

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Regulierte Intramembranproteolyse des Bri2-Proteins

Lucas Martin
aus Mannheim
2010

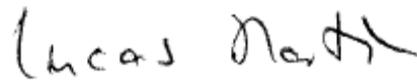
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Christian Haass betreut und von Frau PD Dr. Konstanze Winklhofer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Berlin, am 15.02.2010



Lucas Martin

Dissertation eingereicht am	01.03.2010
1. Gutachter	Priv.-Doz. Dr. Konstanze Winklhofer
2. Gutachter	Prof. Dr. Christian Haass
Mündliche Prüfung am	01.06.2010

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Martin L., Fluhrer, R., Reiss K., Kremmer E., Saftig P., and Haass C.
Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/b
Journal of Biological Chemistry; 2008 Jan 18, 283(3):1644-52

Martin L., Fluhrer, R., and Haass C.
Substrate requirements for SPPL2b dependent intramembrane proteolysis
Journal of Biological Chemistry; 2009 Feb 27, 284(9):5662-70

Die Publikationen befinden sich im Anhang.

Abkürzungsverzeichnis

APP	β -Amyloid Vorläufer Protein
APP CTF α	C-terminales β APP α -Fragment
APP CTF β	C-terminales β APP β -Fragment
APPs	Lösliche APP Ektodomäne
ABRI	Amyloidogenes Peptid der Britischen Demenz
AD	Morbus Alzheimer
ADAM	Disintegrin und Metalloprotease
ADAN	Amyloidogenes Peptid der Dänischen Demenz
AICD	Intrazelluläre Domäne des APP
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A β	Amyloid β -Peptid
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
ATP	Adenosyltriphosphat
BACE	β -Secretase, β -APP schneidendes Enzym
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
BiP	Immunoglobulin-bindendes Protein
Bri1-3	Britisches Demenzprotein 1-3
Bp	Nukleotid-Basenpaare
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
DAPT	N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin t-butylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Erbliche Form der Alzheimer Krankheit
FBD	Familiäre Britische Demenz
FCS	Fötale Kälberserum
FDD	Familiäre Dänische Demenz
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen
ICD	Intrazelluläres Fragment

ICLIP	Intramembranprotease
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ITM2B	Integrales Membran Protein 2b
kDa	Kilo-Dalton
IJMD	Luminale Juxtamembrandomäne
MMP	Matrix Metalloprotease
NICD	Intrazelluläre Domäne des NOTCH-Rezeptors
NFT	Neurofibrilläre Bündel
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
NTF	Amino-Terminales Fragment
p3	Produkt des β APP nach α - und γ -Sekretase Schnitt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEN-2	Presenilin-Verstärkendes Protein 2
PS	Presenilin
PS CTF	C-terminales Fragment des Presenilin Proteins
PS NTF	N-terminales Fragment des Presenilin Proteins
PVDF	Polyvinylidendifluorid Membran
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
S1P	Site-1-Protease
S2P	Site-2-Protease
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Kleine inhibierende RNA-Oligonukleotide
SPP	Signalpeptidpeptidase
SPPL	Homologe Proteine der Signalpeptidpeptidase
SREBP	Bindeprotein des Sterol-regulierenden Promoter Elements
TACE	Tumor Nekrose Faktor α schneidende Protease
TAPI	Inhibitor der Tumor Nekrose Faktor α Protease
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFPP	Typ-4 Prepilin-Protease
TGN	Trans Golgi Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WB	Western Blot
wt	Wild-Typ Form

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
INHALTSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	12
SUMMARY	14
1. EINLEITUNG	17
1.1 Regulierte Intramembranproteolyse	17
1.1.1 Regulierte Intramembranproteolyse durch S2P	18
1.1.1.1 ER-Stress Regulation durch S2P	18
1.1.1.2 Steuerung der Lipid-Biosynthese durch S2P	19
1.1.1.3 S2P Struktur	20
1.1.1.4 Substratanforderungen und Regulation der S2P-abhängigen Proteolyse	21
1.1.2 Intramembranproteolyse durch Rhomboid-Proteasen	22
1.1.2.1 Regulation der EGF-Signaltransduktion durch Rhomboid	22
1.1.2.2 Struktur von Rhomboiden	23
1.1.2.3 Substratanforderungen und Regulation der Rhomboide	24
1.1.3 Regulierte Intramembranproteolyse durch GxGD-Proteasen	24
1.1.3.1 Die γ -Sekretase	27
1.1.3.2 Substratanforderungen der γ -Sekretase	28
1.1.3.3 Die γ -Sekretase steuert Zelldifferenzierung über die RIP des NOTCH-Rezeptors	29
1.1.3.4 A β -Peptide sind Produkte der RIP des APP	30
1.1.3.5 Signalpeptidpeptidase	31
1.1.3.6 Signalpeptidpeptidase-homologe Proteasen	33
1.1.3.7 Regulierte Intramembranproteolyse des TNF α	35
1.1.3.8 Substratanforderungen von SPP/SPPL-Proteasen	37
1.2 Die Alzheimer-Erkrankung	38
1.2.1 Neuropathologische Merkmale	38
1.2.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	40
1.3 Familiäre Britische und Dänische Demenz	40
1.3.1 Auftreten und neuropathologische Merkmale	40

1.3.2 Molekulare Grundlagen der Familiären Britischen und Dänischen Demenz im Vergleich zur Alzheimer-Erkrankung	41
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	43
3. MATERIAL & METHODEN	45
3.1 Geräte und Materialien	45
3.2 Puffer und Lösungen	46
3.3 Reagenzien	49
3.4 Modifikation von DNA und mikrobielle Methoden	50
3.4.1 PCR zur Amplifikation und Mutagenese von DNA-Fragmenten	50
3.4.1.1 PCR Ansatz und Programm	50
3.4.1.2 cDNA	51
3.4.1.3 Oligonukleotide und Konstrukte	51
3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese und präparative Reinigung von DNA	55
3.4.3 Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	55
3.4.4 Herstellung von chemisch kompetenten E. coli	55
3.4.5 Transformation von chemisch kompetenten E. coli	56
3.4.6 DNA-Präparation in kleinem Maßstab	56
3.4.7 Sequenzierung von DNA	56
3.4.8 DNA-Präparation in großem Maßstab	57
3.5 Zellkultur	57
3.5.1 Zelllinien	57
3.5.2 Transfektion von HEK293-Zellen	60
3.5.3 RNA-Interferenz-Experimente	60
3.5.4 Behandlung von HEK293-Zellen mit Inhibitoren	61
3.6 Proteinchemische Methoden	61
3.6.1 Präparation von Zellmembranen	61
3.6.2 Antikörper	62
3.6.3 Immunpräzipitation	62
3.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
3.6.5 Western Blot	63
3.6.6 Quantifizierung der Bandenintensität des Western Blots	64
3.7 Statistik	64

