

Aus dem
Adolf-Butenandt-Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie
Vorstand: Prof. Dr. C. Haass

Die Repression der Translation der anti-amyloidogenen Sekretase ADAM10 durch die 5'-untranslatierte Region

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dominik Büll
aus München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gunnar Schotta
Priv.-Doz. Dr. Markus J. Schwarz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Sven Lammich

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.2010

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region

Lammich S*, **Buell D***, Zilow S, Ludwig AK, Nuscher B, Lichtenthaler SF, Prinzen C, Fahrenholz F, Haass C

J Biol Chem. 2010 Mar 26. [Epub ahead of print]

*equal contribution

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	14
1.1 Die Alzheimer-Krankheit: Epidemiologische und ökonomische Fakten der häufigsten Demenzform	14
1.2 Klinik, Diagnostik, Therapie und Prognose	15
1.3 Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Krankheit	16
1.4 Molekulare und genetische Grundlagen der Demenz vom Alzheimer-Typ	19
1.4.1 Genetischer Hintergrund und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit.....	19
1.4.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und β -Amyloid-Peptid ($A\beta$).....	21
1.4.3 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins	21
1.4.4 Die β -Sekretase	23
1.4.5 Die γ -Sekretase.....	24
1.4.6 Die α -Sekretase	25
1.5 ADAM9, 10 und 17 – Einteilung, Struktur und Eigenschaften	27
1.6 Zielsetzung der Arbeit	30
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Geräte und Materialien	32
2.1.1 Allgemein	32
2.1.2 Molekularbiologie	33
2.1.3 Zellkultur	34
2.1.4 Proteinbiochemie	34
2.2 Enzyme, Kits und Chemikalien	35

2.2.1	Allgemein	35
2.2.2	Molekularbiologie	35
2.2.2.1	Vektoren	37
2.2.2.2	Oligonucleotide und DNA Konstrukte	37
2.2.2.3	qRT-PCR-Primer	39
2.2.3	Zellkultur	39
2.2.4	Proteinbiochemie	40
2.3	Molekularbiologische Methoden	40
2.3.1	Arbeiten mit Escherichia Coli	40
2.3.1.1	Kultivierung von <i>E. Coli</i>	40
2.3.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. Coli</i>	41
2.3.1.3	Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente <i>E. Coli</i>	41
2.3.1.4	Lagerung von <i>E. Coli</i>	42
2.3.2	Arbeiten mit DNA	42
2.3.2.1	Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)	42
2.3.2.1.1	PCR und PCR-Mutagenese	42
2.3.2.1.2	PCR-Mutagenese zur Herstellung der 5'UTR ATG-knock-out-Mutanten	43
2.3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.3.2.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	45
2.3.2.4	Enzymatische Modifikation von DNA	46
2.3.2.4.1	Restriktionsverdau von DNA	46
2.3.2.4.2	Dephosphorylierung von DNA	46
2.3.2.4.3	Ligation	47
2.3.2.5	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab („Mini-Präp“)	47
2.3.2.6	Präparation von Plasmid-DNA in großem („Maxi-Präp“) und sehr großem Maßstab („MegaMaxi-Präp“).	48
2.3.2.7	Sequenzierung	49
2.3.3	Konstrukte und Klonierungen	49
2.3.3.1	Klonierung einer cDNA für 5'UTR ADAM10 in den Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A	49
2.3.3.2	Klonierung verschieden mutierter 5'UTR Konstrukte	50
2.3.3.2.1	Konstrukte mit mutierten „upstream open reading frames“ (uORF)	50

2.3.3.2	Konstrukte mit Deletion verschiedener Abschnitte der 5'UTR von ADAM10 ..	51
2.3.3.3	Klonierung der cDNA für <i>Firefly</i> -Luciferase mit der cDNA der 5'UTR von ADAM10 in einen Expressionsvektor ..	52
2.3.4	Arbeiten mit RNA ..	54
2.3.4.1	Isolation von Gesamt-RNA ..	54
2.3.4.2	Expressionsanalyse der 5'UTR von ADAM10: MTN Blot (" <i>multiple tissue Northern Blot</i> ") ..	55
2.3.4.3	Northern Hybridisierung ..	55
2.3.4.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR) ..	56
2.4	Arbeiten mit eukaryoten Zellen („Zellkultur“) ..	58
2.4.1	Kultivierung, Passagieren, Verdünnung und Zellzahlbestimmung eukaryoter Zellen ..	58
2.4.2	Konservierung eukaryoter Zellen ..	58
2.4.3	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin ..	59
2.4.4	Transfektion adhärenter Zellen mit rekombinanter DNA ..	59
2.5	Proteinbiochemie ..	60
2.5.1	Zellernte und Herstellung von Zelllysaten ..	60
2.5.2	Proteinbestimmung ..	60
2.5.3	Nachweis von Proteinen ..	61
2.5.3.1	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) ..	61
2.5.3.2	Western Blot Analyse ..	62
2.5.3.2.1	Transfer von Proteinen mittels Elektro-Blot ..	62
2.5.3.2.2	Immunchemischer Chemoluminiszenz-vermittelter Proteinnachweis ..	63
2.5.4	Luciferase Reporterexperimente mit dem „Dual-Luciferase™ Reporter Assay“ System ..	65
2.6	<i>In vitro</i>-Transkription und -Translation ..	67
2.6.1	<i>In vitro</i> -Transkription ..	67
2.6.2	<i>In vitro</i> -Translation ..	67

3	ERGEBNISSE	69
3.1	Die ADAM10 mRNA enthält eine lange, GC-reiche 5'UTR	69
3.2	Die ADAM10 5'UTR ist ubiquitär exprimiert	72
3.3	Expression und Nachweis von ADAM10	75
3.3.1	Die 5'UTR unterdrückt die Proteinexpression von ADAM10	75
3.3.2	Die 5'UTR hat keinen Einfluss auf die Transkription von ADAM10	78
3.3.3	Die Unterdrückung der ADAM10 Translation durch die 5'UTR ist nicht Zelltyp-spezifisch	79
3.3.4	Spezielle Eigenschaften der 5'UTR bestimmen die ADAM10 Proteinexpression ..	80
3.3.4.1	Die uORFs der 5'UTR sind nicht an der Translationskontrolle von ADAM10 beteiligt	80
3.3.4.2	Die erste Hälfte der 5'UTR enthält ein die ADAM10 Translation unterdrückendes Element.....	83
3.3.4.3	Die Transkriptmengen der 5'UTR Deletionskonstrukte unterscheiden sich nur schwach	87
3.4	Die Effekte der 5'UTR und ihrer mutierten Varianten sind auf die Translation eines Reportergens übertragbar	89
3.5	<i>In vitro</i>-Transkription und -Translation	92
4	DISKUSSION	94
4.1	Überexpression von ADAM10 in HEK 293 Zellen	94
4.2	5' untranslatierte Regionen und ihre Bedeutung für die Expression von BACE-1 und ADAM10	96
4.3	Translationale Repression der Expression der ADAM10 Metalloprotease durch die 5'UTR	98
4.3.1	Die Rolle der uORFs der 5'UTR von ADAM10.....	98
4.3.2	Strukturbedingte Mechanismen – „Ribosome Stalling“ und „mRNA Decay“	102
4.3.3	RNA-bindende Proteine: Ein möglicher Mechanismus translationaler ADAM10 Kontrolle?.....	107

4.4	Relevanz der Ergebnisse bezüglich der Alzheimer-Krankheit	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	112
	LITERATURVERZEICHNIS	114
	DANKSAGUNG	129
	LEBENS LAUF	130

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierte Region
5'UTR	5' untranslatierte Region
5'UTRwt	Wild-typ 5' untranslatierte Region (nicht mutierte 5'UTR)
A β _{38/40/42}	Amyloid- β Peptid (bestehend aus 38 bis 42 Aminosäuren)
AD	„Alzheimer's disease“, Alzheimer'sche Krankheit, Demenz vom Alzheimer-Typ
ADAM	„a disintegrin and metalloprotease“, Disintegrin Metalloprotease
AICD	„APP intracellular domain“, intrazelluläre Domäne von APP
Aph1	„Anterior pharynx-defective phenotype 1“
APLP-1	„APP-like protein 1“
APP, β APP	„ β -amyloid precursor protein“, Amyloid- β Vorläufer-Protein
APP _{V717I}	APP mit „London“-Mutation (AS 717: Valin – Isoleucin)
AS	Aminosäure
ATF	„activating transcription factor“
BACE	„beta-site APP cleaving enzyme“
BCA	„Bicinchoninic acid“
bp	Basenpaare
cDNA	„coding“ DNA, kodierende DNA
CPE	„cytoplasmic polyadenylation element“
CPEB	„CPE binding protein“
CPSF	„cleavage and polyadenylation specificity factor“
ct	„cycle threshold“
CTF	„C-terminal fragment“, C-terminales Fragment

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	„Desoxyribonucleicacid“, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonucleotid Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	„Epidermal Growth factor“
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	„expressed sequence tags“, transkribierte Nukleotidsequenzen aus cDNA-Bibliotheken unterschiedlichen Gewebes
eRF	„eukaryotic Releasing Factor“
FAD	„Familial Alzheimer’s disease“, familiäre Form der Demenz vom Alzheimer-Typ
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GCN	„general control non-derepressible kinase“
GFP	„Green fluorescent protein“, Grün fluoreszierendes Protein
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
GSH	Glutathion
HAWIE	Hamburg Wechsler Intelligenz Inventar
HB-EGF	„Heparin-binding EGF-like growth factor“
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEK	„human embryonic kidney cells“, menschliche embryonale Nierenzellen
HMW	„High molecular weight“

hnRNA	heterogene nukleäre RNA
hnRNP	„heterogeneous nuclear Ribo-Nucleoprotein (-particle)“
ICD-10	„International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision“
IRE	„iron response element“
IRES	„internal Ribosome entry site“
IRP	„iron regulatory protein“
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
MADM	„Mammalian Disintegrin Metalloproteinase“
MCS	„multiple cloning site“, Vektorregion zur Ligierung des zu klonierenden Gens
min	Minute
mRNA	Boten-(„messenger“)RNA
mRNP	„messenger Ribo-Nucleoprotein (-particle)“
MTN Blot	„Multiple Tissue Northern Blot“
mTOR	„mammalian target of Rapamycin“
MW	Mittelwert
Nct	Nicastrin
NFT	„neurofibrillary tangles“, neurofibrilläre Bündel
NMD	„nonsense-mediated mRNA decay“
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP40	Nonidet P-40
NPC	nuclear pore complex
NRG1	Neuregulin-1

NTF	„N-terminal fragment“, N-terminales Fragment
OD	„Optical density“, optische Dichte
ORF	open reading frame
PABP	poly-A bindendes Protein
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„Polymerase chain reaction“, Polymerase Kettenreaktion
PDGF	„Platelet-derived growth factor“
Pen2	„Presenilin enhancer 2“
PIC	„pre-initiation complex“, Präinitiationskomplex
PKC	Proteinkinase-C
PLC	Phospholipase-C
PM	„Plasma membrane“, Plasmamembran
PS	Presenilin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
RBP	RNA-bindendes Protein
Rer1	Retrieval to the ER or retention in the ER
RISC	„RNA induced silencing complex“
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RIP	Regulierte intramembranäre Proteolyse
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S2P	Transkriptionsfaktor Peptidase-2
SAP	<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase
sAPP α	Lösliches, durch die α -Sekretase geschnittenes, N-terminales Fragment von APP
SD	„standard deviation“, Standardabweichung
SDS	„Sodium dodecyl sulphate“
snRNP	„small nuclear Ribo-Nucleoprotein (-particle)“
SPP	Signalpeptid-Peptidase
SVMP	„snake venom metalloproteinase“
TACE	„TNF- α converting enzyme“, ADAM17
TAPI	TNF- α Protease Inhibitor
TBS	„Tris buffered saline“, Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	„Tris buffered saline“ mit Tween20
TC	„Ternary Complex
TGF	„transforming growth factor“
TGN	„Trans-Golgi network“, Trans-Golgi Netzwerk
TMD	„Transmembrane domain“, Transmembrandomäne
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
tRNA	„transfer“ RNA
uORF	„upstream open reading frame“
WHO	„World Health Organisation“, Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Krankheit: Epidemiologische und ökonomische Fakten der häufigsten Demenzform

Zur Zeit leiden in Deutschland etwa eine Million Menschen an einer Demenz (Kanowski, 2002). Die überwiegende Mehrheit von ihnen, etwa 700.000, ist von der Demenz bei Alzheimer-Krankheit (Demenz vom Alzheimer-Typ, F00 nach ICD-10) betroffen (Bickel, 2000, 2001). Jährlich treten etwa 200.000 Neuerkrankungen auf, davon entfallen 125.000 auf die Alzheimer Demenz. Demenz ist der mit großem Abstand wichtigste Grund für die Heimaufnahme älterer Menschen in Deutschland (Weyerer, 2005). Bis zum Jahr 2050 wird die Zahl der Demenzpatienten in Deutschland auf über 2,2 Millionen ansteigen, was Vorausberechnungen unter Einbeziehung der Bevölkerungsentwicklung ergeben haben (Bickel, 2001; Pöttsch und Sommer, 2003). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) sagt bis zum Jahr 2020 29 Millionen Demenzpatienten voraus, davon etwa 2/3 Alzheimer-Patienten (Haan und Wallace, 2004; Dufouil und Alperovitch, 2005). Die „Delphi consensus study“ rechnet mit einer Verdoppelung der Demenz-Prävalenz alle 20 Jahre seit dem Jahr 2005 auf bis zu 81 Millionen Erkrankte weltweit im Jahr 2040 (Ferri et al., 2005). Dies ist vor allem durch die Tatsache bedingt, dass mit zunehmendem Alter die Häufigkeit von Demenz drastisch zunimmt, von knapp 2% bei den 65- bis 69-Jährigen auf über 30% unter der Bevölkerung der 90-Jährigen und Älteren.

Das Statistische Bundesamt bezifferte die direkten, durch Demenz verursachten Krankheitskosten im Jahr 2002 auf 5,6 Milliarden Euro (Böhm et al., 2004). Hauptanteil daran hat vor allem die stationäre Langzeitbetreuung in Pflegeheimen. Dabei sind die indirekten Kosten, die hauptsächlich aus unbezahltem Betreuungsaufwand der Angehörigen und dessen Folgen bestehen, noch gar nicht eingerechnet. Hallauer und Kollegen ermittelten im Jahr 2000 pro Patient und Jahr durchschnittliche Gesamtkosten von 43.767 Euro. Dabei entfielen über 67% auf die Familie, etwa 30% auf die Pflegeversicherung und lediglich 2,5% auf die Krankenversicherung für Medikamente, Arzt- und Krankenhauskosten (Hallauer et al., 2000).

Dies alles unterstreicht die enorme Bedeutung, die der Alzheimer-Krankheit und ihrer Folgen für unsere Gesellschaft zukommt und zeigt eindrucksvoll die Notwendigkeit der Erforschung und Entwicklung wirksamer medizinischer Behandlungskonzepte auf.

1.2 Klinik, Diagnostik, Therapie und Prognose

Das klinische Bild der Demenz vom Alzheimer-Typ, das sich zusammenfassend als langsamer, progressiver Ausfall aller kognitiver Fähigkeiten beschreiben lässt, ist in seiner Symptomatik multiform und in seiner individuellen Ausprägung äußerst variabel. Vorherrschend sind jedoch Gedächtnisstörungen, insbesondere die allgemeine Merkfähigkeit und das Kurzzeitgedächtnis sind dabei betroffen (Gleixner et al., 2006, 2007). Dabei bleiben Fragmente früheren Wissens und Verhaltens meist noch erkennbar, oft wird Vergangenes als gegenwärtig erlebt (Ekmnesie). Der Abbau intellektueller Fähigkeiten ist ein weiterer Symptomkomplex: Verlangsamtes Denken, Beeinträchtigung der Auffassungsgabe in Logik, Kombinationsfähigkeit, Begriffsbildung und -wahrnehmung, sowie Nachlassen der Konzentrationsfähigkeit, Antriebslosigkeit, Perseverationen, Echolalie, Neologismen und Konfabulationen sind zu beobachten. Neben Orientierungsstörungen zu Ort, Zeit und Personen, später auch zur eigenen Person, und fehlendem Krankheitsbewusstsein, also einem Nicht-Bemerken der Krankheit seitens des Patienten, sind als dritte große Gruppe an Symptomen die Verhaltensstörungen zu nennen: Persönlichkeitsveränderungen (z.B. Enthemmung, Witzeln, Fress-Sucht, Triebhaftigkeit), Misstrauen, depressive Stimmung, Affektlabilität, Emotionsverarmung bis zur Apathie und Verwirrheitszustände sind hierbei zu nennen. Auch von neurologischen Symptomen können die Patienten betroffen sein. Aphasie, Agnosie, Apraxie, Stereotypien wie Nesteln und Pendelbewegungen sowie Akathisie und andere motorische oder extrapyramidal-motorische, als auch vegetative Störungen sind zu beobachten (Gleixner et al., 2006, 2007).

Diagnostisch sollten in frühen Verläufen zunächst andere, oft reversible Ursachen der Demenz ausgeschlossen werden, wie z.B. Vitaminmangelzustände, endokrine- und andere Dysfunktionen, chronische ZNS-Infektionen, Traumata oder Neoplasien. Die neuroradiologische Bildgebung (CT, MRT) kann besonders in frühen Stadien unauffällig sein, später sind sowohl eine diffuse kortikale, als auch in gezielten Aufnahmen eine hippocampale Atrophie nachweisbar (Bird und Miller, 2005). Neben Anamnese, insbesondere auch Fremdanamnese, und klinischer Untersuchung mit kognitiven Tests (z.B. ‚Mini mental state test‘, HAWIE, Benton-Test) und speziellen Demenzskalen ist v.a. die Verhaltensbeobachtung und der Verlauf wichtig für die Diagnose der Demenz vom Alzheimer-Typ. Die Liquorpunktion kann erhöhte Spiegel an Tau-Protein bei normaler Zellzahl mit evtl. leichter Eiweißvermehrung aufweisen. Die endgültige Diagnose lässt sich letztendlich nach wie vor erst in der postmortalen Autopsie stellen (Thorsett und Latimer,

2000).

Zur medizinischen Behandlung der Demenz vom Alzheimer-Typ ist generell zu sagen, dass es keinerlei kurative Therapieansätze im klinischen Alltag gibt. Zur Verlangsamung des Fortschreitens oder Linderung der Symptomatik werden medikamentös vor allem Acetylcholinesteraseinhibitoren wie Donepezil, Rivastigmin oder Galantamin eingesetzt, die durch Inhibition des Enzyms Acetylcholinesterase den Blutspiegel des exzitatorischen Transmitterstoffes Acetylcholin anheben und auf diese Weise die Aktivierung zentraler synaptischer Acetylcholinrezeptoren verbessern sollen. Die Wirkungsweisen von NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Memantin), Ca^{2+} -Antagonisten (Nimodipin), des GABA-Derivats Piracetam oder auch von traditionellen Phytotherapeutika wie Gingko-biloba-Präparaten sind nicht genau verstanden. Diese Präparate werden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit kontrovers diskutiert (Areosa et al., 2005; Golde, 2006; McShane et al., 2006), jedoch in Ermangelung alternativer pharmakologischer Therapieansätze regelmäßig angewandt.

Im Vordergrund der ganzheitlichen Behandlung von Alzheimer-Patienten stehen jedoch therapeutische Maßnahmen, die dem Training kognitiver Fähigkeiten dienen, wie Gedächtnistraining, Beschäftigungs- und Physiotherapie, sowie soziotherapeutische Maßnahmen (Tagesbetreuung zu Hause, ambulante oder stationäre Pflege, später evtl. gerontopsychiatrische Betreuung) (Gleixner et al., 2006, 2007).

Die Prognose der Alzheimer-Krankheit ist ungünstig: Neueren Daten zu Folge beträgt ab dem Zeitpunkt der Diagnose „Demenz vom Alzheimer-Typ“ die mittlere Überlebenszeit durchschnittlich 3,3 Jahre, unter Ausschluss progressiver Verläufe 6,6 Jahre (Wolfson et al., 2001). Dies konnte durch ähnliche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden (Larson et al., 2004).

1.3 Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Krankheit

Bereits am 25. November 1901 hatte Alois Alzheimer als Assistenzarzt in der „Städtischen Anstalt für Irre und Epileptische“ in Frankfurt am Main die erst 51-jährige Patientin Auguste Deter stationär aufgenommen. Alzheimer protokollierte in seinem Befund totale Orientierungslosigkeit zu Person, Zeit, Ort und Situation, Verwirrung, extreme Affektlabilität sowie Wahnvorstellung und Halluzinationen. Nach dem Tod der Patientin im April 1906 führte

Alzheimer die pathologische Untersuchung des Gehirns selbst durch. Am 3. November 1906 stellte er auf einem psychiatrischen Kongress in Tübingen seine später auch veröffentlichten Ergebnisse (Alzheimer, 1907, 1911) erstmals vor: Es handelte sich um die klinischen und neuropathologischen Charakteristiken der Krankheit, die Kraepelin später nach ihm benennen sollte (Kraepelin, 1910).



Abbildung 1: Auguste Deter und Alois Alzheimer

Fotografien der ersten medizinisch dokumentierten, an der Alzheimer-Krankheit leidenden Patientin Auguste Deter und ihres behandelnden und später die Pathologie dieser Krankheit erstbeschreibenden Arztes Alois Alzheimer

Grundsätzlich zeichnet sich die Demenz vom Alzheimer-Typ durch zwei histopathologisch verschiedene Ablagerungen krankhaften Materials aus (s. Abbildung 2): Sowohl „Plaques“ als auch „Tangles“ bestehen aus abnormen Filamenten (Kidd, 1963; Terry et al., 1964), die jedoch unterschiedlich zusammengesetzt sind. Beide kommen vorwiegend in den Hirnregionen des Entorhinalen Cortex, des Hippocampus, des Neocortex, sowie des limbischen Systems vor und folgen diesem örtlichen und zeitlichen Befallsmuster im Sinne einer gewissen voraussagbaren Sequenz, die natürlich immer individuell ein wenig alterniert (Hyman et al., 1984; 1986; 1990; Braak et al., 1996a). Dabei ist interessant zu bemerken, dass diese Reihenfolge sehr stark an das inverse Muster der kortikalen Entwicklung während der Phylo- und Ontogenese erinnert (Rapoport, 1988, 1990; Braak und Braak, 1996).

Plaques, die bereits vor Alzheimer beschrieben wurden (Blocq und Marinesco, 1892), sind extrazelluläre und im zerebralen Gefäßsystem nachweisbare Ablagerungen von Protein, deren Hauptbestandteil das äußerst hydrophobe Amyloid- β -Peptid (A β) darstellt (Glenner

und Wong, 1984; Kang et al., 1987; Beyreuther und Masters, 1991; Selkoe, 1994a). A β ist ein 37 bis 43 Aminosäuren langes Peptid, das zur Akkumulation neigt (Selkoe, 2004a). So entstehen Proteinfilamente mit einem Durchmesser von ungefähr 10 nm, mit β -Faltblattstruktur und charakteristischem Färbemuster in der Silberimprägnierung nach Bielschowsky (Bielschowsky, 1902; Selkoe, 2004a, b). Unter neuritischen Plaques versteht man einen von dystrophen Neuriten, degenerierten Axonen, aktivierter Mikroglia und reaktiven Astrozyten umgebenen, dichten Amyloidkern (Pike et al., 1994; Braak et al., 1996b; Selkoe, 2004a). Man nimmt an, dass sie eine Art Endstadium der Plaquebildung darstellen. Wenngleich der Übergang fließend ist, ist doch eine andere Form extrazellulärer Proteinablagerung, nämlich die diffusen Plaques, von den neuritischen Plaques abzugrenzen: Bezeichnet als „prä-amyloid“ stellen sie eine Art früher Plaquebildung dar (Selkoe, 2004b). Sie bilden noch keine dichten fibrillären Strukturen aus, ihr Umfeld weist darüber hinaus geringere oder neuronale Zellveränderungen auf, und sie lassen sich schließlich auch in Hirnen gesunder, nicht an Demenz erkrankter Individuen nachweisen (Selkoe, 1999, 2004a, b).

Das Tau-Protein bildet den Hauptbestandteil der zweiten großen Komponente der für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen Histopathologie: Die von Alois Alzheimer erstmals beschriebenen neurofibrillären Bündel (engl. „Neurofibrillary Tangles“, NFT). Sie bestehen vorwiegend aus dem hyperphosphorylierten Protein Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986), einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, das in gesundem neuronalem Gewebe vor allem der Axonstabilisierung dient. Die Hyperphosphorylierung, der als Ursache ein Ungleichgewicht verschiedener Kinasen und Phosphatasen zu Grunde liegt (Mandelkow und Mandelkow, 1998), wandelt lösliches Tau in vermehrt unlösliches, was die Bildung von gepaarten, helikal gewundenen Filamenten ermöglicht (Goedert und Spillantini, 2000). Solche „Paired helical Filaments“ lassen sich nicht nur in den vielen dystrophen Neuriten, also durch die filamentöse Degeneration angegriffenen Axonen und Dendriten, die die Amyloid-Plaques umgeben, nachweisen, sondern auch in den neuronalen Zellkörpern. NFT sind im Gegensatz zu neuritischen Plaques nicht Alzheimer-spezifisch. Sie können auch im Kontext anderer neurodegenerativer Krankheiten wie Morbus Parkinson und Fronto-temporaler Demenz nachgewiesen werden (Koo et al., 1999; Morris et al., 2001).

In welchem kausalen und zeitlichen Zusammenhang stehen Plaques und Tangles als histopathologische Korrelate der Alzheimer-Krankheit, auch vor dem Hintergrund der klinischen Symptomatik der Demenz vom Alzheimer-Typ? Der Beantwortung dieser Frage widmen sich diverse Hypothesen, die viele mögliche Theorien verfolgen. Am meisten

diskutiert ist dabei die sogenannte „Amyloid-Kaskade-Hypothese“, die auf das chronologische Auftreten der beiden histopathologischen Phänomene Bezug nimmt und die Bildung von NFT als eine Art zellulärer Antwort der Neuronen auf sich schrittweise bildendes und anhäufendes Amyloid aus A β -Peptiden interpretiert (Hardy und Selkoe, 2002; Selkoe, 2004a).

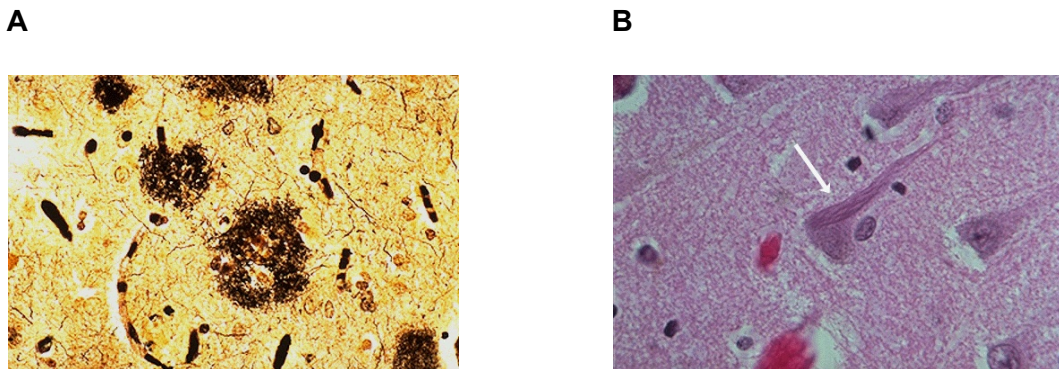


Abbildung 2: Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Krankheit

(A) Mikroskopische Aufnahme eines Präparates aus dem zerebralen Cortex eines Alzheimer-Patienten. Zu sehen sind große Amyloid-Plaques, die aus einem dicht gepackten Amyloid-Kern, umliegenden dystrophen Neuriten, Astrozyten und Mikroglia bestehen. Silberfärbung nach Bielschowsky. (B) Intrazelluläres Neurofibrilläres Bündel (NFT, *Pfeil*) in der hochauflösenden mikroskopischen Aufnahme eines Hirnpräparates. „Tangles“ bestehen aus gepaarten, helikal gewundenen Intermediärfilamenten hyperphosphorylierten Tau-Proteins. Färbung: Hämatoxylin-Eosin (HE).

[Quelle: Histopathologischer Atlas der University of Utah, <http://library.med.utah.edu/WebPath>]

1.4 Molekulare und genetische Grundlagen der Demenz vom Alzheimer-Typ

1.4.1 Genetischer Hintergrund und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit

Generell werden zwei verschiedene Arten der Alzheimer-Krankheit unterschieden: Die familiäre, also genetisch bedingte Form (ca. 5-10% der Alzheimer-Fälle), auch als „Familial

Alzheimer's Disease“ (FAD) bezeichnet (Selkoe, 2001), und die weitaus häufiger vorkommenden sporadisch auftretenden Fälle, die nicht mit einer konkreten Ursache in Verbindung gebracht werden können. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit, an der sporadischen Form zu erkranken, mit höherem Lebensalter ständig zu (Ott et al., 1995). Ganz anders bei der autosomal-dominant vererbten, familiären („early-onset“) Form: Hier liegt der Erkrankungsgipfel eher im mittleren bis späten (40.-60. Lebensjahr) oder im frühen (20.-30.) Erwachsenenalter. Ursache für die FAD sind Mutationen in verschiedenen Genen, die in der Generierung des A β -Peptids, also des Hauptbestandteils der Amyloid-Plaques, eine Rolle spielen. Von zentraler Bedeutung ist dabei das „ β -amyloid precursor protein“ (β APP, APP), das Vorläuferprotein, aus dem das A β -Peptid durch enzymatische Prozessierung hervorgeht (vgl. 1.4.3 und Abbildung 3). Es ist auf Chromosom 21 kodiert. Desweiteren sind die Gene für Presenilin-1 und -2 (Chromosom 14 bzw. 1) betroffen. Mutationen auf diesen Genen führen entweder zu einer Steigerung der A β -Generierung insgesamt oder aber zu einer Erhöhung des Anteils der längeren Form des A β (A β_{42}) (Scheuner et al., 1996). A β_{42} ist deutlich hydrophober und neigt stärker zur Aggregation als sein kürzeres Pendant A β_{40} (Selkoe, 1999). An Trisomie 21 leidende Patienten (Down-Syndrom) weisen höhere Expressionslevel an APP auf, bilden mehr A β und erkranken nahezu ohne Ausnahme an der Alzheimer-Krankheit ab Erreichen eines Alters von etwa 40 Jahren, was wesentlich früher ist als das durchschnittliche Inzidenzalter (Lemere et al., 1996). Bekanntester und wohl am besten erforschter genetischer Risikofaktor für eine Alzheimer-Erkrankung ist jedoch der Nachweis von einem oder zwei Epsilon 4 ($\epsilon 4$)-Allelen für das Apolipoprotein E (ApoE) (Poirier et al., 1993; Saunders et al., 1993; Selkoe, 1999). Natürlich existieren neben genetischen auch andere Faktoren, die ein erhöhtes Risiko, an Alzheimer-Demenz zu erkranken, nach sich ziehen. Zu dem bereits oben erwähnten Faktor „Alter“ kommen weitere Risikofaktoren hinzu, wie z.B. ein erhöhter Cholesterin- und Homocysteinspiegel, Diabetes oder Bluthochdruck (Kivipelto et al., 2002). Mäßiger Rotweinkonsum scheint das Erkrankungsrisiko im Gegenteil eher positiv zu beeinflussen (Wang et al., 2006). Der individuelle Lebensstil spielt also auch eine Rolle in der Ätiologie der Alzheimer-Krankheit.

1.4.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und β -Amyloid-Peptid ($A\beta$)

Das $A\beta$ -Peptid mit 37 bis 43 Aminosäuren Länge ist proteolytisches Endprodukt des Vorläuferproteins APP. 1987 konnte von Kang und Kollegen dieses 695 Aminosäuren lange, etwa 110 kDa schwere Protein nachgewiesen werden (Kang et al., 1987), ein Typ-I-Transmembranprotein. Es besteht aus einer langen N-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Domäne. Somit ähnelt es in seinem Aufbau einem Zelloberflächenrezeptor und wird auch ubiquitär exprimiert (Selkoe et al., 1988). Bedingt durch alternatives Spleißen liegt es hauptsächlich in drei verschiedenen langen Isoformen vor: Während APP_{695} (695 Aminosäuren Länge) fast ausschließlich in neuronalem Gewebe vorkommt, sind APP_{751} und APP_{770} die vorherrschenden Isoformen in nicht-neuronalen Zelltypen (Selkoe, 1994b). Auch APP-homologe Proteine, APLP-1 und -2, konnten identifiziert werden (Wasco et al., 1992). Die physiologische Rolle des APP ist nach wie vor nicht geklärt, *in vitro* Experimente lassen aber auf Funktionen in Blutgerinnung, Zell-Substrat-Adhäsion, Neuritenwachstum und Signaltransduktion schließen (Selkoe, 1994b).

Das $A\beta$ -Peptid entsteht aus dem APP durch proteolytische Prozessierung. Sogenannte Sekretasen, die zwischen bestimmten Aminosäuren das APP spalten, sorgen für das Entstehen von $A\beta$. Drei solche Sekretasen sind bekannt und werden α -, β - und γ -Sekretasen genannt (Selkoe, 2001).

1.4.3 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins

Der überwiegende Teil des APP wird physiologisch auf dem nicht-amyloidogenen Weg, der nicht zur Entstehung von $A\beta$ führt, prozessiert (vgl. Abbildung 3). Dabei wird APP zunächst innerhalb seiner $A\beta$ -Domäne von der α -Sekretase gespalten (Haass et al., 1993; Selkoe, 1996). Es resultieren zwei Spaltprodukte: Erstens das lösliche $sAPP\alpha$, die N-terminale Ektodomäne des APP, dem neuroprotektive und neurotrophe Wirkung attestiert wird und das im Tiermodell die Gedächtnisleistung verbessert (Mattson et al., 1993; Mucke et al., 1996; Meziane et al., 1998). Und zweitens der in der Membran verankerte, intrazelluläre, C-terminale Rest ($\beta APP\ CTF\alpha$, „C-terminales Fragment“, C83) mit 83 Aminosäuren. Dieses Fragment wird von der γ -Sekretase weiter gespalten, was zu einem zytosolischen Fragment (AICD, „APP intracellulär domain“) und dem kurzen löslichen Rest p3 führt (Haass et al.,

1993; Wolfe et al., 1999b; Sastre et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an sAPP α im Blutplasma und im Liquor von Alzheimer-Patienten erniedrigt ist (Lannfelt et al., 1995; Sennvik et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, dass der normale, konstitutive Prozessierungsweg von APP via α -Sekretase in diesem Fall weniger durchlaufen wird. So muss es zu einer vermehrten Verarbeitung von APP über einen anderen, alternativen Weg kommen, der zur Entstehung von A β führt. Hierzu ist die enzymatische Aktivität der β -Sekretase und anschließend der γ -Sekretase erforderlich. Aus dem durch die β -Sekretase zunächst generierten, membranverankerten, C-terminalen Fragment β APP CTF β , bestehend aus 99 Aminosäuren (C99), resultiert über die Spaltung durch die γ -Sekretase das A β -Peptid, sowie analog zu dem nicht-amyloidogenen Weg ein intrazelluläres Fragment (AICD) (Haass und Steiner, 2002). Abbildung 3 veranschaulicht die verschiedenen Prozessierungswege. A β wird auch im gesunden Körper generiert, seine Entstehung ist noch kein pathologischer Prozess. Es ist nicht nur im peripheren Blut, sondern auch direkt im Liquor gesunder Individuen nachweisbar. Daher muss seine konstitutive Sekretion als Teil des normalen APP-Metabolismus gelten (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992).

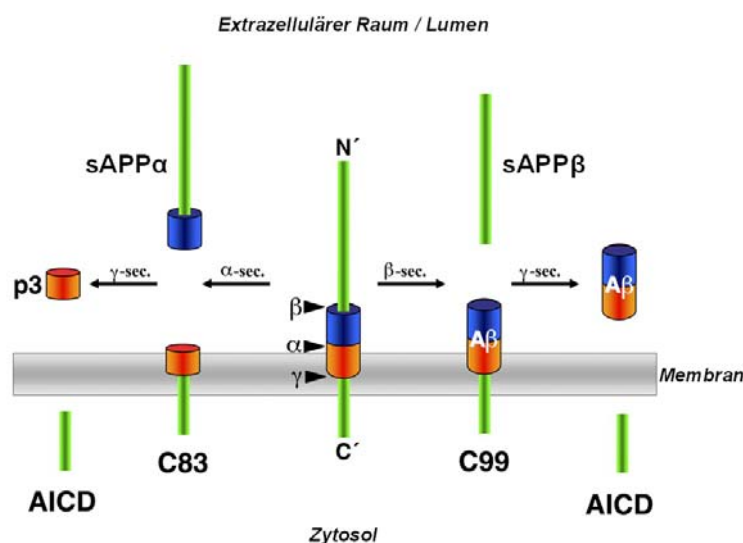


Abbildung 3: Die proteolytische Prozessierung von APP

Das Typ-I-Transmembranprotein APP wird zum überwiegenden Teil von der α -Sekretase innerhalb seiner A β -Domäne (blau-orange) und anschließend von der γ -Sekretase geschnitten. Es resultiert lösliches sAPP α , welchem neuroprotektive und neurotrophische Eigenschaften zugesprochen werden. Ein anderer, alternativer Prozessierungsweg führt über den β -Sekretase- und anschließenden γ -Sekretaseschnitt zum A β -Peptid, welches im Gehirn zu Plaques aggregiert und neuropathologische Veränderungen hervorruft, die für die Alzheimer-Krankheit charakteristisch sind. Auch die übrigen anfallenden Prozessierungsprodukte sind dargestellt. [modifiziert nach: (Kaether und Haass, 2004)]

1.4.4 Die β -Sekretase

Die Proteolyse von APP durch die β -Sekretase stellt den ersten Schritt zur Generierung des A β -Peptids dar. Als β -Sekretase konnte die Aspartylprotease BACE-1 („ β -site APP cleaving enzyme“) identifiziert werden (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Lin et al., 2000). Es handelt sich um ein N-glykosiliertes Typ-I-Transmembranprotein. Homozygote BACE-1 „knock-out“ Mäuse, die keinerlei A β -Produktion in Neuronen aufweisen, zeigten deutlich, dass keine andere Protease β -Sekretase-Aktivität besitzt (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001). Es konnte jedoch eine in ihrer Aminosäuresequenz zu 64% homologe, ebenfalls membrangebundene Aspartylprotease, BACE-2, gefunden werden (Bennett et al., 2000; Hussain et al., 2000; Yan et al., 2001), die jedoch APP anti-amyloidogen innerhalb seiner A β -Domäne spaltet (zwischen Position 19 und 20) und damit im Gegensatz zu BACE-1 α -Sekretase-Aktivität besitzt (Farzan et al., 2000; Fluhrer et al., 2002). BACE-2 wird außerdem mehr im peripheren als im neuronalen Gewebe exprimiert (Bennett et al., 2000). Es ist andererseits unmöglich, eine β -Sekretase-Aktivität von BACE-2 gänzlich auszuschließen: BACE-2 ist wie APP auf Chromosom 21 kodiert. Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) leiden wesentlich früher an Symptomen der Alzheimer-Demenz. Dies könnte durch höhere Expression von APP und vielleicht auch BACE-2 begründet sein (Odetti et al., 1998; Acquati et al., 2000).

