Hilfe der *Real-Time-PCR*-Methode geprüft und quantifiziert. Im Microarray-Assay wurden verschiedene Gene auf eine veränderte Regulation durch die BACE-1-Defizienz überprüft. 10 bekannte Gene, die eine Regulation durch BACE zeigten und aufgrund ihrer Relevanz für das Immunsystem oder ihrer Bedeutung für das Nervensystem interessant erschienen, wurden für diese Arbeit ausgewählt.

Beim Vergleich der Sequenz der für diese Untersuchung zur Verfügung gestellten Plasmide mit der bekannten Gensequenz und der Vektorkarte wurde festgestellt, dass nur 5 der 10 ausgewählten Gene in den jeweiligen Plasmiden vorhanden

waren. Nach Eingabe der Plasmidsequenz im Internet wurde außerdem festgestellt, dass die Sequenz, die das Gen Syntaxin 6 bzw. Slc2a1 kodieren sollte, sich direkt neben oder in der Nähe des Genlokus befand. Die Plasmide, die die Gene Tcrb-v8.2, Axcam und Ramp2 enthalten sollten, enthielten dagegen eine Sequenz, die an einer sehr entfernten Stelle des Genoms zu finden war. Somit konnte in der Arbeit nur mit den übrigen 5 Genen, beschrieben im Teil 1.8, weitergearbeitet werden. Das Ergebnis dieser Sequenzierung lässt sehr an der Verlässlichkeit der Ergebnisse des Microarrays zweifeln, denn in der vorliegenden Stichprobe enthielten 50% der dort verwendeten Plasmide eine falsche Gensequenz.

Zunächst wurden mit Hilfe der Plasmide Standard Eichgeraden erstellt, indem verschiedene Verdünnungsstufen nach dem Protokoll der *Real-Time-PCR* gemessen wurden. Optimalerweise ergibt sich eine Gerade, da der Ct-Wert mit steigender Verdünnung konstant höher wird. Die in dieser Arbeit erstellten Eichgeraden entsprachen in etwa diesem Bild (Abb. 27 bis 32).

Das unter denselben Bedingungen gemessene zu untersuchende Gewebe (cDNA aus dem Gehirn von adulten BACE-1-defizienten und Wildtyp-Mäusen; Abb. 33 bis 38) konnte anschließend anhand der Ct-Werte mit der Eichgerade abgeglichen und so die resultierende Anzahl der Kopien abgelesen werden. In diesem Versuch wurden 5 Geschwister-Mäuse (*Littermates*) in mehreren Versuchsreihen miteinander verglichen. Die Gene CD8b, CD44 sowie das Kontrollgen HPRT zeigten Medianwerte von über 30 an. Diese Ct-Werte sind auf der Standard Eichgerade nicht mehr zu finden und sprechen theoretisch für eine Kopienzahl unter 1, was bedeutet, dass kein Molekül in der Probe vorhanden ist. Der Versuch war somit nicht verlässlich auswertbar.

Unter Verwendung der Formel zur Berechnung der Gesamtratio (3.2.7) war eine sinnvolle Auswertung ebenfalls nicht möglich. Die berechnete Gesamtratio dieses Versuches zeigte, dass CD8b im Knockout 4,77-fach hochreguliert war, während es beim CD44-Gen kaum eine Änderung in der Regulation gab. Csf1r und Periaxin waren etwa 2-fach hochreguliert, Syntaxin 8 ca. 1,6-fach. Allerdings waren die Ergebnisse der einzelnen Messungen nicht reproduzierbar und korrelierten weder untereinander noch mit der Gesamtratio, so dass eine objektive Auswertung der *Real-Time-PCR*-Daten unmöglich war.

Eine Erklärung hierfür könnte ein methodischer Fehler sein, denkbar ist aber auch ein fehlerhaftes Kontrollgen HPRT.