3.8 Immunzytochemische Färbung	65
3.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Bildbearbeitung	65
4. ERGEBNISSE	67
4.1. Bri2 wird in der Ektodomäne prozessiert	67
4.1.1 Eine Metalloprotease prozessiert Bri2 in der Ektodomäne	68
4.1.2 Bri2 ist Substrat für ADAM-10	69
4.2 Intramembranproteolyse des Bri2	70
4.2.1 Bri2 ist ein Substrat für SPPL2a und SPPL2b	70
4.2.2 Ectodomain-Shedding und Intramembranproteolyse von proBri2 sind unabhängig vom Furin-Schnitt	76
4.2.3 Co-Lokalisation des Bri2 und SPPL2b	77
4.2.4 Co-Lokalisation des Bri2 mit SPPL2b ist nicht ausreichend für RIP	78
4.3 Differentielle Intramembranproteolyse durch SPPL2b	81
4.3.1 Bri3 ist kein Substrat für RIP	82
4.3.2 Ectodomain-Shedding ist nicht ausreichend für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse	84
4.4 Substratanforderungen für SPPL2b	85
4.4.1 Determinanten in der luminalen Juxtamembrandomäne beeinflussen die SPPL2b-Schnitteffizienz	85
4.4.2 In der TMD des Bri2 existieren Determinanten für die Prozessierung durch SPPL2b	86
4.4.3 In der ICD des Bri2 existieren Determinanten für SPPL2b	88
4.5 Die Rolle des Ectodomain-Sheddings für SPPL2b-abhängige Proteolyse	91
4.5.1 Ectodomain-Shedding ist keine strikte Voraussetzung für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse	91
4.5.2 Die Schnitteffizienz von SPPL2b korreliert negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats	92
4.5.3 Der ADAM-10 Schnitt reguliert die SPPL2b-abhängige RIP des Bri2	94
5. DISKUSSION	95
5.1 RIP des Bri2	95
5.1.1 Die Funktion des Bri2	95
5.1.2 Ectodomain-Shedding des Bri2	98

5.1.3 Bri2 und Bri3 werden differentiell prozessiert	99
5.1.4 Bri2 ist Substrat für SPPL2a und SPPL2b	100
5.1.5 Die Prozessierung des Bri2 im Vergleich zu NOTCH	102
5.2 GxGD-Proteasen – Ähnlichkeiten zum Proteasom?	104
5.3 Sequenz- und Struktur determinanten der SPPL2b-abhängigen Proteolyse	106
5.3.1 Determinanten in der TMD des Substrats	106
5.3.2 Einfluss der zytoplasmatischen und luminalen JMD	108
5.4 Größenselektion, Ectodomain-Shedding und Substraterkennung	110
5.4.1 Größenselektion, Ectodomain-Shedding und Substraterkennung durch die SPPL2b-Protease und die γ -Sekretase	110
5.4.1.1 Größenselektionsmechanismus und Ectodomain-Shedding	110
5.4.1.2 Substraterkennung	111
5.4.2 Ectodomain-Shedding, Substraterkennung und Größenselektion durch andere Intramembranproteasen	112
5.4.2.1 Ectodomain-Shedding, Substraterkennung und Größenselektion durch SPP	112
5.4.2.2 Ectodomain-Shedding, Substraterkennung und Größenselektion durch S2P	113
5.4.2.3 Substraterkennung durch Rhomboid	113
5.5 Gegenüberstellung von SPPL2b mit der γ-Sekretase	114
5.5.1 Gemeinsamkeiten der SPPL2b-Protease und der γ -Sekretase	114
5.5.1.1 Aktives Zentrum und Schnittmechanismus	114
5.5.1.2 Ectodomain-Shedding und Substrat determinanten	116
5.5.1.3 Lokalisation und Lipidkomposition	116
5.5.2 Unterschiede zwischen der SPPL2b-Protease und der γ -Sekretase	117
5.5.2.1 Substrat topologie	117
5.5.2.2 Anzahl der prozessierten Substrate	119
5.5.2.3 Komplexbildung	120
5.5.2.4 Endoproteolyse	121
5.5.2.5 Glykosylierung	121
5.5.3 Implikationen für die Entwicklung von spezifischen γ -Sekretase-Inhibitoren	123
5.6 Ausblick	124
5.6.1 Strukturelle Analyse	124
5.6.2 Differentielle Substratanforderungen der SPP/SPPL-Proteasen	125

5.6.3 Netzwerke von Intramembranproteasen	126
5.6.4 Regulation der GxGD-Proteasen durch Transportfaktoren	126
5.6.5 Endogene Inhibitoren	126
5.6.6 Inaktive GxGD-Proteasen	127
5.6.7 Protease-unabhängige Funktionen der SPP/SPPL-Proteasen	127
5.6.8 Funktion der Bri-Proteine	127
6. LITERATUR	129
DANKSAGUNG	151
LEBENS LAUF	152
ANHANG – NOMENKLATUR DER INTRAMEMBRANPROTEASEN	154
ANHANG – PUBLIKATIONEN	155

Zusammenfassung

Die „Regulierte Intramembranproteolyse“ (RIP) stellt einen von Bakterien bis zum Menschen konservierten Mechanismus zur proteolytischen Prozessierung von Transmembranproteinen dar. RIP wird im Allgemeinen durch zwei proteolytische Schnitte beschrieben. Die erste Prozessierung, die als „Ectodomain-Shedding“ bezeichnet wird, verkürzt die Ektodomäne des Transmembranproteins. Der zweite Schnitt erfolgt innerhalb der Transmembrandomäne des Substrats durch eine Intramembranprotease. Es sind unterschiedliche Klassen von Intramembranproteasen bekannt. Die Site-2-Protease vertritt die Klasse der Intramembranmetalloproteasen, während Rhomboide Intramembranserinproteasen darstellen. Die Intramembran-aspartylproteasen werden nach einem konservierten GxGD-Motiv in ihrem aktiven Zentrum GxGD-Intramembranproteasen genannt.

Die Abbauprodukte der RIP können wichtige Signalfunktionen übernehmen, so spielen sie beispielsweise bei der Expression von bestimmten Zytokinen oder in Zellteilungs- bzw. Zelldifferenzierungsprozessen eine bedeutende Rolle. Pathologisch erlangt die RIP große Bedeutung in der Alzheimer-Erkrankung. Mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierte A β -Peptide, die im Gehirn der Patienten zu amyloiden Plaques akkumulieren, sind ein Produkt der Prozessierung des amyloiden Vorläufer-Proteins APP durch die γ -Sekretase, einer GxGD-Intramembranprotease.

Die γ -Sekretase ist Gegenstand intensiver pharmazeutischer Forschung, da ihre Inhibition und die damit einhergehende Reduktion der A β -Peptide ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Alzheimer-Patienten ist. Neben der γ -Sekretase sind die Signalpeptidpeptidase (SPP) und die Signalpeptidpeptidase-ähnlichen Proteasen (SPPL; SPPL2a,b,c bzw. SPPL3) Mitglieder der GxGD-Familie. SPP/SPPL-Proteasen übernehmen wichtige Funktionen, so kontrollieren SPPL2a bzw. SPPL2b über die Prozessierung des Tumor Nekrose Faktor α die Expression des Zytokins Interleukin-12. Einige Inhibitoren der γ -Sekretase, die das aktive Zentrum als Zielstruktur haben, zeigen Kreuzreaktionen mit SPP/SPPL-Proteasen. Die Ursache der Kreuzreaktion ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ähnlichkeit der aktiven Zentren der GxGD-Proteasen untereinander. Beim Einsatz unspezifischer γ -Sekretase-Inhibitoren zur Behandlung von Alzheimer-Patienten könnte es durch die Kreuzreaktion mit SPP/SPPL-Proteasen zu erheblichen Nebenwirkungen kommen. Bei der Entwicklung von neuen spezifischen γ -Sekretase-Inhibitoren müssen folglich potenzielle Kreuzreaktionen mit SPP/SPPL-Proteasen in Betracht gezogen werden.

Dies macht einen Vergleich der γ -Sekretase mit SPP/SPPL-Proteasen in Bezug auf den katalytischen Mechanismus, die Substraterkennung und die Substratprozessierung erforderlich. Während für SPP Substrate beschrieben wurden, wird die detaillierte

Analyse von SPPL-Proteasen bislang durch die limitierte Anzahl an Substraten erschwert. In der vorliegenden Dissertation gelang die Identifikation des Bri2-Proteins als neues SPPL-Substrat.