Neben APP ist Neuregulin-1 (NRG1) physiologisches Substrat von BACE-1. NRG1 bindet an den ErbB4-Rezeptor, einer Typ-1-Transmembranrezeptor Tyrosinkinase innerhalb des NRG-ErbB-Signalwegs mit Bedeutung für die Myelinisierung im peripheren Nervensystem (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006) und Assoziation mit der Pathogenese der Schizophrenie (Williams et al., 2003; Harrison und Weinberger, 2005). BACE-1 defiziente Mäuse zeigen alle Zeichen peripherer Hypomyelinisierung, die auch NRG1-heterozygote Mäuse aufweisen (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). Es wird postuliert, dass die Anreicherung von ungeschnittenem NRG1 in diesen Mäusen auf die ausbleibende Prozessierung durch BACE-1 zurückzuführen ist. Die Folge könnte die mangelnde Myelinisierung peripherer Nerven durch Schwann-Zellen sein. Strittig ist, ob die BACE-1 vermittelte NRG1 Prozessierung auch für die Myelinisierung durch Oligodendrozyten im ZNS eine Rolle spielt. Mehrere Studien konnten außerdem zeigen, dass die BACE-1 Proteinlevel in einigen Hirnproben von Patienten mit sporadischer Alzheimer-Demenz im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erhöht waren (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Preece et al., 2003; Yang et al., 2003; Li et al., 2004). Gleichzeitig waren die Transkriptlevel jedoch

unverändert. Dies lässt auf hauptsächlich post-transkriptionale bzw. translationale Regulationsmechanismen der Expression von BACE-1 schließen, Mechanismen, die weiter unten in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind.

1.4.5 Die γ -Sekretase

Nach der β -Sekretase (bzw. der α -Sekretase) ist es Aufgabe der γ -Sekretase, die jeweilig resultierenden C-terminalen Fragmente (APP CTF β bzw. - α) weiter zu prozessieren. Wie die β -Sekretase ist auch die γ -Sekretase eine Aspartylprotease (Wolfe et al., 1999a). Um A β (bzw. p3 auf dem nicht-amyloiden Prozessierungsweg) zu generieren ist es nun erforderlich, dass die γ -Sekretase das APP innerhalb seiner Transmembrandomäne schneidet, ein Vorgang, von dem angenommen wurde, er sei biochemisch gar nicht möglich. Jedoch konnte, neben der γ -Sekretase selbst, auch für andere Proteasen die Fähigkeit zur intramembranären Proteolyse nachgewiesen werden. Zu nennen sind hier die Signalpeptid-Peptidasen (SPP) und ihre homologen Enzyme (SPPL2, -3) sowie Rhomboid oder der Membran-gebundene Transkriptionsfaktor Peptidase-2 (S2P) (Haass und Steiner, 2002; Weihofen und Martoglio, 2003). Im Gegensatz zu diesen Proteasen ist die γ -Sekretase jedoch als ein Komplex vier verschiedener Proteine aktiv: Presenilin (PS), Nicastrin (Nct), „Presenilin-enhancer protein 2“ (PEN-2) und „Anterior pharynx defective 1“ (APH-1) (De Strooper und Woodgett, 2003). Presenilin-1 (PS1) und sein Homolog PS2 sind polytope Transmembranproteine (Levy-Lahad et al., 1995) mit neun Transmembrandomänen (TMD). Presenilin stellt das katalytische Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes dar: Über 100 verschiedene autosomal-dominante Punktmutationen des PS sind bisher bekannt, die mit FAD assoziiert sind und durch Verschiebung der Schnittstelle am APP um zwei Positionen das längere (und vermehrt zur Aggregation neigende) A β_{42} entstehen lassen (Hardy und Selkoe, 2002). In PS1-„knock-out“-Mäusen ist die A β -Produktion stark vermindert. In PS1-PS2-„knout-out“-Mäusen wird sie komplett verhindert (De Strooper et al., 1998; Herreman et al., 2000).

Posttranslational wird PS innerhalb der langen zytoplasmatischen Domäne zwischen TMD 6 und 7 endoproteolytisch gespalten (Haass und Steiner, 2002), die resultierenden NTF und CTF stellen die aktivierte Form des PS in Form eines Heterodimers dar (Ratovitski et al., 1997; Thinakaran et al., 1997; Capell et al., 1998). Mutiert man jedoch die hoch konservierten und für die Aspartylprotease entscheidenden Aspartatreste in TMD 6 oder 7, so führt dies nicht nur dazu, dass die A β -Generierung stark eingeschränkt ist und sich die C-

terminalen APP-Fragmente anhäufen, sondern auch dazu, dass die beschriebene Endoproteolyse des PS verhindert wird (Wolfe et al., 1999b). PS1 sowie den bereits oben erwähnten polytopen Aspartylproteasen (SPPs) ist ein GxGD-Motiv gemein, das sie von den klassischen Aspartylproteasen unterscheidet, jedoch innerhalb ihrer Gruppe hoch konserviert vorliegt (Steiner et al., 2000; Haass und Steiner, 2002; Weihofen und Martoglio, 2003). Das Aspartat innerhalb der TMD 7 des PS ist in genau einem solchen GxGD-Motiv lokalisiert.

Die Preseniline als katalytisches Zentrum benötigen jedoch die anderen drei erwähnten Komponenten für die Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes: Erst alle vier Komponenten zusammen konnten in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), ein eukaryoter, γ -Sekretase-freier Organismus, γ -Sekretase-Aktivität hervorrufen (Edbauer et al., 2003). Gleichzeitig scheinen sie aber auch ausreichend für die volle Aktivität zu sein. Nicastrin ist als einziger der drei anderen Komponenten ein glykosiliertes Typ-I Transmembranprotein, PEN-2 und APH-1 weisen mehrere Transmembrandomänen auf. (Edbauer et al., 2002; Leem et al., 2002; Steiner et al., 2002).

Wahrscheinlich ist die Entstehung von A β nur unerwünschtes Nebenprodukt der PS-Aktivität. Viel wichtiger ist seine Rolle in der Prozessierung von Notch, das neben vielen anderen Kandidaten (APLP-1, -2, ErbB4, Cadherine, CD44) als Substrat des PS identifiziert wurde: Die Phänotypen der PS1-„knock-out“- und der Notch-„knock-out“-Maus sind sich sehr ähnlich (Selkoe und Kopan, 2003).

1.4.6 Die α -Sekretase

Die α -Sekretase ist das entscheidende Enzym zur konstitutiven proteolytischen Sekretion von APP auf dem nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg. APP wird innerhalb der A β -Domäne an der Zelloberfläche (Haass et al., 1992; Sisodia, 1992) oder im trans-Golgi-Netzwerk (Kuentzel et al., 1993) geschnitten. Die Spaltung von APP erfolgt dabei hauptsächlich in 12-13 Aminosäuren Abstand von der Membran zwischen den Aminosäuren Lysin an Position 16 und Leucin an Position 17 der A β -Domäne von APP (Esch et al., 1990; Sisodia, 1992; Zhong et al., 1994). Dies verhindert die A β -Bildung und lässt das N-terminale, lösliche sAPP α -Protein entstehen, welches in den extrazellulären Raum freigegeben wird und neurotrophe sowie neuroprotektive Wirkung hat (Mattson et al., 1993; Mucke et al., 1996; Meziane et al., 1998). Die α -Sekretase wirkt also der Bildung von A β und so der

Entstehung von Plaques entgegen. Darüberhinaus wird aber auch durch sAPP α -Bildung die Integrität der Neuronen und die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten im Mausmodell gefördert (Mattson et al., 1993; Meziane et al., 1998). Interessanterweise sind die sAPP α -Spiegel an Alzheimer Erkrankter sowohl im Plasma als auch im Liquor signifikant erniedrigt (Lannfelt et al., 1995; Sennvik et al., 2000). Auch in Homogenaten von Hirnpräparaten von Patienten konnte eine α -Sekretase-Aktivität von im Schnitt nur mehr 81% im Vergleich zu Kontrollindividuen festgestellt werden (Tyler et al., 2002). Und periphere Blutzellen (aktivierte Thrombozyten) wiesen zudem niedrigere Level an sezerniertem, intravesikulärem sAPP α auf (Colciaghi et al., 2002).

Mehrere Studien ergaben, dass bei der Prozessierung von APP durch die α -Sekretase die α -helikale Konformation des Substrates (APP) und die spezielle Distanz zur Membran viel entscheidender ist als eine bestimmte Aminosäure-Sequenz, welche keine Rolle zu spielen scheint (Sisodia, 1992). Die α -Sekretase ist konstitutiv aktiv, kann jedoch durch verschiedene chemische Substanzen stimuliert oder inhibiert werden. Eine Steigerung der α -Sekretase-Aktivität scheint über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuropeptide mit der Aktivierung des Phospholipase-C- (PLC) und Proteinkinase-C-Systems (PKC) vermittelt zu werden. Phorbol ester, die die PKC über ihren Rezeptor direkt aktivieren, führen beispielsweise zu einer Steigerung des α -Sekretaseumsatzes (Buxbaum et al., 1998; Nitsch et al., 1998; Lammich et al., 1999). Auch über beispielsweise muskarinische Acetylcholinrezeptoren (M1 und M3, stimuliert z.B. durch Carbachol), Serotoninrezeptoren (5-HT_{2a,c} und 5-HT₄), Cholinesteraseinhibitoren oder Steroidhormone (17 β -Östradiol, Testosteron) ist, teils über andere, PKC-unabhängige Signalkaskaden, eine α -Sekretase-Aktivierung möglich (Nitsch et al., 1992; Nitsch et al., 1996; Pakaski et al., 2001).

Mittels Proteinase-Inhibitorstudien ließ sich die α -Sekretase als Metalloprotease klassifizieren: Ein Zink-Chelatkomplex bildendes Agens, 1,10-Phenanthrolin, konnte die Menge an sezerniertem sAPP α signifikant reduzieren (Roberts et al., 1994). Andere Stoffe, die auf der Hydroxamsäure beruhen, einem Stoff, der Komplexe mit zweiwertigen Metallionen bilden kann, konnten ebenfalls die Freisetzung von löslichem sAPP α in der Zellkultur inhibieren, darunter TAPI (TNF- α Protease Inhibitor), Batimastat oder Marimastat (Arribas et al., 1996; Parvathy et al., 1998; Racchi et al., 1999). Bisher konnte für drei Vertreter der ADAM-Familie der Metalloproteasen gezeigt werden, dass sie α -Sekretase-Aktivität besitzen: ADAM9 (Koike et al., 1999), ADAM10 (Lammich et al., 1999) und ADAM17 (Buxbaum et al., 1998).

1.5 ADAM9, 10 und 17 – Einteilung, Struktur und Eigenschaften

ADAM steht für „**a** disintegrin and metalloproteinase“. ADAMs gehören der Gruppe der „Metzincine“ an, einer Untergruppe der Zink-Metalloproteinasen. Innerhalb der Metzincine wiederum gehören die ADAM-Proteinasen zur Gruppe der Reprolysin/Adamalysin. Schließlich sind neben den Disintegrin-Metalloproteinasen auch die SVMPs („**s**nake **v**enom **m**etalloproteinase“) Mitglieder dieser Subgruppe. ADAMs sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer charakteristischen Domänenstruktur (vgl. Abbildung 4): Sie besitzen ein N-terminales Signalpeptid, eine Prodomäne mit der potentiellen Schnittstelle für Pro-Protein-Konvertasen, eine katalytische Domäne mit dem für die Metzincine typischen Zinkbindungsmotiv HExxHxxGxxH (x steht für jede mögliche Aminosäure), eine Disintegrin-ähnliche Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, einen EGF-ähnlichen („**e**pidermal **g**rowth **f**actor“) Bereich, eine hydrophobe Transmembrandomäne sowie eine zytoplasmatische Domäne (Wolfsberg et al., 1995; Black und White, 1998). Derzeit sind etwa 40 Mitglieder der ADAM-Familie bekannt. Bisher konnten nicht für alle Mitglieder physiologische Substrate identifiziert werden. Einige ADAMs sind in Ermangelung einer Metalloprotease-Domäne nicht proteolytisch aktiv. Auch sind nicht alle Vertreter der ADAMs in humanen Zellen exprimiert.

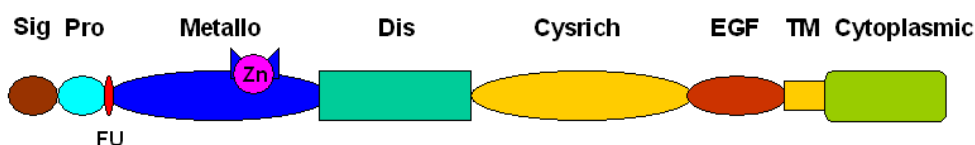


Abbildung 4: Charakteristische Domänenstruktur eines ADAM-Proteins.

ADAMs sind Typ-I-Transmembranproteine. Auf die N-terminale Signalsequenz (Sig) folgt eine Prodomäne (Pro), die einerseits als intramolekulares Chaperon am Beispiel ADAM17 für die korrekte Faltung des katalytisch aktiven Proteins wichtig ist. Zum anderen enthält sie einen konservierten Cysteinrest (Cys an Position 173 am Beispiel ADAM10, nicht abgebildet), der wahrscheinlich durch Wechselwirkung mit dem Zinkion des aktiven Zentrums die katalytische Aktivierung des Proenzym verhindert. Pro-Protein-Konvertasen wie PC7 oder Furin spalten an einem typischen tetrabasischen Erkennungsmotiv als Spaltstelle (FU) die Prodomäne ab. Es resultiert die aktivierte ADAM-Protease mit ihrer Metalloprotease-Domäne (Metallo), welche das Zinkbindungsmotiv als katalytisches Zentrum enthält, und einer Disintegrin-ähnlichen (Dis), einer Cystein-reichen (Cysrich) und einer EGF-ähnlichen (EGF) Domäne. Am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne (TM) schließt die zytoplasmatische Domäne (Cytoplasmic) das ADAM-Protein ab.

ADAM9 (auch MDC9 oder „meltrin- γ “ genannt) spielt bei der Prozessierung des „heparin-binding EGF-like growth factor“ (HB-EGF) sowie bei der Regulation der Zellmotilität eine wichtige Rolle (Izumi et al., 1998; Nath et al., 2000). Bei gleichzeitiger Überexprimierung mit APP in COS-Zellen kommt es zu einer Erhöhung der sAPP α -Sekretion (Koike et al., 1999). *In vitro* spaltet ADAM9 APP jedoch nicht an der α -Sekretase-Stelle, und auch *in vivo* konnte in „knock-out“-Mäusen keine Veränderung hinsichtlich embryonaler und adulter Entwicklung, Sekretionslevel von sAPP α , p3 und A β festgestellt werden. Dies weist auf keine wesentliche Bedeutung von ADAM9 für die α -Sekretaseaktivität *in vivo* hin (Weskamp et al., 2002).

ADAM17, auch TACE („TNF- α cleaving enzyme“) genannt, ist die entscheidende Protease für die Prozessierung des membrangebundenen Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Die katalytischen Domänen von TACE und ADAM10 sind zu 91% homolog (Maskos et al., 1998). TACE-defiziente Mäuse weisen zahlreiche Entwicklungsdefekte auf und sind nicht oder nur kurz lebensfähig. Dabei konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Prozessierung von APP im Gegensatz zur stimulierten durch Phorbolester in neuronalen Zellen nicht beeinträchtigt wird (Buxbaum et al., 1998). Während die TACE mRNA in *In situ*-Hybridisierungsstudien nur teilweise mit APP co-exprimiert vorlag, konnte TACE immunhistochemisch in Neuronen und mit A β -Plaques in Alzheimer-Hirnen colokalisiert nachgewiesen werden (Marcinkiewicz und Seidah, 2000; Skovronsky et al., 2001). Dies lässt eine Rolle für ADAM17 in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung vermuten. Als Substrate von TACE konnten neben APP und TNF- α auch TGF- α , L-Selectin, p75 TNF-Rezeptor, Notch und HER4/erbB4, einem Vertreter der EGF-Rezeptor-Familie, identifiziert werden (Peschon et al., 1998; Brou et al., 2000; Rio et al., 2000).

ADAM10, auch „mammalian disintegrin metalloproteinase“ (MADM) genannt, konnte erstmals 1989 aus bovinem Hirn gereinigt und seine cDNA wenige Jahre später kloniert werden (Chantry et al., 1989; Howard et al., 1996). Identifiziert wurde ADAM10 auf Grund seiner Fähigkeit, das „myelin basic protein“ (MBP) zu schneiden (Chantry et al., 1989). Humanes ADAM10 besteht aus 748 Aminosäuren und hat ein molekulares Gewicht von ca. 90 bzw. 62 kDa in immatorem bzw. maturem Zustand (Lammich et al., 1999). Es ist das humane Homolog zu Kuzbanian (Kuz) aus *Drosophila melanogaster* und ist auf dem langen Arm von Chromosom 15 in der Region q21.3-q23 kodiert (Yamazaki et al., 1997). Kuz ist wesentlich an der Neurogenese und der Myeloblastendifferenzierung beteiligt (Fambrough et al., 1996). ADAM10 ist vor allem im Hirngewebe (Astrozyten, Mikroglia und Neuronen), in (Herz-) Muskulatur und Lunge exprimiert, seine mRNA kann auch in Niere, Knochen und

Knorpel nachgewiesen werden (Chantry und Glynn, 1990; Howard et al., 1996; Dallas et al., 1999; Karkkainen et al., 2000; Kieseier et al., 2003). Seine physiologischen Substrate sind vielfältig: Das Vorläuferprotein von TNF- α (Rosendahl et al., 1997), der Notch-Rezeptor und sein Ligand Delta (Pan und Rubin, 1997; Six et al., 2003), Kollagen Typ IV (Millichip et al., 1998), Ephrin-A2 (Hattori et al., 2000), Chemokin Fraktalkine CX3CL1 (Hundhausen et al., 2003), EGF (Sahin et al., 2004) und natürlich APP (Lammich et al., 1999) seien hier genannt. ADAM10 spaltet ein 18 Aminosäuren umfassendes A β -Fragment (A β_{11-28}) *in vitro* an der postulierten α -Sekretase Spaltstelle und führt *in vivo* zur Sekretion von sAPP α . Sowohl eine gesteigerte basale Sekretion von sAPP α durch Überexpression von ADAM10 in HEK-Zellen, als auch die stimulierte Prozessierung von APP durch Phorbol ester konnten für ADAM10 nachgewiesen werden (Lammich et al., 1999). Durch Punktmutation am Zink-Bindungsmotiv konnten sowohl die basale, als auch die induzierte α -Sekretase-Aktivität inhibiert werden (Lammich et al., 1999). Wie BACE-1 wird auch ADAM10 zunächst als inaktives Proenzym synthetisiert und anschließend durch Abspaltung der Prodomäne durch Pro-Protein-Konvertasen wie PC7 oder Furin zu seiner maturen Form prozessiert (Anders et al., 2001). Während der größte Anteil inaktiven Proenzym im *trans*-Golgi-Netzwerk zu finden ist, ist ADAM10 in seiner aktiven Form vor allem an der Zelloberfläche lokalisiert (Lammich et al., 1999). ADAM10, BACE-1 und APP liegen in humanem und murinem Hirngewebe in Neuronen des Cortex co-lokalisiert vor, was ihre Bedeutung als α -Sekretase (bzw. für BACE-1 als β -Sekretase) für die Prozessierung von APP unterstreicht (Marcinkiewicz und Seidah, 2000).

ADAM10-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig, sie sterben 9,5 Tage nach Beginn ihrer embryonalen Entwicklung und weisen zahlreiche Entwicklungsdefekte im ZNS und im kardiovaskulären System auf. Vor allem das Notch-Signalsystem scheint erheblich gestört zu sein. Fibroblasten, die diesen Mausembryonen entnommen wurden, wiesen jedoch teils erhaltene, teils sogar gesteigerte α -Sekretase-Aktivität auf, was auf die Existenz mehrerer Kandidaten für die α -Sekretase hinweist (Hartmann et al., 2002). Der Beweis, dass ADAM10 den entscheidenden Kandidaten für die α -Sekretase *in vivo* darstellt, konnte im Mausmodell erbracht werden: Durch die Überexpression von ADAM10 in transgenen APP_{V717I}-Mäusen konnte die Sezernierung von sAPP α signifikant gesteigert werden. Gleichzeitig war die Entstehung von A β -Peptiden und Ablagerung in A β -Plaques deutlich reduziert. In Verhaltensexperimenten konnten diese transgenen Tiere die kognitiven Defizite im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich verbessern. Im Gegensatz hierzu führte die Expression von katalytisch inaktivem ADAM10 in diesen Mäusen zur Steigerung der A β -Produktion und

Plaquebildung (Postina et al., 2004). ADAM10 ist daher wohl die wichtigste α -Sekretase *in vivo*. Dies schließt jedoch die Existenz anderer Proteinasen mit α -Sekretase-Aktivität, z.B. ADAM9 und 17, nicht aus.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Alzheimer-Krankheit („Alzheimer’s disease“, AD) stellt die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit dar. Amyloid-Plaques sind eines der Kardinalmerkmale der Alzheimer’schen Erkrankung. A β , Hauptbestandteil der A β -Plaques, entsteht durch die proteolytische Prozessierung von APP durch die β - und die γ -Sekretase. Die α -Sekretase wirkt dem entgegen.

Setzt man an der „Amyloid-Kaskade-Hypothese“ an (vgl. 1.3), so könnte der Alzheimer-Pathologie entweder durch Inhibition der amyloidogenen Sekretasen, oder durch Stimulierung der anti-amyloidogenen Sekretasen entgegengewirkt werden. Die Inhibierung der β - und γ -Sekretase stellt sich zunehmend kompliziert dar. So bleiben viele Probleme wie beispielsweise Bioverfügbarkeit und Substratspezifität, und damit das Auftreten gravierender Nebenwirkungen solcher Inhibitoren, nach wie vor ungelöst (Chang et al., 2004; Wong et al., 2004; van Es et al., 2005). Es ist also ratsam, weiterhin nach sinnvollen Alternativen zu suchen. Eine Forcierung der ADAM10 Aktivität stellt eine mögliche wertvolle Alternative dar. Eine moderate Überexpression in ADAM10 monotransgenen Mäusen führte zu keinem auffälligen Phänotyp und konnte kombiniert im AD Mausmodell mit mutiertem APP eine Verbesserung der Gedächtnisleistung und Abschwächung der beobachteten Lerndefizite erzielen (Postina et al., 2004). In Alzheimer-Patienten ist zudem die α -Sekretase Aktivität signifikant erniedrigt (Lannfelt et al., 1995; Sennvik et al., 2000; Tyler et al., 2002).

Die 5'-untranslatierte Region (5'UTR) von ADAM10 ist eine lange, GC-reiche und in verschiedenen Spezies hoch konservierte Sequenz, die zwei „upstream open reading frames“ (uORF) aufweist. Dies hat sie mit 5'UTRs in Transkripten anderer wichtiger Gene gemein, die eine Rolle in Differenzierung, Zellwachstum und -proliferation spielen (Hinnebusch, 1996; Harding et al., 2000; Pickering und Willis, 2005). Zudem lässt sich die

ADAM10 5'UTR damit sehr gut mit der 5'UTR von BACE-1 vergleichen, die sich durch solche Strukturmerkmale auszeichnet und die für die posttranskriptionale Regulation der BACE-1 Expression von großer Bedeutung ist (De Pietri Tonelli et al., 2004; Lammich et al., 2004; Rogers et al., 2004; Zhou und Song, 2006).

Daher sollte die vorliegende Arbeit die 5'UTR von ADAM10 charakterisieren und hinsichtlich einer möglichen Funktion in der Regulation der ADAM10 Expression untersuchen. Es sollte erforscht werden, auf welcher Ebene der Genexpressionskontrolle von ADAM10 die 5'UTR Einfluss ausüben kann und welche Strukturen oder Elemente der Region maßgeblich für beobachtete Effekte sind. ADAM10 gilt als der wohl entscheidende α -Sekretase-Kandidat *in vivo* (vgl. 1.5). Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, mögliche Wege der Regulation dieses Enzyms zu verstehen, um so der charakteristischen Plaquebildung, die in Alzheimerpatienten beobachtet wird, durch eine mögliche Forcierung der α -Sekretase-Aktivität entgegen wirken zu können. Die Kenntnis potentiell physiologischer Mechanismen, die die Expression der α -Sekretase ADAM10 fördern oder unterdrücken und damit wesentlichen Einfluss auf die Bildung der Amyloid-Plaques ausüben, könnten bei der Entwicklung neuer Strategien zur Prophylaxe und Therapie der Alzheimer-Krankheit von großer Bedeutung sein.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Allgemein

Schüttler (KM2)	Edmund Buhler (EB)
Thermoschüttler (Thermomixer compact)	Eppendorf
Überkopfschüttler (Roto-shake Genie)	Scientific Industries
Magnetrührer (IKAMAG RCT basic)	IKA Labortechnik
Vortex (Vortex Genie 2)	Scientific Industries
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (1083)	GFL
Mikrowelle	Bosch
Heizblöcke	Liebisch
Zentrifugen:	
Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße (Biofuge pico)	Heraeus, Kendro
Kühlzentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße (Biofuge fresco)	Heraeus, Kendro
Zentrifuge (Megafuge 1,0)	Heraeus
Kühlzentrifuge (J2-21), Rotorentypen JA10, JA20	Beckman
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	
pH-Elektrode (Blueline 23 pH)	WTW Schott
Feinwaage (Standard 2000g – 0,01g)	
Analysenwaage (Analytical+ 200g – 0,0001g)	Ohaus
Fotometer (SmartSpec™ 3000)	Ohaus
Einwegküvetten (10 x 11x 45 mm)	BioRad
Quarzküvetten	Sarstedt
(Quartz Spectrophotometer Cell 10 x 10 x 45 mm)	BioRad
Wärmeschrank 37°C (Function line)	Heraeus
Wärmeschrank 60°C	Heraeus
Gefrierschrank -80°C (HFU 80)	Heraeus

Gefrierschrank -20°C	Elektrolux
Kühlschrank 4°C	Elektrolux
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systemec
Wasseraufbereitungsanlage (Ionenaustauscher, Milli-Q)	Millipore
Einwegpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Pipetten (0,5 – 1000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße, steril (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Sarstedt

2.1.2 Molekularbiologie

PCR-Maschine (Mastercycler personal)	Eppendorf
Schüttelinkubator (Certomat BS-1)	B. Braun Biotech
Elektrophoresekammern	PeqLab Biotechnologie GmbH
Agarosegeldokumentationseinheit:	
UV-Lampe (White/Ultraviolet Transilluminator)	Ultraviolet Products (UVP)
Kamera (CCD Video Camera Module)	Kaiser
Dokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Drucker (p91)	Mitsubishi
V-550 UV/VIS Spectrophotometer	Jasco
RNA-Materialien:	
Polypropylen Zentrifugenröhrchen für Gesamtzell-RNA- Extraktion	
Ofen 80°C	Heraeus
Drehofen „Hybridiser HB-1D“	Techne
Glaszylinder „FHB-11“	Techne
Quick Spin Columns	Roche
Multiple Tissue Northern (MTN™) Blot	Clontech
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems

2.1.3 Zellkultur

CO ₂ -Inkubator (Hera cell)	Heraeus, Kendro
Sterilwerkbank (Hera Safe HS12)	Heraeus, Kendro
Bunsenbrenner (Vulcan)	Heraeus, Kendro
Zentrifuge (Megafuge 1,0)	Heraeus, Kendro
Wasserbad (Typ 1002 ; Typ 1003)	GFL
Mikroskop (Wiloverts 10x 4/10/20)	Hund
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-PP-Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Pasteurpipetten	Sarstedt
Zellkulturschalen (60 x 15 mm, 100 x 17 mm, 24 well, 12 well)	Nunc
Sterilfiltereinheiten	Nunc

2.1.4 Proteinbiochemie

Elektrophoresekammern:

Mini-PROTEAN 3 electrophoresis cell	Bio-Rad
Transferkammer: Mini Trans-Blot transfer cell	Bio-Rad
Gel Transfer Filterpapier	Schleicher&Schuell
Immobilon-P (PVDF Transfer Membran)	Millipore
Protran (Nitrozellulose Transfer Membran)	Schleicher&Schuell
Spannungsquelle (Power Pac 300)	Bio-Rad

Scanner:

Astra 1220S	UMAX
Perfection 1650	Epson

Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Röntgenfilme Kodak-X-Omat DS / -LS	Kodak

Röntgenfilme Super RX	FujiFilm
Röntgenfilmkassette	G.Kisker
FluorChem™ 8900	Alpha Innotech
96 Well Mikrotiterplatte	Promega
Microlumat Plus LB 96V	Berthold Technologies
Fluoroscans Ascent FL	Labsystems

2.2 Enzyme, Kits und Chemikalien

2.2.1 Allgemein

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Serva, Roth oder Sigma bezogen und mit dem Reinheitsgrad p.a. („zur Analyse“) verwendet. Mittels einer Milli-Q-Anlage zur bidest. Qualität aufgereinigtes, voll entsalztes H₂O wurde für das Ansetzen der Lösungen verwendet.

2.2.2 Molekularbiologie

Restriktionsenzyme und passende Reaktionspuffer (10fach)	New England Biolabs, Invitrogen, MBI Fermentas
Bovines Serum Albumin („BSA“, 100fach)	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase (Shrimp), 1U/μl	Roche Biochem.
RNAse A	Sigma
T4-DNA-Ligase, 5 U/μl	Roche Biochem., MBI Fermentas
T4-Ligase Puffer (10fach)	Roche Biochem., MBI Fermentas
Pwo PCR-System	Roche Biochem., Invitrogen
GC-rich PCR-System	Roche Biochem.
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

Agarose (Electrophoresis Grade)	Gibco, Invitrogen
Ethidiumbromid	Roth
DNA-Größenstandard (100bp, 1kbp)	Gibco, Invitrogen
Bacto-Agar	Becton, Dickinson
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson
Hefe-Extrakt	Becton, Dickinson
Glycerol (Glyzerin)	Roth
NucleoSpin Extract II (Kit für DNA-Aufreinigung und Gelextraktion)	Macherey & Nagel
NucleoSpin Plasmid DNA-Aufreinigungs Kit („Mini-Präp Kit)	Macherey & Nagel
DNA-Aufreinigung im großen Maßstab (AX500 Nucleobond)	Macherey & Nagel
Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme:	
DH5 α	
BL21	
TOP10 Supercompetent Cells	Invitrogen
DEPC	Sigma
peqGOLD RNAPure™ Kit (für die Extraktion von Gesamtzell-RNA)	PeqLab Biotechnologie GmbH
Chloroform	Roth
Isopropanol	Merck
Ethanol	Merck
DNAfree™ Kit	Ambion
Oligotex™ mRNA Kit	Qiagen
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen
MOPS	Sigma
Formaldehyd, 37%ige Lösung	Sigma
Formamid	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid	Roth

Random Primers DNA Labeling System	Invitrogen
[α - ³² P] dCTP 5,5 MBq (150 μ Ci) in 15 μ l	Amersham, Hartmann Analytic
Quick Spin Columns	Roche
ExpressHyb TM Hybridisation Solution	BD Biosciences
SuperScript TM First-Strand Sythesis System for RT-PCR	Invitrogen
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
mMessage mMachin TM	Ambion

2.2.2.1 Vektoren

Eukaryotische Expressionsvektoren

pcDNA6/V5-His A	Invitrogen
pEGFP-1	Clontech
PEAK12	EdgeBio
phRL-Tk	Promega

2.2.2.2 Oligonucleotide und DNA Konstrukte

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen Thermo Electron GmbH und Invitrogen.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die zur Generierung der angegebenen Konstrukte verwendeten Oligonukleotide, den Vektor, in den sie ligiert wurden, und die dabei verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Konstrukt	Oligonukleotide („sense / anti-sense“)	Vektor	Restriktions- schnittstellen
ADAM10	5' cgg aag ctt cgg cag cgg aag atg gtg ttg ctg aga gtg tta att ctg c '3 5' cgc ctc gag gcg tct cat gtg tcc cat ttg '3	pcDNA6/V5-HisA	<i>HindIII</i> / <i>XhoI</i>
5'UTR ADAM10	5' cgc gct agc gcg gcg gca ggc cta g '3 5' ctc aag ctt ctg ccg ccg ccg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI</i> / <i>HindIII</i>

Konstrukt	Oligonukleotide („sense / anti-sense“)	Vektor	Restriktions- schnittstellen
5'UTR ATG1ko ADAM10	5' cgt ccc ccg cgc gca tac gcg cgc ccc tga agc '3 5' gct tca ggg gcg cgc gta tgc gcg cgg ggg acg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR ATG2ko ADAM10	5' gct tct ccc tcc gga tcg gtg tgc tgc tgt taa ccc g '3 5' cgg gtt aac agc agc aca ccg atc cgg agg gag aag c '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ340- 432 ADAM10	5' cgc gct agc gcg gcg gca ggc cta g '3 5' aag ctt gcc ggg acc tcc cct ggc ag '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ251- 432 ADAM10	5' cgc gct agc gcg gcg gca ggc cta g '3 5' aag ctt ggg acc tcc ctc ccc ctc gt '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ201- 432 ADAM10	5' cgc gct agc gcg gcg gca ggc cta g '3 5' aag ctt gct gcc tct cgg ctc ctc gtc '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ151- 432 ADAM10	5' cgc gct agc gcg gcg gca ggc cta g '3 5' aag ctt ggg acc tcc ctc ccc ctc gt '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ1-259 ADAM10	5' cgc gct agc gga gct agg agc gtt '3 5' ctc aag ctt ctg ccg ccg ccg ccg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ1-215 ADAM10	5' cgc gct agc gga gga agg aaa cga '3 5' ctc aag ctt ctg ccg ccg ccg ccg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ1-175 ADAM10	5' cgc gct agc gag aga ggg acc '3 5' ctc aag ctt ctg ccg ccg ccg ccg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ1-155 ADAM10	5' cgc gct agc tga gtt tcg aag gag '3 5' ctc aag ctt ctg ccg ccg ccg ccg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
5'UTR Δ1-85 ADAM10	5' cgc gct agc agg tag ggg cgc g '3 5' ctc aag ctt ctg ccg ccg ccg ccg '3	pcDNA6/V5-HisA- ADAM10	<i>NheI / HindIII</i>
Luciferase	5' cgc aag ctt atg gaa gac gcc aaa aac '3 5' cgc ctc gag tta caa ttt gga ctt tcc gcc '3	pcDNA6/V5-HisA	<i>HindIII/ XhoI</i>
5'UTR Luciferase	5' cag aag ctt cgg cag cgg aag atg gaa gac gcc aaa aac '3 5' cgc ctc gag tta caa ttt gga ctt tcc gcc '3	pcDNA6/V5-HisA- 5'UTR	<i>HindIII/ XhoI</i>

2.2.2.3 qRT-PCR-Primer

Die Synthese der qRT-PCR-Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen.

Namen und Sequenzen der Oligonukleotide lauten wie folgt:

ADAM10-2228 forward primer	5' cat tca gca acc cca gcg tca g '3
ADAM10-V5 reverse primer	5' atc gag acc gag gag agg gtt ag '3
GAPDH forward primer	5' tca gtg cca ccc aga aga c '3
GAPDH reverse primer	5' cag tga gct tcc cgt tca g '3

Anmerkung: Der „ADAM10-V5 reverse primer“ erkannte nur revers transkribierte und V5-markierte ADAM10 cDNA.

2.2.3 Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	Gibco, Invitrogen
FKS (fötale Kälberserum)	Gibco, Invitrogen
L-Glutamin (100x, 200mM)	Gibco, Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml, 5 mg/ml)	Gibco, Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen
Poly-L-Lysin (MW 111000)	Sigma
DMSO	Merck
Optimem1 (mit Glutamax-I)	Gibco, Invitrogen
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen

Verwendete Zelllinien:

HEK 293 (“human embryonic kidney”, humane embryonale Nierenzellen)	ATCC (Amerikanische Zellkulturkollektion)
COS-7 (Nierenzellen, Affe)	ATCC
SH-Sy5Y (humane Neuroblastomzellen)	ATCC

2.2.4 Proteinbiochemie

BCA™ Protein Assay	Uptima, Interchim
BSA Standard	Interchim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Acrylamid-Lösung 40 % (Acrylamid - Bis-Acrylamid 37,5:1)	Q-BioGene
SDS	Serva
Isopropanol	Roth
Molekulargewichtsmarker See-Blue Prestained Protein Standard	Invitrogen
I-Block	Tropix
ECL- und ECL-Plus Western Blotting Kits	Amersham Biosciences
Dual-Luciferase™ Reporter Assay System	Promega
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega
[³⁵ S] Methionin 185 MBq (5 mCi) in 500 µl	Hartmann Analytic

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Arbeiten mit Escherichia Coli

2.3.1.1 Kultivierung von *E. Coli*

LB-Medium (Low Salt Luria-Bertani Medium):

1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl in dH₂O.

Mit NaOH pH 7,0 einstellen und autoklavieren (120°C, 1,2 bar, 20 min). Ggf. vor Benutzung Hinzusetzen des Selektionsantibiotikums

LB-Agar-Platten:

15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium, autoklaviert (120°C, 1,2 bar, 20 min). Nach Abkühlung auf unter 50°C:

100 µg/ml Ampicillin hinzusetzen und in die Platten (sterile Bakterialschalen, 10 cm Durchmesser) gießen.