Um die Fehlerquelle zu bestimmen, wurden Messungen mit Kontrollgenen durchgeführt, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden. Die Positivkontrolle (PK PM1) erreichte hierbei gegenüber der Negativkontrolle (PK unstimuliert) bei der Berechnung der Ratio die erwarteten Werte um 100, womit eine methodische Ursache des Fehlers ausgeschlossen wurde. Es blieb der Verdacht, dass die zu messenden Proteine, v.a. das HPRT, in dem untersuchten Gewebe in zu niedriger Konzentration exprimiert werden, um vom Gerät erfasst zu werden und repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Auch die sehr hohen Ct-Werte von zum Teil über 40 sprechen für diese These. Solche hohen Werte erreichten weder die Messungen der Kooperationspartner noch die der Kontrollgene. Zuletzt ist auch das Versagen der Primer für HPRT eine mögliche Ursache. Das scheint aber ebenfalls als unwahrscheinlich, da sowohl die Primer als auch die Plasmide im Vorwege der Untersuchungen sequenziert wurden.

Letztendlich konnte die Fehlerquelle des Versuches nicht geklärt werden, so dass eine Verifizierung der Microarray-Daten weiterhin aussteht. Eine weitere gute Methode hierfür, die in Folgearbeiten angewendet werden könnte, ist die 2D-Proteom-Analyse. Hierbei wird das gesamte Proteinprofil einer Zelle anhand von Zelllysaten mittels Gelelektrophorese bestimmt. Die Proteine werden sowohl nach ihrer Ladung als auch nach ihrer Masse in 2 Dimensionen aufgetrennt. Da die Proteine im Zelllysate nicht nur in ihrer ursprünglichen Form und Größe vorliegen, sondern auch von Proteasen abgespaltene Fragmente vorkommen, entstehen bei der Auftrennung im Gel charakteristische *Fingerprints*, anhand derer die Proteine identifiziert werden können. In einer Folgearbeit könnte dieser Versuch jeweils mit Zelllysaten aus Wildtyp- und BACE-defizienten Mäusen durchgeführt und das Ergebnis direkt verglichen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

M. Alzheimer ist die häufigste Demenzerkrankung weltweit. Neben Alzheimer-Degenerationsfibrillen kommt es bei dieser Erkrankung im Gehirn der Patienten zu charakteristischen Plaqueablagerungen, die hauptsächlich das Amyloid β -Peptid ($A\beta$) enthalten. $A\beta$ entsteht durch die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) unter Beteiligung einer β -Sekretase, die als BACE-1 (*β -site APP cleaving enzyme*) identifiziert wurde. Die Inhibition von BACE-1 ist ein zur Zeit vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Behandlung des Morbus Alzheimer.

In der vorliegenden Arbeit sollten neue, physiologische Substrate von BACE identifiziert werden, um Hinweise auf potentielle Nebenwirkungen einer BACE-Inhibition zu erhalten. Im Vorversuch generierte BACE-defiziente Mäuse zeigten unter anderem eine erhöhte neonatale Mortalität. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass BACE an der Proteolyse von TRANCE, einem integralen Membranglykoprotein aus der TNF-Familie (Tumor Necrosis Factor), beteiligt sein könnte. TRANCE übernimmt vielfältige Funktionen im Immunsystem, wie die Induktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen oder von T-Zell-Wachstums- und Differenzierungsfaktoren.

Bisher ist bekannt, dass lösliche Spaltprodukte von TRANCE existieren, welche zumindest teilweise auf ein *Shedding* durch die Metalloprotease ADAM17 zurückzuführen sind. Mit Hilfe von Immunoblot-Analysen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Effekt von BACE auf TRANCE durch Metalloprotease-Inhibition gehemmt werden kann. Dieser Befund spricht dafür, dass BACE nicht direkt auf TRANCE wirkt, sondern seine Wirkung über einen komplizierteren Reaktionsweg ausüben scheint. Es stellt sich deshalb die Frage, auf welche Weise BACE am *Shedding* von TRANCE beteiligt ist. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen in Folgearbeiten nötig.