Die Prozessierung des Bri2 ist ein Beispiel für RIP. Zunächst wird Bri2 in der Ektodomäne durch die Serinprotease Furin und die Metalloprotease ADAM-10 prozessiert, was die Sekretion von Teilen der Bri2 Ektodomäne zur Folge hat. Daraufhin prozessieren die Intramembranproteasen SPPL2a oder SPPL2b das in der Membran verbleibende Fragment des Bri2, während SPP bzw. SPPL3 Bri2 nicht erkennen. Die Intramembranproteolyse des Bri2 resultiert in der Freisetzung der löslichen intrazellulären Domäne ins Zytoplasma und eines niedermolekularen Peptids, das in den extrazellulären Raum sekretiert wird.

Während Bri2 ein Substrat für SPPL2a und SPPL2b darstellt, wird für das nächste homologe Protein Bri3 keine Intramembranproteolyse beobachtet. Dies zeigt, dass SPPL2b Transmembranproteine spezifisch erkennt und prozessiert.

Anhand eines Vergleichs der SPPL2b-abhängigen Prozessierung des Bri2 mit chimären Proteinen, die aus Kombinationen des Bri2 und Bri3 bestehen, konnten wichtige Fragestellungen zu den Substratanforderungen der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse beantwortet werden. So war bislang nicht beschrieben, welchen Einfluss intra- oder extrazelluläre Domänen des Substrats auf die SPPL2b-Schnitteffizienz haben. Es wird gezeigt, dass die luminaire Juxtamembrandomäne und ein kurzer Teil der intrazellulären Domäne des Bri2-Proteins für die Effizienz des SPPL2b-Schnittes eine entscheidende Rolle spielen. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass auch die Transmembrandomäne des Bri2-Proteins die SPPL2b-Schnitteffizienz stark beeinflusst. Es wird nachgewiesen, dass SPPL2b mögliche Substrate über die Größe ihrer luminalen Domäne auswählt und die Schnitteffizienz von SPPL2b mit der Größe der Ektodomäne des Substrats negativ korreliert ist. Damit in Einklang stehend erleichtert Ectodomain-Shedding des Bri2 durch ADAM-10 die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse des Bri2.

Die für die RIP des Bri2 erhaltenen Daten erlauben eine Gegenüberstellung der SPPL2b-Protease mit der γ -Sekretase. Beide Proteasen sind in späten sekretorischen Kompartimenten lokalisiert und besitzen ein ähnliches aktives Zentrum. Die Substratelektion ist sowohl für den Fall von SPPL2b als auch mit großer Wahrscheinlichkeit für den Fall der γ -Sekretase spezifisch. Ectodomain-Shedding erhöht die Schnitteffizienz beider Proteasen, wobei sogar die präferierte Größe der Ektodomäne des Substrats ähnlich ist.

Der Hauptunterschied zwischen der SPPL2b-Protease und der γ -Sekretase besteht in der für die Aktivität notwendige Bildung des γ -Sekretase-Komplexes einerseits und der

Maturierung der SPPL2b-Protease, die keinen Komplex mit anderen Proteinen eingeht, andererseits. Um spezifische γ -Sekretase-Inhibitoren für die Alzheimer-Erkrankung zu entwickeln und Kreuzreaktionen mit SPP/SPPL-Proteasen zu vermeiden, stellt die Komplexbildung der γ -Sekretase das somit potenziell bessere Target dar als das aktive Zentrum.

Summary

Regulated intramembrane proteolysis (RIP) is a conserved mechanism for the proteolytic processing of transmembrane proteins, from bacteria to human. In general, RIP is described as a two-step cleavage process. The first proteolytic processing, called "Ectodomain-Shedding", shortens the ectodomain of the transmembrane protein. The second proteolytic event takes place within the transmembrane domain of the substrate and is accomplished by an intramembrane protease. There are different classes of intramembrane proteases known. Whereas the Site-2 protease belongs to the class of metallo intramembrane proteases, serine intramembrane proteases are represented by rhomboid. According to a conserved GxGD motif in their active site, aspartyl intramembrane proteases are named GxGD intramembrane proteases.

The degradation products of RIP may mediate important signaling functions, e.g. they play an important role in the expression of certain cytokines and cellular division or differentiation processes. Pathologically, RIP plays a major role in Alzheimer's disease: A β -peptides that are critically associated with Alzheimer's disease and accumulate within the patients' brain, are products of the processing of the amyloid precursor protein (APP) by γ -secretase, an intramembrane aspartyl protease of the GxGD-family.

γ -Secretase is a target of intense pharmaceutical research, since inhibition of the protease, which would cause reduced production of A β -peptides, is a promising approach for Alzheimer's disease prevention and treatment. Besides γ -secretase, signalpeptide peptidase (SPP) and the signalpeptide peptidase-like proteases (SPPL; SPPL2a,b,c and SPPL3) belong to the family of GxGD-proteases. SPP/SPPL-proteases play an important role in cellular signalling routes. One example is the expression of the cytokine interleukin-12, which is controlled by SPPL2a and/or SPPL2b by processing tumor necrosis factor α (TNF α).

Some inhibitors of γ -secretase that target the active site of the protease cross-react with SPP/SPPL-proteases. The reason for cross-reactivity is most likely a high similarity of the active sites between the GxGD-proteases. The application of unspecific γ -secretase inhibitors for Alzheimer's disease treatment could cause severe side effects due to their interference of SPP/SPPL-dependent signaling pathways. Therefore, a potential cross-

reactivity with SPP/SPPL-proteases must be evaluated in the development of novel specific γ -secretase inhibitors.

For this reason, a comparison of the GxGD-proteases in respect to their catalytic properties and their employed mechanism of substrate selection is necessary. While many substrates are known for γ -secretase and several substrates have been described for SPP, only a limited number of SPPL-substrates are published, impeding a detailed comparison. This study describes the identification of the Bri2 protein as a novel substrate for SPPL-proteases.

The processing of Bri2 is an example of RIP. First, Bri2 is processed in its ectodomain by the serine protease Furin and the metallo protease ADAM-10, resulting in the secretion of parts of the Bri2 ectodomain. This proteolytic processing takes place in late cellular secretion compartments. In a further proteolytic event, the membrane retained fragment of Bri2 is cleaved by SPPL2a or by SPPL2b, whereas SPP and SPPL3 are not able to process Bri2. Intramembrane proteolysis of Bri2 by SPPL2a and SPPL2b results in a soluble intracellular domain and a low molecular C-terminal peptide that is secreted into the extracellular space.

While Bri2 is a substrate for SPPL2a and SPPL2b, its homolog Bri3 is not. This finding shows that SPPL2b binds and processes transmembrane proteins very selectively.

A detailed comparison of the SPPL2b-dependent processing of Bri2 with chimeric proteins that consist of combinations of Bri2 and Bri3 helped to address several questions in regard to the requirements of SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis e. g. which influence intra- or extra-cellular domains of the substrate have on SPPL2b cleavage efficiency. It is shown that the luminal juxtamembrane domain, as well as a short stretch of cytoplasmic amino acids play a decisive role for SPPL2b cleavage efficiency. The data also illustrate that the amino acid sequence within the transmembrane domain of a SPPL2b-substrate affects the proteolytic activity.

Strikingly, the results show that SPPL2b selects potential substrates in regard to the size of their ectodomain and that SPPL2b cleavage efficiency – as it is known for γ -secretase – correlates negatively with an increasing size of the substrate ectodomain. In agreement with this finding, ectodomain-shedding of Bri2 by ADAM-10 facilitates intramembrane proteolysis by SPPL2b.