Ampicillin (Stocklösung 1000fach):

100 mg/ml in dH₂O, steril filtriert. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

Die Kultivierung der verwendeten *E. Coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium unter Hinzusetzen von Ampicillin (100µg/ml Endkonzentration) zur Selektion transformierter Zellen. Zum

Ausplattieren von Bakterien auf Agarplatten wurden sterile Glaskügelchen verwendet. Mittels Ausstreichen durch sterile Pipettenspitzen wurden die Transformanten auf LB-Agarplatten vereinzelt. Die Kultivierung für die Plasmid-DNA-Präparation im kleinen und großen Maßstab wurde in LB-Flüssigmedium unter Schütteln (200 rpm), bei Raumtemperatur oder 37°C, über Nacht durchgeführt.

2.3.1.2 Herstellung kompetenter *E. Coli*

CaCl₂-Puffer:

50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8,0 in dH₂O, steril filtriert

Zunächst wurde eine auf einer Agar-Platte vereinzelt Kolonie von *E. Coli* in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 250 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Nach anschließendem Pelletieren von 50 ml Kultur im sterilen Falcon (3000 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Zellen in je 17,5 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach weiterem Zentrifugieren (wie oben beschrieben) wurden die entstandenen Pellets in je 1ml eiskaltem CaCl₂-Puffer mit Glycerol (20% Endkonzentration) resuspendiert, anschließend aliquotiert und bei -80°C bis zur Transformation aufbewahrt.

2.3.1.3 Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente *E. Coli*

Zur Transformation kompetenter *E. Coli* wurden entweder Ligationsansätze (vgl. 2.3.2.4.3) bzw. deren Kontrollansätze (je 5-15 µl), oder Plasmid-DNA (vgl. 2.3.2.5) zu 100 µl kompetenten *E. Coli* Zellen (vgl. 2.3.1.2) zugesetzt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle wurde der Ansatz für 90 s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und anschließend auf Eis 2 min heruntergekühlt. Nach Zusetzen von 500 µl LB-Medium (vgl. 2.3.1.1) bei RT und Inkubation unter Schütteln (37°C, 700 rpm, 1h) wurde der Ansatz zentrifugiert (1 min, 3500 rpm, RT), der Überstand verworfen, die entstandenen Pellets in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten (vgl. 2.3.1.1) vollständig ausplattiert. Abschließend wurden die Platten entweder bei RT für mindestens 24-36 h oder bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.1.4 Lagerung von *E. Coli*

Zur Lagerung transformierter *E. Coli* Zellen wurden 750 µl Zellsuspension (in Ampicillin-haltigem LB-Medium) mit 250 µl sterilem Glycerol versetzt. Die so auf 25% (v/v) Glycerol eingestellte Bakterienzellsuspension wurde gut gemischt und bei -80°C aufbewahrt. So konnte die Verfügbarkeit der verschiedenen Transformanden zur Präparation frischer Plasmid-DNA jederzeit gewährleistet werden.

2.3.2 Arbeiten mit DNA

Die DNA der 5'UTR von ADAM10 wurde freundlicherweise von Dr. Falk Fahrenholz und Claudia Prinzen, Universität Mainz, die cDNA von ADAM10 von Dr. Sven Lammich, Universität München, zur Verfügung gestellt.

2.3.2.1 Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)

Zur Umklonierung von ADAM10 und seiner 5'UTR bzw. zur Herstellung der mutierten bzw. verkürzten Konstrukte der 5'UTR von ADAM10 wurde das „Pwo-DNA-Polymerase-Kit“ bzw. das „GC-rich Kit“ sowie das „QuickChange site-directed mutagenesis Kit“ benutzt.

2.3.2.1.1 PCR und PCR-Mutagenese

Die Klonierung der 5'UTR sowie der cDNA von ADAM10 und Verkürzungen der DNA der 5'UTR von ADAM10 erfolgten mittels PCR unter Zuhilfenahme des „Pwo-DNA-Polymerase-Kit“ bzw. das „GC-rich Kit“. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide (vgl. 2.2.2.2) enthielten dabei die gewünschte Restriktionsenzymstichstelle zur weiteren Subklonierung.

Reaktionsansatz:

1 µl der entsprechenden DNA (ca. 0,01 µg/µl)
1,25 µl des entsprechenden vorwärts Oligonukleotids (125 ng)
1,25 µl des entsprechenden rückwärts Oligonukleotids (125 ng)
2 µl dNTP-Mix (10 nM)
1 µl Pwo DNA Polymerase (1 U/µl)
5 µl (bzw. 10 µl) Reaktionspuffer (10fach)
mit H₂O bidest. auf 50 µl (bzw. 100 µl) Endvolumen

Nach Vermischen wurden die entsprechenden Reaktionsansätze in der PCR-Maschine prozessiert. Zuerst wurde die DNA für 3min bei 95 °C denaturiert und anschließend in 30-35 Zyklen mit folgendem Programmzyklus amplifiziert:

Denaturierung:	30 s,	95°C
Anlagern der Primer (Annealing):	30 s,	50°C
Polymerisation (Elongation):	2 min,	72°C

Zur verlängerten Elongation als Abschluss des Programms wurde der Ansatz für weitere 10 min bei 72°C inkubiert und abschließend zum Abstoppen auf 4°C gekühlt. Die Produkte der einzelnen PCRs wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (vgl. 2.3.2.2 ff.). Alle so erhaltenen Amplifikate wurden nach ihrer Klonierung durch DNA-Sequenzierung überprüft. (vgl.2.3.2.7)

2.3.2.1.2 PCR-Mutagenese zur Herstellung der 5'UTR ATG-knock-out-Mutanten

Mutationen der DNA der 5'UTR von ADAM10 erfolgten mittels PCR. Zur Verwendung kam das „QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit“. Dabei enthielten die als Primer verwendeten Oligonukleotide die entsprechend mutierte Base für die ATG-knock-out-Mutation (vgl. 2.2.2.2). Die PCR und die folgende Behandlung des Ansatzes erfolgten gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Reaktionsansatz:

2-4 µl der entsprechenden DNA (ca. 0,01 µg/µl)
 1,25 µl des entsprechenden vorwärts Oligonukleotids (125 ng)
 1,25 µl des entsprechenden rückwärts Oligonukleotids (125 ng)
 1 µl dNTP-Mix (10 nM)
 1 µl *PfuTurbo*TM DNA Polymerase (2,5 U/µl)
 5 µl Reaktionspuffer (10fach)
 mit H₂O bidest. auf 50 µl Endvolumen

Mit folgendem Programm wurde nach Mischen der verschiedenen Reaktionsansätze die PCR durchgeführt:

Denaturierung:	1 min	95°C
18 Zyklen:		
Denaturierung:	30 s,	95°C
Anlagern der Primer (Annealing):	30 s,	48°C
Polymerisation (Elongation):	6 min,	68°C
Verlängerte Elongation:	10 min,	68°C

Anschließend wurde die Reaktion durch Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 4°C gestoppt. Um das Ursprungsplasmid, das als „template“ für die Reaktion diente und die entsprechende Mutation nicht beinhaltete, zu eliminieren, machte man sich die Tatsache zu Nutze, dass nahezu jeder *E. Coli*-Stamm seine Fremd-DNA-Plasmide methyliert. Daher folgte nach abgeschlossener PCR ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, das methylierte DNA an der Zielsequenz 5'-G(m⁶)-ATC-'3 spaltet. Abschließend wurden die Ansätze direkt in 50µl-Aliquots superkompetenter *E. Coli* (TOP10) transformiert (vgl. 2.3.1.3). Nach der Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (vgl. 2.3.2.5) wurden sämtliche mutierte Sequenzen durch DNA-Sequenzierung verifiziert (vgl. 2.3.2.7).

2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (Stocklösung 10fach):

900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, in dH₂O, pH 8,0

TAE-Puffer (50fach):

2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA

Ethidiumbromid:

10 mg/ml in dH₂O

10fach DNA-Ladepuffer:

50% Glycerin (v/v), 0,25% Bromphenolblau und 0,25% Xylencyanol FF, 50% 10fach TBE

Zur Überprüfung von Restriktionen und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA in 0,8 bis 2%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose wurde in TAE- bzw. TBE-Puffer, die als Elektrolytlösung dienten, durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst, nach Abkühlen auf unter 50°C und Hinzufügen von 4 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Lösung in die Gelkammer gegossen und der gewünschte Probenaschenkamm eingesetzt. Nach Zusetzen von 1/10 Volumen 10fach DNA-Ladepuffer wurden die DNA-Proben in die Ladetaschen des erstarrten Gels gegeben, das zuvor mit TAE- bzw. TBE-Pufferlösung überschichtet worden war. Dabei wurde eine Tasche mit einem DNA-Größenstandard beladen (100bp oder 1kbp DNA-Leiter). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100-120 V, je nach Gelgröße. Die Interkalation von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren ermöglichte die Dokumentation durch Photographie im UV-Durchlicht bei 312 nm mit Hilfe einer Digitalkamera.

2.3.2.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung des amplifizierten DNA-Fragments wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Anwendung des „Nucleo Spin Extract II Kits“ gemäß der Herstelleranweisung gereinigt. Dasselbe Kit wurde auch zur Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Modifikationen wie Restriktionsverdau oder Dephosphorylierung ohne elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel benutzt.

2.3.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

Für optimale Bedingungen bei sämtlichen enzymatischen Modifikationen von DNA wurden die verschiedenen Enzyme ausschließlich unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen und in den mitgelieferten, passenden Reaktionspuffern verwendet. Falls unterschiedliche Modifikationen direkt nacheinander nötig waren, wurde die betreffende DNA wie in 2.3.2.3 beschrieben aufgereinigt.

2.3.2.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Die enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen hatte dreierlei Ziele: Sie diente der Überprüfung von Plasmid-DNA aus Präparationen in kleinem sowie großem Maßstab, der Klonierung durch Linearisierung von Plasmid-DNA und Schneiden der verschiedenen DNA-Fragmente, sowie der Kontrolle der Integrität von PCR-Produkten. Zu diesen verschiedenen Zwecken wurden 0,1-5 µg DNA im jeweiligen vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit mindestens 2 U Enzymaktivität pro µg DNA (und zusätzlich, falls vom Hersteller empfohlen, mit 1fach BSA) versetzt und bei der vom Hersteller vorgeschriebenen Temperatur für 2-16 h inkubiert. Das Volumen der glycerinhaltigen Enzymlösung betrug dabei maximal ein Zehntel des gesamten Reaktionsvolumens. Die DNA wurde anschließend entweder mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.3.2.2) hinsichtlich der Restriktion analysiert oder mittels des „Nucleo Spin Extract II Kits“ gereinigt.

2.3.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Enden durch die DNA-Ligase erfordert phosphorylierte 5'-DNA-Enden. DNA-Moleküle, die am 5'-Ende dephosphoryliert sind, können somit nicht durch die Ligase mit DNA-3'-Enden verknüpft werden. Dadurch kann bei einer Ligation verhindert werden, dass das 5'-Ende eines DNA-Moleküls mit dem 3'-Ende der gleichen DNA verknüpft wird (Sambrook und Russel, 2001). Daher wurden die 5'-Phosphatgruppen des linearisierten Vektors (vgl. 2.3.2.4.1) vor seiner Ligation (vgl. 2.3.2.4.3) mit alkalischer Phosphatase (SAP) in folgendem Reaktionsansatz entfernt: 1 U SAP pro 0,5-5 µg linearisierter Plasmid-DNA, 1/10 Volumen des Reaktionspuffers des Herstellers (10fach), 1-

3h bei 37°C. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über ein Agarosegel aufgereinigt oder direkt mit dem „Nucleo Spin Extract II Kit“ (vgl. 2.3.2.3) von den Reaktionsreagenzien befreit.

2.3.2.4.3 Ligation

Das Enzym T4-DNA-Ligase ermöglicht die Insertion eines DNA-Fragments in den zuvor durch Restriktionsverdau (und ggf. Dephosphorylierung) modifizierten Plasmid-Vektor mittels Verknüpfung der 5'-dephosphorylierten und 3'-hydroxylierten DNA-Enden unter Bildung einer Phosphodiesterbindung. Dazu wurden 0,2-2 µg Plasmid, 0,5-2 µg (mindestens 3facher molarer Überschuss) des entsprechenden DNA-Fragments, 1 µl T4-Ligase und 2 µl des T4-Ligase-Reaktionspuffers (10fach) in einem Endvolumen von 20 µl für 1-2 h bei RT (oder bei 4°C über Nacht) inkubiert. Zur Reaktionskontrolle wurden zusätzlich Ligationsansätze ohne Insert sowie Ansätze komplett ohne DNA und Enzym mitprozessiert. Die Hälfte des gesamten Ligationsansatzes wurde anschließend, wie unter 2.3.1.3 beschrieben, in kompetente *E. Coli* transformiert.

2.3.2.5 **Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab („Mini-Präp“)**

TENS:

10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5 % (w/v) SDS in dH₂O

Na-Acetat-Lösung:

3,0 M Na-Acetat, pH 5,2

RNase (DNase-frei):

10 mg/ml Ribonuklease A (RNase) in Tris-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM NaCl), 15 min bei 100°C erhitzen, langsam auf RT abkühlen. Aliquote bei -20°C lagern.

Zur Identifizierung rekombinanter *E. coli*-Klone wurden kleine Mengen Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse isoliert (Birnboim und Doly, 1979; Zhou et al., 1990). 1,5 ml einer 3 ml Übernachtskultur, die zuvor mittels einer sterilen Pipettenspitze von einer Platte transformierter *E. Coli* Zellen (vgl. 2.3.1.3) aus einer einzelnen Kolonie angeimpft worden war, wurde im Eppendorfreaktionsgefäß zentrifugiert (13000 rpm, 30 s, RT) und der Überstand teilweise dekantiert, wobei ca. 50 - 100 µl im Reaktionsgefäß verblieben. Das

Sediment wurde durch vortexen resuspendiert, mit 300 µl TENS-Lösung versetzt und durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt. Nach maximal 10 min Inkubation bei RT wurde zur Neutralisation 150 µl Na-Acetat-Lösung zugegeben. Nach erneutem Mischen durch vorsichtiges Invertieren wurden die unlöslichen Bestandteile (Zellbruchstücke mit chromosomaler DNA) durch Zentrifugieren (13000 rpm, 5 min, RT) abgetrennt. Der Überstand wurde sodann in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 0,9 ml -20°C kaltem Ethanol (100 %) gefällt. Nach 20minütiger Inkubation bei -80°C wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation präzipitiert (13000 rpm, 2 min, 4°C) und nach Verwerfen des Überstands mit 300-500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach Wiederholen dieses Waschschriffs wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet bei 37°C getrocknet. Um vorhandene RNA zu entfernen erfolgte ein Verdau des Ansatzes (30 min, 37°C) mit 30 µl RNase/dH₂O-Lösung (1 µg/µl). 1-5 µl der so erhaltenen Plasmid-DNA wurden zur Kontrolle der Integrität des klonierten DNA-Fragments in analytischem Maßstab mit Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. 2.3.2.4.1) und auf einem Agarosegel analysiert. Alternativ wurden DNA Mini-Präparationen mit dem „Nucleo Spin Plasmid DNA-Reinigungs Kit“ gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die so aufgereinigte DNA konnte auch direkt für die Sequenzierung verwendet werden.

2.3.2.6 Präparation von Plasmid-DNA in großem („Maxi-Präp“) und sehr großem Maßstab („MegaMaxi-Präp“)

Unter Verwendung dieser Methoden konnten größere Mengen (0,5-1,5 mg) sauberer Plasmid-DNA für Transfektionen (vgl. 2.4) und Klonierungen erhalten werden. Für die Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab wurden 200 ml LB-Medium (mit Ampicillin) mit der Vorkultur des gewünschten *E. coli* Klons angeimpft. Nach der Inkubation unter Schütteln und über Nacht (200 rpm, 37°C) wurden die Bakterien abzentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4°C). Galt es, Plasmid-DNA zu isolieren, die cDNA von ADAM10 enthielt, so wurde das Protokoll modifiziert („MegaMaxi-Präp“). In diesem Fall beimpfte man 1 l selektionsantibiotikumhaltiges LB-Medium mit der Vorkultur des gewünschten *E. coli* Klons und inkubierte 20-24 h bei RT und 200 rpm. Die Lyse der Bakterien-Pellets und die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte jeweils mit dem „Nucleobond AX 500 Kit“ gemäß den Anweisungen des Herstellers. Nach Fällung und Waschschriffen wurde das jeweilige DNA-Pellet in 200 (bzw. 400) µl dH₂O aufgenommen und die Plasmid-DNA-Konzentration photometrisch bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt. Zur Verifizierung der

Plasmid-DNA schlossen sich Restriktionshydrolyse in analytischem Maßstab (vgl. 2.3.2.4.1) und DNA-Agarosegelelektrophorese an (vgl. 2.3.2.2).

2.3.2.7 Sequenzierung

Sämtliche Konstrukte wurden bei der Firma GATC-Biotech AG (Konstanz) durch Sequenzierung verifiziert und die ermittelten Sequenzen mit den Programmen „HUSAR ProfAlign“ des Bioinformatik Services des DKFZ (Heidelberg) und „GATCViewer“ (GATC Biotech AG Konstanz) kontrolliert.

2.3.3 Konstrukte und Klonierungen

2.3.3.1 Klonierung einer cDNA für 5'UTR ADAM10 in den Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A

Die im pEAK12-Vektor vorliegende cDNA von humanem ADAM10 wurde mittels PCR unter Einfügung einer *HindIII*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende, 12 bp stromaufwärts des ORF, und einer *XhoI*-Restriktionsstelle am 3'-Ende amplifiziert und in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA6/V5-His A (vgl. 0) kloniert. Für die Generierung eines ADAM10-Konstrukts, das die 5'-UTR unmittelbar vor dem 5'-Ende der kodierenden Sequenz enthält, wurde die 5'UTR mittels PCR unter Anfügung einer *NheI*-Schnittstelle (5'-Ende) und einer *HindIII*-Schnittstelle (3'-Ende) amplifiziert und anschließend in den ADAM10 enthaltenden Vektor gesetzt. Abbildung 5 veranschaulicht die zwei resultierenden DNA-Konstrukte „5'UTR ADAM10“ und „ADAM10“.



Abbildung 5: DNA-Konstrukte von ADAM10 mit und ohne seine untranslatierte Region am 5'-Ende.

Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte von ADAM10 mit und ohne 5'UTR am 5'-Ende der für ADAM10 kodierenden Sequenz (ADAM10 ORF, oranger Kasten), wie sie in die „multiple cloning site“ (MCS) des Vektors pcDNA6/V5-His A mit Hilfe der angegebenen Restriktionsstellen kloniert wurden. In Rot und Blau sind die „upstream open reading frames“ (uORFs) der 5'UTR markiert. Die Anzahl der Basenpaare der einzelnen Genabschnitte ist angegeben. Stromabwärts der MCS ist der im Vektor vorliegende, für ein V5-Tag kodierende Bereich angezeigt, der zur späteren Detektion von exogenem ADAM10 herangezogen wurde. Das His-Tag des Vektors, dessen Epitop jedoch in der vorliegenden Arbeit später nicht genutzt wurde, schließt das Konstrukt am 3'-Ende ab. In den nachfolgenden Abbildungen ist es aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mehr abgebildet.

2.3.3.2 Klonierung verschieden mutierter 5'UTR Konstrukte

2.3.3.2.1 Konstrukte mit mutierten „upstream open reading frames“ (uORF)

Zur Untersuchung der Rolle der beiden uORFs, die in der 5'UTR von ADAM10 enthalten sind, wurden Konstrukte kloniert, deren ATG-Startkodons des jeweiligen uORF mittels „Site-directed mutagenesis“ (vgl. 2.3.2.1.2) mutiert worden waren. Dabei wurde beim Konstrukt „5'UTR ATG1ko ADAM10“ das Guanin an Position 45 der humanen ADAM10-cDNA-Sequenz in Adenin, beim Konstrukt „5'UTR ATG2ko ADAM10“ das Adenin an Position 391 in Guanin mutiert. Nach Klonierung der jeweilig mutierten 5'UTR in den ADAM10 enthaltenden Expressionsvektor ergaben sich so zwei weitere Konstrukte: „5'UTR ATG1ko ADAM10“, „5'UTR ATG2ko ADAM10“ mit jeweils mutiertem Start-ATG des ersten bzw. zweiten uORF. Abbildung 6 stellt die Konstrukte dar.

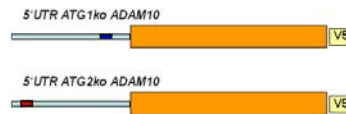


Abbildung 6: DNA-Konstrukte mit jeweils mutiertem Start-ATG der uORFs der ADAM10 5'UTR.

Schematische Darstellung der 5'UTR ADAM10 Konstrukte, deren uORFs (rote und blaue Box) mittels PCR mutiert wurden. Der für ADAM10 kodierende Bereich (ORF) ist als oranger Kasten dargestellt.

2.3.3.2.2 Konstrukte mit Deletion verschiedener Abschnitte der 5'UTR von ADAM10

Zur Charakterisierung verschiedener Abschnitte der 5'UTR hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Expression von ADAM10 war das Klonieren weiterer cDNA-Vektorkonstrukte notwendig. Hierzu wurden mit Hilfe verschiedener Primer, die die zur Klonierung entsprechend obigem Schema verwendeten Restriktionsschnittstellen beinhalten (vgl. 2.2.2.2), mittels PCR diverse Deletionsmutanten hergestellt, deren 5'- oder 3'-Enden der 5'UTR verschieden lang deletiert wurden. Anschließend wurden die mutierten 5'UTRs wiederum in die ADAM10-enthaltende MCS des Vektors kloniert. Abbildung 7 illustriert die entstandenen Deletionskonstrukte:

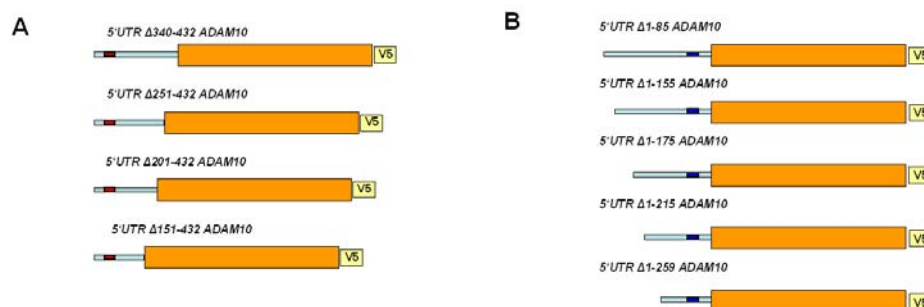


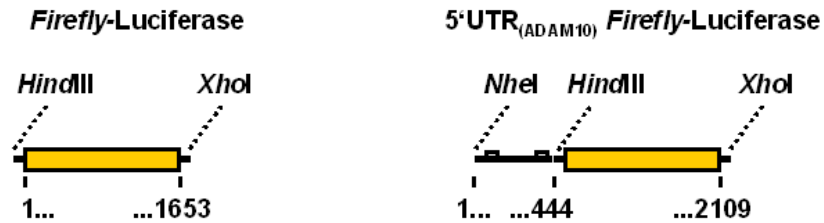
Abbildung 7: DNA-Konstrukte von ADAM10 mit verschieden deletierten 5'UTR.

(A) Konstrukte mit deletierten Abschnitten am 3'-Ende der 5'UTR, (B) Konstrukte mit am 5'-Ende deletierten Bereichen der 5'UTR. Dabei bezeichnet *Delta* (Δ) x - y die jeweils deletierten Basenpaare der 5'UTR einschließlich der angegebenen Start- und Endbasen. Die in der 5'UTR von ADAM10 nach Deletion noch enthaltenen uORFs sind wie in Abbildung 5 und Abbildung 6 farbig markiert.

2.3.3.3 Klonierung der cDNA für *Firefly*-Luciferase mit der cDNA der 5'UTR von ADAM10 in einen Expressionsvektor

Zur Herstellung der für die Luciferase-Reportergenexperimente benötigten Luciferase-Konstrukte, die die 5'UTR vor einem Reportergen, also „stromaufwärts“, beinhalten sollten, wurde zunächst mittels PCR (vgl. 2.3.2.1.1) die kodierende Sequenz des Enzyms *Firefly*-Luciferase unter Einfügung einer *Hind*III-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende mit den speziellen Primern (vgl. 2.2.2.2) und mit dem Vektor „peak12-5'UTR-(BACE)-Luc“ (Lammich et al., 2004), der die gesamte, für *Firefly*-Luciferase kodierende Sequenz enthielt und der PCR als DNA-Matrize diente, amplifiziert. Diese wurde dann mittels der beiden Schnittstellen in die MCS des Expressionsvektors pcDNA6/V5-His A kloniert. Damit resultierte das Konstrukt „pcDNA6/V5-His A Luciferase“. Ein anderer PCR-Ansatz diente der Generierung eines *Firefly*-Luciferase Amplifikats, das zusätzlich zu den am 5'- und 3'-Ende mittels spezifischer Primer angefügten Restriktionsschnittstellen noch 12 weitere Basen, analog zu den klonierten 5'UTR ADAM10 Konstrukten, zwischen der *Hind*III-Schnittstelle und dem Beginn des ORF der *Firefly*-Luciferase aufwies und in die MCS des Vektors kloniert wurde. In diesen Vektor wurden wiederum die gewünschten 5'UTR Mutanten unter Zuhilfenahme der *Nhe*I- und *Hind*III-Restriktionsschnittstellen hinein ligiert. So erlangte man Konstrukte, die die bereits für die diversen ADAM10 Konstrukte zuvor veränderte 5'UTR von ADAM10 stromaufwärts der *Firefly*-Luciferase Sequenz in der MCS beinhalteten. Sämtliche Konstrukte wurden anschließend durch Sequenzanalyse in ihrer Integrität überprüft. Abbildung 8 gibt einen Überblick über die analog zu den ADAM10 Konstrukten klonierten Reportergenkonstrukte.

A



B

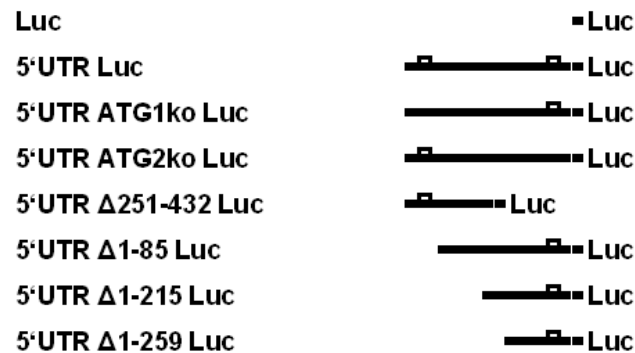


Abbildung 8: Schematische Darstellung der *Firefly*-Luciferase Reportergernekonstrukte ohne, mit, und mit modifizierten 5'UTRs von ADAM10

(A) Die kodierende Sequenz des Enzyms *Firefly*-Luciferase (1653 bp) wurde mittels der durch PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen (*Hind*III, *Xho*I) in die MCS des Vektors pcDNA6/V5-His A (nicht dargestellt) eingefügt. Es resultiert das Luciferase Konstrukt ohne 5'UTR von ADAM10. Zur Generierung des Konstrukts „5'UTR_{ADAM10} *Firefly*-Luciferase“ (5'UTR Luc) wurde die 5'UTR von ADAM10 nach Verdau durch die Restriktionsenzyme *Nhe*I und *Hind*III in die MCS des selben Vektors 12 bp stromaufwärts der für *Firefly*-Luciferase kodierenden Sequenz kloniert. (B) Das Luciferase Vektorkonstrukt ohne 5'UTR von ADAM10 („Luc“) und die divers deletierten und modifizierten 5'UTR Konstrukte wurden mit den Restriktionsenzymen *Nhe*I und *Hind*III verdaut. Durch Ligation der entsprechenden DNA-Moleküle entstanden die vereinfacht dargestellten, weiteren 5'UTR Luciferase Konstrukte. Die beiden auf der 5'UTR von ADAM10 vorhandenen uORFs sind als offene Kästen markiert und veranschaulichen durch ihre Löschung in den betreffenden Konstrukten die einzelnen Mutationen der betreffenden Startkodons (5'UTR ATG1ko Luc; 5'UTR ATG2ko Luc). Δx-y bezeichnet die in den jeweiligen Luciferase Konstrukten durch Deletion entfernten bp der 5'UTR von ADAM10.

2.3.4 Arbeiten mit RNA

DEPC-H₂O:

1ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) in 1l H₂O mischen, 12h bei RT durch Rühren lösen, anschließend autoklavieren

Sämtliche Arbeiten mit Ribonukleinsäuren erfolgten mit eigens dafür verwendeten Materialien und Reagenzlösungen, die mit RNase-freiem Wasser (DEPC-H₂O) zubereitet wurden.

2.3.4.1 Isolation von Gesamt-RNA

Gemäß den Anweisungen des Herstellers PeqLab wurde Gesamtzell-RNA aus HEK 293 Zellen mittels Phenol-Guanidinium-Isothiocyanat-Reagenz isoliert. Das Prinzip basiert auf der sauren Guanidinium-Isothiocyanat-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987), indem man RNA unter sauren Bedingungen in einer Phenol/Chloroform Extraktion von DNA und Protein separiert und nachfolgend alkoholisch fällt. Guanidinium-Isothiocyanat (GITC) fungiert dabei als potenter RNase-Inhibitor. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte peqGOLD RNAPureTM Reagenz ist eine einphasige Lösung aus Phenol und GITC. Während des Aufschlusses und der Homogenisierung der Zellen wird die RNA durch das Reagenz (2ml pro 6 cm Zellkulturschale) geschützt. Nach Phasentrennung durch Zugabe von Chloroform und nachfolgender Präzipitation mittels 2-Propanol, erfolgten zweimaliges Waschen der die RNA enthaltenden wässrigen Phase mit 1 ml 75%igem Ethanol im 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß. Es schlossen sich ein Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 13000 rpm) und das Lösen des an der Luft getrockneten RNA-Pellets durch kurzes Erhitzen (55-60°C) in DEPC-H₂O an. Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm.

Waren die resultierenden Total-RNA-Isolate nachfolgend für die „Erststrangsynthese“ für RT-PCR Experimente (vgl. 2.3.4.4) bestimmt, so wurden abschließend 10 µg im DNA-freeTM Kit der Firma Ambion nach Herstellerprotokoll mittels rekombinanter DNase von eventuell noch vorhandener genomischer DNA befreit.

2.3.4.2 Expressionsanalyse der 5'UTR von ADAM10: MTN Blot *("multiple tissue Northern Blot")*

Um zu überprüfen, ob und in welchen Zellen oder Geweben die 5'UTR von ADAM10 auf RNA-Ebene exprimiert ist, wurden Northern Blot Experimente unter der Verwendung einer „multiplen Gewebe Northern Blot Membran“ (MTN-Blot: „Multiple Tissue Northern Blot“) durchgeführt. Die dabei verwendete Membran wurde kommerziell erworben (BD Biosciences).

Zur Herstellung der radioaktiv markierten cDNA-Sonde und zur Hybridisierung der Blot-Membran wurde wie folgt verfahren:

2.3.4.3 Northern Hybridisierung

Prä-/Hybridisierungspuffer:

0,5 M NaPhosphat Puffer (pH 7,2), 7% (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 7,0), 1% (w/v) BSA

Waschlösung 1:

2x SSC, 0,1% (w/v) SDS

Waschlösung 2:

0,1x SSC, 0,1% (w/v) SDS

Striplösung:

0,5% (w/v) SDS in H₂O

Zum Nachweis von RNA diente ein radioaktiv markierter DNA-Abschnitt als Sonde, die mit dem passenden Anteil des RNA-Komplementärstrangs auf der MTN-Blot-Membran (vgl. 2.3.4.2) hybridisierte. Zur Herstellung der für die 5'UTR von ADAM10 spezifischen cDNA-Sonde wurden zunächst 20 µg des Vektors „pcDNA6/V5-His A 5'UTR ADAM10“ mit den Restriktionsenzymen NheI und HindIII 2 h bei 37°C verdaut. Nach der Auftrennung über ein 1,2%iges Agarosegel (vgl. 2.3.2.2) konnte das spezifische, ca. 450 bp lange Fragment in einer geeigneten Puffermenge (30 µl) eluiert werden (vgl. 2.3.2.3). Unter Verwendung des „Random Primers DNA Labeling Systems“ der Firma Invitrogen wurde die DNA-Sonde gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Einbau von [α -³²P]-markiertem dCTP synthetisiert. Dabei kamen ca. 25-50 ng linearisierter DNA zum Einsatz. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in den „Quick Spin Columns“ der Firma Roche gemäß Herstellerprotokoll gereinigt und bei 95-100°C für 5 min denaturiert. Die Nylon-Membran war zuvor im Glaszylinder für 2h im Drehofen bei 68°C in ca. 15 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert worden. Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv gelabelte DNA-Sonde in

frischem, auf 65°C vortemperierten Hybridisierungspuffer bei 65°C über Nacht mit der Membran im Drehofen inkubiert. Die avisierte Aktivität der Lösung betrug dabei 2×10^6 cpm/ml. Es folgten drei Waschschriffe in Waschlösung 1 bei RT für jeweils 20-40 min, gefolgt von zwei Waschschriffen in Waschlösung 2 im Drehzylinder bei 50°C für je 10-20 min. Nach kurzem Abtropfen wurde die hybridisierte Membran abschließend in Plastikfolie eingeschweißt. Zur Detektion der Signale wurde ein Röntgenfilm bei -80°C in der Filmkassette belichtet.

Analog wurde die Nylon-Membran nach Abwaschen der hybridisierten Sonde in Striplösung (10 min, 95°C) mit der cDNA von β -Actin, also einem ubiquitär exprimierten und nicht regulierten Strukturprotein, als Sonde beschickt. Somit konnte β -Actin als Referenzsignal detektiert und analysiert werden.

2.3.4.4 Quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Um über eine spezielle mRNA, die in einem Gewebe oder in Zellen exprimiert ist, quantitative Aussagen stellen zu können, wurden quantitative *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion-Experimente (qRT-PCR) durchgeführt. Dabei wird von dem verwendeten Gerät „7500 Fast Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) der Verlauf einer PCR in Echtzeit aufgezeichnet. So konnte die exponentielle Amplifizierungsphase exakt bestimmt werden, in der ein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen eingesetzter Ausgangsmenge der Zielsequenz und des zu messenden Amplifikats, also des PCR-Produkts, besteht.

Erster Schritt war die Synthese des Erststrangs, also die reverse Transkription von isolierter mRNA in cDNA. Dazu diente das Kit „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen). Mittels Oligo(dT)-Primer, also einzelner Stränge von Thyminbasen, die sich an polyadenylierte mRNA eukaryoter Zellen heften (1 μ l, 0,5 μ g/ μ l) und somit als Primer für die reverse Transkription dienen, und dem Enzym SuperScript™ Reverse Transkriptase (1 μ l, 50 Units/ μ l), das RNase-Aktivität während der Reaktion vermindert, wurde mRNA aus isolierter Gesamt-RNA, die DNase-verdaut worden war (vgl. 2.3.4.1), in den cDNA Einzelstrang gemäß Herstelleranweisung übersetzt.

Für die quantitative *Real-Time* PCR mit Hilfe des Fast SYBR Green Master Mix Kit wurden nun 1 μ l des Erststrangsyntheseansatzes und 1 μ M der spezifischen Primerpaare (vgl.

2.2.2.3) zur Bindung an die zu amplifizierende Sequenz der cDNA im nach Firmenprotokoll pipettierten Reaktionsansatz eingesetzt. Der Farbstoff SYBR Green lagert sich an die kleine Furche der (bereits amplifizierten) doppelsträngigen DNA an, wirkt also als Interkalator. Die Quantifizierung beruht auf der Detektion der Extinktion dieses Farbstoffes. Die Zunahme des PCR-Produkts während der PCR entspricht daher der Zunahme der gemessenen Fluoreszenz. Reaktionsansätze, Negativ- (H₂O) und auch „non-RT“-Kontrollen wurden in 96-well Platten in einem Endvolumen von 20 µl in Triplikaten angesetzt. In einem anderen, genau gleich pipettierten Ansatz der zu bestimmenden Proben wurden Primer für die Hybridisierung an die cDNA von GAPDH, einem klassischen Referenzgen mit konstantem Expressionsniveau, verwendet. In der späteren Auswertung konnte so eine relative Quantifizierung der ADAM10-Proben durchgeführt werden, nachdem sie auf ihren entsprechenden, in der jeweiligen Probe gemessenen GAPDH-Wert normiert worden waren. Die Messung der Fluoreszenz des in die kleine Furche der DNA interkalierten SYBR Green Farbstoffs erfolgte jeweils nach der Elongation des Stranges und innerhalb der exponentiellen Phase, also vor der nächsten Denaturierung. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse konnte die Temperatur bestimmt werden, bei der die Messung erfolgen sollte. Sie sollte oberhalb der Schmelztemperatur kürzerer, durch Hybridisierung wenig spezifischer DNA-Moleküle entstandener Nebenprodukte und unterhalb der Schmelztemperatur der spezifisch gebildeten DNA-Amplifikate liegen. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte durch relative Quantifizierung der RNA nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode [Übersicht von Schefe (Schefe et al., 2006)]. Dabei wurden die Messwerte sämtlicher analysierter Proben auf das Signal des 5'UTR ADAM10 Konstrukts bezogen.

2.4 Arbeiten mit eukaryoten Zellen („Zellkultur“)

2.4.1 Kultivierung, Passagieren, Verdünnung und Zellzahlbestimmung eukaryoter Zellen

PBS-Puffer (steril):

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1,75 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl in dH₂O, pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert bei 120°C und 1,2 bar für 20 min

Trypsin-EDTA-Lösung:

0,05 % Trypsin (w/v), 0,53 mM EDTA·4Na in Hanks, B.S.S. (Gibco Invitrogen Corporation)

Kulturmedium (Grundmedium):

10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Stocklösung (100fach) Endkonzentration: 50 U/ml / 50 µg/ml) in DMEM (mit high Glucose, 2mM L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Die Kultivierung der adhärent wachsenden HEK 293 Zellen, sowie der weiteren verwendeten Zelllinien, erfolgte nach Standardprotokoll (Kruse und Patterson, 1973) bei 37°C, 5% CO₂ und Feuchtigkeitssättigung im CO₂-Inkubator. Sämtliche Geräte wurden vor Benutzung in der Sterilwerkbank mit 80% Ethanol desinfiziert. Bei Konfluenz wurde der Zellrasen einmal mit sterilem PBS-Puffer (4 ml pro 10 cm Petrischale) gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung (2 ml) abgelöst. Trypsin spaltet dabei die Adhäsionsproteine, während EDTA alle zweiwertigen Kationen bindet, die die Proteine, mit deren Hilfe sich die Zellen am Substrat anheften, stabilisieren. Die abgelösten Zellen wurden sofort in 2 ml Grundmedium aufgenommen, um die Trypsinaktivität zu inhibieren und eine Schädigung der Zellen durch zu lange Trypsineinwirkung zu unterbinden. Nach Überführung in ein steriles Reaktionsgefäß wurden die Zellen mittels Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Grundmedium in geeigneten Verdünnungen auf neue Kulturschalen (6 cm, 10 cm, Zellverdoppelungszeit 24-36 h) verteilt.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop.