Ferner wurde versucht, die Ergebnisse eines im Vorversuch stattgefundenen Microarray-Screening-Tests für potentielle BACE-Substrate, mittels *Real-Time-PCR* zu verifizieren. Hierzu wurden 10 Proteine ausgewählt, die relevante Rollen im Immun- oder Nervensystem spielen und im Microarray-Versuch eine signifikante *Up*- oder *Down*-Regulation zeigten. Aufgrund verschiedener materieller und

methodischer Fehler, die offenbar zum Teil auch schon im Vorversuch bestanden, war jedoch die Verifizierung mittels *Real-Time-PCR* nicht auswertbar.

BACE stellt nach wie vor den vielversprechendsten Angriffspunkt für die Entwicklung einer Therapie des Morbus Alzheimers dar. Bevor aber Therapeutika zur Blockierung dieser Protease entwickelt werden können, muss die Funktion von BACE noch besser verstanden sein. Hierfür ist es wichtig, weitere Substrate zu identifizieren sowie den Reaktionsweg von indirekten Effekten, wie den auf TRANCE, weiter zu erforschen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2003. Biochemie. Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.
- Bogdanovic A, Bennett N, Kieffer S, Louwagie M, Morio T, Garin J, Satre M, Bruckert F. 2002. Syntaxin 7, syntaxin 8, Vti1 and VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) form an active SNARE complex for early macropinocytic compartment fusion in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 368:29-39.
- Booth BW, Smith GH. 2007. Roles of transforming growth factor-alpha in mammary development and disease. *Growth Factors* 25:227-235.
- Bosselut R, Kubo S, Guinter T, Kopacz JL, Altman JD, Feigenbaum L, Singer A. 2000. Role of CD8beta domains in CD8 coreceptor function: importance for MHC I binding, signaling, and positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Immunity* 12:409-418.
- Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. 2004. Function and regulation of tumor necrosis factor type 2. *Curr Med Chem* 11:2205-2212.
- Cheng CF, Fan J, Fedesco M, Guan S, Li Y, Bandyopadhyay B, Bright AM, Yerushalmi D, Liang M, Chen M, Han YP, Woodley DT, Li W. 2008. Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* 28:3344-3358.
- Citron M. 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:677-685.
- Cole, SL, Vassar, R. 2007. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener.* 2:22.
- Cole SL, Vassar R. 2008. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem* 283:29621-29625.
- Desikan RS, Fischl B, Cabral HJ, Kemper TL, Guttmann CR, Blacker D, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ. 2008. MRI measures of temporoparietal regions show differential rates of atrophy during prodromal AD. *Neurology*.
- Dingwall C. 2001. Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease. *J Clin Invest* 108:1243-1246.
- Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B. 2005. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem* 280:30797-30806.
- Dominguez DI, De Strooper B, Annaert W. 2001. Secretases as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Amyloid* 8:124-142.
- Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, Denoyelle C, Lazar V, Cagnard N, Dubart-Kupperschmitt A, Mangeney M, Fruman DA, Bismuth G. 2008. FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 181:2980-2989.
- Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC. 2004. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* 164:719-725.
- Ganten D, Ruckpaul K. 2008. Grundlagen der molekularen Medizin. Heidelberg: Springer Medizin. 546 p.
- Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, Cottrell DF, Tait S, Garry EM, Wallace VC, Ure J, Griffiths IR, Smith A, Brophy PJ. 2000. Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron* 26:523-531.