The novel data for the RIP of Bri2 allows a detailed comparison of SPPL2b and γ -secretase. Both proteases are located in late cellular secretion compartments and carry a highly conserved active site. Ectodomain-shedding increases the cleavage efficiency of both SPPL2b and γ -secretase, whereby even the preferred size of the ectodomain of a substrate is highly similar. The substrate selection is very likely to be specific for each protease. The main difference, however, between SPPL2b and γ -secretase seems to be

the formation of the γ -secretase complex compared to SPPL2b, that does not need protein co-factors for activity. Therefore, in order to avoid cross-reactivity with SPP/SPPL-proteases, γ -secretase complex formation may serve as the better target for the development of specific γ -secretase inhibitors rather than the active site.

1. Einleitung

1.1 Regulierte Intramembranproteolyse

Die „Regulierte Intramembranproteolyse“ (RIP) wird im Allgemeinen durch zwei proteolytische Schritte charakterisiert (Abbildung 1). Im ersten Schritt wird die lösliche luminal oder extrazelluläre Domäne eines Proteins in der Nähe der Membran geschnitten. Dieser proteolytische Prozess wird auch als „Ectodomain-Shedding“ bezeichnet (Schlondorff und Blobel, 1999). Die Ektodomäne des Substrats wird nach der Prozessierung in den extrazellulären Raum sezerniert. Das verbleibende membranständige Fragment wird durch eine weitere proteolytische Prozessierung innerhalb der hydrophoben Membran gespalten (Intramembranproteolyse). Die Intramembranproteolyse muss eine Regulation erfahren, da andernfalls Transmembranproteine unkontrolliert abgebaut werden würden. Die Regulation wird durch das der Intramembranproteolyse vorangestellte Ectodomain-Shedding übernommen (Brown et al., 2000). Transmembranproteine, die nicht zuvor luminal verkürzt wurden, sind daher in der Regel keine Substrate für Intramembranproteasen. Es bestehen jedoch Ausnahmen (siehe 1.1.2 und 1.1.2.3).

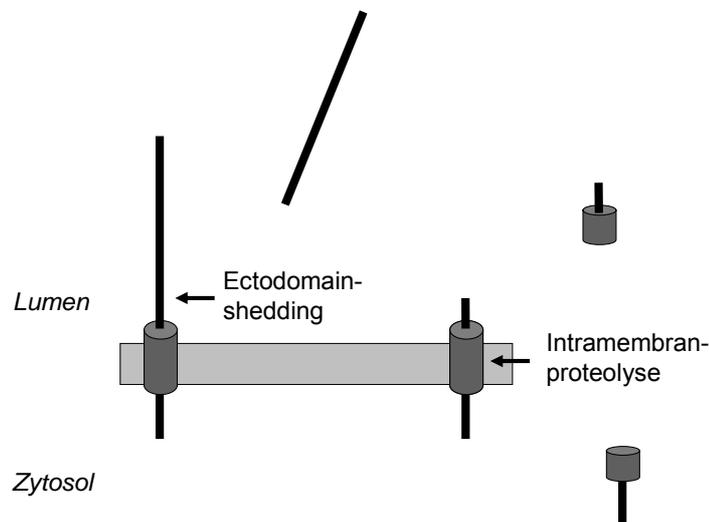


Abbildung 1. Regulierte Intramembranproteolyse (RIP). Im ersten Schritt der RIP wird ein Transmembranprotein in der Nähe der Membran luminal prozessiert (Ectodomain-Shedding). Ectodomain-Shedding setzt die Ektodomäne des Proteins frei, während das Gegenstück in der Membran verankert bleibt. Im zweiten Schritt wird das in der Membran verbliebene Fragment innerhalb der Transmembrandomäne gespalten (Intramembranproteolyse). Die Produkte der Intramembranproteolyse sind ein luminales sowie ein zyttoplasmatisches Peptid.

Die Tatsache, dass für jeden proteolytischen Prozess die Anwesenheit von Wasser notwendig ist, blieb lange mit dem Konzept einer Proteolyse in der hydrophoben

Umgebung der Lipid-Doppelschicht unvereinbar (Salvesen, 2003). Erste Struktur-Untersuchungen an Intramembranproteasen lassen jedoch Rückschlüsse darauf zu, wo und wie Wasser in den Prozess eingreift (eine detaillierte Beschreibung findet sich unter 1.1.1.3 und 1.1.2.2) (Urban und Shi, 2008).

Die Intramembranproteolyse resultiert in der Freisetzung von zwei löslichen Peptiden in unterschiedlichen Kompartimenten (Abbildung 1), die wichtige Signalfunktionen übernehmen können (Fluhrer et al., 2009; Wolfe und Kopan, 2004).

Wie die löslichen Proteasen werden die Intramembranproteasen nach ihrer nukleophilen Gruppe klassifiziert, die den Carbonyl-Kohlenstoff einer Peptidbindung angreift (Puente et al., 2003; Rawlings et al., 2006). Die Site-2-Protease-Familie (S2P-Familie) repräsentiert die Intramembranmetalloproteasen, während die Rhomboid-Familie zur Klasse der Serinproteasen und die GxGD-Intramembranproteasen zur Klasse der Aspartylproteasen gehören (Weihofen und Martoglio, 2003; Wolfe und Selkoe, 2002). Anders als bei den löslichen Proteasen wurde bisher noch keine Intramembranprotease beschrieben, die als reaktive Gruppe einen Cystein-Rest trägt. Alle bislang identifizierten Intramembranproteasen sind polytope Transmembranproteine, die als Monomer, Dimer oder in Form von hochmolekularen Komplexen in der Membran verankert sind.

1.1.1 Regulierte Intramembranproteolyse durch S2P

Die Klasse der Intramembranmetalloproteasen wird durch die S2P-Familie vertreten (Brown et al., 2000). S2P ist von Bakterien bis zum Menschen konserviert. Im katalytischen Zentrum von S2P wird ein Zink²⁺-Ion durch ein HExxH-Motiv koordiniert (Urban und Shi, 2008). Während bei *Bacillus subtilis* die Sporenbildung und in *Mycobacterium tuberculosis* die Virulenz von S2P abhängig ist (Makinoshima und Glickman, 2005; Rudner et al., 1999), antworten Eukaryoten mithilfe von S2P auf Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) (Shen et al., 2002b). Außerdem ist S2P an der Steuerung der Lipid-Biosynthese beteiligt (Brown und Goldstein, 1999).

1.1.1.1 ER-Stress Regulation durch S2P

Unter zellulären Stressbedingungen wie beispielsweise erhöhter Temperatur akkumulieren fehlgefaltete Proteine im ER. Dies führt zu einem erhöhten Bedarf an Chaperonen wie BiP, das in nicht gestressten Zellen den membranständigen Transkriptionsfaktor ATF6 im ER bindet. Die Sequestrierung von BiP an fehlgefaltete Proteine unter ER-Stress hat die Dissoziation von ATF6 und BiP und daraufhin den Transport von ATF6 zum Golgi-Apparat zur Folge (Abbildung 2) (Shen et al., 2002a). Dort wird ATF6 als RIP-Substrat zweifach proteolytisch prozessiert. Während der erste

Schnitt durch die Subtilisin-ähnliche Site-1-Protease (S1P) katalysiert wird, schneidet S2P in der Transmembrandomäne (TMD) von ATF6. Die freigesetzte zytoplasmatische Domäne von ATF6 transloziert in den Zellkern und fungiert als Transkriptionsfaktor für Gene, deren Produkte von der Zelle als Antwort auf ER-Stress benötigt werden, beispielsweise für BiP oder Calreticulin (Brown et al., 2000; Kaufman et al., 2002; Shen et al., 2002b).