2.4.2 Konservierung eukaryoter Zellen

Einfriermedium:

90 % FKS, 10 % DMSO

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde der konfluente Zellrasen einer Petrischale (10 cm) pelletiert (vgl. 2.4.1), in 1 ml Einfriermedium (4°C) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen

überführt und bei -80°C mittels einer Einfrierbox, die eine langsame, definierte Abkühlung ermöglicht, eingefroren. Sollten Zellen dauerkonserviert werden, so wurden sie anschließend in flüssigen Stickstoff umgelagert.

2.4.3 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin (Stocklösung 1000fach):

10 mg/ml Poly-L-Lysin in sterilem dH_2O

Für eine bessere Haftung der Zellen wurden für manche Experimente die Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dadurch wurde mehrmaliges Wechseln des Kulturmediums und das Waschen des Zellrasens ermöglicht. Zur Beschichtung wurden die zuvor mit Poly-L-Lysin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) befüllten Petrischalen bei 37°C im CO_2 -Inkubator für 30 min inkubiert. Nach Abnehmen der Lysinlösung wurden die Schalen mehrmals mit 4-5 ml PBS oder sterilem H_2O (vgl. 2.4.1) gewaschen, unter der Sterilbank bei RT getrocknet, verpackt gelagert oder anschließend gleich zum Aussähen von Zellen genutzt.

2.4.4 Transfektion adhärenter Zellen mit rekombinanter DNA

Die transiente Expression von Proteinen in eukaryonten Zellen konnte durch die Transfektion mittels LipofectAMINE 2000TM (Invitrogen) erreicht werden. Sie beruht auf der Aufnahme von DNA-Lipofectamine-Komplexen durch Endozytose. Einen Tag vor der Transfektion wurden die entsprechenden Zellen in einer geeigneten Verdünnung auf Zellkulturschalen (6 cm) ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % gewachsen waren und noch genügend Platz für weitere 24 h Wachstum nach der Transfektion vorhanden war. Nach den Anweisungen des Herstellers wurde die Transfektion einer geeigneten Menge DNA (8 μg) mittels LipofectamineTM 2000 durchgeführt und die Zellen 24 h nach der Transfektion für das entsprechende Experiment verwendet.

2.5 Proteinbiochemie

2.5.1 Zellernte und Herstellung von Zelllysaten

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 1,75 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl in dH₂O

STEN-Lysepuffer:

50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,02 % PI-Mix, 1% Triton X-100 in dH₂O

Zellen in konfluenten 6 cm Zellkulturschalen wurden 24h nach ihrer Transfektion (vgl. 2.4.4) vorsichtig von Kulturmedium befreit, auf Eis 2-mal mit eiskaltem PBS-Puffer (2 ml) gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Puffer mit einem Spatel abgeschabt. Die Zellen wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, durch Zentrifugation (3200 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert und der Überstand entfernt. Zur Zellyse wurden die Zellpellets in 500 µl STEN-Lysepuffer resuspendiert, durch Vortexen gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile, wie Cytoskelett und Zellkerne, wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die vorliegenden Proteinlysate wurden entweder bei -20°C zur späteren Analyse eingefroren oder nach anschließender Proteinbestimmung (vgl. 2.5.2) zur Auftrennung direkt in der SDS-PAGE (vgl. 2.5.3) eingesetzt.

2.5.2 Proteinbestimmung

BSA-Standard Lösung:

2 mg/ml BSA

Zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen wurde das BCA^{TCM} Protein Assay Kit verwendet, basierend auf der Methode nach Smith (Smith et al., 1985): Zweiwertige Kupferionen (Cu²⁺) werden mit Protein in alkalischem Milieu zu einwertigem Kupfer (Cu⁺) reduziert, bekannt als Biuret-Reaktion, anschließend reagieren die Cu⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA), es resultiert ein violettees Reaktionsprodukt durch die Chelatbildung zweier BCA-Moleküle mit einem Kupferion. Die Absorption des wasserlöslichen BCA-Kupfer-Komplexes kann bei 562 nm gemessen werden und weist eine starke Linearität mit zunehmender Proteinkonzentration auf. Im Gegensatz zur Methode nach Bradford (Bradford, 1976) ist die Proteinbestimmung mittels BCA wesentlich genauer und sicherer hinsichtlich der

Quantifizierung, da störende Substanzen wie z.B. Detergenzien weniger Einfluss auf die Reaktion ausüben und auch keine Mindestmenge an Protein benötigt wird.

Die zu bestimmenden Lysate wurden 1:5 in dH₂O verdünnt, ebenso der als Nullwert dienende Lysispuffer. Zur Eichung wurden außerdem 6 verschiedene BSA-Standards mit 0, 4, 8, 12, 16 und 20 µg pro 10µl in dH₂O in Eppendorfreaktionsgefäßen vorgelegt. Alle Proben und die Kalibrierstandards wurden als 2fache Bestimmung in eine 96-well-Platte (10 µl / well) überführt, 200 µl des BCA-Assay Reaktionspuffers (Reagent A / Reagent B 50:1) mit der Mehrkanalpipette hinzugegeben und eventuell entstandene Luftblasen mit einer spitzen Kanüle entfernt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Proteinkonzentration im Photometer bei 562 nm bestimmt.

2.5.3 Nachweis von Proteinen

2.5.3.1 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel-Puffer (4fach „lower Tris“):
1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O

Sammelgel-Puffer (4fach „upper Tris“):
0,5 M Tris pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O

Acrylamid-Lösung:
40 % (w/v) Bis-Acrylamid 37,5:1 in dH₂O

Ammoniumpersulfat Lösung (APS):
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in dH₂O

SDS-Probenpuffer (5fach):
16 % (v/v) Trenngel-Puffer, 10 % (w/v) SDS, 1% (w/v) DTT, 50 % (v/v) Glycerin, Bromphenolblau

Laufpuffer ohne SDS (10fach):
250 mM Tris, 2 M Glycin in dH₂O

Laufpuffer (1fach):
25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS in dH₂O

Zusammensetzung der Gel-Lösungen für 1 Minigel (1,5 mm):

	8 % Trenngel	10 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	4,4 ml	4,0 ml	3,6 ml	3,25 ml
Trenngel-Puffer	2 ml	2 ml	2 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	-	-	1,25 ml
Acrylamid-Lösung	1,6 ml	2,0 ml	2,4 ml	0,5 ml
10 % APS	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Die Gelelektrophorese zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen als diskontinuierliche vertikale SDS-PAGE (Laemmli, 1970) mittels des Minigelsystems und einer Elektrophoreseapparatur der Firma BioRad.

Vor dem Gießen der 1,5 mm dicken Gele (8 – 12 %) wurden die Glasplatten gründlich mit Isopropanol gereinigt, in die Gießhaltevorrichtung (BioRad) gespannt und abgedichtet. Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurden der Alkohol entfernt, das Sammelgel hinzugegeben und der gewünschte Probenaschenkamm eingefügt. War das Gel vollständig polymerisiert wurde es in die Trennkammer eingesetzt, der Kamm entfernt und die Taschen gut mit Elektrophoresepuffer ausgespült, mit dem sowohl die Seite der Anode, als auch die Seite der Kathode der Trennkammer befüllt wurde. Nach dem Aufkochen (5 min, 95°C) der in Probenpuffer aufgenommenen Proben (vgl. 2.5.1) wurden die Geltaschen befüllt. Zusätzlich wurde auch der „See-Blue Prestained Protein Standard“ (8 µl) als Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen. Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden, die Elektrophorese bei 70 V konstanter Spannung gestartet und nach Eintritt der Proben in das Trenngel bei 120 V fortgesetzt. Anschließend erfolgte eine Western Blot Analyse der im Gel aufgetrennten Proteine (vgl. 2.5.3.2).

2.5.3.2 Western Blot Analyse

2.5.3.2.1 Transfer von Proteinen mittels Elektro-Blot

Transferpuffer (1fach):

25 mM Tris, 0,2 M Glycin in dH₂O

Mittels der Transfermethode des Western (oder Elektro-) Blots wurden Proteine nach der SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (vgl. 2.5.3.1) auf eine PVDF-Membran übertragen und konnten dann durch immunologische Methoden nachgewiesen werden. Nachfolgend ist der Aufbau des Blots skizziert.

Transferaufbau:

Anodenplatte
Poröser, in Transferpuffer äquilibrierter Schwamm
Zwei Lagen in Transferpuffer äquilibriertes Gel- Transferpapier
In Transferpuffer äquilibrierte Membran
SDS-Gel
Zwei Lagen in Transferpuffer äquilibriertes Gel- Transferpapier
Poröser, in Transferpuffer äquilibrierter Schwamm
Kathodenplatte

Die Transferpapiere und die PVDF-Membran wurden zuvor auf die Größe des Gels zugeschnitten und die Membran in Isopropanol geschwenkt und mit Transferpuffer gewaschen. Beim Bau wurde darauf geachtet, Luftblasen, die eventuell zwischen den Schichten entstanden, durch Rollen eines 50 ml Probengefäßes sorgfältig zu entfernen. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA über 65 min in der vollständig mit Transferpuffer gefüllten und mittels Magnetrührer und Eiseinlage ständig homogen gekühlten Blotkammer.

2.5.3.2.2 Immunchemischer Chemoluminiszenz-vermittelter Proteinnachweis

TBST-Puffer (1fach):

0,3 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,6, 0,1 % Tween20 in dH₂O

Blockierungspuffer:

0,2 % I-Block, 0,1 % Tween20 in PBS

Nach erfolgtem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zur Sättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer geschwenkt. Anschließend erfolgte die Erstantikörper-Reaktion während einer Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur (alternativ über Nacht bei 4°C) unter Schwenken in Blockierungspuffer. Dabei dienten die folgenden Antikörper, in den

angegebenen Verdünnungen, als Primärantikörper:

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Firma
Anti-V5 Antikörper Maus-IgG, monoklonal	gegen V5-Bindungsstelle	1:5000 verdünnt	Invitrogen
Anti-GFP Antikörper Maus-IgG, monoklonal	gegen GFP	1:2000 verdünnt	Clontech
Anti- β -Actin Antikörper Maus-IgG, monoklonal	gegen β -Actin	1:2000 verdünnt	Sigma

Die Antikörper wurden in Blockierungspuffer unter Zugabe von Natrium-Azid (Endkonzentration: 0,02 %) angesetzt. Überschüssiger oder unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch Schwenken der PVDF-Membran über 1 h gewaschen. Der verwendete TBST-Waschpuffer wurde dabei mehrmals gewechselt. Anschließend erfolgte die Zweitantikörper-Reaktion: Der entsprechende Peroxidase gekoppelte („horse raddish peroxidase“, HRP) Sekundär-Antikörper, ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt, wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran unter Schütteln inkubiert und damit an den Erstantikörper gebunden. Folgender Zweitantikörper kam zum Einsatz:

Anti-mouse-HRP	gegen Maus-IgG	1:10000 verdünnt	Firma: Promega
----------------	----------------	------------------	----------------

Anschließend wurde die Membran erneut eine Stunde lang mehrmals mit TBST-Puffer gewaschen und schließlich kurz mit dH_2O gespült, ehe die Detektion der nun mit den Antikörpern gekoppelten, aufgetrennten Proteine mit Hilfe des ECL-Kits („enhanced chemoluminescence“) gemäß den Angaben des Herstellers erfolgte. Bei schwächeren Signalen und zum quantitativen Nachweis wurde das „ECL-Plus Western Blotting Kit“ angewendet. Die Signale der Lichtemission durch Umsetzung des Substrats (Chemolumineszenz) wurden mit Röntgenfilmen aufgenommen, die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels des FluorChemTM 8900 Systems.

2.5.4 Luciferase Reporterexperimente mit dem „Dual-LuciferaseTM Reporter Assay“ System

Das Prinzip eines Reporterexperimentes ist, die regulatorischen Funktionen eines Genbereichs, z.B. eines Promotors oder jeder anderen in 5'-Richtung gelegenen Sequenz, für die Expression eines (stromabwärts) kodierten Proteins künstlich auf ein sogenanntes Reporter gen zu übertragen, dessen Messung einfach, schnell, etabliert und gut zu vergleichen ist. Als Reporter gen werden meist Gene benutzt, die für Enzyme kodieren, die sich leicht nachweisen lassen und im verwendeten biologischen Expressionssystem physiologisch nicht vorkommen, wie z.B. CAT (bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase), β -Galaktosidase oder, wie in der vorliegenden Arbeit, Luciferase. Das Enzym Luciferase bietet sich aus zweierlei Gründen als Reporter an: Zum Einen ist Hintergrundaktivität bei seiner Messung ausgeschlossen, da dieses Enzym in Säugerzellen physiologisch nicht vorkommt, zum Anderen ist seine Aktivitätsmessung im Luminometer äußerst sensitiv, bereits geringste Mengen (im Femtogrammbereich) können im Experiment nachgewiesen werden.

Ursprünglich wurde das Enzym *Firefly*-Luciferase aus *Photinus pyralis*, dem gemeinen Glühwürmchen, isoliert. Es katalysiert die Lichtproduktion, also die Freisetzung von Licht ($h\nu$) in bioluminiszenten Organismen durch Reaktion von Luciferin, ATP und Sauerstoff zu CO_2 und AMP unter Freisetzung eines Photons. Die *Renilla*-Luciferase wurde dagegen erstmals aus der Seeanemone, *Sea Pansy*, gewonnen und katalysiert die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid ebenfalls unter Freisetzung eines Photons. Damit katalysiert sie ebenfalls die Lichtproduktion (Matthews et al., 1977; Lorenz et al., 1991).

Das „Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System“ der Firma Promega ist hervorragend dazu geeignet, einen regulatorischen Effekt einer Gensequenz auf die Proteinexpression eines stromabwärts kodierten Bereichs zu untersuchen. Es ermöglicht die gleichzeitige Messung zweier verschiedener Luciferase Enzymaktivitäten in einem Reaktionsansatz nach Transfektion in eukaryote Zellen (im vorliegenden Fall HEK 293 Zellen). Die Expression jedes *Firefly*-Luciferase (FLU) Reporter genkonstrukts wurde im Luminometer anhand der Substratumsetzung gemessen. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und zur Normierung der Aktivität der *Firefly*-Luciferase diente die Messung der Enzymaktivität der *Renilla*-Luciferase, des kotransfizierten „Kontroll-Reporters“. Die normierten Lumineszenzen jeden Ansatzes (*Firefly*-Luciferase / *Renilla*-Luciferase), und somit also die verschiedenen

Reportergenkonstrukte, kann man auf diese Art direkt hinsichtlich ihrer Enzymaktivität einem Vergleich unterziehen. Damit wurde die Transfektionseffizienz bei der Auswertung der Messdaten immer automatisch berücksichtigt. Der zur Transfektion der Luciferase Reportergenkonstrukte verwendete Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A bringt den eigenen eukaryoten Promotor P_{CMV} mit. Der für *Renilla*-Luciferase kodierende Vektor phRL-Tk enthält einen Thymidinkinase-Promotor.

Die ADAM10 5'UTR und ihre verschieden mutierten Varianten wurden in die MCS des Vektors pcDNA6/V5-His A unmittelbar vor den für das Enzym *Firefly*-Luciferase kodierenden Bereich kloniert (vgl. 2.3.2 ff. und 2.3.3.3). Anschließend wurden gleiche Mengen Vektor-DNA (200-400 ng) der klonierten Konstrukte und eines Luciferase-Konstrukts ohne 5'UTR für die Transfektion von HEK 293 Zellen mittels LipofectamineTM2000 (vgl. 2.4.4) eingesetzt. Am Vortag wurden etwa $1,8 \times 10^5$ Zellen in Poly-L-Lysin beschichteten (vgl. 2.4.3) 24-well-Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie zum Transfektionszeitpunkt zu ca. 80% konfluent vorlagen. Zur späteren Normierung der Aktivität der *Firefly*-Luciferase und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde gleichzeitig in jedem Ansatz 1 μ l (10 ng/ μ l) des Vektors phRL-Tk, der den für *Renilla*-Luciferase kodierenden Bereich beinhaltet, kotransfiziert. Nach 24stündiger Inkubation der Zellen im Brutschrank und einmaligem Mediumwechsel 6 h nach Transfektion wurden das Medium entfernt, die Zellen einmalig mit eiskaltem PBS-Puffer (vgl. 2.5.1) gewaschen und anschließend gemäß den Anweisungen des Herstellers lysiert und prozessiert. Dabei wurden 20 μ l der resultierenden Proben, die im Falle eines erwartet starken Signals noch einmal 1:10 verdünnt wurden, in 96-well-Platten der Analyse im Luminometer mit automatischem Dispenser unterzogen. Quantifizierung und Analyse erfolgten mit dem Microlumat LB 96V und der „WinGlow software“ (Berthold Technologies). Die in der Messung gemäß Firmenprotokoll erhobene *Firefly*-Luciferase Aktivität wurde auf den Referenzwert der im selben Ansatz gemessenen *Renilla*-Luciferase Aktivität der jeweiligen Probe normiert. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplet- oder Quadruplet-Bestimmung, deren Mittelwerte gebildet wurden. Dadurch konnten die Luciferase-Konstrukte zuverlässig miteinander verglichen werden. Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Enzymaktivitäten der einzelnen Experimente gebildet und graphisch dargestellt. Insgesamt wurden die einzelnen Konstrukte in mindestens drei unabhängigen Experimenten getestet.

2.6 *In vitro*-Transkription und -Translation

2.6.1 *In vitro*-Transkription

Die *In vitro*-Transkription, also die Übersetzung der DNA in mRNA, erfolgte nach Linearisierung der betreffenden, zu transkribierenden DNA mittels Verdau durch die geeignete Restriktionsendonuklease. Dabei wurde 1 µg des linearisierten Stranges unter Zuhilfenahme des mMessage mMachine™ Kits nach dem Protokoll des Herstellers im Eppendorf Reaktionsgefäß in mRNA übersetzt. Anschließend wurde die eingesetzte DNA durch Verdau mit RNase-freier DNase bei 37°C für 15 min gemäß den Anweisungen des Herstellers aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die resultierende mRNA wurde präzipitiert, gewaschen, in 20-30 µl DEPC-Wasser aufgenommen und hinsichtlich ihrer Konzentration im Photometer bei 260 bzw. 280 nm analysiert. Zur Veranschaulichung und Überprüfung der erfolgreichen Transkription wurde ein Aliquot der Proben auf einem Agarosegel (vgl. 2.3.2.2) sichtbar gemacht und hinsichtlich der Größe des RNA-Moleküls kontrolliert.

2.6.2 *In vitro*-Translation

Fixierlösung:

5 % (v/v) 2-Propanol, 7 % (v/v) Eisessig

Zur *In vitro*-Proteinbiosynthese wurde das „Rabbit Reticulocyte Lysate System“ benutzt. Das Retikulozyten-Lysat wird aus dem „Neuseeländischen Weißen Hasen“ gewonnen und nach dem Standard-Protokoll nach Pelham (Pelham und Jackson, 1976) zur Proteinbiosynthese benutzt. Das Retikulozyten-Lysat beinhaltet alle nötigen zellulären Bestandteile (tRNA, Ribosomen, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren). Sogenannte „Hintergrund“-Translation wird soweit es geht durch Zerstörung der endogenen mRNA mittels „Micrococcal Nuclease“ auf ein Minimum reduziert.

Für die Translationsreaktion wurden 35 µl des Lysats, 1 µl eines Aminosäuregemisches (1 mM, ohne Methionin), 2 µl einer [³⁵S] radioaktiv gelabelten Methioninlösung (1200 Ci/mmol,

10 mCi/ml), 1 µl RNAse Inhibitor (40 U/µl) und 1 µg der, wie in 2.6.1 beschrieben, *in vitro*-transkribierten mRNA im Reaktionsgefäß gemischt und mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl aufgefüllt. Vor Zugabe der RNA wurde diese bei 65°C für 3 min aufgeköcht, um evtl. ausgebildete Sekundärstrukturen zu lösen. Als Kontrolle dienten jeweils Ansätze ohne transkribierte RNA. Die Reaktionsgemische wurden bei 30°C für 90 min inkubiert, anschließend wurden 5 bzw. 15 µl der Reaktionslösungen mit SDS-Probenpuffer (vgl. 2.5.3.1) im 10% SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele mit Fixierlösung fixiert und bei 80°C auf Gel-Transferpapier getrocknet. Zur Detektion der radioaktiven Signale wurden Röntgenfilme in der Kassette für ca. 10 bis zu 50 h bei -80°C belichtet.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der 5'UTR von ADAM10 und ihrer Bedeutung für die Expression dieser Alzheimer-relevanten Sekretase. Dabei sollte herausgefunden werden, ob die 5'UTR transkriptional oder posttranskriptional bzw. translational Einfluss auf die ADAM10 Expression ausübt. Zudem wurde untersucht, welche Bereiche oder Eigenschaften der 5'UTR eine Rolle hinsichtlich veränderter ADAM10 Proteinmengen spielen. Außerdem wurden eventuelle Effekte in Reporterexperimenten überprüft sowie *in vitro* nachvollzogen.

Zunächst wurde jedoch die 5'UTR einer Sequenzanalyse unterzogen.

3.1 Die ADAM10 mRNA enthält eine lange, GC-reiche 5'UTR

Die genomische Region des humanen ADAM10-Gens liegt auf Chromosom 15, Genlocus 15q22.1-15q22.33 und umfasst in etwa 154 kb. Der kodierende Bereich verteilt sich auf 16 Exons. Dabei ist die gesamte 5'UTR und die Signalpeptidsequenz auf Exon1 enthalten (vgl. 3.2, Abbildung 9, A). Unter den Zugangsnummern („Accession Number“, „Acc.No.“) NM_001110 und AF09615 findet sich in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ der USA die gesamte ADAM10-cDNA. Der offene Leseraster weist 2247 für 748 Aminosäuren kodierende Nukleotide auf, die Länge der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) variiert auf Grund verschiedener Poly-A-Signale zwischen 694 und 1236 bp, je nach Zugangsnummer. Die Länge der 5'UTR wird in der cDNA-Sequenz mit 469 bp angegeben. Vergleicht man diese aber mit der genomischen ADAM10-Sequenz (Acc.No. NT_010194), so zeigt sich keine Homologie der ersten 25 bp. Somit besteht die 5'UTR von ADAM10 aus 444 bp (Prinzen et al., 2005). Abbildung 9 (B) stellt den Aufbau des ADAM10 Transkripts schematisch dar.

In einer Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass der GC-Gehalt der 5'UTR 69% beträgt. Zwei uORFs sind auf der 5'UTR lokalisiert, sie befinden sich zwischen den Positionen 43-78 und 391-405 (Position 1 in dieser Zählung ist das erste Nukleotid der 5'UTR). Bei einer eventuellen Initiation der Translation an diesen Start-AUGs, folgender Elongation und Termination der Translation an den im Leseraster gelegenen, passenden Stop-Kodons würden ein elf bzw. ein vier Aminosäuren kurzes Peptid entstehen.

Die humane ADAM10 5'UTR liegt im Vergleich mit dem angenommenen murinen Homolog in einem hoch konservierten Bereich (Prinzen et al., 2005): Die ersten 500 bp (ab

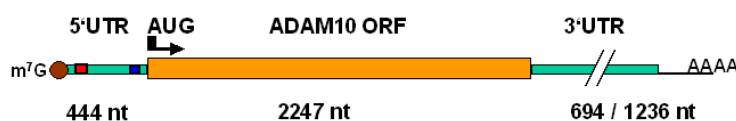
Transkriptionsstartpunkt, entsprechend Position 1 der humanen ADAM10 5'UTR) des menschlichen ADAM10 Transkripts weisen eine Sequenzhomologie von 77% mit der korrespondierenden genomischen Sequenz des murinen ADAM10 auf (vgl. Abbildung 9, C). Der genaue Transkriptionsstartpunkt des murinen ADAM10 ist jedoch noch nicht bekannt. Für die gesamte mRNA beträgt die Nukleotidsequenzidentität des ADAM10-Gens und seines murinen Homologs 90% (*Acc.Nos.* für murines ADAM10: NM_007399 [mRNA], NT_039474 [genomisch]). Auch zwischen Mensch und Ratte (NW_047799) besteht zwischen Position 60 und 501 der ADAM10 cDNA eine 77%ige Übereinstimmung (nicht in der Abbildung gezeigt). Darüberhinaus sind die Sequenzen der (vorhergesagten) ADAM10 5'UTRs des Rhesusaffen und des Schimpansen in hohem Maße identisch (97% bzw. 98%) mit der Basenfolge der humanen 5'UTR von ADAM10 (vgl. Abbildung 9, D). Eine EST („expressed sequence tags“) Analyse zeigte, von einer kürzeren 5'UTR bedingt durch das Fehlen der ersten 13 Nukleotide abgesehen, eine identische Basenfolge eines EST-Klons aus menschlichem Milzgewebe (NCBI *Acc.No.* DA941750) hinsichtlich der ADAM10 5'UTR Sequenz. Die Sequenzidentitäten der 5'UTR in verschiedenen Spezies lassen auf eine allgemeine biologische Relevanz der Region hinsichtlich einer physiologischen Funktion schließen.

Die lange 5'UTR der ADAM10 mRNA und ihre speziellen Eigenschaften erinnern zudem sehr stark an die 5'UTR von BACE-1 (vgl. 4.2). Die BACE-1 5'UTR spielt für die Unterdrückung der Translation von BACE-1 eine wichtige Rolle (De Pietri Tonelli et al., 2004; Lammich et al., 2004; Rogers et al., 2004; Zhou und Song, 2006).

A



B



C

```

Mensch 1      ←5'UTR→
GCGGCGGCAGGCCTAGCAGCACGGGAAC-CGTCCCCCGCGCGCATGCGC-GCGCCCTGA 58
|||||
Maus
GCGGCGG--GGCCTAGCGGCCCGGGCGCTCG-CCTCGGCACGCATGCGCATTATCCC-GG

Mensch 59
AGCGCCTGGGGGA-C-GGGTAGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGG-CTC-CGCGTGCCAGTT 114
|||||
Maus
GGCGCTTGGGGGAGCAGGG-CGGGGCGGGAGGCAGGGGTGCGGCCTCGCGAGTG-TA-TT

Mensch 115
GGGTGCCCG-CGCGT CACGTGGT GAGGAAGGAGGCGGAGGT CTGAGTTT CGAAGG-AGGG 172
|||||
Maus
GGGTG-CCGT CGCGT CACGTGGCGAGAAAGGAGGCGGAGGGCCGCGGCTC-AGGGAAGGG

Mensch 173
GGGAGAGAAGAGGGAAACGAGCAAGGGAAGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGGAA-ACGAA 231
|||||
Maus
GCTGAGACCAG-GCGAA-GAGCGAGGGCAGGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGGAAAGA-GGC

Mensch 232
CGAGGGGGAGGGAGGTCCCTGTTTTGGAGGAGCTA-GGAGCGTTGC-CGGCCCCTGAAGT 289
|||||
Maus
CGAGGGGGAGGGAGGGCCCTGTTTTGGCGGAGC-AGGGCGCGCGGCTGGGCCCTGAAGT

Mensch 290
GGAGCGAGAGGGAGGTGCTTCGCC-GTTTCTC-CTGCCAGGGGAGGTCCCGGCTCCCGT 347
|||||
Maus
GGAGCGAGAGGGAGGCGCTTCGCCGGGTGC-CACTGCC-GGGGAGG-CTC-G--T--CG-

Mensch 348
GGAGGCTCCGGACCAAGCCCTT CAGCTTCTCCCTCCGGATCGATGCTGCTGTAAAC 407
|||||
Maus
GGA--C--CC--AGC--G-CCGTC-GCGGCTCCCTCAGGATCGATGCACC GCGGTTAAC

Mensch 408
CGTGAGGAGGCGGCGGCGGCGG CAGCGG CAGCGGAAGATGGTGTGCTGAGAGTGTTAAT 467
|||||
Maus
CGTGAGGA-----GGCGGCGGC--C-G--G-GGAAGATGGTGTGCGCAGTGTTAAT

Mensch 468
TCTGCTCCTCTCCTGGGCGGCGGGATGGGAGGT 501
|||||
Maus
TCTGCTCCTCTCCTGGGCGGCGGGGCTGGGAGGT
    
```

D

```

Homo sapiens      ←5'UTR→
---GCGGCGGCAGGCCTAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCGCGCGCATGCGC-GCGCCCTG 57
-----TAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCGCGCGCATGCGC-GCGCCCTG 44
DA941750
Pan troglodytes
GAAGCGCGCGCAGGCCTAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCGCGCGCATGCGC-GCGCCCTG 60
AAGCGCTGGGGGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGCTCCCGTGCAGTTGGG 120
Macaca mulatta
---CGGCGGCGGGTCTAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCGCGCGCATGCGC-GCGCCCTG 56
*****

Homo sapiens
AAGCGCCTGGGGGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGCTCCCGTGCAGTTGGG 117
AAGCGCCTGGGGGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGCTCCCGTGCAGTTGGG 104
DA941750
Pan troglodytes
AAGCGCCTGGGGGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGCTCCCGTGCAGTTGGG 120
AAGCGCAGGGGGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGCTCCCGTGCAGTTGGG 116
Macaca mulatta
*****

Homo sapiens
TGCCCGCGCTACGTTGTTGAGGAAGGAGGCGGAGGCTGAGTTTCGAGGAGGGGGGA 177
DA941750
TGCCCGCGCTACGTTGTTGAGGAAGGAGGCGGAGGCTGAGTTTCGAGGAGGGGGGA 164
Pan troglodytes
TGCCCGCGCTACGTTGTTGAGGAAGGAGGCGGAGGCTGAGTTTCGAGGAGGGGGGA 180
Macaca mulatta
TGCCCGCGCTACGTTGTTGAGGAAGGAGGCGGAGGCTGAGTTTCGAGGAGGGGGGA 176
*****

Homo sapiens
GAGAAGAGGGAAACGAGCAAGGGAAGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGCAACGAGGG 237
DA941750
GAGAAGAGGGAAACGAGCAAGGGAAGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGCAACGAGGG 224
Pan troglodytes
GAGAAGAGGGAAACGAGCAAGGGAAGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGCAACGAGGG 240
Macaca mulatta
GAGAAGAGGGAAACGAGCAAGGGAAGGAAAGCGGGAAAGGAGGAAGCAACGAGGG 236
*****

Homo sapiens
GGAGGGAGGTCCTGTTTTGGAGGAGCTAGGAGCGTTGCCGCGCCCTGAGTGGAGCGAG 297
DA941750
GGAGGGAGGTCCTGTTTTGGAGGAGCTAGGAGCGTTGCCGCGCCCTGAGTGGAGCGAG 284
Pan troglodytes
GGAGGGAGGTCCTGTTTTGGAGGAGCTAGGAGCGTTGCCGCGCCCTGAGTGGAGCGAG 300
Macaca mulatta
GGAGGGAGGTCCTGTTTTGGAGGAGCTAGGAGCGTTGCCGCGCCCTGAGTGGAGCGAG 296
*****

Homo sapiens
AGGGAGGTGCTTCGCCGTTTCTCCTGCCAGGGAGGTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCTCCG 357
DA941750
AGGGAGGTGCTTCGCCGTTTCTCCTGCCAGGGAGGTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCTCCG 344
Pan troglodytes
AGGGAGGTGCTTCGCCGTTTCTCCTGCCAGGGAGGTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCTCCG 360
Macaca mulatta
AGGGAGGTGCTTCGCCGTTTCTCCTGCCAGGGAGGTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCTCCG 356
*****

Homo sapiens
GACCAAGCCCTTCAGCTTCTCCCTCCGGATCGATGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGG 417
DA941750
GACCAAGCCCTTCAGCTTCTCCCTCCGGATCGATGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGG 404
Pan troglodytes
GACCAAGCCCTTCAGCTTCTCCCTCCGGATCGATGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGG 420
Macaca mulatta
GACCAAGCCCTTCAGCTTCTCCCTCCGGATCGATGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGG 416
*****

Homo sapiens
CGCGCGCGCGGCGAGCGGCGGAGG 444
DA941750
CGCGCGCGCGGCGAGCGGCGGAGG 431
Pan troglodytes
CGCGCGCGCGGAGG----- 435
Macaca mulatta
CGCGCGCGCGGAGG----- 431
*****
    
```

Abbildung 9: Die Struktur der genomischen Region und der mRNA von ADAM10 sowie ein Sequenzvergleich der 5' untranslatierten Regionen (5'UTR) der ADAM10 cDNA verschiedener Spezies.

Teilabbildung **(A)** zeigt die Exon-Intron-Struktur der genomischen ADAM10-Region. Der für humanes ADAM10 kodierende genomische Bereich ist auf insgesamt 16 Exons verteilt und erstreckt sich auf in etwa 154 kb. Exon 1 umfasst die gesamte 5'UTR, einschließlich des Start-ATG und der für das Signalpeptid kodierenden Sequenz. Die Länge der 3'UTR (Exon 16) variiert. Weiße Lücken zwischen den Exons stehen für die Introns der genomischen ADAM10 Region.

(B) Schematisch dargestellt ist die mRNA des menschlichen ADAM10 mit einer 444 Nukleotide umfassenden 5'UTR, die zwei „upstream open reading frames“ (uORF) aufweist (rot und blau markiert) und GC-reich ist. Die für die ADAM10-Metalloprotease (748 AS) kodierende Sequenz (ADAM10 ORF) umfasst 2247 Nukleotide. Der Translationsstartpunkt (AUG) ist mit einem Eckpfeil markiert. Die 3'UTR variiert zwischen einer Länge von 694 und 1236 Nukleotiden. Die mRNA wird von der 5'-Cap-Struktur (m⁷G) und dem Poly-(A)⁺-Schwanz flankiert. **(C)** Ein Vergleich der ersten 500 Nukleotide der humanen ADAM10 cDNA mit der korrespondierenden murinen ADAM10 Sequenz ergab eine Homologie von 77% (Prinzen et al., 2005). Die Start- und Stop-Kodons der uORFs der 5'UTR sind grün bzw. rot markiert.

Teilabbildung **(D)** vergleicht die Nukleotidsequenz der humanen ADAM10 5'UTR (1-444) mit den korrelierenden 5'UTR Sequenzen des Schimpansen (*Pan troglodytes*; NCBI-Referenzsequenz XM_001172405.1, GI:114657268) und des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*; NCBI-Referenzsequenz XM_001097016.1, GI:109081291). Die Analyse ergab Sequenzidentitäten von 98% bzw. 97% (durch Sternchen* angezeigt). Zusätzlich erweist sich die um 13 Nukleotide verkürzte ADAM10 5'UTR eines EST-Klons aus menschlichem Milzgewebe (NCBI: DA941750) als sequenzidentisch. Der Translationsstartpunkt des ADAM10 ORF liegt an Position 445 (nicht angezeigt), das heißt, die 5'UTR endet mit der Purinbase an Position 444 unmittelbar vor dem Start-ATG des ORF. Aus der humanen ADAM10 cDNA (NCBI: NM_001110, AF09615) ergibt sich der Transkriptionsstartpunkt an Position 1, also dem Beginn der 5'UTR (unterbrochener Pfeil). Die zwei konservierten uORFs an den Positionen 43-78 und 391-405 sind jeweils durch Unterstreichen hervorgehoben. Die vergleichende Analyse der Sequenzen geschah mit Hilfe der Anwendung BLASTTM Align des NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

3.2 Die ADAM10 5'UTR ist ubiquitär exprimiert

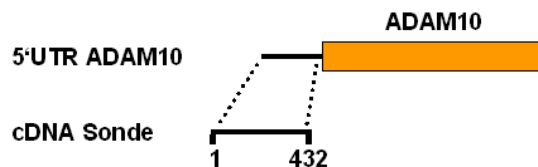
Die α -Sekretase ADAM10 ist in diversen humanen Zelltypen exprimiert. Auf mRNA-Ebene konnten Northern Blot Experimente zwei verschiedene Transkripte von 4,4 kb und 3,2 kb Länge in unterschiedlichen Gewebetypen identifizieren (Howard et al., 1996). Für die vorliegende Arbeit war nun von besonderer Bedeutung, dass die genomische Region der 5'UTR von ADAM10 in mRNA transkribiert wird und damit Teil des Transkriptes ist. Dies wurde experimentell untersucht.

Die Expression der 5'UTR wurde mittels Northern Blot Analyse überprüft: Eine „Multiple Tissue Northern Blot“-Membran (MTN-Blot) wurde mittels einer radioaktiv markierten Sonde, die für die 5'UTR von ADAM10 kodiert, analysiert. Die cDNA-Sonde bestand fast aus der gesamten 5'UTR-Sequenz (vgl. Abbildung 10, A) und sollte, falls diese im Gewebe als Teil des Transkriptes exprimiert wird, mit der mRNA von ADAM10 hybridisieren. Ein MTN-Blot ist eine Nylonmembran, die auf verschiedenen Spuren je ca. 2 µg poly-(A)⁺-RNA, also Gesamt-mRNA, aus verschiedenen humanen Gewebetypen enthält. So kann mit Hilfe einer spezifischen Sonde die Existenz des Transkriptes, nach dem gesucht wird, in diversen Gewebeproben überprüft werden.