- Guarda G, Hons M, Soriano SF, Huang AY, Polley R, Martin-Fontecha A, Stein JV, Germain RN, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2007. L-selectin-negative CCR7⁻ effector and memory CD8⁺ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat Immunol* 8:743-752.
- Guntinas-Lichius O. 2002. [Growth factors in otorhinolaryngology]. *Laryngorhinootologie* 81 Suppl 1:S39-60.
- Head E, Lott IT, Patterson D, Doran E, Haier RJ. 2007. Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention. *J Alzheimers Dis* 11:61-76.
- Hinkle CL, Diestel S, Lieberman J, Maness PF. 2006. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Neurobiol* 66:1378-1395.
- Hoareau C, Borrell V, Soriano E, Krebs MO, Prochiantz A, Allinquant B. 2008. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. *Neurobiol Aging* 29:542-553.
- Holtmann MH, Schuchmann M, Zeller G, Galle PR, Neurath MF. 2002. The emerging distinct role of TNF-receptor 2 (p80) signaling in chronic inflammatory disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50:279-288.
- Horiuchi D, Collins CA, Bhat P, Barkus RV, Diantonio A, Saxton WM. 2007. Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr Biol* 17:1313-1317.
- Huotari MA, Palgi J, Otonkoski T. 1998. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. *Endocrinology* 139:1494-1499.
- Isom LL. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7:42-54.
- Janeway C. 2005. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. New York: Garland Science.
- Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. 2000. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 191:495-502.
- Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 162:2562-2568.
- Kalus I, Bormann U, Mzoughi M, Schachner M, Kleene R. 2006. Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* 98:78-88.
- Kasai K, Suga K, Izumi T, Akagawa K. 2008. Syntaxin 8 has two functionally distinct dileucine-based motifs. *Cell Mol Biol Lett* 13:144-154.
- Kitazume S, Nakagawa K, Oka R, Tachida Y, Ogawa K, Luo Y, Citron M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Paulson JC, Miyoshi E, Taniguchi N, Hashimoto Y. 2005. In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *J Biol Chem* 280:8589-8595.
- Kitazume S, Saido TC, Hashimoto Y. 2004a. Alzheimer's beta-secretase cleaves a glycosyltransferase as a physiological substrate. *Glycoconj J* 20:59-62.
- Kitazume S, Suzuki M, Saido TC, Hashimoto Y. 2004b. Involvement of proteases in glycosyltransferase secretion: Alzheimer's beta-secretase-dependent cleavage and a following processing by an aminopeptidase. *Glycoconj J* 21:25-29.
- Kolkova K. 2008. Biosynthesis of NCAM. *Neurochem Res*.
- Kubis AM, Janusz M. 2008. [Alzheimer's disease: new prospects in therapy and applied experimental models]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 62:372-392.
- Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH. 2001. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest* 108:971-979.
- Li Q, Sudhof TC. 2004. Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem* 279:10542-10550.

- Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, Saftig P, De Strooper B, Seed B. 2003. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278:48713-48719.
- Löffler G, Petrides PE. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin [u.a.]: Springer.
- Lüllmann-Rauch R. 2003. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlondorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP. 1999. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274:13613-13618.
- Marcinkiewicz M, Seidah NG. 2000. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 75:2133-2143.
- Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I. 1996. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest* 97:1647-1654.
- McBryan J, Howlin J, Napoletano S, Martin F. 2008. Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:159-169.
- Miyagawa J, Hanafusa O, Sasada R, Yamamoto K, Igarashi K, Yamamori K, Seno M, Tada H, Nammo T, Li M, Yamagata K, Nakajima H, Namba M, Kuwajima M, Matsuzawa Y. 1999. Immunohistochemical localization of betacellulin, a new member of the EGF family, in normal human pancreas and islet tumor cells. *Endocr J* 46:755-764.
- Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, Sugahara KN, Miyauchi T, Sako Y, Yanagida T, Miyasaka M. 2004. Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J Biol Chem* 279:4541-4550.
- Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostade X, Condliffe AM, Dransfield I, Haslett C, Chilvers ER. 1997. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 90:2772-2783.
- Olson AL, Pessin JE. 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 16:235-256.
- Patterson D, Gardiner K, Kao FT, Tanzi R, Watkins P, Gusella JF. 1988. Mapping of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein and its relationship to the Down syndrome region of chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8266-8270.
- Perez-Torres M, Valle BL, Maihle NJ, Negron-Vega L, Nieves-Alicea R, Cora EM. 2008. Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. *Exp Cell Res*.
- Pfizenmaier DKD, Scheurich, Dr. Peter (DE), Thoma, Dr. Bettina (DE). 1991. Antibody specific for the tumor necrosis factor receptor. In: Max, Planck Gesellschaft (DE).
- Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrup H, Wijsman J, Wright S, McConlogue L. 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10:1317-1324.
- Rosnet O, Birnbaum D. 1993. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev Oncog* 4:595-613.
- Scheurich P, Thoma B, Ucer U, Pfizenmaier K. 1987. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 138:1786-1790.
- Seno M, Tada H, Kosaka M, Sasada R, Igarashi K, Shing Y, Folkman J, Ueda M, Yamada H. 1996. Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in

- pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. *Growth Factors* 13:181-191.
- Stockley JH, O'Neill C. 2008. Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 65:3265-3289.
- Sugahara KN, Hirata T, Hayasaka H, Stern R, Murai T, Miyasaka M. 2006. Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J Biol Chem* 281:5861-5868.
- Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. 2003. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem* 278:32259-32265.
- Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P, Cassiman D, Kempfle J, Wuttke TV, Weber Y, Lerche H, Afawi Z, Vandenberghe W, Korczyn AD, Berkovic SF, Ekstein D, Kivity S, Ryvlin P, Claes LR, Deprez L, Maljevic S, Vargas A, Van Dyck T, Goossens D, Del-Favero J, Van Laere K, De Jonghe P, Van Paesschen W. 2008. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain* 131:1831-1844.
- Tada H, Sasada R, Kawaguchi Y, Kojima I, Gullick WJ, Salomon DS, Igarashi K, Seno M, Yamada H. 1999. Processing and juxtacrine activity of membrane-anchored betacellulin. *J Cell Biochem* 72:423-434.
- Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. 1995. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 181:2259-2264.
- Thakral D, Dobbins J, Devine L, Kavathas PB. 2008. Differential expression of the human CD8beta splice variants and regulation of the M-2 isoform by ubiquitination. *J Immunol* 180:7431-7442.
- Thal DR, Griffin WS, de Vos RA, Ghebremedhin E. 2008. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 115:599-609.
- Thowfeequ S, Ralphs KL, Yu WY, Slack JM, Tosh D. 2007. Betacellulin inhibits amylase and glucagon production and promotes beta cell differentiation in mouse embryonic pancreas. *Diabetologia* 50:1688-1697.
- Tracey KJ, Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45:491-503.
- Underhill C. 1992. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 103 (Pt 2):293-298.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Vassar R. 2005. beta-Secretase, APP and Abeta in Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 38:79-103.
- Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K, Matsuzawa Y, Kawamori R, Yamasaki Y. 1996. PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 45:1826-1831.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C. 2006. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664-666.
- Willmarth NE, Ethier SP. 2008. Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:171-179.
- Wong BR, Josien R, Choi Y. 1999. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 65:715-724.
- Wong HK, Sakurai T, Oyama F, Kaneko K, Wada K, Miyazaki H, Kurosawa M, De Strooper B, Saftig P, Nukina N. 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* 280:23009-23017.