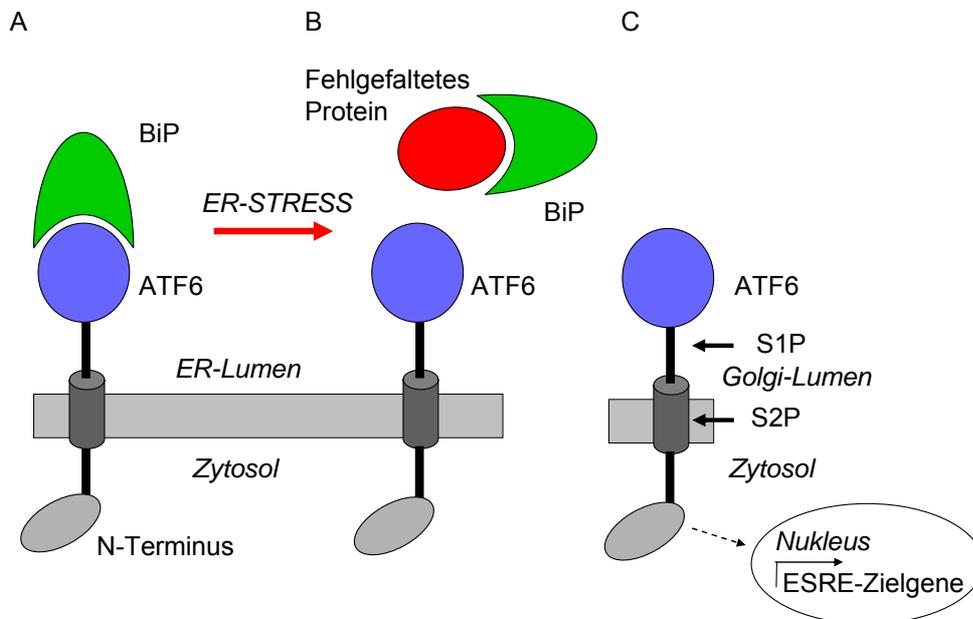


Abbildung 2. ER-Stress Regulation durch S2P. (A) Der membranständige Transkriptionsfaktor ATF6 bindet unter normalen Bedingungen das Chaperon BiP. (B) Kommt es durch ER-Stress zur Fehlfaltung von Proteinen im ER-Lumen, so wird BiP an die fehlgefalteten Proteine sequestriert. ATF6 wird daraufhin zum Golgi-Apparat transportiert. (C) Im Golgi-Apparat wird ATF6 zweifach durch S1P und S2P prozessiert. Der durch die RIP von ATF6 ins Zytosol freigesetzte N-Terminus transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor für Gene, deren Produkte von der Zelle als Antwort auf ER-Stress benötigt werden (ESRE, ER-stress responsive element).

1.1.1.2 Steuerung der Lipid-Biosynthese durch S2P

Ein weiteres Beispiel für S2P-abhängige RIP ist die Kontrolle der Cholesterin-Biosynthese. Sinkt die Cholesterin-Konzentration in der ER-Membran, so wird das membranverankerte Sterol-Response-Element-Binding-Protein (SREBP) vom ER zum Golgi-Apparat transportiert und dort durch S1P prozessiert. Im zweiten Schritt schneidet S2P SREBP in der TMD 2 und katalysiert die Freisetzung der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, die in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor für Gene der Lipid-Biosynthese wirkt, beispielsweise für die HMG-CoA Reduktase, die HMG-CoA Synthase oder die Squalen Synthase (Abbildung 3) (Brown et al., 2000; Goldstein et al., 2006). Weiterhin werden die SREBP-ähnlichen Proteine CREBH, Luman, OASIS und BBF2H7 durch S2P-abhängige RIP prozessiert. Die zytoplasmatischen Domänen dieser Proteine regulieren nach Translokation in den

Zellkern ebenfalls Zielgene des Lipid-Stoffwechsels (Bailey et al., 2007; Kondo et al., 2005; Kondo et al., 2007; Liang et al., 2006).

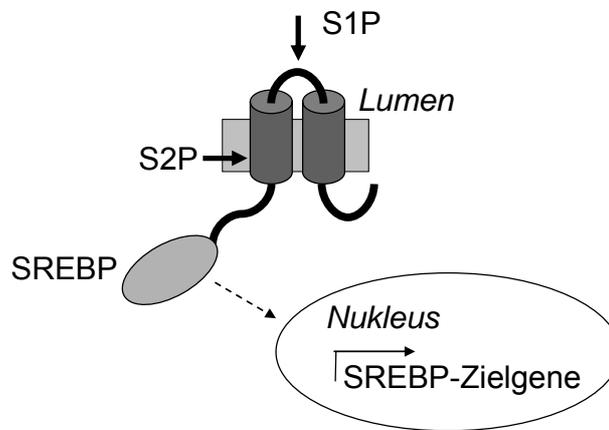


Abbildung 3. RIP des SREBP. Die aufeinander folgende Prozessierung des membranverankerten SREBP durch S1P und die Intramembranmetalloprotease S2P setzt die zytoplasmatische Domäne frei. Nach Translokation in den Nukleus wirkt diese als Transkriptionsfaktor für Gene, die den Lipid-Haushalt der Zelle steuern.

1.1.1.3 S2P Struktur

Mithilfe der Röntgenkristallographie konnte die Struktur der S2P aus *Methanococcus jannaschii* (mjS2P) mit einer Auflösung von 3,3 Å aufgeklärt werden (Feng et al., 2007). Die Kernstruktur der S2P besteht aus drei hochkonservierten TMD, in denen das katalytische Zentrum mit dem für Metalloproteasen charakteristischen HExxH-Motiv zu finden ist (Feng et al., 2007). Für mjS2P liegt dieses Motiv innerhalb der Membran und die räumliche Anordnung der katalytisch aktiven Aminosäurereste besitzt bemerkenswerte Übereinstimmung mit dem aktiven Zentrum von löslichen Metalloproteasen (Feng et al., 2007). Die Strukturanalyse zeigt, dass das in die Membran eingebettete aktive Zentrum von mjS2P hydratisiert ist. Außerdem existiert ein schmaler Kanal ausgehend von der zytoplasmatischen Seite zum Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum. So lässt sich erklären, auf welche Weise Wassermoleküle zum katalytischen Zentrum von mjS2P gelangen können (Abbildung 4) (Urban und Shi, 2008).

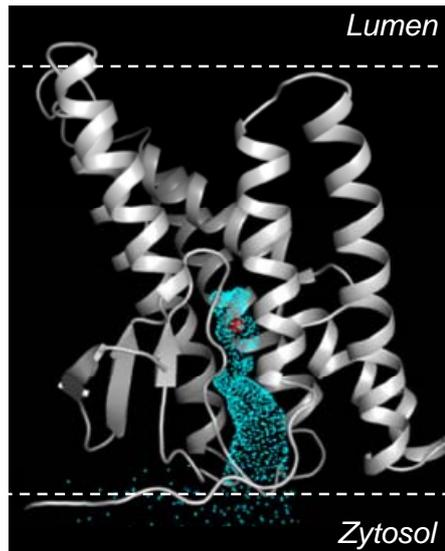


Abbildung 4. Wasserzugang zum aktiven Zentrum der mS2P. Das Zn^{2+} -Ion (rot) im aktiven Zentrum der mS2P liegt innerhalb der hydrophoben Membran. Es ist jedoch über einen schmalen, wasserdurchlässigen Kanal mit dem Zytosol verbunden und daher wahrscheinlich hydratisiert. Abbildung verändert nach (Urban und Shi, 2008).