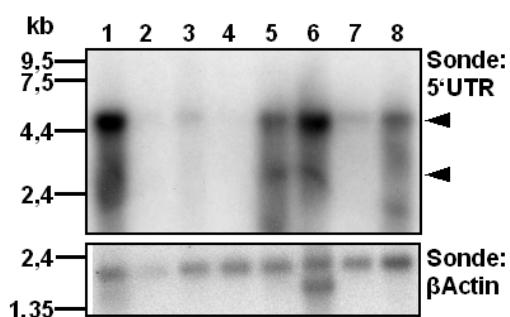
In nahezu jedem Organgewebe konnte die mRNA von ADAM10 detektiert werden (vgl. Abbildung 10, B+C). Besonders starke Expression zeigte sich in Herz, Leber, Skelettmuskulatur und Pankreas. Auch in diesem Experiment erschienen zwei unterschiedliche Transkripte, die auf einer Höhe von ca. 4,4 bzw. 3,2 kb nachgewiesen wurden und im Gewebe unterschiedlich verteilt waren. Beispielsweise war das kürzere ADAM10 Transkript in Nierenzellen weitaus weniger vorhanden als in Leber- oder Skelettmuskelzellen. Wahrscheinlich sind Differenzen in der Länge der 3'UTR, die ja auch Teil des Transkriptes ist, für die unterschiedlichen ADAM10 mRNAs verantwortlich. Des Weiteren waren deutlich verschiedene Signalstärken im Vergleich der Spuren untereinander feststellbar. So war die Expression von ADAM10 im Hirngewebe nur schwach nachweisbar. Zum einen lag dies an einer natürlich unterschiedlich stark ausgeprägten ADAM10 Expression in verschiedenen Gewebetypen. Andererseits war in der Spur, die mit Hirn-poly-(A)⁺-RNA beladen war, deutlich weniger Gesamt-mRNA aufgetragen, laut Herstellerangaben lediglich 1/10 der in den anderen Spuren eingesetzten Menge, also ca. nur 0,2 µg. Hybridisierte man denselben Blot mit einer Sonde, die ein in jedem Gewebe etwa gleichstark exprimiertes Transkript erkennt, wie beispielsweise β-Actin, so wurde dies verdeutlicht (vgl. Abbildung 10, C). Im Falle eines gleichmäßig beladenen MTN-Blots sollte also ein deutlich stärkeres Signal des ADAM10-Transkriptes zu erwarten sein. Ein in einem weiteren Experiment genutzter, neuer und korrekt beladener Blot konnte dies bestätigen (vgl. Abbildung 10, C).

Fazit ist, dass die Sonde, die spezifisch an die 5'UTR von ADAM10 bindet, die ADAM10 Transkripte im MTN-Blot erkennt und somit der 5'-untranslatierte Bereich tatsächlich Teil der ADAM10 mRNA im humanen Gewebe ist. Die 5'UTR ist demnach als Teil des ADAM10 Transkriptes ubiquitär exprimiert.

A



B



C

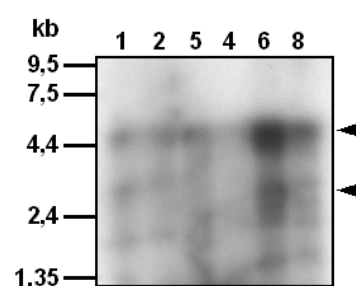


Abbildung 10: Die ADAM10-mRNA-Expression in unterschiedlichem humanem Organgewebe

Zur Analyse der mRNA Expression von humanem ADAM10 wurden kommerziell erworbene MTN-Blots über Nacht mit einer radioaktiv gelabelten cDNA-Sonde hybridisiert. **(A)** Die Sonde umfasste die Nukleotide 1-432 der 5'UTR von ADAM10. Nach verschiedenen Waschschrritten wurde in einer Kassette ein Film belichtet und so die hybridisierte, radioaktiv markierte Sonde detektiert. **(B+C)** Die ADAM10-Expression in Form beider bekannten Transkripte (Pfeilspitzen, ca. 4,4 und 3,2 kb) konnte somit in nahezu allen geladenen Gewebetypen unterschiedlich stark nachgewiesen und die Präsenz der 5'UTR in der mRNA von ADAM10 bewiesen werden. Andere detektierte Banden könnten auf weitere, bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Transkripte schließen lassen. Auf die Membranen geladen war isolierte poly-(A)⁺-RNA aus Gewebe folgender Organe: Herz (1), Hirn (2), Plazenta (3), Lunge (4), Leber (5), Skelettmuskulatur (6), Niere (7) und Pankreas (8). Gezeigt sind zwei unterschiedliche „Multiple Tissue Northern Blots“ zweier unabhängiger Experimente. In **(C)** wurde, nach Hybridisierung der 5'UTR-cDNA-Sonde und abgeschlossener Analyse, der Blot gereinigt und zur Veranschaulichung und Überprüfung der vom Hersteller geladenen mRNA-Mengen mit einer β -Actin-Sonde beschickt. Zu beachten ist die geringere Beladung des Blots mit aus humanem Hirn isolierter poly-(A)⁺-RNA (Spur 2).

3.3 Expression und Nachweis von ADAM10

Physiologisch finden sich die höchsten Expressionsspiegel von ADAM10 Protein vor allem in Hirn- und Lungengewebe, des Weiteren in (Herz-) Muskulatur, peripheren Nerven, Milz und Nebenniere (Chantry und Glynn, 1990; Howard et al., 1996). Nachgewiesen wurde in diesen Experimenten vor allem die prozessierte, mature Form von Säugetier-ADAM10 mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa.

Um die Beeinflussung der Expression von ADAM10 durch seine 5'UTR zu untersuchen, musste jedoch der kodierende Bereich mit seiner 5'UTR verschieden modifiziert und exogen einem biologischen System, im vorliegenden Fall eukaryoten Zellen, zugeführt werden. Anschließend wurden die Proteinlevel analysiert. Dabei ist zu bemerken, dass die Überexpression von ADAM10 zu erhöhten immaturren ADAM10 Proteinmengen führt. Auch in der Literatur ist diese Beobachtung für die Überexpression der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 bereits beschrieben (Lammich et al., 1999; Borroto et al., 2003; Villanueva de la Torre et al., 2004; Bech-Serra et al., 2006). Die Zellen sind wahrscheinlich nicht in der Lage, für eine Maturierung der überexprimierten Proteine zu sorgen. Dies kann beispielsweise durch das Fehlen wichtiger Faktoren für die Maturierung begründet sein (vgl. auch 4.1). Die transfizierten Zellen wurden immer zum selben Zeitpunkt (24h nach Transfektion) der Proteinanalyse unterzogen. Eventuelle Differenzen, die auf unterschiedlichem Maturierungsverhalten von exogenen ADAM10 beruhen könnten, konnten auf diese Weise nahezu ausgeschlossen werden. Somit war ein Vergleich der verschieden modifizierten ADAM10 Konstrukte hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Proteinexpression gut möglich.

3.3.1 Die 5'UTR unterdrückt die Proteinexpression von ADAM10

Zunächst wurden die beiden Konstrukte „5'UTR ADAM10“ und „ADAM10“ (vgl. Abbildung 5) in gleichen DNA-Mengen in HEK 293 Zellen transient transfiziert. Überexprimiertes ADAM10 ließ sich in seiner immaturren Form bei ca. 98 kDa im Western Blot gut nachweisen. Das zur Transfektionskontrolle parallel transfizierte GFP konnte bei ca. 30 kDa, endogenes β -Actin

bei ca. 43 kDa detektiert werden. Abbildung 11 (A, B) zeigt das im Western Blot detektierte Bandenmuster.

Bereits in diesem Versuch wurde ein Unterschied in der ADAM10 Proteinexpression der transfizierten Konstrukte deutlich: In der Spur der Zellen, die mit dem ADAM10 Konstrukt ohne 5'UTR transfiziert worden waren, war signifikant mehr Protein detektierbar als nach Transfektion des 5'UTR ADAM10 Konstrukts. Mittels der Co-Transfektion von GFP ließ sich ausschließen, dass die Unterschiede in der Proteinexpression von exogen zugeführtem ADAM10 auf etwaigen Unterschieden der Transfektionseffizienz oder eingesetzter DNA-Mengen beruhen. Die GFP-Signale unterscheiden sich nicht. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt aufgrund des Einsatzes unterschiedlicher Mengen an Proteinlysate im SDS-PAGE zustande kommt, wurde in einigen Experimenten parallel β -Actin detektiert, ein ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimiertes Strukturprotein. Die Kontrollspur zeigt zudem, dass der verwendete Erstantikörper, Anti-V5, spezifisch das exogene, transfizierte ADAM10 erkennt.

In zahlreichen Experimenten konnte dieser Effekt der unterschiedlichen Expression von ADAM10 in mit diesen beiden Konstrukten transfizierten HEK 293 Zellen reproduziert werden.

Der beobachtete Effekt der unterschiedlichen Proteinexpression, der durch die ADAM10 5'UTR hervorgerufen wird, sollte quantitativ analysiert werden. Abbildung 11 (C) zeigt die Ergebnisse der vergleichenden Quantifizierung im Diagramm. Dabei ist die Grafik nicht etwa mit dem Ergebnis einer Western Blot Analyse gleichzusetzen. Vielmehr handelt es sich um Durchschnittswerte von sechs kompletten Experimentalreihen. Die ADAM10 Proteinsignale wurden direkt auf GFP und auf gleichzeitig detektiertes (endogenes) β -Actin normiert. Die Messung ergab, dass die 5'UTR zu einem Abfall der ADAM10 Proteinexpression um durchschnittlich ca. 66% führt ($MW_{ADAM10 (-5'UTR)}$: 2,99 +/- 0,62; n=6). ADAM10, ohne seine 5'UTR überexprimiert, bewirkt also 3fach höhere Proteinlevel als das ADAM10 Konstrukt mit 5'UTR.

Die Experimente zeigten, dass die 5'UTR in wesentlichem Maße die Proteinexpression von ADAM10 beeinflusst.

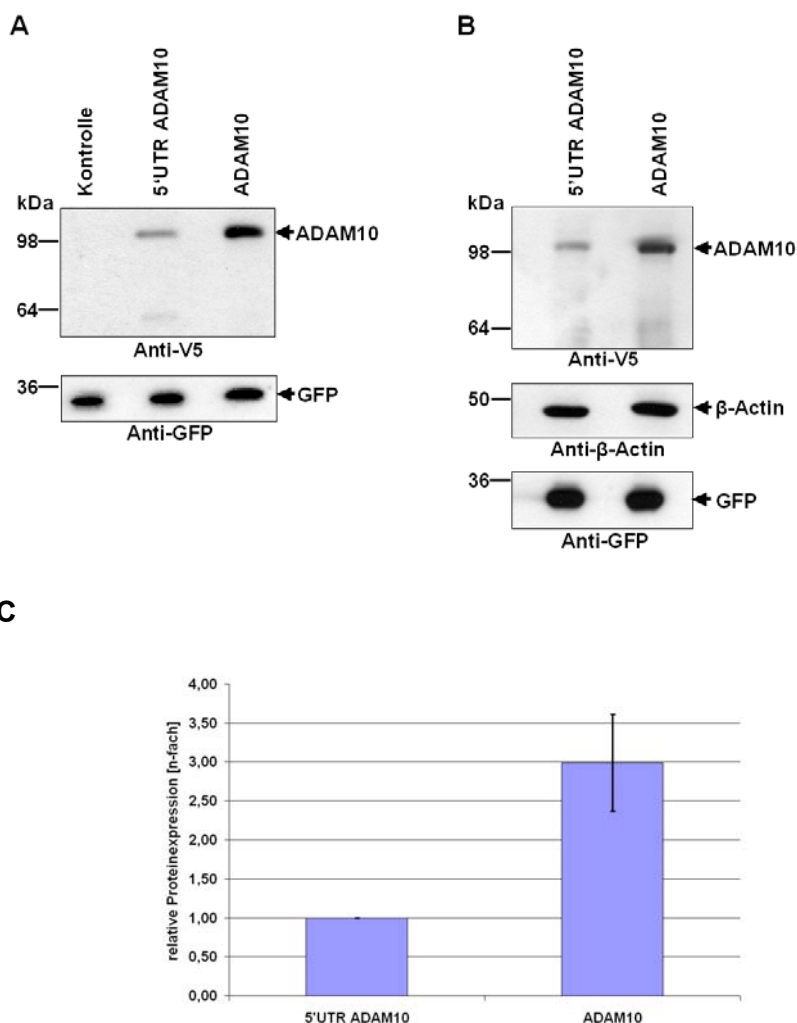


Abbildung 11: Detektion und Quantifizierung von transient transfiziertem ADAM10 mittels Western Blot

HEK 293 Zellen wurden mittels Lipofectamine™ 2000 mit 8 µg bzw. 0,1 µg Plasmid-DNA (ADAM10, 5'UTR ADAM10 Konstrukte und pEGFP-1) transient transfiziert, 24h später geerntet und lysiert. Nach Proteinbestimmung wurden gleiche Mengen Proteinlysate mittels 8% und 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgten Proteintransfer auf eine PVDF-Membran, Blockierung und Inkubation im jeweiligen Erst- und Zweitantikörper (Angabe unter dem jeweiligen Blot-Bild). Abgebildet ist der durch Chemolumineszenz belichtete Röntgenfilm. **(A)** Auf der Kontrollspur (Kontrolle) ist Lysat eines lediglich mit GFP transfizierten Zellansatzes, der gleichermaßen behandelt wurde, geladen. Der V5-Antikörper erkennt somit spezifisch exogenes ADAM10. **(B)** Anderer, unabhängiger Ansatz des gleichen Experiments. Zusätzlich wurde mittels β-Actin-Antikörper endogenes β-Actin bei etwa 43 kDa nachgewiesen, um den Einsatz gleicher Mengen Protein im SDS-PAGE zu verdeutlichen. **(C)** Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem FluorChem™ 8900 System. Die durch den V5-Antikörper detektierten Signale von exogenem ADAM10 wurden auf das jeweilige GFP-Signal (Transfektionskontrolle) und endogenes β-Actin (Ladekontrolle) auf der gleichen Membran im jeweiligen Versuch normiert. Zur Auswertung wurden die Messwerte für 5'UTR ADAM10 gleich dem Wert 1 gesetzt und die Messwerte der ADAM10 Konstrukte darauf bezogen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) der relativen Proteinexpression von sechs unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Die 5'UTR hat keinen Einfluss auf die Transkription von ADAM10

Mittels der qRT-PCR-Methode (vgl. 2.3.4.4) und Nutzung spezifischer Primerpaare (vgl. 2.2.2.3) wurden die mRNA Mengen von überexprimiertem ADAM10 mit und ohne 5'UTR gemessen und miteinander verglichen. Die erhaltenen ct-Werte wurden auf die ct-Werte des endogenen, nicht regulierten GAPDH normiert.

Es zeigte sich, dass sich die Konstrukte 5'UTR ADAM10 und ADAM10 hinsichtlich ihrer mRNA Expression nicht signifikant unterscheiden: Im Vergleich zum Konstrukt mit 5'UTR ist die mRNA Expression des Konstrukts ohne 5'UTR im Mittel etwas gesenkt (MW_{ADAM10} : 0,82; SD: 0,25). Vergleicht man das Expressionsbild mit den Proteinmessungen, wird deutlich, dass der Anstieg an ADAM10 Protein durch das Konstrukt ohne 5'UTR nicht durch einen Anstieg an ADAM10 mRNA begründet werden kann. Fehlt die 5'UTR, so ist sogar etwas weniger ADAM10 mRNA messbar als im Vergleichskonstrukt mit 5'UTR. Es muss sich also um einen translationalen Effekt handeln, der zu dem gemessenen Unterschied in der ADAM10 Proteinexpression führt.

Folgende Abbildung zeigt die relative Transkriptexpression der beiden Konstrukte:

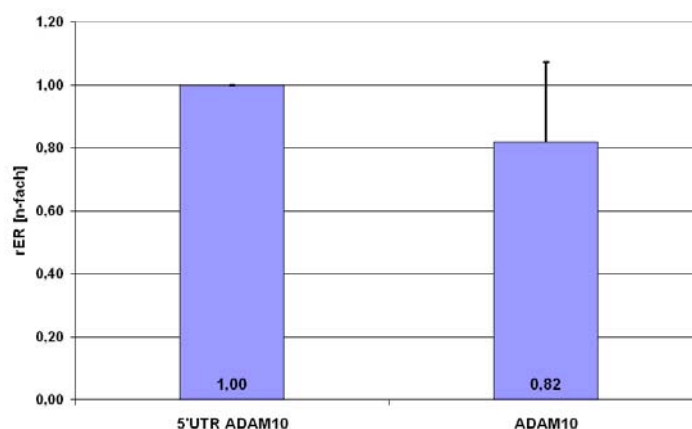


Abbildung 12: Relative mRNA Expression der 5'UTR ADAM10 und ADAM10 Konstrukte in HEK 293 Zellen

HEK 293 Zellen wurden mit den Vektorkonstrukten, die ADAM10 mit und ohne 5'UTR enthielten, transient transfiziert. 24 h nach Transfektion und einmaligem Mediumwechsel wurde die Gesamt-Zell-RNA isoliert und mit DNase verdaut. Der cDNA-Erststrang wurde mittels Oligo(dT)-Primern synthetisiert und die qRT-PCR durchgeführt. Die Messung erfolgte in Triplikaten, die ct-Werte wurden auf den jeweiligen GAPDH-ct-Referenzwert normiert. Angegeben ist der Mittelwert (MW) der relativen RNA-Expression (rER: „relative expression ratio“) des ADAM10 Konstrukts bezogen auf den auf 1 gesetzten Wert des Konstrukts 5'UTR ADAM10 aus mindestens 6 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung (SD) ist als Fehlerbalken angegeben.

3.3.3 Die Unterdrückung der ADAM10 Translation durch die 5'UTR ist nicht Zelltyp-spezifisch

Es stellte sich die Frage, ob der beobachtete Effekt spezifisch für die Expression von exogenem ADAM10 in der verwendeten Zelllinie HEK 293 ist. Um diese Frage zu klären, wurden weitere Zelllinien zur Transfektion der beiden Konstrukte ADAM10 und 5'UTR ADAM10 eingesetzt. Zum Einsatz kamen COS-7 Zellen („African green monkey kidney“) (Gluzman, 1981) sowie die menschliche, neuronale Zelllinie SH-Sy5Y (Biedler et al., 1973). Die zwei weiteren Zelllinien wurden ebenfalls mit den beiden Konstrukten ADAM10 und 5'UTR ADAM10 sowie GFP transfiziert und auf die gleiche Weise analysiert wie zuvor die HEK 293 Zellen. Auch hier zeigte sich der wesentliche Unterschied der transfizierten Konstrukte hinsichtlich der ADAM10 Proteinexpression:

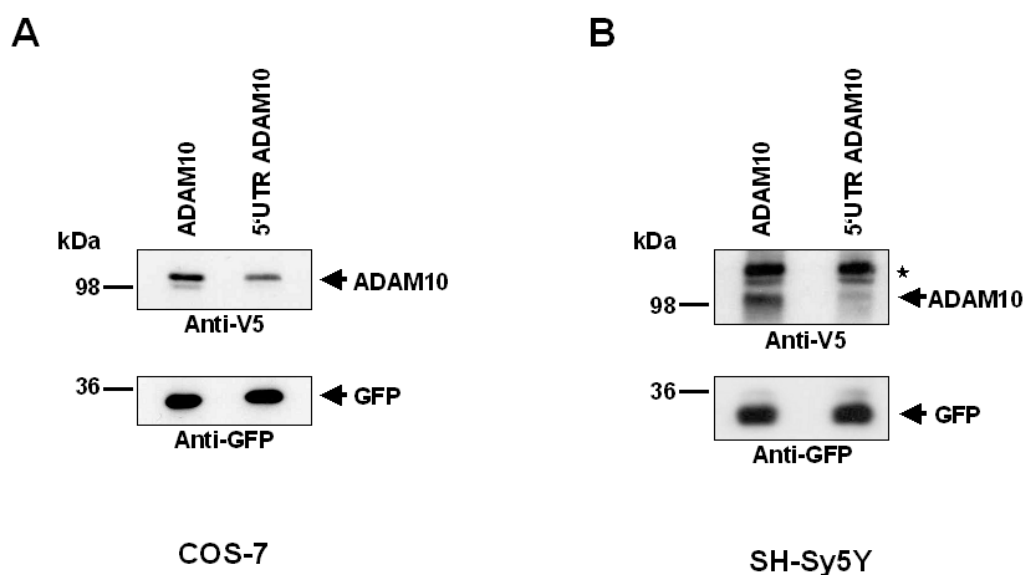


Abbildung 13: Transient transfizierte ADAM10 Konstrukte und ihre unterschiedliche Expression in verschiedenen Zelllinien

ADAM10 Plasmid-DNA (+/- 5'UTR) und pEGFP1 wurden transient in COS-7 und SH-Sy5Y Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion, Zellyse und Proteinbestimmung wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtprotein mittels 8% bzw. 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Exogenes ADAM10 konnte mittels monoklonalem V5-Antikörper, GFP als Transfektionskontrolle mittels monoklonalem GFP-Antikörper nachgewiesen werden.

Es zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Expression von exogenem ADAM10 in COS-7 Zellen (**A**) und in Zellen der Zelllinie SH-Sy5Y (**B**). Das Signal des immaturren ADAM10 konnte bei ca. 98 kDa nachgewiesen werden. Unspezifische Banden sind mit einem Stern markiert.

Auch in COS-7 und SH-Sy5Y Zellen ließ sich der oben beschriebene Effekt also nachweisen und reproduzieren. Die 5'UTR führt zur Repression von ADAM10. Dies lässt den Schluss zu, dass der beobachtete Unterschied nicht für HEK 293 Zellen spezifisch ist und auf andere Zelllinien, auch neuronaler Herkunft, übertragbar ist.

Die nachfolgenden Experimente wurden in der weiteren Arbeit mit HEK 293 Zellen fortgesetzt.

3.3.4 Spezielle Eigenschaften der 5'UTR bestimmen die ADAM10 Proteinexpression

3.3.4.1 Die uORFs der 5'UTR sind nicht an der Translationskontrolle von ADAM10 beteiligt

In weiteren 5'UTR ADAM10 Konstrukten wurden die Start-ATGs der uORFs durch Punktmutation verändert und damit als potentielle Startpunkte der Translationsinitiation für das „scannende“ Ribosom ausgeschaltet (vgl. 2.3.2.1.2 und 2.3.3.2.1). Ein Einfluss von uORFs auf die Translation des nachgeschalteten Hauptleserahmens ist z.B. für Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle im Aminosäurehaushalt eukaryotischer Organismen (Hefen und Vertebraten) spielen, beschrieben worden (Hinnebusch, 1996, 1997; Harding et al., 2000; Vatter und Wek, 2004). Die Translationsinitiation an solchen offenen Leserahmen kann entweder zur Translationstermination und Re-Initiation durch das Ribosom oder aber zur Synthese eines N-terminal verlängerten Proteinendprodukts führen. Auch eine komplette Termination mit nachfolgender Dissoziation des Ribosoms vom Transkript ist denkbar (Meijer und Thomas, 2002). Darüberhinaus sind Krankheiten bekannt, die durch Einfügung oder Verlust eines uORF durch Mutation bedingt sind (Wiestner et al., 1998; Liu et al., 1999). Solche uORF können die Translation des nachgeschalteten Hauptleserahmens unmittelbar beeinflussen. Daher sollten die uORFs der ADAM10 5'UTR hinsichtlich ihrer Rolle in der ADAM10 Proteinexpression untersucht werden. Die Plasmidkonstrukte mit mutierten Startkodons der uORFs (vgl. Abbildung 6) wurden transient in HEK 293 Zellen transfiziert und die Zellen anschließend hinsichtlich ihrer exogenen ADAM10 Expression analysiert. Abbildung 14 (A) stellt repräsentativ einen Western Blot eines Experiments dar.

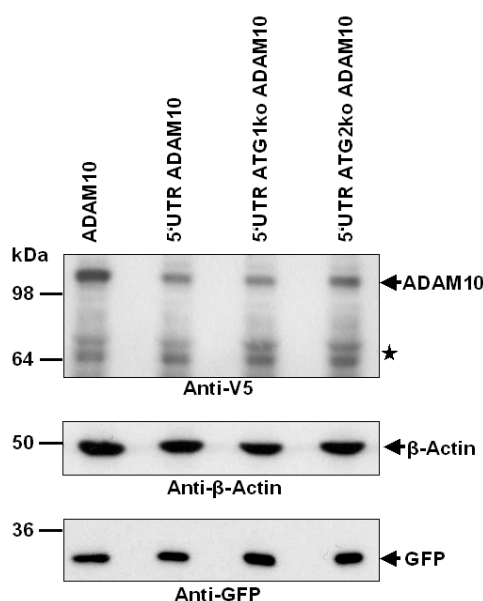
Während der Unterschied in der exogenen ADAM10 Proteinexpression im Falle der beiden Konstrukte mit und ohne 5'UTR wieder deutlich in Erscheinung tritt, lässt sich aus Abbildung 14 entnehmen, dass die in der 5'UTR vorhandenen uORFs keine Rolle für die geringere

Expression von ADAM10 durch seine 5'UTR spielen.

In der Quantifizierung (Abbildung 14, B) mehrerer unabhängiger Experimente mit den mutierten Start-ATG-Konstrukten bestätigte sich dieses Ergebnis: Die Mutation jedes einzelnen ATGs der uORFs führte im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt zu keiner signifikanten Änderung in der Proteinexpression von ADAM10. Falls die offenen Leserahmen jedoch eine Rolle hinsichtlich des Effekts der translationalen Repression der ADAM10 Proteinexpression spielen sollten, so wäre eigentlich ein gegenteiliges Ergebnis zu erwarten gewesen: Nach Mutation sollte die Proteinexpression deutlich ansteigen. Dies war nicht der Fall. Die uORFs haben demnach keinen funktionellen Einfluss auf die ADAM10 Translation und können nicht als Erklärung für die beobachtete Unterdrückung der ADAM10 Proteinexpression durch die 5'UTR dienen.

Abbildung 14 (C) zeigt die Quantifizierung der korrelierenden mRNA Expression mittels qRT-PCR nach Transfektion der Konstrukte in HEK 293 Zellen. Die Experimente wurden in exakt gleicher Weise durchgeführt wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Messwerte der Konstrukte wurden gebildet und relativ auf den auf 100% (=1) gesetzten Wert des Konstrukts 5'UTR ADAM10 bezogen. Es zeigte sich, dass die Konstrukte mit mutierten Start-ATGs ihrer uORFs auf RNA-Ebene im Vergleich zum Vollängen-5'UTR-Konstrukt im Durchschnitt etwas vermindert exprimiert waren. Die Mutation führte also auch auf transkriptioneller Ebene zu keinerlei Anstieg der ADAM10 Expression.

A



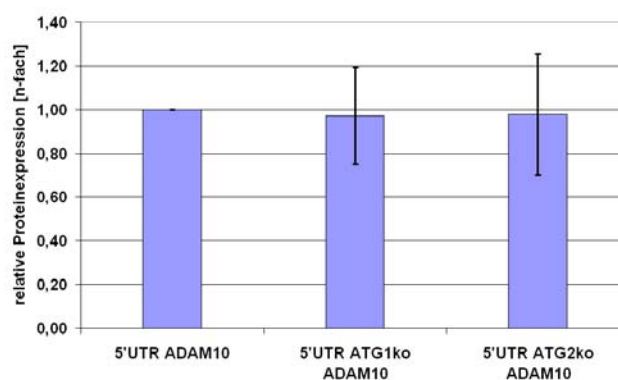
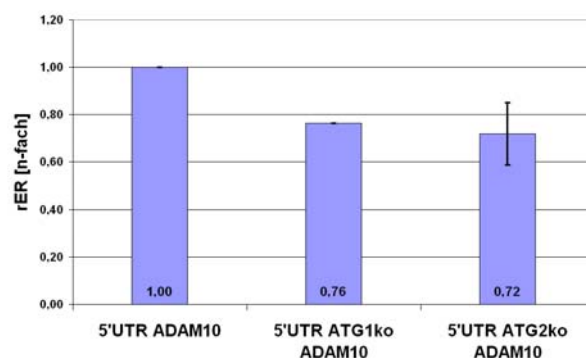
B**C**

Abbildung 14: Die Expression von ADAM10 nach Transfektion der 5'UTR ATGko ADAM10 Konstrukte

Proteinlysate von HEK 293 Zellen, die 24h vor ihrer Ernte mit gleichen DNA-Mengen der beschriebenen Konstrukte bzw. GFP transfiziert worden waren, wurden mittels BCA Protein Assay auf gleiche Konzentrationen eingestellt und mit Hilfe 8% bzw. 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot **(A)** waren das exogene ADAM10 durch Nachweis mit dem V5-Antikörper, endogenes β -Actin mit Anti- β -Actin-Antikörper zur Demonstration des Einsatzes gleicher Proteinmengen und parallel transfiziertes GFP mit dem GFP-Antikörper zur Transfektionskontrolle nachweisbar. Unspezifische Banden sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. **(B)** Quantitative Analyse der Proteinlevel. Der Wert des Signals des 5'UTRwt ADAM10 Konstrukts ist 1 gesetzt. Die durch die Detektion mit dem V5-Antikörper gemessene Proteinexpression von exogenem ADAM10 wurde nun in jedem unabhängigen Experiment auf diesen Wert bezogen. Zuvor waren die Messwerte auf ihr jeweiliges GFP-Signal bzw. endogenes β -Actin-Signal normiert worden. Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Messwerte und Standardabweichungen von 3 verschiedenen, unabhängigen Translationsexperimenten.

(C) Relative mRNA Expression der ATG-ko-Konstrukte 24h nach Transfektion in HEK 293 Zellen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Die GAPDH-ct-Werte dienten der Normierung der ct-Werte der Proben. Das Konstrukt 5'UTR ADAM10 wurde auf den Wert 1 (=100%) gesetzt, angegeben sind die Mittelwerte (MW) der relativen RNA-Expression (rER) von 3 unabhängigen Experimenten.

Es lässt sich also daraus schließen, dass die offenen Leserahmen, die die 5'UTR aufweist, keinen Beitrag zum beobachteten Effekt der geringeren Expression von ADAM10 durch seine 5'UTR leisten. Weder auf translationaler, noch auf transkriptionaler Ebene sind die uORFs der 5'UTR dafür verantwortlich.

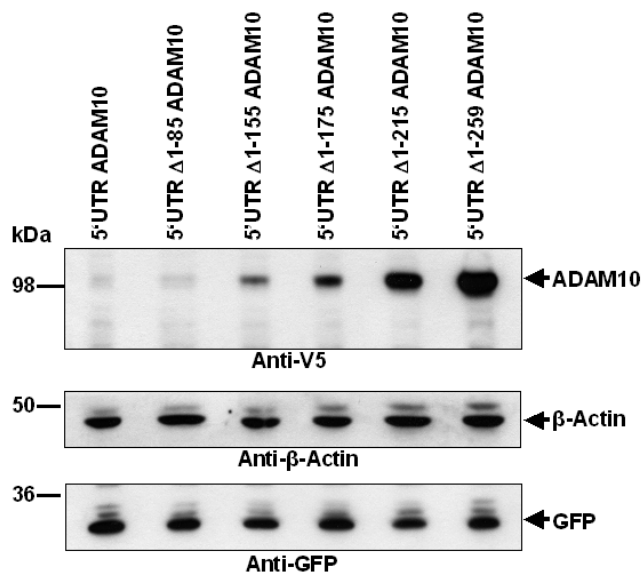
Demnach müssen wohl andere Eigenschaften der 5'UTR für die Unterdrückung der ADAM10 Translation verantwortlich sein. Ein hoher GC-Gehalt kann beispielsweise zur Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen führen und damit eine verminderte Proteinsynthese bedingen.

3.3.4.2 Die erste Hälfte der 5'UTR enthält ein die ADAM10 Translation unterdrückendes Element

Der hohe GC-Gehalt der 5'UTR lässt darauf schließen, dass die ADAM10 Translation durch komplexe Sekundärstrukturen innerhalb der 5'UTR beeinflusst werden könnte. Um Regionen der 5'UTR zu identifizieren, die von Bedeutung für die Translation des Leserahmens sind, wurde ein stufenweiser Deletionsansatz der 5'UTR versucht: Die 5'UTR wurde sequentiell an ihrem 5'-Ende bzw. an ihrem 3'-Ende verkürzt. Diese verschieden langen 5'UTR ADAM10 Deletionskonstrukte (vgl. 2.3.3.2.2) wurden ebenfalls in eukaryotischen Zellen überexprimiert und hinsichtlich der Expression von exogenem ADAM10 analysiert. Zunächst wurden die Konstrukte eingesetzt, deren 5'UTR an ihrem 5'-Ende unterschiedlich lang deletiert worden war (vgl. Abbildung 7, B). Die Experimente wurden in exakt gleicher Weise wie die vorhergehenden ADAM10 Proteinexpressionsanalysen durchgeführt.

Abbildung 15 (A) zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieses Experiments, (B) die Quantifizierung der unterschiedlichen Proteinexpression.

A



B

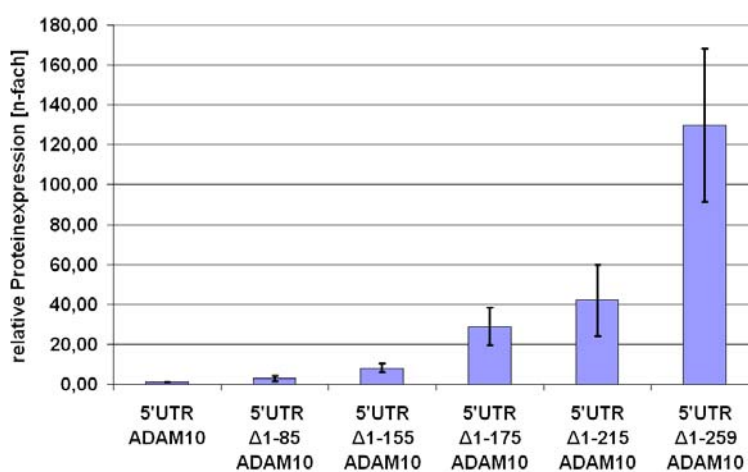


Abbildung 15: ADAM10 Proteinexpression nach Transfektion der 5'-Deletionsmutanten der 5'UTR

(A) Die Mengen an eingesetztem Proteinlysate wurden mittels BCA Protein Assay, nach transienter Transfektion der angegebenen Konstrukte in HEK 293 Zellen, Ernte und Lyse, angeglichen. Mittels 8% bzw. 10% SDS-PAGE wurden die Proteinlysate ihrer Größe nach aufgetrennt und exogenes ADAM10 im Western Blot mit dem V5-Antikörper detektiert (oberster Blot). Als Ladekontrolle wurde im mittleren und unteren Bereich des Blots β -Actin und zur Transfektionskontrolle GFP nachgewiesen.

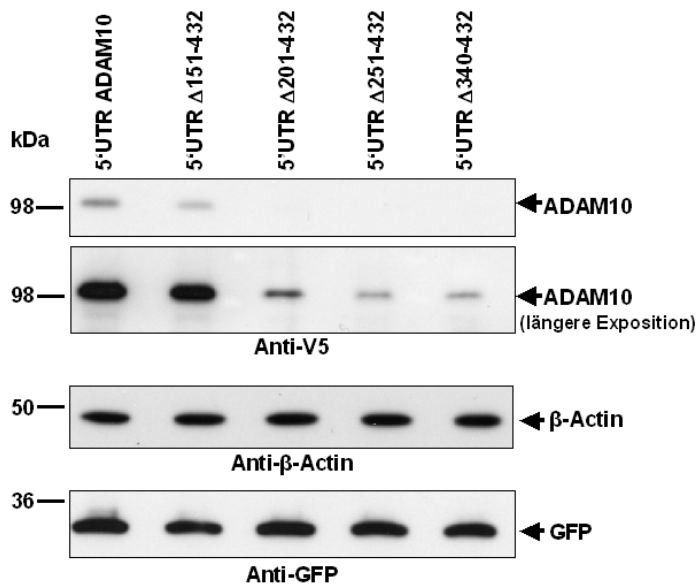
(B) Quantifizierung der Proteinexpression der 5'-Deletionsmutanten. Die quantitative Analyse erfolgte wie in Abbildung 11 (C) beschrieben. Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD, +/-) von mindestens n unabhängigen Experimenten sind angegeben (n s. Text). Alle Signale wurden zuvor innerhalb ihrer Messreihen auf das Signal des mittransfizierten GFP und endogenen β -Actins normiert.

Die Deletion der ersten 85 bp der 5'UTR wies für die Proteinexpression des Konstrukts im Mittel einen geringen Anstieg verglichen mit dem 5'UTR ADAM10 Konstrukt auf. Sind 155 bp am 5'-Ende deletiert, verachtfacht sich die exogene ADAM10 Expression im Vergleich zum 5'UTR-Wildtyp-Konstrukt breits (MW: 8,2 +/- 2,02; n=3). Fehlen nur 20 bp mehr, erhöht sich das detektierte Proteinsignal im Schnitt um das 28fache ($MW_{5'UTR \Delta 1-175 ADAM10}$: 28,94 +/- 9,42; n=3). Bei weiterer Deletion am 5'-Ende steigt die Expression gar auf das 40- bzw. knapp 130fache des Ausgangssignals des auf den Wert 1 gesetzten 5'UTR ADAM10 Konstruktes an ($MW_{5'UTR \Delta 1-215 ADAM10}$: 42,06 +/- 17,69; n=4; $MW_{5'UTR \Delta 1-259 ADAM10}$: 129,80 +/- 38,46; n=7). Es lassen sich also zwei Aussagen treffen: Es ist nicht nur ein signifikanter Effekt der 5'UTR auf die Expression von exogenem ADAM10 festzustellen, da durch ihre Anwesenheit im Konstrukt die detektierten Proteinlevel an ADAM10 deutlich gesenkt sind. Sondern es wird auch deutlich, dass durch Deletion der ersten Hälfte der 5'UTR die Expression von ADAM10 um ein Vielfaches gesteigert wird und die durch das Konstrukt ohne 5'UTR hervorgerufene Expression von ADAM10 Protein weit übersteigt. Die sukzessive Deletion der 5'UTR am 5'-Ende bis über die Hälfte der gesamten Region resultierte also in einem die zunehmende Verkürzung begleitenden, stufenweisen Anstieg an ADAM10 Protein.

Die mRNA Expressionsmengen sollen aus Gründen der Übersichtlichkeit weiter unten gemeinsam mit allen Deletionskonstrukten dargestellt werden.