- Wu W, O'Reilly MS, Langley RR, Tsan RZ, Baker CH, Bekele N, Tang XM, Onn A, Fidler IJ, Herbst RS. 2007. Expression of epidermal growth factor (EGF)/transforming growth factor-alpha by human lung cancer cells determines their response to EGF receptor tyrosine kinase inhibition in the lungs of mice. *Mol Cancer Ther* 6:2652-2663.
- Yamada M, Ichikawa Y, Yamagishi S, Momiyama N, Ota M, Fujii S, Tanaka K, Togo S, Ohki S, Shimada H. 2008. Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14:2351-2356.
- Yamamoto K, Miyagawa J, Waguri M, Sasada R, Igarashi K, Li M, Nammo T, Moriwaki M, Imagawa A, Yamagata K, Nakajima H, Namba M, Tochino Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y. 2000. Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion. *Diabetes* 49:2021-2027.
- Yamane A, Mayo ML, Bringas P, Jr., Chen L, Huynh M, Thai K, Shum L, Slavkin HC. 1997. TGF-alpha, EGF, and their cognate EGF receptor are co-expressed with desmin during embryonic, fetal, and neonatal myogenesis in mouse tongue development. *Dev Dyn* 209:353-366.
- Zeren T, Inan S, Seda Vatansever H, Ekerbicer N, Sayhan S. 2008. Significance of tyrosine kinase activity on malign transformation of ovarian tumors: a comparison between EGF-R and TGF-alpha. *Acta Histochem* 110:256-263.
- Zha J, Shu H. 2002. Molecular mechanism of signaling by tumor necrosis factor. *Sci China C Life Sci* 45:113-119.
- Zigman WB, Lott IT. 2007. Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13:237-246.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zerebrale Atrophie	1
Abbildung 2: β -amyloider Plaque.....	2
Abbildung 3: APP-Spaltung	5
Abbildung 4: Wildtyp- vs. BACE-defiziente Maus	7
Abbildung 5: Mortalität.....	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteine, die einer APP-ähnlichen Proteolyse unterliegen.....	12
Abbildung 7: Ausschaltung des murinen BACE-1-Gens.....	24
Abbildung 8: Das Prinzip der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion.....	29
Abbildung 9: Anti-NCAM-Immunoblot mit Maus-Gehirn-Lysat.....	39
Abbildung 10: Immunoblot nach Überexpression mit NCAM und BACE	40
Abbildung 11 : Darstellung eines Proteins mit AP- und Flag- <i>Tag</i>	41
Abbildung 12: <i>Screening</i> -Versuch mit PSGL-1	42
Abbildung 13: <i>Screening</i> -Versuch mit TNF α und TGF α	43
Abbildung 14: <i>Screening</i> -Versuch mit L-Selektin, Amphiregulin und Betacellulin.....	44
Abbildung 15: <i>Screening</i> -Versuch mit TRANCE	45
Abbildung 16: AP-Assay zur Verifizierung von TRANCE als BACE-Substrat (1).....	46
Abbildung 17: AP-Assay zur Verifizierung von TRANCE als BACE-Substrat (2).....	47
Abbildung 18: AP-Assay zur Verifizierung von TRANCE als BACE-Substrat (3).....	49
Abbildung 19: Untersuchung zur Größe von TRANCE-Spaltprodukten (1)	50
Abbildung 20: Untersuchung zur Größe von TRANCE-Spaltprodukten (2)	51
Abbildung 21: Immunoblot zur Untersuchung von intrazellulären TRANCE-Spaltprodukten (1)	53
Abbildung 22: Immunoblot zur Untersuchung von intrazellulären TRANCE-Spaltprodukten (2)	54
Abbildung 23: Ergebnisse des Microarray-Chips.....	56
Abbildung 24: Genotypisierung.....	57
Abbildung 25: RNA-Qualitätsprüfung.....	58
Abbildung 26: Überprüfung der Standardplasmide.....	58
Abbildung 27: Standardkurve für CD8b	60
Abbildung 28: Standardkurve für CD44	60
Abbildung 29: Standardkurve für Syntaxin 8.....	60

Abbildung 30: Standardkurve für Csf1r.....	61
Abbildung 31: Standardkurve für Periaxin	61
Abbildung 32: Standardkurve für das Kontrollgen HPRT	61
Abbildung 33: Ergebnisse aus den Messungen für CD8b	62
Abbildung 34: Ergebnisse aus den Messungen für CD44	62
Abbildung 35: Ergebnisse aus den Messungen für Syntaxin 8.....	63
Abbildung 36: Ergebnisse aus den Messungen für Csf1r.....	63
Abbildung 37: Ergebnisse aus den Messungen für Periaxin	63
Abbildung 38: Ergebnisse aus den Messungen für das Kontrollgen HPRT	64
Abbildung 39: Hypothesen über die Wirkung von BACE auf TRANCE	74