1.1.1.4 Substratanforderungen und Regulation der S2P-abhängigen Proteolyse

Für alle bislang identifizierten S2P-Substrate wurde Ectodomain-Shedding beschrieben. In Eukaryoten wird dieser Schnitt von S1P vollzogen. Die S2P-Substrate ATF6, SREBP, CREBH, Luman, OASIS und BBF2H7 besitzen ein luminales RxxL-Motiv, das die Erkennungssequenz für den S1P-Schnitt darstellt (Duncan et al., 1997; Kondo et al., 2005). Die Prozessierung durch S1P wurde als Voraussetzung für den S2P-Schnitt postuliert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Schnitteffizienz von S2P negativ mit der Länge der luminalen Domäne von ATF6 korreliert (Shen und Prywes, 2004). Daneben besitzen bakterielle S2P wie beispielsweise YaeL eine PDZ-Domäne, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln kann. Für die YaeL soll die Interaktion mit der PDZ-Domäne für die Substraterkennung verantwortlich sein (Kanehara et al., 2003). Die PDZ-Domäne soll über die spezifische Erkennung von kurzen C-Termini die Selektivität von S2P auf zuvor durch S1P geschnittene Substrate einschränken (Inaba et al., 2008; Kanehara et al., 2003). Allerdings ist diese PDZ-Domäne in Säuger-S2P nicht konserviert. Auffällig ist, dass alle bisher identifizierten S2P-Substrate eine Typ-II-Transmembrantopologie besitzen. Neben der Länge der luminalen Domäne und der Topologie spielt auch die getrennte Lokalisation von Substrat und Protease für die S2P-abhängige RIP eine entscheidende Rolle: ATF6 wird nach Induktion von ER-Stress im Golgi-Apparat durch S1P und S2P geschnitten. Eine durch Brefeldin A induzierte Relokalisation von S1P und S2P in das ER erlaubt jedoch die Prozessierung von ATF6 auch im ER (Shen und Prywes, 2004). Unter normalen zellulären Bedingungen wirkt die strikte Trennung von ATF6 im ER einerseits und den Proteasen im Golgi-Apparat

andererseits unkontrollierter Prozessierung entgegen (Shen et al., 2002b). Die räumliche Trennung stellt damit neben der Länge der Ektodomäne einen weiteren wichtigen Kontrollpunkt in der S2P-abhängigen RIP dar.

1.1.2 Intramembranproteolyse durch Rhomboid-Proteasen

Die Klasse der Intramembranserineproteasen wird durch von Einzellern bis zum Menschen konservierte Rhomboide vertreten (Lemberg und Freeman, 2007b). Der erste Rhomboid-Vertreter wurde über eine Mutation im *rhomboid*-Gen in *Drosophila melanogaster* identifiziert, die einen abnormalen Phänotyp im Kopfbereich verursacht (Mayer und Nüsslein-Volhard, 1988). Aufgrund der Ähnlichkeit des Phänotyps mit Mutationen in *spitz* wurde *rhomboid* in die Gruppe der „Spitz-Gene“ eingeordnet. Spitz ist ein Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) in *Drosophila melanogaster*. Über die Prozessierung von Spitz und weiterer EGFs stellt Rhomboid den Hauptregulator der EGF-abhängigen Signaltransduktion in *Drosophila melanogaster* dar (Lee et al., 2001; Urban et al., 2001; Wasserman und Freeman, 1997).

Weiterhin übernehmen Rhomboide zahlreiche andere Funktionen, so kontrollieren sie beispielsweise Mitochondrien-Fusion, Apoptose und Parasiteninvasion (Brossier et al., 2005; McQuibban et al., 2003; O'Donnell et al., 2006). Der Hauptunterschied zwischen der Substrat-Prozessierung durch Rhomboide und der Prozessierung durch die anderen Intramembranprotease-Klassen besteht darin, dass kein Ectodomain-Shedding des Substrats nötig ist (Urban et al., 2001). Rhomboid-Substrate sind folglich Volllängenproteine und werden nur einmal prozessiert. Dies hat Konsequenzen für die Regulation der Rhomboid-Aktivität, da Ectodomain-Shedding als Regulationsmechanismus nicht genutzt wird (siehe 1.1.2.1).

1.1.2.1 Regulation der EGF-Signaltransduktion durch Rhomboid

Die Prozessierung der EGFs Spitz, Gurken und Keren in *Drosophila melanogaster* ist die am besten untersuchte Funktion von Rhomboiden (Lemberg und Freeman, 2007a). Die EGFs werden als membranverankerte Vorläuferproteine synthetisiert und müssen durch Rhomboid freigesetzt werden, um ihre Signalwirkung zu entfalten (Abbildung 5). Die löslichen Ektodomänen der EGFs sind Liganden für EGF-Rezeptoren (EGFR), die der Klasse der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren angehören. Die Ligandenbindung erlaubt die Autophosphorylierung der intrazellulären Domänen des EGFR und kontrolliert Zelldifferenzierungsprozesse und circadiane Aktivität (Kramer et al., 2001; Lemberg und Freeman, 2007a). Eine elegante Studie zeigt den Zusammenhang zwischen Rhomboid und Schlaf am Nervensystem von *Drosophila melanogaster*. Die zyklische Aktivität von

Rhomboid in der Pars intercerebralis, die entwicklungsbiologisch mit dem Hypothalamus verwandt ist, führt über die Prozessierung von Spitz zu Aktivierung des EGFRs und zur Steuerung von circadianen Signalen (Foltényi et al., 2007).

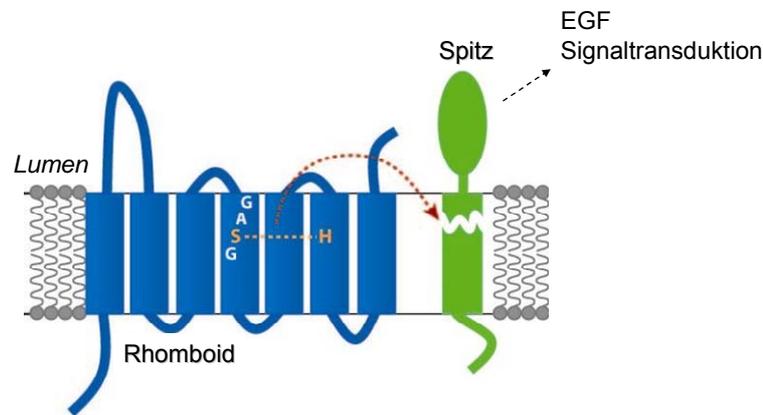


Abbildung 5. Intramembranproteolyse des Spitz-Proteins. Spitz wird innerhalb der TMD von der Intramembranserinprotease Rhomboid prozessiert. Die lösliche Ektodomäne von Spitz ist in *Drosophila melanogaster* für EGF-Signaltransduktion verantwortlich. Im Gegensatz zu anderen Intramembranproteasen ist Ectodomain-Shedding keine Voraussetzung für Rhomboid-abhängige Proteolyse. Abbildung verändert nach (Freeman, 2008).