Anschließend wurden die Konstrukte in ihrer ADAM10 Proteinexpression analysiert, die am 3'-Ende ihrer 5'UTR verschieden lang deletiert worden waren (vgl. Abbildung 7, A). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 16 (A). Wurden Teile der 5'UTR am 3'-Ende entfernt, so resultierte dies in einer noch stärkeren Unterdrückung der exogenen ADAM10 Proteinexpression im Vergleich zum transfizierten Konstrukt von ADAM10 mit unveränderter 5'UTR. Fehlte etwas weniger als die 3'-Hälfte der 5'UTR, so war die Expression im Mittel auf nur noch ca. 10% des Ausgangswertes des 5'UTR ADAM10 Konstruktes gesenkt ($MW_{5'UTR \Delta 251-432 ADAM10}$: 0,11; SD: 0,06). Ähnliche Werte erreichte auch das Konstrukt mit Deletion der letzten 90 Nukleotide der 5'UTR ($MW_{5'UTR \Delta 340-432 ADAM10}$: 0,08; SD: 0,07). Im Fall des Konstrukts 5'UTR $\Delta 201-432 ADAM10$, also unter Deletion von mehr als der 3'-Hälfte der 5'UTR, resultierte eine Reduktion der Proteinexpression um knapp 80% ($MW_{5'UTR \Delta 201-432 ADAM10}$: 0,23 SD: 0,12;). Interessanterweise führte das Konstrukt 5'UTR $\Delta 151-432 ADAM10$ zu keiner signifikanten Änderung der Proteinexpression im Vergleich zum 5'UTR Wildtyp Konstrukt. Abbildung 16 (B) zeigt die quantitative Proteinmessung. Vergleichskonstrukt zur Normierung ist das 5'UTR Wildtyp ADAM10 Konstrukt.

A



B

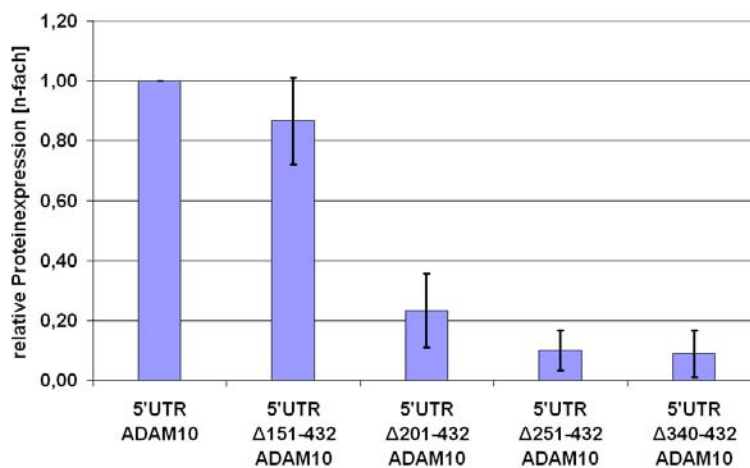


Abbildung 16: ADAM10 Proteinexpression nach Transfektion der am 3'-Ende der 5'UTR veränderten ADAM10 Konstrukte

Die angegebenen Konstrukte (vgl. Abbildung 7) wurden wie in den vorangegangenen Proteinexpressionsexperimenten transient in HEK 293 Zellen transfiziert und die Zellysate in gleichen Proteinmengen im SDS-PAGE aufgetrennt. ADAM10, β -Actin als Ladekontrolle und transfiziertes GFP wurden im Western Blot (A) detektiert (vgl. Abbildung 15, A). (B) Quantifizierung der Proteinexpression in sechs unabhängigen Experimenten. Zur Versuchsbeschreibung vgl. Abbildung 11 (C).

Die Ergebnisse der 3'-Deletionsmutanten stellen eine schlüssige Ergänzung der 5'-Deletionen dar. Wird mehr als die Hälfte der cDNA-Sequenz am 5'-Ende der 5'UTR entfernt (5'UTR Δ 1-259 ADAM10), so wird ein Maximum an ADAM10 exprimiert. Sollte also die für die beobachtete Inhibierung bedeutende Region wirklich auf dem 5'-Abschnitt der 5'UTR lokalisiert sein, so wäre für die 3' Deletionsmutanten eine geringere Expression zu erwarten. Dies ist der Fall. Die nahezu unveränderte Expression des Konstrukts mit einer 5'UTR von nur noch 150 Nukleotiden am 5'-Ende könnte auf der Deletion wichtiger inhibitorischer Elemente für die Translation beruhen.

Das Vielfache an ADAM10 Protein, das nach Transfektion des 5'UTR Δ 1-259 ADAM10 Konstrukts detektiert werden kann, ist damit natürlich nicht erklärt. Eine Erklärung hierfür könnten gewisse Sekundärstrukturen, die sich in der ADAM10 mRNA bilden könnten, leisten. Wahrscheinlich ist eine Kombination von verschiedenen Mechanismen der Translationsregulation für die gemessenen Unterschiede der ADAM10 Proteinexpression verantwortlich. Dies soll weiter unten in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

Dennoch musste natürlich ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Proteinmengen durch Unterschiede in der Transkription der ADAM10 Konstrukte hervorgerufen wurden. Dazu sollten auch für die Deletionskonstrukte die mRNA Expressionsmengen analysiert werden.

3.3.4.3 Die Transkriptmengen der 5'UTR Deletionskonstrukte unterscheiden sich nur schwach

Mittels qRT-PCR wurden die unterschiedlichen 5'UTR Deletionskonstrukte hinsichtlich ihrer Transkriptexpression analysiert. Abbildung 17 fasst die relativen Expressionsraten in Bezug auf die Werte des unveränderten 5'UTR ADAM10 Konstrukts zusammen.

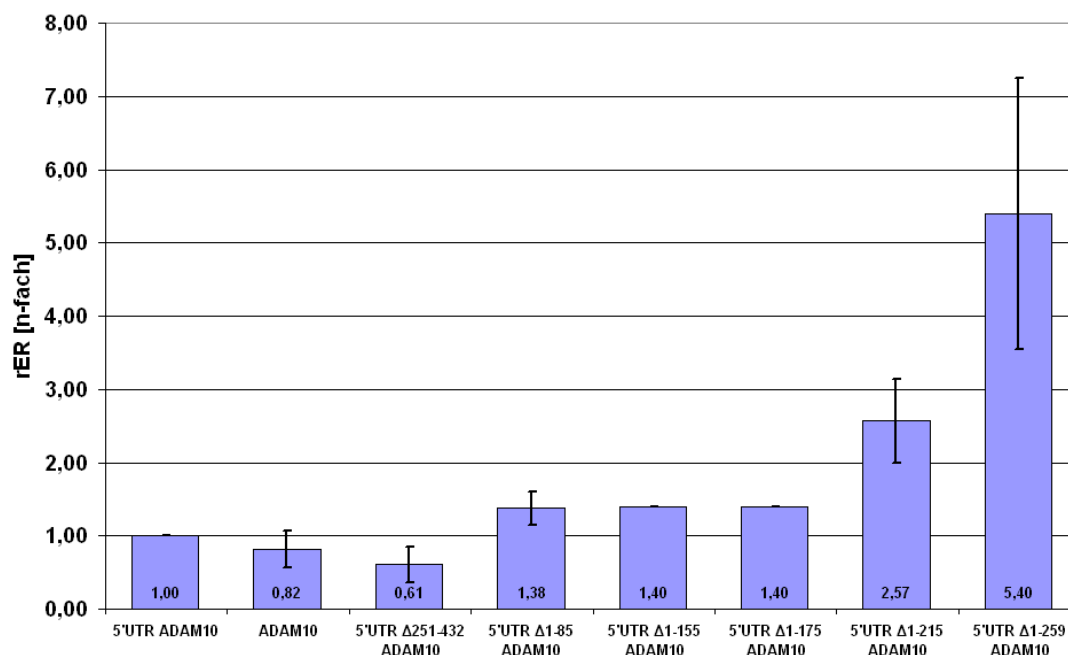


Abbildung 17: Relative mRNA Expression der 5'UTR ADAM10 Konstrukte in HEK 293 Zellen

Isolierte RNA wurde mittels qRT-PCR analysiert (s. Abbildung 12). Die Messung erfolgte in Triplikaten, die ct-Werte wurden auf den jeweiligen GAPDH-ct-Referenzwert normiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) der relativen RNA-Expression (rER) bezogen auf den auf 1 gesetzten Wert des Konstrukts 5'UTR ADAM10 aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (bzw. 1 Experiment für 5'UTR Δ1-155 und 1-175). Die Standardabweichungen (SD) sind als Fehlerbalken angegeben.

Wie schon weiter oben dargelegt, unterschieden sich die Konstrukte 5'UTR ADAM10 und ADAM10 hinsichtlich ihrer RNA-Expression nicht signifikant. Die 5'UTR führte zu keiner signifikanten ADAM10 Expressionsänderung ($MW_{5'UTR\ ADAM10}=1$, MW_{ADAM10} : 0,82; SD: 0,25). So wurde deutlich, dass der Anstieg an ADAM10 Protein durch das Konstrukt ohne 5'UTR wohl nicht durch einen Anstieg an ADAM10 mRNA begründet werden konnte.

Im Falle des Konstrukts mit deletierter 3'-Hälfte der 5'UTR ist die Expression auf im Mittel nur knapp 60% des Bezugswerts erniedrigt ($MW_{5'UTR\ \Delta 251-432\ ADAM10}$: 0,61; SD: 0,25). Das 5'UTR Δ251-432 ADAM10 Konstrukt kann hier als repräsentativ für den beobachteten Abfall der mRNA-Expression der 3'-Deletionsmutanten gelten.

Auch in der mRNA Expression steigen die gemessenen Werte für die Konstrukte mit am 5'-Ende deletierter 5'UTR konsekutiv an: Ist die Expression der Konstrukte mit bis zu 175 deletierten bp der 5'UTR am 5'-Ende noch auf das im Schnitt 1,4fache des 5'UTR ADAM10 Vergleichswerts gesteigert, so liegen die mRNA Mengen der Konstrukte mit 215 bzw. 259

deletierten Basen im Mittel in 2,6facher bzw. in etwa 5,4facher Menge vor. Ein solch moderater Anstieg der mRNA Expression kann aber nicht die massive, bis zu 42fach bzw. 130fach gesteigerte ADAM10 Proteinexpression erklären. Eine beispielsweise gesteigerte mRNA-Stabilität ist in diesem Fall als Erklärung unzureichend.

Die Messung der mRNA Expression der transient transfizierten Konstrukte in HEK 293 Zellen machte also deutlich: Hinsichtlich der Deletionsmutanten der 5'UTR, die eine massive Steigerung der ADAM10 Proteinexpression aufwiesen, ist der Effekt wahrscheinlich nicht durch die mäßige, nur bis zu 5fache Steigerung in der Transkription und folglich erhöhter mRNA Stabilität begründet. Demnach lassen diese Ergebnisse ebenfalls darauf schließen, dass die ersten 259 Nukleotide der ADAM10 5'UTR ein starkes, die Translation unterdrückendes Element beinhalten. Der 3'-Teil weist dagegen eine die ADAM10 Translation eher aktivierende Wirkung auf.

3.4 Die Effekte der 5'UTR und ihrer mutierten Varianten sind auf die Translation eines Reportergens übertragbar

Zur weiteren Bestätigung der beobachteten Effekte wurde untersucht, ob die 5'UTR und ihre Mutationen die Translation der *Firefly*-Luciferase in ähnlicher Weise beeinträchtigen.

Um herauszufinden, ob bestimmte (angrenzende) Genregionen einen Einfluss auf die Expression eines stromauf- oder abwärts kodierten Proteins ausüben, kann man nicht nur die Expression des kontrollierten Proteins selbst messen, sondern einen eventuellen regulatorischen Effekt auch auf ein sogenanntes „Reportergen“ übertragen und dessen Expression unter dem Einfluss der zu untersuchenden regulatorischen Sequenz bestimmen. Diese Untersuchung geschah nach Transfektion verschieden klonierter *Firefly*-Luciferase Reportergenkonstrukte (mit, ohne und mit mutierter 5'UTR) in HEK 293 Zellen und anschließender Messung der Aktivität des Genprodukts. Falls also die 5'UTR von ADAM10 eine regulatorische Funktion auf das stromabwärts kodierte Protein ausübt, so müsste sich diese auf das Enzym *Firefly*-Luciferase übertragen lassen. Mit Hilfe des „Dual-Luciferase™ Reporter Assay System“ der Firma Promega konnten die *Firefly*-Luciferase Aktivitäten der einzelnen 5'UTR Luciferase Konstrukte gemessen, auf ihre *Renilla*-Luciferase Aktivität normiert und so miteinander verglichen werden. Im Reportergen-Experiment gilt demnach die Aktivität und damit die Menge des gebildeten Reporterenzym als direktes Maß für die

regulatorische Bedeutung der Sequenz für die Expression des Proteins.

Durch den Einsatz gleicher Mengen der (5'UTR) Luciferase Konstrukte bei der Transfektion und durch die Co-Transfektion des *Renilla*-Luciferase Vektors (phRL-Tk1) im gemeinsamen Ansatz wurde die Vergleichbarkeit der Proben hinsichtlich ihrer Luciferase Enzymaktivität gewährleistet. Die Messungen geschahen in drei- oder vierfacher Mehrfachbestimmung der einzelnen Proben auf 96-Well-Mikrotiterplatten im Luminometer mit automatischem Dispenser zur Substratbeimischung. Abbildung 8 stellt die eingesetzten Luciferase Konstrukte schematisch dar. Die relativen Luciferase Aktivitäten der Konstrukte sind in der folgenden Abbildung 18 wiedergegeben:

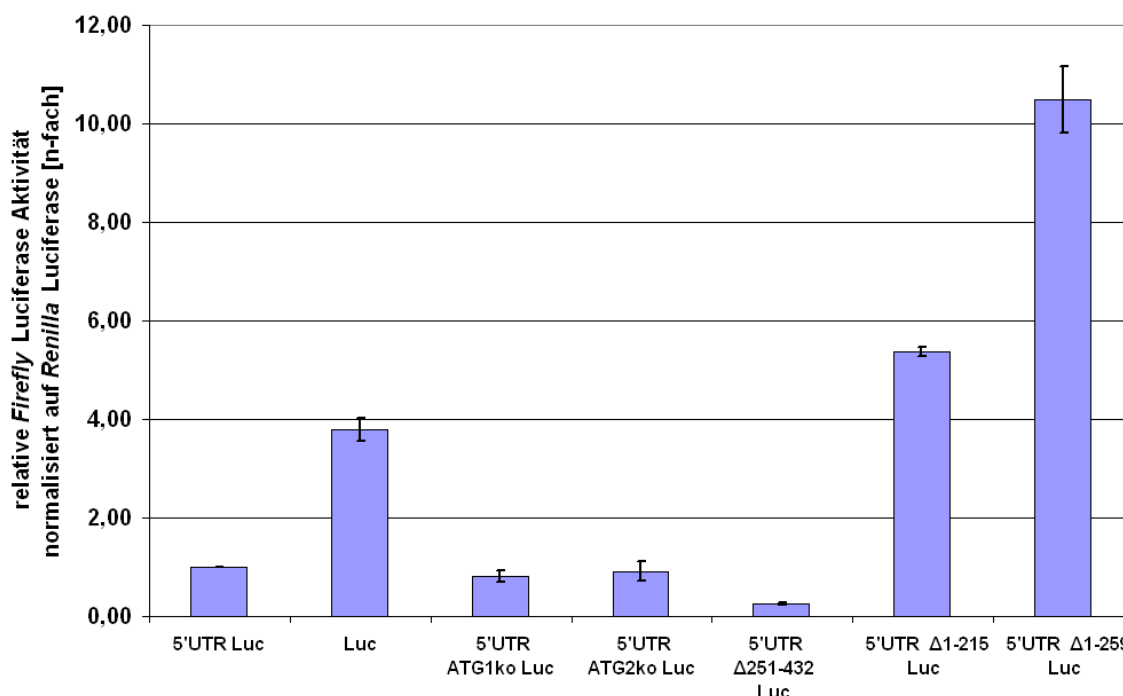


Abbildung 18: Relative Luciferase-Aktivitäten der 5'UTR Luciferase-Konstrukte

Die verschiedenen *Firefly*-Luciferase-Reportergen-Vektorkonstrukte wurden nach photometrischer Bestimmung ihrer DNA-Konzentrationen und Verifizierung durch Sequenzierung in gleichen Mengen in HEK 293 Zellen transient transfiziert. Dabei wurde zur späteren Normierung in allen Ansätzen der für *Renilla*-Luciferase kodierende Vektor phRL-Tk1 mittransfiziert. Nach einmaligem Mediumwechsel (6h nach Transfektion) wurden die Zellen 24h nach Transfektion gemäß Firmenprotokoll prozessiert und im Luminometer die Aktivitäten von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase gemessen. Durch die Normierung auf ihre jeweiligen *Renilla*-Luciferase-Signale konnten die gemessenen Aktivitäten der *Firefly*-Luciferase der einzelnen Konstrukte auf den auf 1 gesetzten Wert des Konstrukts „5'UTR Luc“ bezogen und als relative Vielfache dieser Aktivität dargestellt werden. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) dreier unabhängiger Experimente.

Auch im Reporterexperiment hat die 5'UTR von ADAM10 großen Einfluss auf die Proteinexpression des 3'-stromabwärts kodierten, überexprimierten Proteins. Die Luciferase Aktivität des Konstrukts ohne 5'UTR ist um das knapp 4fache im Vergleich zum Konstrukt mit 5'UTR gesteigert (MW: 3,80; SD: 0,24). Liegen die ATGs der uORFs mutiert vor, so hat dies keinen signifikanten Einfluss auf die Translation des für Luciferase kodierenden Bereichs (MW_{5'UTR ATG1ko Luc} : 0,81; SD: 0,12; MW_{5'UTR ATG2ko Luc} : 0,92; SD: 0,20). Dies korreliert gut mit den Ergebnissen bei Überexpression der 5'UTR ADAM10 Konstrukte, bei denen vergleichbare Verhältnisse gemessen wurden.

Auch im Luciferaseexperiment führt das Konstrukt mit deletierter 3'-Hälfte der 5'UTR zu einer minimalen Translation des Proteins (MW_{5'UTR Δ251-432 Luc} : 0,26; SD: 0,03). Bei Deletion der ersten 215 bp der 5'UTR wird jedoch schon signifikant mehr Protein translatiert als im Falle des reinen Luciferase Konstrukts (MW_{5'UTR Δ1-215 Luc} : 5,37; SD: 0,09). Bei Expression des Konstrukts mit am 5'-Ende um 259 bp verkürzter 5'UTR resultiert ein bis zu ca. 10facher Anstieg. Die Werte des vergleichbaren ADAM10 Experiments werde zwar nicht erreicht, jedoch führt auch hier die Deletion der ersten 259 Nukleotide der 5'UTR zur stärksten Proteinexpression im Vergleich mit allen anderen Konstrukten (MW: 10,49; SD: 0,68).

Es kann also festgestellt werden: Der Effekt der Translationsunterdrückung, den die 5'UTR von ADAM10 auf ihre physiologisch nachfolgende, zu translatierende Sequenz ausübt, lässt sich auf ein Reporter gen übertragen. Nur hat die Deletion am 5'-Ende der 5'UTR für die Translation der Luciferase weniger forcierende Wirkung als für ADAM10, bei dem schon im Falle des 5'UTR Δ1-215 ADAM10 Konstrukts die Expression um das knapp 42fache, und bei Deletion der ersten 259 bp der 5'UTR gar im Mittel um das 130fache gesteigert war. Dies kann auch der Tatsache geschuldet sein, dass die Halbwertszeit von Luciferase wesentlich kürzer ist als die Halbwertszeit von ADAM10 (Thompson et al., 1991; Ludwig et al., 2005). Dies soll auch weiter unten in der Arbeit diskutiert werden.

Neben der Erkenntnis, dass der Effekt der 5'UTR in der Inhibierung der Translation von ADAM10 auf Luciferase übertragbar ist, wurde auch im Reporterexperiment die geringe Bedeutung der uORFs deutlich. Für den Fall der Deletion der zweiten Hälfte der 5'UTR fiel auch die Luciferase Expression analog zum ADAM10 Modell weiter ab. Im Vergleich zum Einfluss der am 5'-Ende modifizierten 5'UTR auf ADAM10 und dessen Translation fällt die forcierende Wirkung der 5'-Deletionsmutanten der 5'UTR für die Proteinexpression von Luciferase jedoch geringer aus, wenngleich auch hier die Aktivität und damit die Expression des Proteins signifikant gesteigert ist. Fazit ist, dass es ein sehr starkes, die Translation inhibierendes Element innerhalb der ersten 259 Nukleotide der ADAM10 5'UTR geben muss.

Auch für die Existenz eines die Translation eher aktivierenden Bereichs in der 3'-Hälfte liefert der Luciferase Reporterassay ein weiteres Indiz.

3.5 *In vitro*-Transkription und -Translation

Zum weiteren Beweis, dass die 5'UTR die ADAM10 Proteinexpression oder eines heterologen ORF über eine Reduzierung der Translation der mRNA unterdrückt, wurden *in vitro*-Transkriptions- und Translationsexperimente durchgeführt (vgl. 2.6). Die *in vitro* übersetzte mRNA (*in vitro*-Transkription) wurde in Protein übersetzt (*in vitro*-Translation). Das in die Proteinsequenz eingebaute, im Aminosäuregemisch enthaltene, radioaktiv markierte Methionin diente der Detektion der Translationsprodukte.

In den *in vitro*-Experimenten stellte sich heraus, dass die Proteinexpression von ADAM10 nach Einsetzen gleicher Mengen mRNA in der Translationsreaktion durch die 5'UTR vollständig inhibiert wird: Es war im Falle des Konstrukts mit 5'UTR keinerlei Translationsprodukt mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten zwei distinkte Banden bei ca. 80-90 und zwischen 38 und 45 kDa bei Translation der ADAM10 mRNA des Konstrukts ohne 5'UTR detektiert werden (vgl. Abbildung 19, B). ADAM10 kann im *in vitro*-Ansatz etwas niedermolekularer (unter 98 kDa) als in der Zelle nachgewiesen werden. Dies mag an mangelnder Glykosylierung des synthetisierten Proteins in der *in vitro*-Situation liegen. Andere detektierte (niedermolekulare) Banden könnten daher rühren, dass die Translationsreaktion an einem anderen Startkodon beginnt oder frühzeitig abbricht, was zur Synthese alternativer oder nur verkürzter Proteinendprodukte führt. Die 5'UTR unterdrückt die Proteinsynthese in diesem *in vitro*-Ansatz vollständig.

Ebenso verhielt es sich in *in vitro*-Experimenten mit den Konstrukten aus den Reporterexperimenten. Dabei wurden gleiche Mengen *in vitro*-transkribierter mRNA der Luciferase Konstrukte mit und ohne 5'UTR in Protein translatiert. Nur im *in vitro*-Reaktionsansatz des Konstrukts ohne 5'UTR konnte eine solide Luciferase Proteinexpression detektiert werden. Abbildung 19 zeigt den Einsatz der *in vitro* transkribierten mRNA (A, C) für die *in vitro*-Translation von ADAM10 (B) und Luciferase (D).

Die *in vitro*-Transkriptions- und Translationsexperimente zeigten eindrucksvoll, dass die

5'UTR in der Lage ist, die Translation von ADAM10 oder 3'-nachfolgender, heterologer kodierender Sequenzen, höchst effizient zu reprimieren.

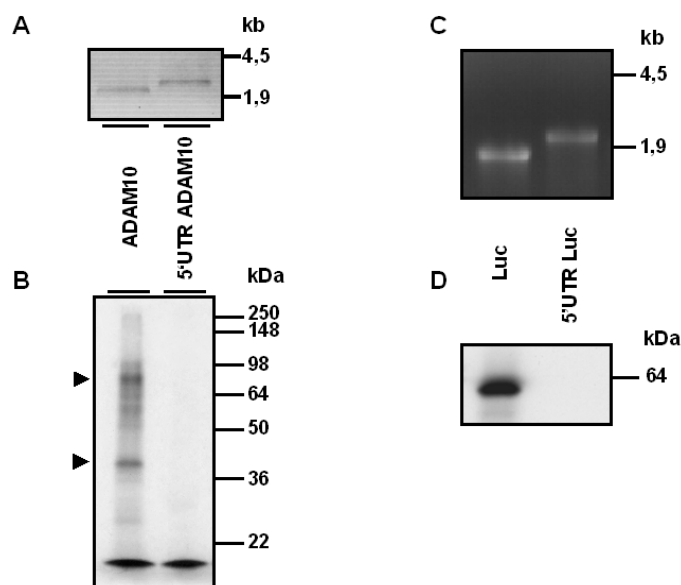


Abbildung 19: *In vitro*-Transkription und -Translation der ADAM10 Konstrukte mit und ohne 5'UTR sowie der korrespondierenden Luciferase Konstrukte.

1 μ g der cDNA der angegebenen Konstrukte ADAM10 und 5'UTR ADAM10 wurden *in vitro* nach Linearisierung der Vektoren in mRNA mit Hilfe des „mMessage mMachin“-Kits translatiert. Die resultierenden Transkripte wurden auf einem Agarosegel überprüft (A). Nach photometrischer Bestimmung der Konzentrationen der RNA-Proben wurden gleiche Mengen (2 μ g) RNA für die *in vitro*-Translationsreaktion eingesetzt, welche mit Hilfe des „Rabbit Reticulocyte Lysate“-Systems ausgeführt wurde. Der Translationsansatz wurde mittels SDS-PAGE im 10%igen Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt. Nach Fixierung und Geltrocknung konnten die durch radioaktives Methionin markierten Translationsprodukte (Pfeilspitzen) durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden (B).

(C+D) Die Konstrukte aus den vorangegangenen Reportergenexperimenten, „Luc“ und „5'UTR Luc“, wurden gemäß Protokoll *in vitro* transkribiert und gleiche Mengen mRNA in Protein übersetzt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der 5'UTR auf die Translation von ADAM10 untersucht. Im Zellkultursystem wurden Elemente und Bereiche der 5'UTR analysiert, die zur Unterdrückung oder Begünstigung der ADAM10 Expression beitragen. Ferner wurde geklärt, auf welcher Ebene der Expressionskontrolle von ADAM10 die 5'UTR eine Rolle spielt. Im Kontext von in der Literatur beschriebenen Beispielen sollen Mechanismen diskutiert werden, die den Einfluss der 5'UTR auf die ADAM10 Translation erklären können.

4.1 Überexpression von ADAM10 in HEK 293 Zellen

Die Wahl der HEK 293 Zellen als Expressionssystem für die ADAM10 Konstrukte und der mutierten 5'UTRs in der Zellkultur beruht auf mehreren Gesichtspunkten: Zunächst ist diese Zelllinie bestens in der Alzheimerforschung etabliert. Viele bedeutende Entdeckungen hinsichtlich der Funktionsweise der einzelnen Sekretasen und ihrer Regulation, die Erforschung der Generierung und Assemblierung von A β und anderer APP-Prozessierungsprodukte rühren aus Untersuchungen und Experimenten mit diesen Zellen. Der Nachweis, dass alle Sekretasen, die APP prozessieren, in HEK 293 Zellen endogen exprimiert sind, wurde teils direkt, teils indirekt erbracht. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die α -Sekretase, als auch die β -Sekretase in HEK 293 Zellen, wie auch in anderen eukaryotischen Zellen, aktiv sind und das A β -Peptid aus seinem Vorläufer freigesetzt wird (Haass et al., 1992). Auch zur Klonierung der β -Sekretase BACE-1 wurden HEK 293 Zellen benutzt (Vassar et al., 1999), die Charakterisierung des γ -Sekretasekomplexes gelang ebenfalls in HEK 293 Zellen (Capell et al., 1998; Steiner et al., 2002; Shirotani et al., 2004). Auch die Experimente, die zur Entdeckung führten, dass die lange, GC-reiche 5'UTR von BACE-1 inhibierenden Einfluss auf die Translation dieser β -Sekretase ausübt, erfolgten in dieser Zelllinie (Lammich et al., 2004). Promotorstudien, die die 5'-flankierenden Bereiche (einschließlich der 5'UTRs) von BACE-1 und ADAM10 betrafen und zur Charakterisierung der Bereiche führten, die Promotoraktivität zur Transkription des betreffenden ORF dieser beiden Sekretasen aufwiesen, sowie potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (z.B. Sp1) und deren regulative Funktion in der Transkription offenbarten, erfolgten ebenfalls in HEK 293 Zellen (Christensen et al., 2004; Ge et al., 2004; Sambamurti et al., 2004; Prinzen et al., 2005).

Desweiteren erfüllen die HEK 293 Zellen alle Voraussetzungen, um ADAM10 exogen exprimieren und nachweisen zu können. Sie sind im Vergleich zu beispielsweise neuronalen Zelllinien ein leicht zu kultivierendes System und sehr gut zu transfizieren. Demzufolge eignen sie sich hervorragend, um Effekte mutierter Konstrukte in zellulärem Kontext zu untersuchen und auch quantitativ durch standardisierte und somit gut vergleichbare, experimentelle Prozeduren zu messen.

Endogen ist ADAM10 in Nierenzellen wie auch in anderem peripheren Gewebe exprimiert (Chantry und Glynn, 1990; Howard et al., 1996) und konnte aus Plasmamembranpräparationen der Rinderniere aufgereinigt werden (Lammich et al., 1999). Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass die 5'UTR als Teil des Transkriptes von ADAM10 in verschiedenen Gewebetypen, so auch in Hirn und Niere, exprimiert ist (vgl. 3.2).

Der Nachweis von endogenem ADAM10 spielte in der vorliegenden Arbeit keine Rolle, da der Einfluss der 5'UTR, die physiologisch als flankierende Region der ADAM10 mRNA am 5'-Ende vorliegt und unverändert Teil des Transkriptes ist, auf die Expression von ADAM10 bestimmt, gemessen und charakterisiert werden sollte. Somit musste ADAM10 und seine mit teils veränderter 5'UTR versehenen Konstrukte in HEK 293 Zellen überexprimiert werden und durch den nur dieses exogene ADAM10 erkennenden V5-Antikörper detektiert werden, um den Nachweis von endogenem ADAM10 und damit eine Beeinflussung und Störung der Messung eines Effektes, den die 5'UTR und ihre mutierten Varianten hervorrufen, ausschließen zu können. Die klonierte cDNA von ADAM10 und der 5'UTR steht im Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A unter der Kontrolle des starken Promotors P_{CMV} , der aus dem Cytomegalievirus (CMV, entspricht dem humanen Herpesvirus Typ 5, HHV-5) stammt. Dieser CMV-Promotor bewirkt eine kontinuierliche Expression des in die MCS klonierten rekombinanten Proteins (Boshart et al., 1985; Nelson et al., 1987; Andersson et al., 1989).

Die Überexpression von ADAM10 führt dazu, dass vor allem die immature Form des exogenen ADAM10 nachgewiesen werden kann. Dies ist in der Literatur für ADAM10 und ADAM17 bereits beschrieben worden (Lammich et al., 1999; Borroto et al., 2003; Villanueva de la Torre et al., 2004; Bech-Serra et al., 2006). Immatures ADAM10 ist jedoch proteolytisch nicht aktiv. In einem System, in dem ein Enzym exogen überexprimiert ist, kann die Menge an proteolytisch wirksamen Enzym aber trotzdem erhöht sein. Sämtliche Daten in den Untersuchungen der ADAM10 Konstrukte wurden 24h nach Transfektion erhoben. Um exogenem ADAM10 die Möglichkeit zur Maturierung zu geben, könnten in nachfolgenden Experimenten die Expressionszeiten im Zellkultursystem erhöht werden. Der Frage,

inwiefern sich ein Effekt der 5'UTR von ADAM10 auch auf die APP-Prozessierung und die Generierung des A β -Peptids auswirkt, könnte mit Hilfe dieses Systems dann nachgegangen werden. In sich an die vorliegende Arbeit anschließenden Experimenten wurde die Auswirkung der 5'UTR auf die Prozessierung von APP analysiert. Nach längerer Inkubationszeit nach Transfektion konnten tatsächlich geringe Mengen an maturem ADAM10 detektiert werden. Die 5'-deletierte 5'UTR bewirkte einen 2fachen Anstieg an sAPP α , die Menge an sekretiertem A β nahm signifikant ab. Diese Experimente, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, deuten auf eine potentiell wichtige physiologische Rolle der 5'UTR für die posttranskriptionale Regulation der ADAM10 Expression hinsichtlich der APP Prozessierung und damit der A β Produktion hin.

Alle Untersuchungen wurden an gleichartig prozessierten und transient transfizierten Zellen durchgeführt. Es wurden weder Veränderungen in der Morphologie, noch Unterschiede im Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten Kontrollen festgestellt.

4.2 5' untranslatierte Regionen und ihre Bedeutung für die Expression von BACE-1 und ADAM10

Eine 5'-untranslatierte Region (5'UTR) umfasst die exonische Region stromaufwärts einer für ein Protein kodierenden Genregion, die zwar in mRNA transkribiert, jedoch nicht in Protein übersetzt wird. Die größte Anzahl der Gene von Wirbeltieren weist kurze, nur 10-200 Nukleotide umfassende 5'UTRs auf, die sich durch keinen besonders großen GC-Reichtum auszeichnen, somit wenig Sekundärstrukturen ausbilden und darüberhinaus keine uORFs aufweisen (Kozak, 1987). Nur weniger als 10% der 5'UTRs der Gene von Wirbeltieren sind länger als 200 Nukleotide, enthalten uORFs und bestehen zu einem hohen Prozentsatz (70-90%) aus Guanin und Cytosin (Kozak, 1987, 1991). Bei diesen Genen handelt es sich zumeist um (Proto-)Oncogene (z.B. BCL-2, *c-myc*, *c-mos*) oder um wichtige, an der Proliferation bestimmter Zellen beteiligte Faktoren, wie z.B. TGF- β , FGF-2 oder PDGF (Willis, 1999). Dabei spielt die Regulation der Translation durch bestimmte Struktur motive, IRES-Sequenzen („internal Ribosome entry site“) oder uORFs, die die 5'UTRs der Kandidaten aufweisen, häufig eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, in der Proliferation bestimmter Gewebe und damit natürlich auch in der Entstehung und Entwicklung

von Neoplasien (Gray und Hentze, 1994a; Hinnebusch, 1996, 1997; Muckenthaler et al., 1998; Harding et al., 2000).

Die 5'UTR der Alzheimer-relevanten β -Sekretase BACE-1 (vgl. 1.4.4) gehört mit ihren 446 Nukleotiden, einem GC-Anteil von 77% und drei uORFs auch zu dieser Klasse von 5'UTRs. Lammich und Kollegen konnten zeigen, dass sie die Translation von BACE-1 unterdrückt und die uORFs einen eher geringen Anteil an diesem Effekt haben (Lammich et al., 2004). Jedoch scheinen der hohe GC-Gehalt und sich dadurch ergebende Sekundärstrukturen ein wichtiger Grund für die translationale Repression der BACE-1 Expression zu sein. Die Unterdrückung der BACE-1 Expression durch die 5'UTR konnte auch durch andere unabhängige Gruppen bestätigt werden (De Pietri Tonelli et al., 2004; Lammich et al., 2004; Rogers et al., 2004; Zhou und Song, 2006). Darüberhinaus ist die 5'UTR von BACE-1 in Mensch, Maus und Ratte hoch konserviert, was auf eine physiologische Funktion hindeutet. Wie in der vorliegenden Arbeit dargelegt wurde, lässt sich die 5'UTR von ADAM10 hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Eigenschaften gut mit der 5'UTR von BACE-1 vergleichen: Sie ist mit 444 Nukleotiden ebenfalls sehr lang, ist mit einem Guanin- bzw. Cytosinbasenanteil von 69% GC-reich und enthält zudem zwei „upstream open reading frames“. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Sequenz stromaufwärts des für ADAM10 kodierenden Bereichs in verschiedenen Spezies in hoch konservierten Regionen lokalisiert ist, was auf eine biologische Relevanz verweist (vgl. 3.1). Darüberhinaus sind ADAM10 Transkripte mit der langen, GC-reichen 5'UTR in vielen menschlichen Organen exprimiert, was durch eine die ADAM10 5'UTR spezifisch detektierende Sonde bewiesen werden konnte.

Die ADAM10 5'UTR gehört demnach in die Klasse der langen, GC-reichen 5'UTRs und ist der 5'UTR von BACE-1 sehr ähnlich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machten deutlich, dass auch die ADAM10 5'UTR dazu in der Lage ist, die Proteinexpression von ADAM10 und eines heterologen ORF wirkungsvoll zu unterdrücken. Damit könnte sie von großer Bedeutung für die physiologische Regulation der α -Sekretase sein.

4.3 Translationale Repression der Expression der ADAM10 Metalloprotease durch die 5'UTR

Die Experimente zeigten, dass die ADAM10 5'UTR die Translation von ADAM10 supprimiert. Dass dieser Einfluss translational begründet ist, zeigten die mRNA-Quantifizierungsexperimente, die keine oder nur teils geringe Änderungen in den Transkriptmengen nach transienter Transfektion der verschiedenen Konstrukte aufwiesen. Diesen Befund unterstützten *in vitro*-Translationsexperimente, in denen die Translation von ADAM10 Transkripten durch die 5'UTR komplett verhindert wurde. Der selbe Effekt war auch für die *in vitro* translatierte Luciferase zu beobachten, was beweist, dass die 5'UTR die Translation des stromabwärts gelegenen ORF supprimiert.

Es wurde auch untersucht, welche Bereiche der 5'UTR für den inhibitorischen Effekt verantwortlich waren. Dazu wurde eine Mutationsanalyse der 5'UTR herangezogen, die zeigte, dass die uORFs der 5'UTR keine Rolle für den Suppressionseffekt spielten. Daher mussten strukturelle Mechanismen von entscheidender Bedeutung sein. Deletionsmutanten zeigten, dass die zweite Hälfte der 5'UTR von großer Bedeutung für eine effiziente Translation ist. Andererseits führte die Deletion am 5'-Ende der 5'UTR zu einem stufenweisen Anstieg der Proteinmengen, bei kompletter Deletion der ersten Hälfte erreichte die Proteinexpression den 130-fachen Wert bezüglich der Wildtyp-5'UTR. Diesem extremen Anstieg lagen nur moderat erhöhte mRNA-Mengen zu Grunde. Die ersten 259 Nukleotide umfassen also ein die Translation effizient inhibierendes Element.

Doch welche speziellen Eigenschaften der 5'UTR von ADAM10 sind für diese Mechanismen verantwortlich? Wie ist das die Translation sehr stark hemmende Element, das in den ersten 259 Nukleotiden der 5'UTR lokalisiert ist, zu erklären? Im Folgenden sollen verschiedene Erklärungsversuche angesprochen und diskutiert werden.