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ausgewählte Gene Für die <i>Real-Time</i> -PCR.....	13
Tabelle 2: Verwendete Vektoren.....	18
Tabelle 3: Verwendete Standardplasmide.....	18
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.....	19
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper.....	19
Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren.....	19
Tabelle 7: Zelllinien und Kulturmedien.....	23
Tabelle 8: Microarray-Ergebnis.....	56
Tabelle 9: Ergebnisse der <i>Real-Time</i> -PCR-Berechnung.....	65
Tabelle 10: Bestimmung der Fehlerquelle bei der <i>Real-Time</i> -PCR.....	65

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin, Österreich, Alanin
ad	auffüllen auf
AD	Alzheimer-Demenz
Abb.	Abbildung
A β	β -amyloides Peptid
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aph	Aminoglykosid Phosphotransferase
APLP	APP-like protein
Apo1	CD95
APP	Amyloid Precursor Protein
ATCC	American Type Culture Collection
B	Belgien
BACE	β -site APP cleaving enzyme
BD	Becton, Dickinson and Company
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indoylphosphate p-Toluidine salt
BgIII	Endonuklease 2 aus <i>Bacillus globigii</i>
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum-Albumin
BTC	Betacellulin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C3	Compound 3 Inhibitor
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
CH	Schweiz

cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxyd
COS7	African Green Monkey SV40-transf'd kidney fibroblast cell line
CP	Crossing Point
CSF	Colony Stimulating Factor
Csf1r	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
Ct	threshold cycle
D	Deutschland, Aspartat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
E	Spanien, Glutamat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et.al.	et alii
evtl.	eventuell
EZR	Extrazellulärraum
F1	Forward 1 (Primer)
Fas	CD95
FKS	fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSP	Forward Primer
FST	Fine Science Tools GmbH
G	Guanin, Glycin

g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH
ggf.	gegebenenfalls
GM6001	Metalloproteaseinhibitor Galardin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Histidin
h	Stunde/n
h-BACE	humanes BACE
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horse Radish Peroxidase
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse Gamma
inakt.	inaktiv
IZR	Intrazellulärraum
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
L	Leucin
l	Liter
LAM	Leukocyte adhesion molecule
Lb	lysogeny broth (Nährmedium)
LECAM	Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule
Leu8	L-Selektin
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
M	Methionin, Mol/l
m-BACE	murines BACE
mbH	mit beschränkter Haftung

MEF	embryonale Mausfibroblasten
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minute/n
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
neo	Neomyconresistenzgen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
°C	Grad Celsius
OD	optical density (Absorption)
OX40	CD 134
P	Prolin
P1	1. Tag postnatal
p3	3 kD großes Spaltfragment von APP
P5	5. Tag postnatal
PAA	Proteine, Antigene, Antikörper
Page	Polyacrylamidgel
PBS	phosphate-buffered saline
pcDNA	Leervektor
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen	Penicillin, Presenilin-Enhancer-Protein
pfm	Produkte für die Medizin AG
pH	Potentia Hydrogenii