1.1.2.2 Struktur von Rhomboiden

Rhomboiden sind polytope Transmembranproteine mit 6 bzw. 7 TMD. Vier Arbeitsgruppen waren in der Lage, die Struktur des bakteriellen Rhomboids GlpG röntgenkristallographisch zu lösen (Ben-Shem et al., 2007; Lemieux et al., 2007; Wang et al., 2006c; Wu et al., 2006). Während bei löslichen Serinproteasen üblicherweise eine katalytische Triade mit einem Serin-, einem Histidin- und einem Aspartyl-Rest zu finden ist, die den Serin-Rest in ein starkes Nukleophil verwandelt, wurde bei GlpG nur eine katalytische Dyade bestehend aus einem Serin- und einem Histidin-Rest nachgewiesen (Wang et al., 2006c). Variationen der Triade sind allerdings auch für lösliche Serinproteasen bekannt (Ekici et al., 2008). Die katalytisch aktiven Aminosäurereste sind in die Membran eingebettet (Wang et al., 2006c). Ihre räumliche Anordnung ist dem katalytischen Zentrum der klassischen Serinprotease Trypsin sehr ähnlich (Urban und Shi, 2008). Fünf der sechs TMD von GlpG durchspannen die Membran komplett, während die vierte TMD kürzer als die übrigen ist und die luminalen Membrangrenze nicht erreicht. Gerade dort, am luminalen Ende der TMD 4, befindet sich das katalytisch aktive Serin. Durch die Anordnung der anderen TMDs wird eine Aussparung gebildet, die für Wasser zugänglich ist. In der röntgenkristallographischen Analyse wurde deutlich, dass Wasser in diese Aussparung eindringen kann, da Wassermoleküle in der Elektronendichtekarte nachzuweisen waren. Es wird angenommen, dass das Wasser über diese Aussparung ins katalytische Zentrum von GlpG gelangen kann (Abbildung 6) (Lemberg und Freeman, 2007a; Urban und Shi, 2008).

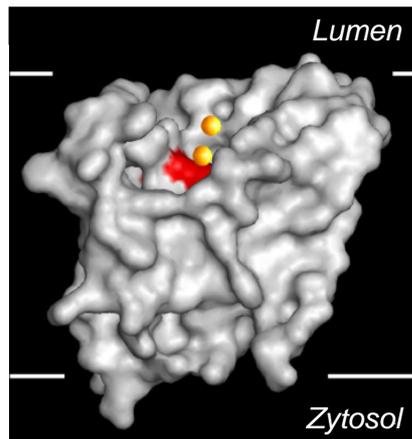


Abbildung 6. Wasser im aktiven Zentrum der Rhomboid-Protease GlpG. Das aktive Zentrum von GlpG ist in rot gezeigt. Die röntgenkristallographische Analyse zeigt in direkter Nähe des aktiven Zentrums zwei fixierte Wassermoleküle (gelb). Es kann daher angenommen werden, dass das aktive Zentrum von GlpG hydratisiert ist. Abbildung verändert nach (Urban und Shi, 2008).

1.1.2.3 Substratanforderungen und Regulation der Rhomboide

Anders als im Fall von S2P- und GxGD-Proteasen (siehe 1.1.1.4, 1.1.3.2 und 1.1.3.8) ist eine Prozessierung in der Ektodomäne des Substrats keine Voraussetzung für Rhomboid-abhängige Proteolyse. Die Regulation des Intramembranschnitts kann daher nicht auf vorheriges Ectodomain-Shedding beruhen (Freeman, 2008). Folglich kommt der strikten örtlichen Trennung von Substrat und Protease in der Zelle eine entscheidende Bedeutung zu. Außerdem wurden distinkte örtliche und zeitliche Expressionsmuster für das *rhomboid*-Gen beschrieben, die eine unkontrollierte Substratprozessierung unterbinden (Foltenyi et al., 2007). Weiterhin konnten Rhomboide identifiziert werden, die Polymorphismen im aktiven Zentrum tragen (inaktive, bzw. inhibitorische Rhomboide, iRhoms). Es wird spekuliert, dass diesen iRhoms eine regulatorische Funktion zukommt, indem sie Substrate binden und dadurch den Zugang für aktive Rhomboide blockieren (Lemberg und Freeman, 2007b).

1.1.3 Regulierte Intramembranproteolyse durch GxGD-Proteasen

Die Klasse der Intramembranaspartylproteasen umfasst die Preseniline 1 und 2 (PS1, PS2), die Signalpeptidpeptidase (SPP) und die SPP-homologen Proteasen (SPPL; SPPL2a,b,c und SPPL3) (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002; Wolfe et al., 1999)¹. Die Sequenzhomologie der polytopen Transmembranproteine ist insgesamt begrenzt. Sie tragen jedoch alle in der TMD 7 ein hochkonserviertes GxGD-Motiv, das einen der beiden katalytisch aktiven Aspartyl-Reste enthält (Abbildung 7) und namensgebend für

¹ Eine detaillierte Auflistung der Intramembranaspartylproteasen befindet sich im Anhang.

die Klasse der „GxGD-Proteasen“ ist (Friedmann et al., 2004; Ponting et al., 2002; Steiner et al., 2000; Wolfe et al., 1999).

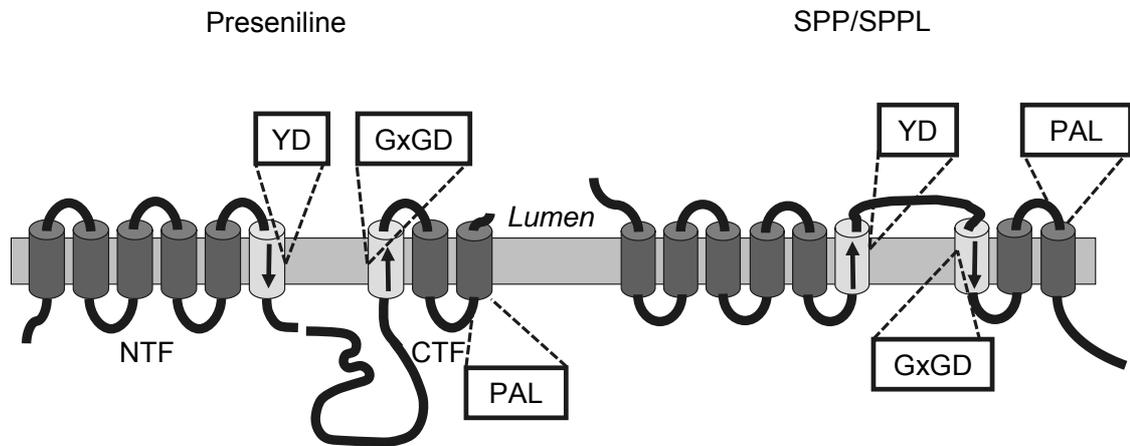


Abbildung 7. Intramembranaspartylproteasen. Sowohl die Preseniline als auch SPP/SPPL gehören zur Familie der GxGD-Proteasen. Der Name leitet sich von einem konservierten GxGD-Motiv ab, das zusammen mit dem YD- und dem PAL-Motiv das aktive Zentrum der Proteasen bildet (Details siehe Text). Die polytope Transmembranproteine tragen jeweils neun TMD. Die Preseniline sind in ihrer Topologie im Vergleich zu SPP/SPPL invertiert. Dies hat Konsequenzen für die Anordnung der Motive im aktiven Zentrum (Pfeilrichtung). Abbildung verändert nach (Fluhrer et al., 2009).

Neben PS, SPP und SPPL enthalten auch die bakteriellen Typ-4 Prepilin-Peptidasen (TFPP) ein GxGD-Motiv (LaPointe und Taylor, 2000; Steiner et al., 2000). TFPP spalten Signalpeptide von Typ-4 Prepilinen, die als Komponenten einer bakteriellen Sekretionsmaschine beispielsweise die Freisetzung von Toxinen übernehmen (Kirn et al., 2000; LaPointe und Taylor, 2000). Anders als bei PS, SPP und SPPL ist für TFPP das GxGD-Motiv wahrscheinlich nicht Teil einer TMD, sondern an der Grenze zwischen Zytoplasma und Membran lokalisiert (Steiner et al., 2000). Da TFPP-Substrate folglich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht innerhalb einer TMD prozessiert werden, entsprechen die TFPP im Grunde nicht der Definition von Intramembranproteasen und nehmen eine Sonderstellung innerhalb der GxGD-Proteasen ein.