4.3.1 Die Rolle der uORFs der 5'UTR von ADAM10

Das Vorhandensein von sogenannten uORFs („upstream open reading frames“), also stromaufwärts des ORF der mRNA gelegener, offener Leserahmen in der 5'UTR, die theoretisch die Synthese kurzer, nur wenige Aminosäuren langer Peptide ermöglichen könnten, stellt den Schlüssel zu einem wichtigen Kontrollmechanismus der Translation von

mRNA bestimmter Gene dar.

Als erstes Beispiel soll die Regulation der Translation des Transkriptionsfaktors GCN4 („general control non-derepressible 4 kinase“) herangezogen werden. Im Falle von Aminosäuremangel phosphoryliert eine spezielle Kinase, GCN2, in Hefezellen die α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF2, was zu einer globalen Verminderung der Translation führt. Allerdings zieht die Phosphorylierung von eIF2 α eine vermehrte Translation des Transkriptionsfaktors GCN4 nach sich, welcher an der Regulation des Aminosäurestoffwechsels beteiligt ist. GCN4 besitzt vier uORFs in seiner 5'UTR. Wird der erste offene Leserahmen translatiert, so kann GCN4 in Protein übersetzt werden, was durch die Möglichkeit der Re-Initiation erklärt wird: Ein Ribosom, das bereits einen ORF translatiert hat, setzt auf dem selben mRNA-Molekül erneut zur Translation eines weiter stromabwärts (Richtung 3'-Ende) gelegenen ORF an. Ist die Translation des ersten uORF beendet, so kann nach Ablösen der 60S-Untereinheit die 40S-Untereinheit an der mRNA gebunden bleiben und weiter nach einem Startkodon „scannen“. Zur erneuten Initiation ist jedoch die Rekrutierung eines weiteren Ternärkomplexes („ternary complex“, TC) und anderer Initiationsfaktoren notwendig. Der TC besteht aus der aktivierten Aminoacyl-Met-tRNA (Methionin-transfer-RNA) und dem eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2 (Holcik und Sonenberg, 2005) und bildet zur Translation mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms den 43S-Präinitiationskomplex (PIC). Im Falle von Aminosäuremangel, also der Situation, in der GCN2 eIF2 α phosphoryliert, ist die Menge an TC jedoch begrenzt. Je länger das Ribosom nach einem ATG „scannt“, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass GCN4 translatiert wird, da sich die Möglichkeit, einen TC zu rekrutieren, mit zunehmender „Wanderstrecke“ des Ribosoms vermehrt bietet. Bei ausreichender Aminosäurezufuhr stehen bereits bei den nachfolgenden uORFs 2, 3 und 4 genügend TC zur Verfügung. Dies hat zur Folge, dass die Translation in größerer Regelmäßigkeit bereits bei den uORFs wieder einsetzt und die Wahrscheinlichkeit der Translationsinitiation am GCN4 Startkodon erheblich vermindert ist, was zu erniedrigter GCN4 Proteinexpression führt. Ist die Aminosäurekapazität unter Stressbedingungen jedoch begrenzt, stehen zur Initiation der Translation der uORFs weniger TC zur Verfügung. Die uORFs werden weniger wahrscheinlich translatiert und die Anzahl der ribosomalen 40S-Untereinheiten, die bis zum GCN4 ORF scannen, ist deutlich erhöht. Dies zeigt, wie trotz globaler translationaler Regulationsmechanismen die Translation spezieller, im jeweiligen Kontext wichtiger mRNAs durch mRNA-spezifische, die 5'UTR betreffende Kontrollmechanismen gewährleistet ist (Hinnebusch, 1996, 1997; Harding et al., 2000). Abbildung 20 veranschaulicht den beschriebenen Mechanismus.

Auch in Säugerzellen wurde ein vergleichbares Prinzip beschrieben. Phosphoryliertes eIF2 α führt zur Translation von ATF4 („activating transcription factor“). ATF4 ist ebenfalls ein Faktor, der die Transkription von Genen reguliert, die an der zellulären Stressreaktion beteiligt sind. Der Kontrollmechanismus funktioniert in exakt gleicher Weise wie für GCN4 beschrieben (Harding et al., 2000; Vattam und Wek, 2004). Somit kann auch die Säugerzelle auf Stresssignale wie Aminosäuremangel gezielt mit der Expression spezieller Gene antworten, ein somit in der Evolution konservierter Mechanismus.

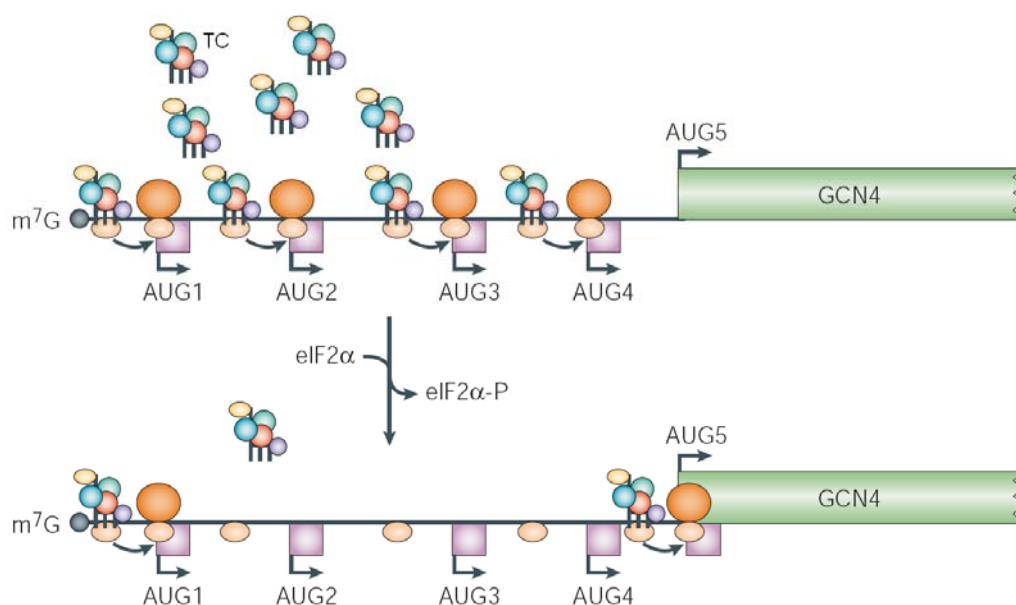


Abbildung 20: Die Regulation der Translation durch uORFs

mRNA-spezifische Translationsregulation kann durch das Vorhandensein von „upstream open reading frames“ (uORFs) in der 5'UTR bestimmter mRNA vermittelt werden. Der Transkriptionsfaktor GCN4, entscheidend am Aminosäurestoffwechsel in Hefen beteiligt, enthält vier uORFs (Startkodons: AUG1-4) in seiner 5'UTR. Ist wenig eIF2 α phosphoryliert und stehen genug „ternary complexes“ (TC) zur Verfügung, so können die Ribosomen nach Initiierung der Translation des uORF1 an den folgenden uORFs die Translation erneut aufnehmen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit der Translationsinitiierung am Startcodon von GCN4 (AUG5) erniedrigt. Herrscht Aminosäuremangel, so ist die Menge rekrutierbarer TC durch vermehrte eIF2 α -Phosphorylierung begrenzt. Die Re-Initiationsrate der Translation an den folgenden uORFs ist eingeschränkt und die „scannenden“ Ribosomen können den Hauptleserahmen von GCN4 erreichen. Grüne Rechtecke stellen den kodierenden Bereich dar, violette Rechtecke uORFs, Eckpfeile markieren Startkodons. Ribosomen (60S bzw. 40S-Untereinheit) sind dunkel- bzw. hellorange markiert. m⁷G: 5'-Cap-Struktur.

[modifiziert nach (Holcik und Sonenberg, 2005)]

Auch der Kontext, in dem die Start-AUGs solcher uORFs in ihrer Basensequenz stehen, ist für eine mögliche Initiation der Translation an diesen Stellen und damit für eine mögliche Bedeutung für den inhibitorischen Effekt von großer Bedeutung. Die Bindung des 43S-PIC und damit die Initiation der Translation erfolgt favorisiert an bestimmten AUGs: Beim „scanning“ bewegt sich der Komplex mit Hilfe von Helikasen unter ATP-Hydrolyse am mRNA-Strang entlang und sucht das Startcodon (Sequenz: AUG), welches bei Eukaryoten im günstigsten Fall von einer optimalen Kozak-Konsensus-Sequenz (GCC GCC RCC AUG G; R=Purinbase, AUG=Startcodon) flankiert ist (Kozak, 1987). Ist dies im Falle eines Start-AUG eines uORF der Fall, so kann dies zur Translation des uORF führen und die Proteinbiosynthese am Hauptleserahmen hemmen. Als Beispiel sei hier die 5'UTR von Huntingtin genannt, deren uORF in gutem Initiationskontext liegt und die Translation hemmt (Lee et al., 2002).

Die beiden uORFs der ADAM10 5'UTR umfassen die Nukleotidpositionen 43-78 und 391-405 (ab Transkriptionsstartpunkt). Sie würden im Falle einer Translationsreaktion durch Initiation an ihrem entsprechenden Start-AUG, folgender Elongation und letztendlich auch Termination am Stop-Kodon zur Generierung eines elf bzw. vier AS langen Peptids führen. Für eine biologische Funktion der uORFs könnte auch die Tatsache sprechen, dass beide uORFs der humanen 5'UTR-Sequenz in anderen Spezies hoch konserviert sind. Beide uORFs der humanen ADAM10 5'UTR sind identisch mit den korrelierenden Sequenzen des Schimpansen und des Rhesusaffen (vgl. 3.1).

Nun bestand der Verdacht, die uORFs der ADAM10 5'UTR könnten eine Rolle spielen hinsichtlich des beobachteten Effekts der Inhibierung der Translation durch die 5'UTR. In Anbetracht der oben genannten Beispiele könnten die uORFs damit für einen physiologischen Mechanismus zur gezielten Beeinflussung der ADAM10 Expression wichtig sein. Eine Mutation der potentiellen Startkodons hätte demnach einen Anstieg der ADAM10 Proteinexpression bewirken können.

Die Mutation der einzelnen Start-AUGs und damit das Verhindern einer möglichen Translationsinitiation zeigte jedoch keine Änderung in der Proteinexpression von ADAM10 verglichen mit dem Konstrukt, das beide uORFs in seiner 5'UTR enthält. Dies zeigt, dass die uORFs keinen signifikanten Anteil am inhibitorischen Effekt der 5'UTR haben. Dies könnte unter anderem der Tatsache geschuldet sein, dass beide Startkodons in keinem guten, zur Initiation der Translation durch Bindung des PIC befähigten Kontext stehen. Mit einem Pyrimidin sowohl an Position -3 als auch an Position +4 im Falle beider uORFs ist die geforderte Kozak-Sequenz zur optimalen Initiation der Translation nicht erfüllt (Kozak, 1986).

Das Startkodon des Hauptleserahmens ist jedoch von einem Adenin an Position -3 und einem Guanin an Position +4 flankiert. Dies repräsentiert einen guten Kontext für die Initiation der Translation. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass uORFs nicht immer regulativen Einfluss auf die Translation des folgenden ORF ausüben: Anhand der B-Kette des PDGF („platelet derived growth factor“) und der NR2A-Untereinheit des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass die reine Existenz solcher uORFs nicht zwingend zur Inhibierung oder anderweitigen Beeinflussung oder Kontrolle des ORF führen muss. Die uORFs scheinen in diesen Fällen für die Translationsinhibition durch die 5'UTRs eine untergeordnete Rolle zu spielen. Stattdessen wurde angenommen, dass einige stabile Sekundärstrukturen, die sich durch den hohen GC-Gehalt innerhalb dieser 5'UTRs bilden können, die Ursache der Suppression der Translation seien (Horvath et al., 1995; Wood et al., 1996). Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die uORFs der 5'UTR auch im Falle von ADAM10 keine entscheidende Rolle spielen, was die inhibierende Wirkung der 5'UTR auf die Translation des ADAM10 ORF betrifft. Vielmehr deuten die Ergebnisse der Arbeit darauf hin, dass Gesichtspunkte, die strukturelle Eigenschaften der 5'UTR betreffen, viel bedeutender für den inhibitorischen Effekt der ADAM10 5'UTR sind.

4.3.2 Strukturbedingte Mechanismen – „Ribosome Stalling“ und „mRNA Decay“

Die Zusammenstellung und die Ausübung der Funktion des Prä-Initiationskomplexes (PIC) in der Translationsreaktion ist neuesten Ergebnissen zur Folge global über die Modifikation verschiedener Initiationsfaktoren und deren Interaktion mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms geregelt. Trotzdem sind Modelle bekannt, nach denen eine Inhibierung der Rekrutierung des Initiationskomplexes der mRNA-spezifischen Translationskontrolle unterliegt. Die besten Beispiele solcher Kontrollmechanismen liefern der Eisenhaushalt und seine Regulationswege. Dabei spielen gewisse Motive auf den 5'UTRs bestimmter, an der Eisen-Homöostase beteiligter mRNAs, eine wichtige Rolle: Sie sind in der Lage, Sekundär- oder Tertiärstrukturen innerhalb ihrer mRNA auszubilden und somit eine Translationsreaktion sterisch zu blockieren. Ferritin, ein Eisenspeicherprotein, das sich aus einer schweren und einer leichten Kette zusammensetzt, weist auf der 5'UTR seiner mRNA ein sogenanntes

„stem-loop motif“ auf, das als IRE („iron-response element“) bezeichnet wird. Stark vereinfacht beschrieben binden im Falle von Eisenmangel die Eisen-regulierenden Proteine IRP1 und -2 („iron-regulatory protein“) an dieses Motiv, das etwa 40 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt ist. Dadurch wird die Assoziation des PIC mit der mRNA, an die bereits eIF4F gebunden hat, verhindert und so die Translation gehemmt (Gray und Hentze, 1994a; Muckenthaler et al., 1998). Auf diese Weise wird weniger Ferritin synthetisiert, also weniger Eisen in Ferritin gespeichert. Der Eisenspiegel steigt an. Abbildung 21 fasst den beschriebenen Regulationsmechanismus schematisch zusammen.

Auch auf der für APP kodierenden mRNA konnte ein IRE charakterisiert werden, das IRE Typ II (Rogers et al., 2002a). Vermittelt durch die Bindung von IRP-1 und -2 an die IRE II-Region der 5'UTR des APP Transkripts konnten verschiedene Reportergene auf diese Weise eisenabhängig reguliert werden. Interessanterweise gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Demenz vom Alzheimer-Typ mit dem Eisen- und Kupferhaushalt in Verbindung steht: Die Gabe von Kupfer- und Eisen-chelatierenden Molekülen kann die APP Proteinmengen signifikant senken. Zudem scheinen die Spiegel freier Metallionen im Cortex von Alzheimer-Patienten erhöht zu sein (Rogers et al., 2002b).

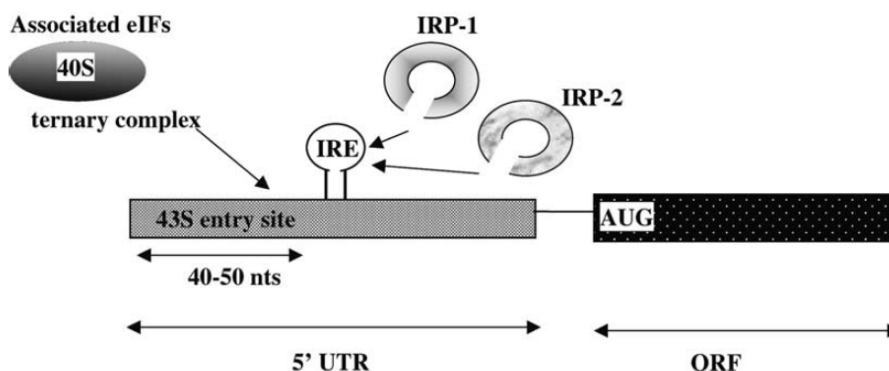


Abbildung 21: Regulation der Eisenhomöostase über „iron-response elements“ (IRE):

„Ribosome Stalling“

Translationale Regulation kann mRNA-spezifisch durch das IRE/IRP-System erfolgen. Die abgebildete 5'UTR (beispielsweise die Ferritin mRNA) beinhaltet ein IRE in einer Entfernung von ca. 40-50 Nukleotiden vom 5'-Ende. Diese Region stellt die Eingangsstelle für den 43S-Präinitiationskomplex dar. Im Falle eines sinkenden Eisenspiegels binden die IRPs in Interaktion mit dem IRE an die mRNA. Somit kann die Assoziation des Initiationskomplexes mit der mRNA und folglich die Translation gehemmt werden.

[Modifiziert nach (Pickering und Willis, 2005)]

Strukturbedingte Mechanismen wie das beschriebene „Ribosome Stalling“ sind ein wesentlicher Mechanismus in der inhibierenden Funktion von langen, GC-reichen 5'UTRs. Ein hoher GC-Gehalt einer langen 5'UTR kann darauf schließen lassen, dass eine solche 5'UTR zur Bildung von stabilen Sekundärstrukturen neigt, die eine Translationsinitiation durch eine Blockade des „scannenden“ Ribosoms im Initiationskomplex behindern können. Dabei scheint das Ausmaß eines solchen sterischen „Aufhaltens“ wesentlich von der Stabilität, der Größe und der Position der Sekundärstruktur hinsichtlich des 5'-Cap der mRNA anhängig zu sein. Eine solche stabile Sekundärstruktur, nahe am 5'-Cap gelegen, kann wie eben beschrieben durch eine Blockade des Zugangs des PIC an die mRNA wirksam das „Scannen“ des Ribosoms verhindern und damit zu einem Ausfall der Initiation der Translation des ORF führen (Kozak, 1989). Die freie Energie einer solchen Sekundärstruktur kann mittels mathematischer Modelle berechnet werden und wird in kcal/mol angegeben. Das Minimum an freier Energie, das ein Strukturmotiv einer 5'UTR dazu befähigt, die Translationsinitiation signifikant zu behindern, variiert abhängig vom GC-Gehalt und der Entfernung des Motivs vom 5'-Cap. Eine Haarnadelstruktur in dichter Nähe zum 5'-Cap mit einer freien Energie von -30 bis -61 kcal/mol scheint dafür auszureichen (Kozak, 1989; Gray und Hentze, 1994b). Ist das Motiv in weiterer Entfernung lokalisiert, so steigt die Mindestenergiemenge, die benötigt wird, auf -50 bis -70 kcal/mol dementsprechend an. Wahrscheinlich sind solche Strukturen stabil genug, um der Helikase-Untereinheit des eIF4F, die Sekundärstrukturen zur Initiation der Translation entwinden soll, zu trotzen (Kozak, 1989; Gray und Hentze, 1994b).

Mit Hilfe des Programms mFOLD⁺⁺ (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>) des Rensselaer Polytechnic Institute, NY, USA, lässt sich die freie Energie der 5'UTR von ADAM10 und ihrer möglichen Sekundärstrukturen anhand thermodynamischer Methoden kalkulieren. Dabei resultierte eine freie Energie von -191 bis -200,1 kcal/mol für die ADAM10 5'UTR, was die geforderten -30 bis -70 kcal/mol weit übersteigt. Die prädiktiven Strukturmodelle des Programms lassen zudem auf verschiedene, mögliche Stamm-Schleifen- und Haarnadel-Motive schließen, die eine solche komplexe Sekundärstruktur beinhalten kann (Zuker, 2003). Abbildung 22 veranschaulicht ein solches prädiktives Strukturmodell.

Dieses Modell verdeutlicht, dass die 5'UTR fähig sein könnte, mittels Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen die ADAM10 Translation zu behindern. Dies kann eine Erklärung für den wesentlichen Abfall der ADAM10 Proteinexpression, den die 5'UTR nach Transfektion der ADAM10 Konstrukte mit 5'UTR bewirkt, darstellen. Dies kann auch eine Erklärung für den weiteren Abfall der Proteinexpression nach Transfektion des 5'UTR Δ 251-432 ADAM10

Konstrukts liefern, der zeigte, dass die 3'-Hälfte der 5'UTR für eine effiziente Translation wichtig ist. Bei Deletion der 3'-Hälfte der 5'UTR könnte sich die Struktur der 5'UTR weiter stabilisieren und somit die „scannenden“ Ribosomkomplexe weiter hemmen.

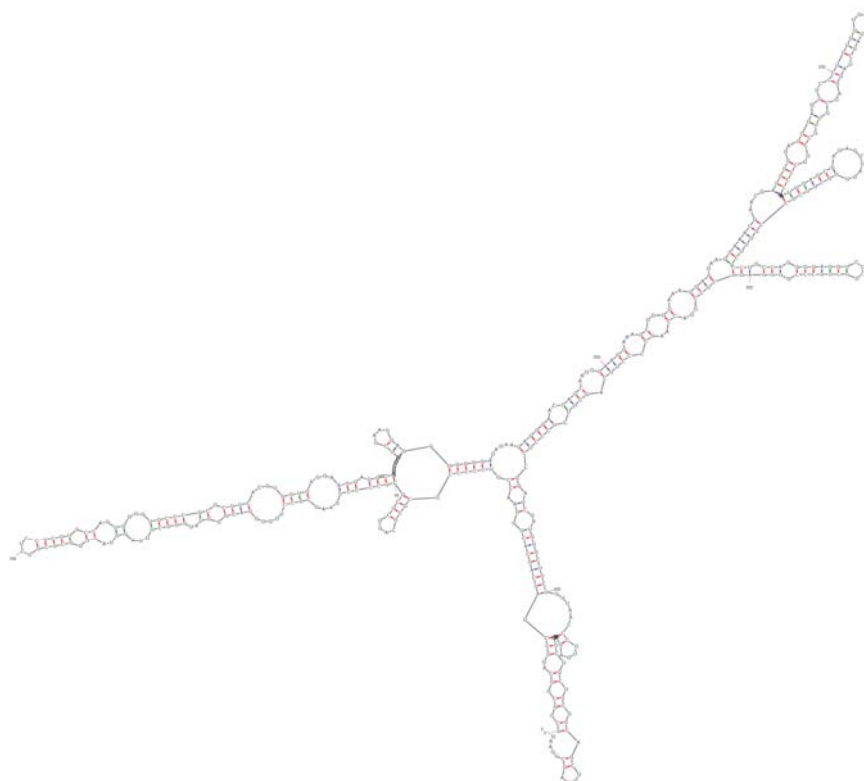


Abbildung 22: Prädiktives mRNA-Strukturmodell für die 5'UTR von ADAM10

Der Algorithmus „mFOLD⁺⁺“ (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>) zur Vorhersage möglicher Sekundärstrukturen von mRNA Molekülen lieferte das Strukturmodell einer sehr stabilen Sekundärstruktur der 5'UTR von ADAM10 mit einer freien Energie von -190 bis -200,1 kcal/mol. Die Abbildung verdeutlicht auch mehrere Stamm-Schleifen- und Haarnadelmotive als komplexe Bestandteile der prognostizierten Struktur.

Jedoch kann der Abfall der Expression für die 3'-Deletionskonstrukte der 5'UTR auch auf eine veränderte mRNA Stabilität hindeuten. Diese könnte durch die 3'-Deletion insoweit beeinflusst sein, als dass ein solches verkürztes Transkript stärker zum mRNA Abbau („mRNA decay“) neigt. Normalerweise geschieht der Abbau von mRNA immer gleichzeitig zur Translation und beginnt bereits parallel und in unmittelbarer Konkurrenz mit der Initiation. Der Poly-(A)⁺-Schwanz der mRNA wird während des Translationsprozesses mit jedem

erfolgreichen Durchlaufen eines vollständigen Translationszyklus nach der Termination immer weiter verkürzt. Man konnte herausfinden, dass das Erreichen einer Länge von 10-12 Adenylaten ausreicht, um durch ein kritisches Minimum an verfügbaren Bindungsstellen für das „Poly-A-Binding Protein“ (PABP) die ringförmige Struktur des gerade translatierten mRNPs so zu verändern, dass durch die Bindung zusätzlicher Proteine die Abdissoziation des 5'-Cap-bindenden Initiationskomplexes herbeigeführt wird und bestimmte mRNA-Abbau-Wege eingeleitet werden (Decker und Parker, 1993; Muhrad et al., 1995). Die mRNA kann dann durch zwei verschiedene Mechanismen „entsorgt“ werden: Nach dem „Decapping“, also dem Abtrennen der 5'-Cap-Struktur, wird die mRNA durch das Enzym Xrn1, das 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt, in 3'-Richtung degradiert (Coller und Parker, 2005). Andererseits besteht auch die Möglichkeit, die mRNA vom 3'-Ende in 5'-Richtung durch einen Enzymkomplex abzubauen, der als Exosom bezeichnet wird und sich durch 3'-5'-Exonukleaseaktivität auszeichnet. Die 5'-Cap-Struktur kann dann durch das Enzym DcpS entfernt werden (Parker und Song, 2004). Die 3'-Deletion könnte nun zur Ausbildung oder Stabilisierung gewisser Sekundärstrukturen der mRNA in Folge des hohen GC-Gehalts der 5'UTR führen. Somit könnte beispielsweise über die Bindung von „Decapping“-Enzymen an solche Sekundärstrukturen die mRNA zu vermehrtem Abbau neigen. Die deletierte Region würde das im physiologischen Fall verhindern. Damit könnte eine funktionelle Relevanz dieses Abschnitts der 5'UTR hinsichtlich einer effizienten Translation begründet sein.

Auch der enorme Anstieg der ADAM10 Proteinexpression nach Transfektion der 5'-Deletionsmutanten kann durch strukturbedingte Mechanismen begründet sein. Bei Deletion der ersten 85 Nukleotide der 5'UTR ist der Ausgangswert des physiologischen 5'UTR ADAM10 Konstrukts bereits gering übertroffen. Verkürzt man die 5'UTR nun weiter, so könnten Sekundärstrukturen verloren gehen, die für die Inhibierung der ADAM10 Translation entscheidend sind. Die ADAM10 Expression nach Transfektion der $\Delta 1-155$, $\Delta 1-175$ und $\Delta 1-215$ Konstrukte steigt stark an. Die Deletion der ersten 259 Nukleotide resultierte in 130-facher ADAM10 Proteinexpression. Ein solch enormer Anstieg, hervorgerufen durch die Deletion der 5'-Hälfte der 5'UTR, war nicht zu erwarten. Die einhergehenden Transkriptlevel waren in diesem Fall jedoch nur moderat erhöht. Das deutet eindrücklich darauf hin, dass der 5'-Anteil der 5'UTR wohl über die Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen zur Inhibition der Translation von ADAM10 führt. Ein solcher Mechanismus ist z.B. anhand der B-Kette des PDGF beschrieben (Horvath et al., 1995). Natürlich könnte auch für die 5'-Deletionen eine veränderte mRNA Stabilität als Erklärung für die veränderte ADAM10 Proteinexpression dienen.

Es lässt sich also zusammenfassend feststellen: Die freie Energie der Struktur der 5'UTR von unter -190 kcal/mol ist deutlich ausreichend, um für eine „Blockade“ der Translationsinitiation durch stabile Sekundärstrukturen zu sorgen und somit eine inhibierende Wirkung der 5'UTR auf die ADAM10 Proteinexpression zu gewährleisten. Während jedoch die erste Hälfte der 5'UTR (Nukleotide 1-259) einen starken inhibitorischen Effekt auf die ADAM10 Translation ausübt, scheint der 3'-Rest der 5'UTR nicht an diesem Effekt beteiligt zu sein, im Gegenteil scheint er zu einem Anstieg der Translation zu führen. Wie dargelegt, könnte dies durch eine gewisse „Schutzfunktion“ begründet sein: Der 3'-Rest der 5'UTR könnte die mRNA vor ihrem Abbau bewahren.

Die translationsinhibitorische Beeinflussung der 5'UTR und speziell ihrer 5'-Hälfte und die translationsforzierende Wirkung des 3'-Anteils könnten aber auch dafür sprechen, dass noch andere, unbekannte Mechanismen, beispielsweise andere RNA-bindende Proteine, für die Translationskontrolle der ADAM10 Metalloprotease durch die 5'UTR in Frage kommen könnten.

4.3.3 RNA-bindende Proteine: Ein möglicher Mechanismus translationaler ADAM10 Kontrolle?

Ein denkbarer Mechanismus, der die Inhibierung der Translation von ADAM10 durch die 5'UTR erklären könnte, ist die Möglichkeit des regulierenden Wirkens von an die RNA bindenden Proteinen. Solche Proteine sind an der Translationskontrolle einzelner Gene über die Bindung gewisser Elemente, die die Sekundärstruktur der mRNA aufweisen kann, beteiligt. Wie gerade dargelegt wurde, ist die translationale Suppression von ADAM10 wahrscheinlich durch solche komplexen Sekundärstrukturen bedingt.

RNA-bindende Proteine (RBP) können vielfältiger Art und Weise sein. Am Beispiel der am Eisenhaushalt (vgl. 4.3.2) beteiligten „iron-response elements“-(IRE)-bindenden Proteine (IRP) wurde ein solcher Mechanismus beschrieben. Sie können über die Assoziation mit IREs der 5'UTR das Anheften des initiiierenden PIC verhindern und dienen auf diese Weise als gut steuerbare 5'UTR-Elemente der Kontrolle bestimmter Haushaltsgene. Die Translation der leichten und schweren Kette des Ferritin seien hier nochmals als eindruckliche Beispiele genannt: Ihre 5'UTRs weisen IREs sehr nah am 5'-Cap in der Form eines Stamm-Schleifen-

Motivs auf und führen nach Bindung der IRPs zu einer geringeren Ferritin Proteinexpression, der Serum-Eisenspiegel steigt. So kann schnell auf Eisenmangel reagiert werden (Gray und Hentze, 1994a; Muckenthaler et al., 1998; Gebauer und Hentze, 2004). Als aktuelleres Beispiel soll die mRNA des Apolipoprotein B Erwähnung finden. Deren 5'UTR weist ebenfalls ein Stamm-Schleifen-Motiv auf, das von einem unbekanntem Protein insulinabhängig gebunden werden kann und somit die Translation eines (verkürzten) ApoB-Reporterkonstrukts kontrolliert (Gebauer und Hentze, 2004; Pontrelli et al., 2004; Sidiropoulos et al., 2005). Leider können solche Motive noch nicht exakt auf 5'UTRs prädiktiv bestimmt werden. Dennoch kann ein Vorhandensein dieser Elemente auf der 5'UTR von ADAM10 nicht ausgeschlossen werden, da komplexe Sekundärstrukturen der 5'UTR der ADAM10 mRNA sehr wahrscheinlich sind.

Die 5'UTR von ADAM10 weist jedoch eine Region auf, die besonders reich an Purinsequenzen ist. Solche Purin-reiche Sequenzen können als mögliche Bindungsstellen für mRNA-bindende Proteine dienen (Chen et al., 1992). Es handelt sich um die Nukleotide 164-246, also ein Sequenzabschnitt, der teilweise oder ganz in den 5'-Deletionskonstrukten entfernt ist. Mögliche mRNA-bindende Proteine können vielseitig durch Bindung an die 5'UTR einen Einfluss auf die Translation der mRNA ausüben: Sie können die Translation nur behindern, forcieren, nur mehr zu einem Minimum zulassen oder auch zu einem kompletten, schnellen Abbau des gebundenen mRNA Moleküls führen. Im Falle der Deletionskonstrukte, die solche Bindungsstellen für eventuelle RBPs nicht mehr besitzen, kann dies z.B. eine Erklärung dafür sein, dass die Proteinexpression so enorm gesteigert ist. Darüberhinaus liegen beide Purin-reiche Sequenzen in Mensch, Schimpanse und Rhesusaffe in hoch konservierten Bereichen, was eine mögliche biologische Bedeutung unterstreicht.

Weitere Experimente, die zur Identifizierung und Charakterisierung bestimmter Proteine führen können, die an z.B. diese Purin-reichen Sequenzen der 5'UTR binden könnten, wären der nächste Schritt, um besseren Einblick in die Regulation des beobachteten Effekts des enormen Anstiegs der Translation zu gewinnen. Solche Ansätze könnten beispielsweise „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) darstellen, in denen unbekannte Proteine aus nukleären oder zytosolischen Proteinextrakten an bekannte, markierte RNA-Konstrukte binden und damit isoliert und identifiziert werden können.

Ein Hinweis auf die Existenz und die Bedeutung solcher spezieller, an die 5'UTR von ADAM10 bindender RBPs könnten auch die *in vitro*-Transkriptions- und Translationsexperimente geben. Das 5'UTR ADAM10 Konstrukt, in gleicher Transkriptmenge eingesetzt wie das Konstrukt ohne 5'UTR, führte im Reagenzglas zu keiner Translation.

Ebenso verhielt es sich mit den Luciferase Reportergergenkonstrukten. *Firefly*-Luciferase mit der ADAM10 5'UTR wurde im Gegensatz zum nachweisbaren Proteinendprodukt, das das Konstrukt ohne 5'UTR hervorbrachte, nicht translatiert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass eventuell die Translation bedingende oder begünstigende Faktoren wie RBPs, die in HEK 293 Zellen physiologisch exprimiert sind, in der *in vitro*-Situation fehlen oder auch angereichert vorliegen.

Zusammenfassend kann also davon ausgegangen werden, dass die Translation des ADAM10 Transkripts durch cis-trans-Interaktionen spezifischer RNA bindender Proteine mit bestimmten Sekundärstrukturen innerhalb der 5'UTR erheblich beeinflusst werden könnte.

4.4 Relevanz der Ergebnisse bezüglich der Alzheimer-Krankheit

Blickt man auf die „Amyloid-Kaskade-Hypothese“ (vgl. 1.3), so scheint ein wesentlicher Weg, den es zukünftig in der Entwicklung neuartiger Therapieansätze zur kurativen Behandlung der Demenz vom Alzheimer-Typ zu beschreiten gilt, in der Inhibierung oder Aktivierung der für die APP-Prozessierung zuständigen Sekretasen vorgezeichnet zu sein. Hier modulierend eingreifen zu können, um entweder die Entstehung des A β -Peptids, Hauptbestandteil der Plaques, zu verhindern oder vielleicht bereits vorhandene Plaques in definierten Hirnarealen abzubauen, wäre ein viel versprechendes Konzept zur Therapie, aber auch Prophylaxe der Alzheimer-Krankheit. Dabei ist eine medikamentöse Beeinflussung jeder Sekretase denkbar. Beispielsweise vermindert eine Inhibition der γ -Sekretase, wie zu erwarten ist, die Bildung amyloidogener A β -Peptide (Wolfe et al., 1998). Jedoch lässt sich leicht vermuten, dass ein solches Vermindern der γ -Sekretaseaktivität zu ernststen Nebenwirkungen führen muss, da APP ja nicht das exklusive Substrat der γ -Sekretase darstellt, sondern eine Vielzahl weiterer Proteine bereits bekannt ist, die via regulierter intramembranärer Proteolyse verarbeitet werden und physiologisch wichtige Aufgaben beispielsweise in der Embryonalentwicklung oder in der Zelldifferenzierung erfüllen. Die Rolle der γ -Sekretase im Notch-Signalübertragungsweg in der Embryonalentwicklung oder in der Prozessierung des ErbB4, des E-Cadherins oder von CD44 seien als Beispiele genannt (Lammich et al., 2002; Selkoe und Kopan, 2003; Weihofen und Martoglio, 2003). Darüberhinaus ist es auch denkbar, dass

eine Inhibition der γ -Sekretase auch andere, sehr ähnliche Proteasen des selben Typs beeinflusst, wie beispielsweise die Signalpeptid-Peptidasen (Weihofen und Martoglio, 2003). Gerade die Beeinflussung des „Notch signalings“ durch γ -Sekretase-Inhibitoren wird als Ursache für ernste Nebenwirkungen wie gastrointestinale Blutungen und Störungen der Immunantwort verantwortlich gemacht (De Strooper et al., 1999; Tournoy et al., 2004; Wong et al., 2004; van Es et al., 2005).

Über eine Inhibierung von BACE als der entscheidenden β -Sekretase ließe sich auch eine Reduzierung der A β -Peptid-Last erzielen, jedoch stellte sich heraus, dass die Entwicklung spezifischer β -Sekretase-Inhibitoren aufgrund der Konformation von BACE hinsichtlich seines aktiven Zentrums äußerst schwierig ist und die Folgen einer zwangsläufigen Inkaufnahme der Inhibierung homologer Enzyme wie BACE-2 nicht absehbar sind. Auch im Fall der medikamentösen BACE-Beeinflussung würden weitere wichtige Substrate in ihrer Prozessierung mitinvolviert sein, wie beispielsweise Neuregulin-1, das eine wichtige Rolle in der Myelinisierung spielt und mit der Pathogenese der Schizophrenie in Verbindung gebracht wird (Williams et al., 2003; Willem et al., 2006). Inwiefern dies für den adulten Organismus von Bedeutung ist, ist noch nicht abschließend geklärt.

Da die α -Sekretase der Entstehung von amyloidogenem A β entgegenwirkt, liegt es nahe, auch über eine Aktivierung von ADAM10 als der α -Sekretase *in vivo* einen Weg zur Entwicklung einer kurativen Therapie der Alzheimer-Krankheit zu suchen. Die direkte oder indirekte Stimulierung der PKC beispielsweise führt zu gesteigerter Bildung von neuroprotektivem und neurotrophem sAPP α (Lammich et al., 1999). ADAM10 spielt jedoch auch eine entscheidende Rolle im Notch-Signalweg, der nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern auch im Erwachsenenalter von Wichtigkeit ist, sodass erwartet wurde, dass eine Beeinflussung der α -Sekretase bei Säugern mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen würde (Berezovska et al., 1998). Jedoch sind neuere Ergebnisse an ADAM10 transgenen Mäusen, die mit Alzheimer-Mausmodellen gekreuzt wurden, sehr vielversprechend (Postina et al., 2004). Lernen und Gedächtnis war in diesen Mäusen signifikant verbessert. ADAM10 monotransgene Mäuse mit permanenter neuronaler ADAM10 Überexpression wiesen zudem phänotypisch keine Auffälligkeiten auf. Dies zeigt, dass durch eine Überexpression von ADAM10 in Neuronen die Homöostase des Gesamtorganismus nicht ernsthaft beeinträchtigt wird.