PK	Positivkontrolle
Prof.	Professor
Prx	Periaxin
PSGL-1	p-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
R1	Reverse 1 (Primer)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSP	Reverse Primer
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten-Reaktion
S	Serin
SacI	Endonuklease 1 aus Streptomyces achromogenes
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde/n
Siglec-2	sialic acid binding Ig-like lectin-2
Slc2a1	Solute Carrier Family 2 Member 1
s.o.	siehe oben
Soc	Suppressor of cytokine
ST6Gal1	ST6 Beta-galactosamide Alpha-2,6-sialyltransferase 1
Strep	Streptomycin
Stx	Syntaxin
s.u.	siehe unten
SV40 TAg	Simian Vacuolating Virus 40 T-Antigen
T	Thymin, Threonin
TACE	TNF α -converting Enzyme-like Protease
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TAPI	TGase-activating protease inhibitor
Taq	thermus aquaticus
TBS/T	tris buffered saline / Tween
Tcrb-V8.2	T cell receptor beta-chain variable segments 8.2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFRII	Tumor Necrosis Factor Receptor 2
TQ-1-antigen	L-Selektin
TRANCE	Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
u.a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt, Valin
v.a.	vor allem
vs.	versus
W	Tryptophan
Wt	Wildtyp
XbaI	Endonuklease 1 aus <i>Xanthomonas badrii</i>
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Saftig für die freundliche Aufnahme im Institut bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Reiß für die Übernahme des Referats und für die sehr gute fachliche Betreuung dieser Arbeit.

Vielen Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Proksch für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Ebenfalls besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Maretzky, der mir mit viel Geduld und Engagement fast sämtliche Methoden im Labor beibrachte und im ersten Jahr meiner Arbeit, bis er die Arbeitsgruppe verließ, einer meiner wichtigsten Ansprechpartner war.

Danke auch meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, hier sind vor allem Dr. Andrea Rittger und Katharina Rothe zu nennen, aber auch Dr. Marc Schulte, Alexander Schneede, Beate Schulz, Christian Beimgraben, Silvio Weber und Johannes Prox danke ich für viele hilfreiche und interessante Gespräche. Vielen Dank auch an Marlies Rusch, Stefanie Jessen, Björn Ahrens und Julian Buchholtz für die große Hilfe im Labor.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Paul Saftig sowie allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Carolin Drenke und Andreas Wanker danke ich für viele aufbauende Gespräche, die mich auch in schwierigen Zeiten zur Weiterarbeit ermutigten.

Jonas Völcker, Hendrik Völz und Karsten Diercks danke ich für ihre Hilfe bei verschiedenen technischen Problemen, die mein Computer mir beim Schreiben dieser Arbeit bereitete.

Vielen Dank auch Hildegard Diercks und Wolfgang Miehle, die diese Arbeit zur Korrektur der Rechtschreibung durchlasen.

Abschließend bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mich vor und während meines Studiums auf jede erdenkliche Weise unterstützten.

11 LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Diercks
Vornamen: Katrin Manuela
Anschrift: Klausbrooker Weg 173
24106 Kiel
Geburtsdatum: 14. Juni 1981
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

August 1988 – Juli 1992: **Grundschule**
Grundschule Steinbeck, Buchholz i.d.N.

August 1992 – Juli 2001: **weiterführende Schule**
Gesamtschule Harburg, Hamburg

Juni – Dezember 1998: **Auslandsaufenthalt**
Australien, Launceston Church Grammar School

22. Juni 2001: **Allgemeine Hochschulreife**
Gesamtschule Harburg, Hamburg

Freiwilliges Soziales Jahr:

August 2001 – Januar 2002: Fachklinik Satteldüne für Kinder und Jugendliche auf Amrum

Studium:

Oktober 2002 – Juli 2004: **Vorklinisches Studium der Humanmedizin**
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

18. August 2004: **Ärztliche Vorprüfung**
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Seit Oktober 2004: **Klinisches Studium der Humanmedizin**
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1. – 30. März 2005: **Famulatur**
Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

20. Juli – 18. September 2005: **Famulatur**
Notaufnahme, Milnerton Medi-Clinic, Kapstadt, Südafrika
12. Februar – 14. März 2007: **Famulatur**
St. Anne´s Hospital, Nkhotakota, Malawi
- August 2007 – Juli 2008: **Praktisches Jahr**
Chirurgie: Victoria Hospital, Kapstadt, Südafrika
Innere Medizin: Segeberger Kliniken, Bad Segeberg
Urologie: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- Oktober 2004 – August 2009: **Dissertation**
Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, AG Prof. Saftig