Die Fragestellung, ob und inwiefern die 5'UTR von ADAM10 Einfluss auf die Expression von ADAM10 ausübt, war Gegenstand dieser Arbeit. Eine Untersuchung eines solchen Effektes ist insofern relevant, als dass jedes weitere Verstehen von Kontrollmechanismen der

Expression von ADAM10 eine entscheidende Rolle spielen kann, um zukünftig durch medikamentöse Intervention auf die Bildung von ADAM10 und damit wesentlich auf die Entstehung des A β -Peptids, dem Hauptbestandteil der A β -Plaques, Einfluss auszuüben. So böte sich beispielsweise über die Beeinflussung noch zu identifizierender, die 5'UTR der mRNA von ADAM10 bindender Proteine, die die Proteinexpression von ADAM10 regulieren könnten, ein neuer Ansatz, um eventuell spezifisch in Hirnarealen auf die Expression von ADAM10 aktivierend einzuwirken. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist der Einfluss der 5'UTR von ADAM10 auf die Translation dieser Metalloprotease immens und könnte über modulierende Substanzen, die zwar nicht direkt die α -Sekretase aktivieren, aber über eventuelle „Vermittler“-Proteine, die die mRNA spezifisch binden und die Proteinexpression von ADAM10 beeinflussen, und wiederum deren Beeinflussung, genutzt werden. Experimente, die im Anschluss an die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, konnten bereits zeigen, dass sich die Effekte der 5'UTR hinsichtlich der ADAM10 Translation auch unmittelbar auf die A β -Sekretion und die Generierung von sAPP α auswirkten (vgl. 4.1): Geringe Mengen an maturem ADAM10, die nach längerer Inkubation der transfizierten Zellen detektiert werden konnten, beeinflussten die APP Prozessierung. Die 5'-deletierte 5'UTR bewirkte einen 2fachen Anstieg an sAPP α . Die Menge an sekretiertem A β nahm dabei signifikant ab. Eine potentiell wichtige physiologische Rolle der 5'UTR für die posttranskriptionale Regulation der ADAM10 Expression hinsichtlich der APP Prozessierung und damit der A β Produktion ist demnach wahrscheinlich.

Zusammenfassend ist in der vorliegenden Arbeit gezeigt worden, dass die 5'UTR von ADAM10 die Translation dieser Metalloprotease wirksam inhibiert. Innerhalb der ersten 259 Nukleotide der langen, GC-reichen 5'UTR muss ein Translations-inhibitorisches Element lokalisiert sein. Darüberhinaus scheint der 3'-Teil der 5'UTR von großer Wichtigkeit für die Stabilität der ADAM10 mRNA und ihre effiziente Translation.

ADAM10 ist der wichtigste α -Sekretase-Kandidat *in vivo* und damit entscheidend für die Prozessierung von APP auf dem anti-amyloidogenen Weg. Jede sich bietende Chance, diesen Weg vermehrt zu beschreiten, liefert große Möglichkeiten, der Bildung von Plaques und damit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit entgegen zu wirken. Daher könnten die hier dargelegten Ergebnisse und Befunde große Bedeutung für eine therapeutische Intervention dieser verheerenden Krankheit erlangen.

5 Zusammenfassung

Die proteolytische Prozessierung des „Amyloid precursor proteins“ (APP) durch die α -Sekretase wirkt der Bildung des Amyloid β -Peptids (A β), dem Hauptbestandteil der Plaques in Hirnen von Alzheimerpatienten, entgegen. ADAM10 ist der wichtigste α -Sekretase-Kandidat *in vivo*. Die Aktivität der α -Sekretase ist in Alzheimerpatienten erniedrigt. Die Überexpression von ADAM10 im Mausmodell kann die pathognomonische Amyloidpathologie verhindern. ADAM10 weist eine lange und GC-reiche 5'UTR mit „upstream open reading frames“ (uORF) auf, Merkmale, die Transkripte vieler Gene aufweisen, die durch translationale Kontrollmechanismen reguliert werden.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, ob und inwiefern die 5'UTR von ADAM10 Einfluss auf die Expression von ADAM10 ausübt. Neben der Ermittlung eines solchen Effekts war es außerdem das Ziel, herauszufinden, auf welcher Ebene der Expressionskontrolle des ADAM10-Gens dies geschieht, ob ein eventuell beobachteter Effekt auf spezielle Strukturen oder Elemente der 5'UTR zurückgeführt werden kann und ob ein solcher Effekt auch auf ein Reporter-gen übertragbar ist. Jede weitere Einsicht in die Regulation der Expression von ADAM10 ist wertvoll und äußerst hilfreich, da ADAM10 die α -Sekretase *in vivo* ist und somit entscheidend dem Entstehen von A β entgegenwirkt (Lammich et al., 1999; Postina et al., 2004).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse seien im Folgenden kurz zusammengefasst: Die ADAM10 5'UTR ist, als Teil von Exon1 der genomischen Region, im Gewebe ubiquitär transkribiert, also kann sie translational Einfluss auf ADAM10 ausüben. Die 5'UTR von ADAM10 sorgt für einen signifikanten Abfall der ADAM10 Proteinexpression verglichen mit dem ADAM10 Konstrukt ohne 5'UTR bei gleich großer Transkriptexpression. Die beiden uORFs spielen dabei keine Rolle in der Unterdrückung der ADAM10 Translation. Bei Deletion der 3'-Hälfte der 5'UTR sinkt die Expression im Vergleich zum wt-Konstrukt signifikant ab, was auf eine mRNA-Struktur stabilisierende und damit die ADAM10 Translation begünstigende Funktion des 3'-Abschnitts der 5'UTR hindeutet. Fehlen 215 bp am 5'-Ende, steigt die Expression bereits auf das 42fache des Ausgangswertes an, bei Deletion der ersten 259 bp steigt die Expression im Schnitt auf den Faktor 130 an. Auch ein vergleichsweise geringer Anstieg der mRNA-Expression der 5'-Deletionskonstrukte um das 2-5fache der Transkriptmenge des Vergleichskonstrukts kann nicht den immensen Anstieg der Proteinexpression durch beispielsweise erhöhte mRNA Stabilität erklären. Es muss also ein stark Translations-inhibitorisches Element auf der 5'-Hälfte der 5'UTR lokalisiert sein.

Der Effekt der Inhibierung der ADAM10 Proteinexpression durch seine 5'UTR kann sowohl in *in vitro*-Transkription und -Translation nachgewiesen, als auch auf ein Luciferase-Reportergen und damit auf einen heterologen ORF übertragen werden. Jedoch fällt die expressionssteigernde Wirkung der am 5'-Ende deletierten 5'UTR auf Luciferase geringer aus als auf ADAM10, was durch sehr unterschiedliche Halbwertszeiten dieser beiden Proteine erklärt werden kann. Der zu Grunde liegende Mechanismus beruht am wahrscheinlichsten auf mRNA-Struktur-bedingten Mechanismen der Translationskontrolle. In nachfolgenden Experimenten, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass überexprimiertes und an der 5'UTR modifiziertes ADAM10 sich direkt auf die APP Prozessierung und damit auf die A β Produktion auswirkte.

Die vorliegende Arbeit legt dar, dass die 5'UTR von ADAM10 eine wichtige Rolle in der posttranskriptionalen Regulation der ADAM10 Expression und folglich der A β -Produktion spielen kann. Dies könnte große Bedeutung für die weitere Erforschung und Entwicklung neuartiger Therapieansätze der Alzheimer'schen Erkrankung erlangen.

Literaturverzeichnis

- Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S. und Taramelli, R. (2000). "The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region." FEBS Lett **468**(1): 59-64.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." Allg Zeitschr Psychiatr **64**: 146-148.
- Alzheimer, A. (1911). "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters." Zeitschr Gesamte Neurol Psychiatr **4**: 356-385.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. und Fahrenholz, F. (2001). "Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases." Faseb J **15**(10): 1837-9.
- Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H. und Russell, D. W. (1989). "Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme." J Biol Chem **264**(14): 8222-9.
- Areosa, S. A., Sherriff, F. und McShane, R. (2005). "Memantine for dementia." Cochrane Database Syst Rev(3): CD003154.
- Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T. K., Rose-John, S. und Massague, J. (1996). "Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors." J Biol Chem **271**(19): 11376-82.
- Bech-Serra, J. J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J. und Canals, F. (2006). "Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis." Mol Cell Biol **26**(13): 5086-95.
- Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M. und Vassar, R. (2000). "Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues." J Biol Chem **275**(27): 20647-51.
- Berezovska, O., Xia, M. Q. und Hyman, B. T. (1998). "Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **57**(8): 738-45.
- Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1991). "Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function." Brain Pathol **1**(4): 241-51.
- Bickel, H. (2000). "[Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]." Gesundheitswesen **62**(4): 211-8.
- Bickel, H. (2001). "[Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]." Z Gerontol Geriatr **34**(2): 108-15.
- Biedler, J. L., Helson, L. und Spengler, B. A. (1973). "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." Cancer Res **33**(11): 2643-52.
- Bielschowsky, M. (1902). "Die Silberimprägation der Achsenzylinder." Neurologisches Zentralblatt **21**: 579-84.
- Bird, T. D. und Miller, B. L. (2005). Harrisons Innere Medizin. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. und Cerretti, D. P. (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-33.
- Black, R. A. und White, J. M. (1998). "ADAMs: focus on the protease domain." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 654-9.
- Blocq, P. und Marinesco, G. (1892). "Sur les lesions et la pathogenie de l'epilepsie dite essentielle." La Semaine Medicale **12**: 445-446.
- Böhm, K., Cordes, M., Forster, T. und Krah, K. (2004). Krankheitskosten 2002, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Borroto, A., Ruiz-Paz, S., de la Torre, T. V., Borrell-Pages, M., Merlos-Suarez, A., Pandiella, A., Blobel, C. P., Baselga, J. und Arribas, J. (2003). "Impaired trafficking and activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in cell mutants defective in protein ectodomain shedding." J Biol Chem **278**(28): 25933-9.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985). "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus." Cell **41**(2): 521-30.
- Braak, H. und Braak, E. (1996). "Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis." Acta Neuropathol **92**(2): 197-201.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J. und Reintjes, R. (1996a). "Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease." Neurosci Lett **210**(2): 87-90.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R. A., Jansen, E. N. und Bohl, J. (1996b). "Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases." J Neural Transm **103**(4): 455-90.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. und Israel, A. (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." Mol Cell **5**(2): 207-16.
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. und Black, R. A. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**(43): 27765-7.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. und Wong, P. C. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." Nat Neurosci **4**(3): 233-4.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. und Haass, C. (1998). "The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex." J Biol Chem **273**(6): 3205-11.
- Chang, W. P., Koelsch, G., Wong, S., Downs, D., Da, H., Weerasena, V., Gordon, B., Devasamudram, T., Bilcer, G., Ghosh, A. K. und Tang, J. (2004). "In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors." J Neurochem **89**(6): 1409-16.

- Chantry, A. und Glynn, P. (1990). "A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues." Biochem J **268**(1): 245-8.
- Chantry, A., Gregson, N. A. und Glynn, P. (1989). "A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization." J Biol Chem **264**(36): 21603-7.
- Chen, C. Y., You, Y. und Shyu, A. B. (1992). "Two cellular proteins bind specifically to a purine-rich sequence necessary for the destabilization function of a c-fos protein-coding region determinant of mRNA instability." Mol Cell Biol **12**(12): 5748-57.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Christensen, M. A., Zhou, W., Qing, H., Lehman, A., Philipsen, S. und Song, W. (2004). "Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1." Mol Cell Biol **24**(2): 865-74.
- Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A. und Di Luca, M. (2002). "[alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients." Mol Med **8**(2): 67-74.
- Coller, J. und Parker, R. (2005). "General translational repression by activators of mRNA decapping." Cell **122**(6): 875-86.
- Dallas, D. J., Genever, P. G., Patton, A. J., Millichip, M. I., McKie, N. und Skerry, T. M. (1999). "Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone." Bone **25**(1): 9-15.
- De Pietri Tonelli, D., Mihailovich, M., Di Cesare, A., Codazzi, F., Grohovaz, F. und Zacchetti, D. (2004). "Translational regulation of BACE-1 expression in neuronal and non-neuronal cells." Nucleic Acids Res **32**(5): 1808-17.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. und Kopan, R. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." Nature **398**(6727): 518-22.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. und Van Leuven, F. (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." Nature **391**(6665): 387-90.
- De Strooper, B. und Woodgett, J. (2003). "Alzheimer's disease: Mental plaque removal." Nature **423**(6938): 392-3.
- Decker, C. J. und Parker, R. (1993). "A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation." Genes Dev **7**(8): 1632-43.
- Dufouil, C. und Alperovitch, A. (2005). "[Epidemiology of Alzheimer's disease]." Rev Prat **55**(17): 1869-78.
- Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C. und Steiner, H. (2002). "Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8666-71.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H. und Haass, C. (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." Nat Cell Biol **5**(5): 486-8.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D. und Ward, P. J. (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." Science **248**(4959): 1122-4.

- Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G. M. und Goodman, C. S. (1996). "The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13233-8.
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D. und Choe, H. (2000). "BACE2, a beta - secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9712-7.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E. und Sczufca, M. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet **366**(9503): 2112-7.
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M. M., Teplow, D. B., Haass, C. und Walter, J. (2002). "A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway." J Neurochem **81**(5): 1011-20.
- Fukumoto, H., Cheung, B. S., Hyman, B. T. und Irizarry, M. C. (2002). "Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease." Arch Neurol **59**(9): 1381-9.
- Ge, Y. W., Maloney, B., Sambamurti, K. und Lahiri, D. K. (2004). "Functional characterization of the 5' flanking region of the BACE gene: identification of a 91 bp fragment involved in basal level of BACE promoter expression." Faseb J **18**(9): 1037-9.
- Gebauer, F. und Hentze, M. W. (2004). "Molecular mechanisms of translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 827-35.
- Gleixner, C., Müller, M. und Wirth, S. (2006, 2007). Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis. Breisach, Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
- Glenner, G. G. und Wong, C. W. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-90.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-82.
- Goedert, M. und Spillantini, M. G. (2000). "Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1502**(1): 110-21.
- Golde, T. E. (2006). "Disease modifying therapy for AD?" J Neurochem **99**(3): 689-707.
- Gray, N. K. und Hentze, M. W. (1994a). "Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs." Embo J **13**(16): 3882-91.
- Gray, N. K. und Hentze, M. W. (1994b). "Regulation of protein synthesis by mRNA structure." Mol Biol Rep **19**(3): 195-200.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. und Binder, L. I. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4913-7.
- Haan, M. N. und Wallace, R. (2004). "Can dementia be prevented? Brain aging in a population-based context." Annu Rev Public Health **25**: 1-24.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1993). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." J Biol Chem **268**(5): 3021-4.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. und et al. (1992). "Amyloid

- beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." Nature **359**(6393): 322-5.
- Haass, C. und Steiner, H. (2002). "Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases." Trends Cell Biol **12**(12): 556-62.
- Hallauer, J., Schons, M. und Smala, A. (2000). "Untersuchung von Krankheitskosten bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung." Gesundheitsökonomie und Qualitätsmanagement **5**: 73-79.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. und Ron, D. (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-108.
- Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-6.
- Harrison, P. J. und Weinberger, D. R. (2005). "Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence." Mol Psychiatry **10**(1): 40-68; image 5.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. und Saftig, P. (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." Hum Mol Genet **11**(21): 2615-24.
- Hattori, M., Osterfield, M. und Flanagan, J. G. (2000). "Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent." Science **289**(5483): 1360-5.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L. und De Strooper, B. (2000). "Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells." Nat Cell Biol **2**(7): 461-2.
- Hinnebusch, A. G. (1996). Translational Control. J. W. B. Hershey, M. Mathews and N. Sonenberg. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 199-244.
- Hinnebusch, A. G. (1997). "Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome." J Biol Chem **272**(35): 21661-4.
- Holcik, M. und Sonenberg, N. (2005). "Translational control in stress and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 318-27.
- Holsinger, R. M., McLean, C. A., Beyreuther, K., Masters, C. L. und Evin, G. (2002). "Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease." Ann Neurol **51**(6): 783-6.
- Horvath, P., Sukanuma, A., Inaba, M., Pan, Y. B. und Gupta, K. C. (1995). "Multiple elements in the 5' untranslated region down-regulate c-sis messenger RNA translation." Cell Growth Differ **6**(9): 1103-10.
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S. und Glynn, P. (1996). "Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types." Biochem J **317** (Pt 1): 45-50.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D. und Yan, R. (2006). "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system." Nat Neurosci **9**(12): 1520-5.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K. J., Rose-John, S. und Ludwig, A. (2003). "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion." Blood **102**(4): 1186-95.

- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C. und Christie, G. (1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." Mol Cell Neurosci **14**(6): 419-27.
- Hussain, I., Powell, D. J., Howlett, D. R., Chapman, G. A., Gilmour, L., Murdock, P. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Schneider, K., Ratcliffe, S. J., Tattersall, D., Testa, T. T., Southan, C., Ryan, D. M., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C. und Christie, G. (2000). "ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site." Mol Cell Neurosci **16**(5): 609-19.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W. und Damasio, A. R. (1990). "Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study." Neurology **40**(11): 1721-30.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R. und Barnes, C. L. (1984). "Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation." Science **225**(4667): 1168-70.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Kromer, L. J. und Damasio, A. R. (1986). "Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease." Ann Neurol **20**(4): 472-81.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. und Mekada, E. (1998). "A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor." Embo J **17**(24): 7260-72.
- Kaether, C. und Haass, C. (2004). "A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation." J Cell Biol **167**(5): 809-12.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Muller-Hill, B. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-6.
- Kanowski, S. (2002). Vierter Altenbericht zur Lage der älteren Generation in der Bundesrepublik Deutschland: Risiken, Lebensqualität und Versorgung Hochaltriger – unter besonderer Berücksichtigung demenzieller Erkrankungen, Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend. **4**.
- Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M. und Huovila, A. P. (2000). "Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS." Mol Cell Neurosci **15**(6): 547-60.
- Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." Nature **197**: 192-3.
- Kieseier, B. C., Pischel, H., Neuen-Jacob, E., Tourtellotte, W. W. und Hartung, H. P. (2003). "ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS." Glia **42**(4): 398-405.
- Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A. und Soininen, H. (2002). "Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease." Ann Intern Med **137**(3): 149-55.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. und Ishiura, S. (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." Biochem J **343 Pt 2**: 371-5.

- Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr. und Kelly, J. W. (1999). "Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 9989-90.
- Kozak, M. (1986). "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes." Cell **44**(2): 283-92.
- Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Res **15**(20): 8125-48.
- Kozak, M. (1989). "Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs." Mol Cell Biol **9**(11): 5134-42.
- Kozak, M. (1991). "An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control." J Cell Biol **115**(4): 887-903.
- Kraepelin, E. (1910). Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Leipzig, Barth Verlag.
- Kruse, P. K. und Patterson, M. K. (1973). Tissue culture, methods and applications. New York and London.
- Kuentzel, S. L., Ali, S. M., Altman, R. A., Greenberg, B. D. und Raub, T. J. (1993). "The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells." Biochem J **295** (Pt 2): 367-78.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. und Fahrenholz, F. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3922-7.
- Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A. K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H. und Haass, C. (2002). "Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide." J Biol Chem **277**(47): 44754-9.
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A. K., Lichtenthaler, S. F. und Haass, C. (2004). "Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region." EMBO Rep **5**(6): 620-5.
- Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L. O., Rowe, B. A. und Wagner, S. L. (1995). "Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease." Nat Med **1**(8): 829-32.
- Larson, E. B., Shadlen, M. F., Wang, L., McCormick, W. C., Bowen, J. D., Teri, L. und Kukull, W. A. (2004). "Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease." Ann Intern Med **140**(7): 501-9.
- Lee, J., Park, E. H., Couture, G., Harvey, I., Garneau, P. und Pelletier, J. (2002). "An upstream open reading frame impedes translation of the huntingtin gene." Nucleic Acids Res **30**(23): 5110-9.
- Leem, J. Y., Vijayan, S., Han, P., Cai, D., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Xu, H. und Thinakaran, G. (2002). "Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin." J Biol Chem **277**(21): 19236-40.
- Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C. und Selkoe, D. J. (1996). "Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation." Neurobiol Dis **3**(1): 16-32.

- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D. und Schellenberg, G. D. (1995). "A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1." Science **269**(5226): 970-3.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L. B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D. und Shen, Y. (2004). "Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3632-7.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. und Tang, J. (2000). "Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1456-60.
- Liu, L., Dilworth, D., Gao, L., Monzon, J., Summers, A., Lassam, N. und Hogg, D. (1999). "Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma." Nat Genet **21**(1): 128-32.
- Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. und Cormier, M. J. (1991). "Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4438-42.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M. H., Broadway, N., Andrews, R. C., Bickett, D. M., Leesnitzer, M. A. und Becherer, J. D. (2005). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." Comb Chem High Throughput Screen **8**(2): 161-71.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M. und Vassar, R. (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." Nat Neurosci **4**(3): 231-2.
- Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E. (1998). "Tau in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol **8**(11): 425-7.
- Marcinkiewicz, M. und Seidah, N. G. (2000). "Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain." J Neurochem **75**(5): 2133-43.
- Maskos, K., Fernandez-Catalan, C., Huber, R., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., Ellestad, G. A., Reddy, P., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Castner, B. J., Davis, R., Clarke, H. R., Petersen, M., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., March, C. J., Paxton, R. J., Black, R. A. und Bode, W. (1998). "Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3408-12.
- Matthews, J. C., Hori, K. und Cormier, M. J. (1977). "Purification and properties of Renilla reniformis luciferase." Biochemistry **16**(1): 85-91.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I. und Rydel, R. E. (1993). "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein." Neuron **10**(2): 243-54.
- McShane, R., Areosa Sastre, A. und Minakaran, N. (2006). "Memantine for dementia." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003154.
- Meijer, H. A. und Thomas, A. A. (2002). "Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA." Biochem J **367**(Pt 1): 1-11.

- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M. und Ungerer, A. (1998). "Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12683-8.
- Millichip, M. I., Dallas, D. J., Wu, E., Dale, S. und McKie, N. (1998). "The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro." Biochem Biophys Res Commun **245**(2): 594-8.
- Morris, H. R., Khan, M. N., Janssen, J. C., Brown, J. M., Perez-Tur, J., Baker, M., Ozansoy, M., Hardy, J., Hutton, M., Wood, N. W., Lees, A. J., Revesz, T., Lantos, P. und Rossor, M. N. (2001). "The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia." Arch Neurol **58**(11): 1813-6.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahl, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D. und et al. (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." Nature **385**(6618): 733-6.
- Mucke, L., Abraham, C. R. und Masliah, E. (1996). "Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice." Ann N Y Acad Sci **777**: 82-8.
- Muckenthaler, M., Gray, N. K. und Hentze, M. W. (1998). "IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F." Mol Cell **2**(3): 383-8.
- Muhlrad, D., Decker, C. J. und Parker, R. (1995). "Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA." Mol Cell Biol **15**(4): 2145-56.
- Nath, D., Slocombe, P. M., Webster, A., Stephens, P. E., Docherty, A. J. und Murphy, G. (2000). "Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility." J Cell Sci **113** (Pt **12**): 2319-28.
- Nelson, J. A., Reynolds-Kohler, C. und Smith, B. A. (1987). "Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene." Mol Cell Biol **7**(11): 4125-9.
- Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H. und Wurtman, R. J. (1996). "Serotonin 5-HT2a and 5-HT2c receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion." J Biol Chem **271**(8): 4188-94.
- Nitsch, R. M., Kim, C. und Growdon, J. H. (1998). "Vasopressin and bradykinin regulate secretory processing of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease." Neurochem Res **23**(5): 807-14.
- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J. und Growdon, J. H. (1992). "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors." Science **258**(5080): 304-7.
- Odetti, P., Angelini, G., Dapino, D., Zaccheo, D., Garibaldi, S., Dagna-Bricarelli, F., Piombo, G., Perry, G., Smith, M., Traverso, N. und Tabaton, M. (1998). "Early glycoxidation damage in brains from Down's syndrome." Biochem Biophys Res Commun **243**(3): 849-51.
- Ott, A., Breteler, M. M., van Harskamp, F., Claus, J. J., van der Cammen, T. J., Grobbee, D. E. und Hofman, A. (1995). "Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study." Bmj **310**(6985): 970-3.

- Pakaski, M., Rakonczay, Z. und Kasa, P. (2001). "Reversible and irreversible acetylcholinesterase inhibitors cause changes in neuronal amyloid precursor protein processing and protein kinase C level in vitro." Neurochem Int **38**(3): 219-26.
- Pan, D. und Rubin, G. M. (1997). "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis." Cell **90**(2): 271-80.
- Parker, R. und Song, H. (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." Nat Struct Mol Biol **11**(2): 121-7.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. und Hooper, N. M. (1998). "Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase." Biochemistry **37**(6): 1680-5.
- Pelham, H. R. und Jackson, R. J. (1976). "An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates." Eur J Biochem **67**(1): 247-56.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J. und Black, R. A. (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." Science **282**(5392): 1281-4.
- Pickering, B. M. und Willis, A. E. (2005). "The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 39-47.
- Pike, C. J., Cummings, B. J., Monzavi, R. und Cotman, C. W. (1994). "Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease." Neuroscience **63**(2): 517-31.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. und Gauthier, S. (1993). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease." Lancet **342**(8873): 697-9.
- Pontrelli, L., Sidiropoulos, K. G. und Adeli, K. (2004). "Translational control of apolipoprotein B mRNA: regulation via cis elements in the 5' and 3' untranslated regions." Biochemistry **43**(21): 6734-44.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F. und Fahrenholz, F. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." J Clin Invest **113**(10): 1456-64.
- Pöttsch, O. und Sommer, B. (2003). Bevölkerung Deutschlands bis 2050. 10. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung., Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Preece, P., Virley, D. J., Costandi, M., Coombes, R., Moss, S. J., Mudge, A. W., Jazin, E. und Cairns, N. J. (2003). "Beta-secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer's disease." Brain Res Mol Brain Res **116**(1-2): 155-8.
- Prinzen, C., Muller, U., Endres, K., Fahrenholz, F. und Postina, R. (2005). "Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter." Faseb J **19**(11): 1522-4.
- Racchi, M., Solano, D. C., Sironi, M. und Govoni, S. (1999). "Activity of alpha-secretase as the common final effector of protein kinase C-dependent and -independent modulation of amyloid precursor protein metabolism." J Neurochem **72**(6): 2464-70.
- Rapoport, S. I. (1988). "Brain evolution and Alzheimer's disease." Rev Neurol (Paris) **144**(2): 79-90.

- Rapoport, S. I. (1990). "Integrated phylogeny of the primate brain, with special reference to humans and their diseases." Brain Res Brain Res Rev **15**(3): 267-94.
- Ratovitski, T., Slunt, H. H., Thinakaran, G., Price, D. L., Sisodia, S. S. und Borchelt, D. R. (1997). "Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin." J Biol Chem **272**(39): 24536-41.
- Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J. und Corfas, G. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4." J Biol Chem **275**(14): 10379-87.
- Roberts, S. B., Ripellino, J. A., Ingalls, K. M., Robakis, N. K. und Felsenstein, K. M. (1994). "Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase." J Biol Chem **269**(4): 3111-6.
- Rogers, G. W., Jr., Edelman, G. M. und Mauro, V. P. (2004). "Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2794-9.
- Rogers, J. T., Randall, J. D., Cahill, C. M., Eder, P. S., Huang, X., Gunshin, H., Leiter, L., McPhee, J., Sarang, S. S., Utsuki, T., Greig, N. H., Lahiri, D. K., Tanzi, R. E., Bush, A. I., Giordano, T. und Gullans, S. R. (2002a). "An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript." J Biol Chem **277**(47): 45518-28.
- Rogers, J. T., Randall, J. D., Eder, P. S., Huang, X., Bush, A. I., Tanzi, R. E., Venti, A., Payton, S. M., Giordano, T., Nagano, S., Cahill, C. M., Moir, R., Lahiri, D. K., Greig, N., Sarang, S. S. und Gullans, S. R. (2002b). "Alzheimer's disease drug discovery targeted to the APP mRNA 5'untranslated region." J Mol Neurosci **19**(1-2): 77-82.
- Rosendahl, M. S., Ko, S. C., Long, D. L., Brewer, M. T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S. M., Moreland, J., Meyers, M. A., Kohno, T., Lyons, D. und Lichenstein, H. S. (1997). "Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases." J Biol Chem **272**(39): 24588-93.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P. und Blobel, C. P. (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." J Cell Biol **164**(5): 769-79.
- Sambamurti, K., Kinsey, R., Maloney, B., Ge, Y. W. und Lahiri, D. K. (2004). "Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter." Faseb J **18**(9): 1034-6.
- Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B. und Haass, C. (2001). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch." EMBO Rep **2**(9): 835-41.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J. und et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." Neurology **43**(8): 1467-72.
- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. und Funke-Kaiser, H. (2006). "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula." J Mol Med **84**(11): 901-10.

- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. und Younkin, S. (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." Nat Med **2**(8): 864-70.
- Selkoe, D. und Kopan, R. (2003). "Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration." Annu Rev Neurosci **26**: 565-97.
- Selkoe, D. J. (1994a). "Alzheimer's disease: a central role for amyloid." J Neuropathol Exp Neurol **53**(5): 438-47.
- Selkoe, D. J. (1994b). "Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease." Annu Rev Cell Biol **10**: 373-403.
- Selkoe, D. J. (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." J Biol Chem **271**(31): 18295-8.
- Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." Nature **399**(6738 Suppl): A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev **81**(2): 741-66.
- Selkoe, D. J. (2004a). "Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies." Ann Intern Med **140**(8): 627-38.
- Selkoe, D. J. (2004b). "Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases." Nat Cell Biol **6**(11): 1054-61.
- Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., Joachim, C. L., Vickers, E. A., Lee, G., Fritz, L. C. und Oltersdorf, T. (1988). "Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7341-5.
- Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L. O., Winblad, B. und Benedikz, E. (2000). "Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients." Neurosci Lett **278**(3): 169-72.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C. und et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." Nature **359**(6393): 325-7.
- Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C. und Steiner, H. (2004). "Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants." J Biol Chem **279**(40): 41340-5.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. und et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." Science **258**(5079): 126-9.
- Sidiropoulos, K. G., Pontrelli, L. und Adeli, K. (2005). "Insulin-mediated suppression of apolipoprotein B mRNA translation requires the 5' UTR and is characterized by decreased binding of an insulin-sensitive 110-kDa 5' UTR RNA-binding protein." Biochemistry **44**(37): 12572-81.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. und John, V.

- (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* **402**(6761): 537-40.
- Sisodia, S. S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6075-9.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A. und Logeat, F. (2003). "The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7638-43.
- Skovronsky, D. M., Fath, S., Lee, V. M. und Milla, M. E. (2001). "Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques." *J Neurobiol* **49**(1): 40-6.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fichtler, K. und Haass, C. (2000). "Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases." *Nat Cell Biol* **2**(11): 848-51.
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. und Haass, C. (2002). "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin." *J Biol Chem* **277**(42): 39062-5.
- Terry, R. D., Gonatas, N. K. und Weiss, M. (1964). "Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia." *Am J Pathol* **44**: 269-97.
- Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R. und Sisodia, S. S. (1997). "Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors." *J Biol Chem* **272**(45): 28415-22.
- Thompson, J. F., Hayes, L. S. und Lloyd, D. B. (1991). "Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation." *Gene* **103**(2): 171-7.
- Thorsett, E. D. und Latimer, L. H. (2000). "Therapeutic approaches to Alzheimer's disease." *Curr Opin Chem Biol* **4**(4): 377-82.
- Tournoy, J., Bossuyt, X., Snellinx, A., Regent, M., Garmyn, M., Serneels, L., Saftig, P., Craessaerts, K., De Strooper, B. und Hartmann, D. (2004). "Partial loss of presenilins causes seborrhic keratosis and autoimmune disease in mice." *Hum Mol Genet* **13**(13): 1321-31.
- Tyler, S. J., Dawbarn, D., Wilcock, G. K. und Allen, S. J. (2002). "alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun* **299**(3): 373-6.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. und Clevers, H. (2005). "Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells." *Nature* **435**(7044): 959-63.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. und Citron, M. (1999). "Beta-secretase cleavage of

- Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* **286**(5440): 735-41.
- Vattem, K. M. und Wek, R. C. (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11269-74.
- Villanueva de la Torre, T., Bech-Serra, J. J., Ruiz-Paz, S., Baselga, J. und Arribas, J. (2004). "Inactivating mutations block the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in the early secretory pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **314**(4): 1028-35.
- Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D. L., Thiyagarajan, M., Percival, S. S., Talcott, S. T. und Pasinetti, G. M. (2006). "Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease." *Faseb J* **20**(13): 2313-20.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E. und Solomon, F. (1992). "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10758-62.
- Weihofen, A. und Martoglio, B. (2003). "Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides." *Trends Cell Biol* **13**(2): 71-8.
- Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T. A., Higashiyama, S., Manova, K., Ludwig, T. und Blobel, C. P. (2002). "Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life." *Mol Cell Biol* **22**(5): 1537-44.
- Weyerer, S. (2005). Altersdemenz, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut. **Heft 28**.
- Wiestner, A., Schlemper, R. J., van der Maas, A. P. und Skoda, R. C. (1998). "An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia." *Nat Genet* **18**(1): 49-52.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C. und Haass, C. (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." *Science* **314**(5799): 664-6.
- Williams, N. M., Preece, A., Spurlock, G., Norton, N., Williams, H. J., Zammit, S., O'Donovan, M. C. und Owen, M. J. (2003). "Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia." *Mol Psychiatry* **8**(5): 485-7.
- Willis, A. E. (1999). "Translational control of growth factor and proto-oncogene expression." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 73-86.
- Wolfe, M. S., Citron, M., Diehl, T. S., Xia, W., Donkor, I. O. und Selkoe, D. J. (1998). "A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity." *J Med Chem* **41**(1): 6-9.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Moore, C. L., Leatherwood, D. D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I. O. und Selkoe, D. J. (1999a). "Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease." *Biochemistry* **38**(15): 4720-7.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. und Selkoe, D. J. (1999b). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* **398**(6727): 513-7.
- Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P., Primakoff, P., Myles, D. G. und White, J. M. (1995). "ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene

- family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain." Dev Biol **169**(1): 378-83.
- Wolfson, C., Wolfson, D. B., Asgharian, M., M'LAN, C. E., Ostbye, T., Rockwood, K. und Hogan, D. B. (2001). "A reevaluation of the duration of survival after the onset of dementia." N Engl J Med **344**(15): 1111-6.
- Wong, G. T., Manfra, D., Poulet, F. M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J. S., Lee, H. J., Zhang, L., Higgins, G. A. und Parker, E. M. (2004). "Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation." J Biol Chem **279**(13): 12876-82.
- Wood, M. W., VanDongen, H. M. und VanDongen, A. M. (1996). "The 5'-untranslated region of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2A subunit controls efficiency of translation." J Biol Chem **271**(14): 8115-20.
- Yamazaki, K., Mizui, Y. und Tanaka, I. (1997). "Radiation hybrid mapping of human ADAM10 gene to chromosome 15." Genomics **45**(2): 457-9.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L. und Gurney, M. E. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." Nature **402**(6761): 533-7.
- Yan, R., Munzner, J. B., Shuck, M. E. und Bienkowski, M. J. (2001). "BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells." J Biol Chem **276**(36): 34019-27.
- Yang, L. B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X. L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R. und Shen, Y. (2003). "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." Nat Med **9**(1): 3-4.
- Zhong, Z., Higaki, J., Murakami, K., Wang, Y., Catalano, R., Quon, D. und Cordell, B. (1994). "Secretion of beta-amyloid precursor protein involves multiple cleavage sites." J Biol Chem **269**(1): 627-32.
- Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A. Y. (1990). "Mini-prep in ten minutes." Biotechniques **8**(2): 172-173.
- Zhou, W. und Song, W. (2006). "Leaky scanning and reinitiation regulate BACE1 gene expression." Mol Cell Biol **26**(9): 3353-64.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-15.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Christian Haass für die Möglichkeit zur Promotion in seinem Labor im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin. Seine Energie und sein Enthusiasmus für die biomedizinische Forschung sind Vorbild und großer Ansporn weit über diese Arbeit hinaus.

Größter Dank gilt Sven Lammich für seine umfangreiche Betreuung, seine Geduld und seine Unterstützung. Vor allem durch seine ständige Präsenz war er immer eine große Hilfe. Ihm verdanke ich das Erlernen klassischer Labormethoden „von der Pike auf“ und das Angreifen, Planen und Organisieren eines Laborprojekts – für mich als Mediziner von unschätzbarem Wert und Grundlage eines weiteren „Forscherdaseins“.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe und anderen Labornachbarn möchte ich besonders danken, v.a. Ann-Katrin Ludwig, Bozidar Nowak, Sonja Zilow, Michael Willem und Keiro Shirovani für ihre Unterstützung bei der Bewältigung kleiner und größerer Probleme im Laboralltag und der Diskussion wichtiger Themen. Ich habe viel von Euch gelernt.

Weiterer Dank gilt Prof. Heesemann und dem „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der LMU. Danke für methodische und finanzielle Unterstützung.

Vielen Dank an Sandra Vengadasalam für ihre Expertise und Gelassenheit am Computer.

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken für ihre Unterstützung und Hilfe nicht nur finanzieller Natur, während meines Studiums und auch darüber hinaus. In allen Lebenslagen gab es nur konstruktive Kritik und Ansporn. Ihr zwei seid einfach spitze.

Und natürlich vielen Dank an Leonie Heesemann für alle Schreibstunden in ausgewählten Münchner Bibliotheken, in der Volkartstraße oder am schönsten See – gemeinsam geht es sowieso am besten.

Lebenslauf

Name Dominik Büll
Geburtstag 10.06.1980
Geburtsort München

Ausbildung

Seit 04/2009 **Wissenschaftler und Assistenzarzt, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München**
 AG Molekulare Psychotraumatologie

04 – 06/2008 **2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

01/2005 – 02/2007 **Experimentelle Doktorarbeit im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU**

10/2003 – 02/2008 **Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München**

10/2001 – 09/2003 **Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München**

09/2000 – 06/2001 **Grundwehrdienst**

09/1991 – 06/2000 **Rhabanus-Maurus-Gymnasium St.Otilien**

Publikation

Lammich S.*, Buell D.*, Zilow S., Ludwig A.K., Nuscher B., Lichtenthaler S.F., Prinzen C., Fahrenholz F., Haass C.:
Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region
 J Biol Chem. 2010 Mar 26. [Epub ahead of print] *equal contribution

Stipendien

4/2009 – 4/2010 **Forschungsstipendium der Max-Planck-Gesellschaft**

2/2005 – 7/2006 **Stipendium des Promotionsstudiums Molekulare Medizin (FöFoLe) der LMU**