PS, SPP und SPPL sind polytope Transmembranproteine mit neun TMD (Abbildung 7) (Friedmann et al., 2004; Laudon et al., 2005; Spasic et al., 2006). Bemerkenswert ist die invertierte Transmembrantopologie der PS gegenüber der von SPP/SPPL-Proteinen (Friedmann et al., 2004; Weihofen et al., 2002). Dies hat Konsequenzen für die Topologie des aktiven Zentrums der Proteasen, das ebenso invertiert ist. Durch die Inversion kann möglicherweise erklärt werden, weshalb PS nur Typ-I-Transmembranproteine als Substrate akzeptieren, während sich SPP/SPPL-Proteasen anscheinend auf Typ-II-Transmembranproteine beschränken (Fluhrer und Haass, 2007; Fluhrer et al., 2009; Friedmann et al., 2004; Haass, 2004).

Neben dem GxGD-Motiv sind zwischen PS-, SPP- und SPPL-Proteinen zwei weitere Motive hochkonserviert: Das YD-Motiv in TMD 6 und das PAL-Motiv an der zytoplasmatischen Grenze der TMD 9 (Ponting et al., 2002). Für PS könnte das PAL-Motif auch in der TMD 9 liegen, die exakte Lokalisation kann jedoch nur über hochauflösende Strukturbestimmung erfolgen, die für die GxGD-Proteasen aussteht.

Aspartylproteasen benötigen für enzymatische Aktivität zwei sich gegenüberliegende Aspartyl-Reste (Abbildung 8) (Berg et al., 2002). Während sich ein Aspartyl-Rest im GxGD-Motiv befindet, liefert das YD-Motiv den zweiten Aspartyl-Rest (Kimberly et al., 2000; Wolfe et al., 1999). Das PAL-Motiv liegt für PS in unmittelbarer räumlicher Nähe des YD-Motivs (Tolia et al., 2008) und ist mit großer Wahrscheinlichkeit an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt und für katalytische Aktivität notwendig (Wang et al., 2006a; Wang et al., 2004).

YD-, GxGD- und PAL-Motiv sind in löslichen Aspartylproteasen nicht konserviert (Steiner et al., 2000). Es handelt sich demnach um neuartige Aspartylproteasen, auf deren enzymatischen Mechanismus nur bedingt Rückschlüsse von Untersuchungen an löslichen Aspartylproteasen gezogen werden können.

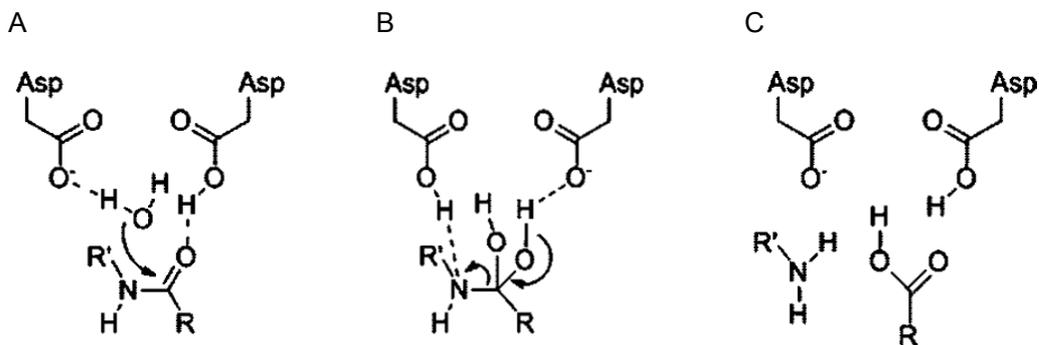


Abbildung 8. Modell des Katalysemechanismus der Aspartylproteasen. (A) Aspartylproteasen benötigen für die Aktivierung eines Wassermoleküls zwei Aspartyl-Reste. Der deprotonierte Aspartyl-Rest bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Proton des Wassermoleküls aus, während der protonierte Aspartyl-Rest das Substrat über den Sauerstoff der Carbonyl-Gruppe fixiert. Das elektronegative Sauerstoffatom des Wassers greift den Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung nukleophil an (Pfeil). (B) Durch Umlagerung von Elektronenpaaren entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand am Carbonyl-Kohlenstoff und die Peptidbindung wird gespalten. (C) Durch die Proteolyse wird eine Carboxyl- und eine Aminogruppe generiert. Die Aspartyl-Reste befinden sich im ursprünglichen Zustand. Abbildung nach (Wolfe, 2009b).

Die Aktivierung eines Wassermoleküls durch die beiden sich in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft befindlichen Aspartyl-Reste ist für Aspartylproteasen unerlässlich (Lopez-Otin und Bond, 2008). Auf welche Weise Wasser im Fall von PS, SPP und SPPL in das aktive Zentrum gelangt, ist bislang nicht vollständig geklärt. Allerdings sind die YD-, GxGD- und PAL-Motive in PS Bestandteil einer hydrophilen Pore, die die Anwesenheit von Wasser im aktiven Zentrum der Proteasen ermöglichen könnte (Lazarov et al., 2006;

Osenkowski et al., 2009; Sato et al., 2006a; Sato et al., 2008a; Tolia et al., 2006). Anders als für Rhomboide und S2P wurde bislang keine Intramembranaspartylprotease strukturell mit atomarer Auflösung aufgeklärt.

1.1.3.1 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist die am weitgehendsten untersuchte Protease der GxGD-Familie. Die beiden homologen PS-Proteine PS1 und PS2 stellen die katalytischen Untereinheiten der γ -Sekretase dar. PS1 und PS2 nehmen unter den Intramembranproteasen eine besondere Stellung ein, da sie einen Komplex mit anderen Transmembranproteinen bilden. In den γ -Sekretase-Komplex wird entweder PS1 oder PS2 eingebaut. Komplexe, die sowohl PS1 als auch PS2 enthalten, wurden bislang nicht identifiziert (Lai et al., 2003; Sato et al., 2007; Shirotani et al., 2004b; Wolfe et al., 1999). PS ist die einzige bekannte Intramembranprotease, die endoproteolytisch in ein N-terminales und ein C-terminales Fragment (PS NTF und PS CTF) geschnitten wird (Thinakaran et al., 1996). Der Schnitt erfolgt in einer hydrophoben Region zwischen TMD 6 und TMD 7. Da Mutationen im aktiven Zentrum von PS die Endoproteolyse unterbinden, ist davon auszugehen, dass es sich um einen autoproteolytischen Schnitt handelt (Wolfe et al., 1999). Formal ist die „Presenilinase“ jedoch noch nicht identifiziert.

Für enzymatische Aktivität der γ -Sekretase sind die Komplex-Untereinheiten Nicastrin, Anterior-Pharynx-Defective-1 (APH-1) und Presenilin-Enhancer-2 (PEN-2) unerlässlich (Abbildung 9) (Edbauer et al., 2003; Francis et al., 2002; Goutte et al., 2000; Kimberly et al., 2003). Im Komplex treten die Komponenten wahrscheinlich in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie auf (Sato et al., 2007). Nicastrin wurde als Substrat-Akzeptor der γ -Sekretase vorgeschlagen, dieses Ergebnis wird jedoch diskutiert (Chavez-Gutierrez et al., 2008; Shah et al., 2005). Während gezeigt wurde, dass PEN-2 ein Stabilisator des γ -Sekretase-Komplexes ist (Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2004), wurde für APH-1 noch keine Funktion beschrieben. APH-1 wird durch die Gene *aph-1a* und *aph-1b* kodiert, wobei für APH-1a zusätzlich die beiden Spliceformen APH-1aS (Short) und APH-1aL (Long) nachgewiesen werden konnten (Francis et al., 2002).

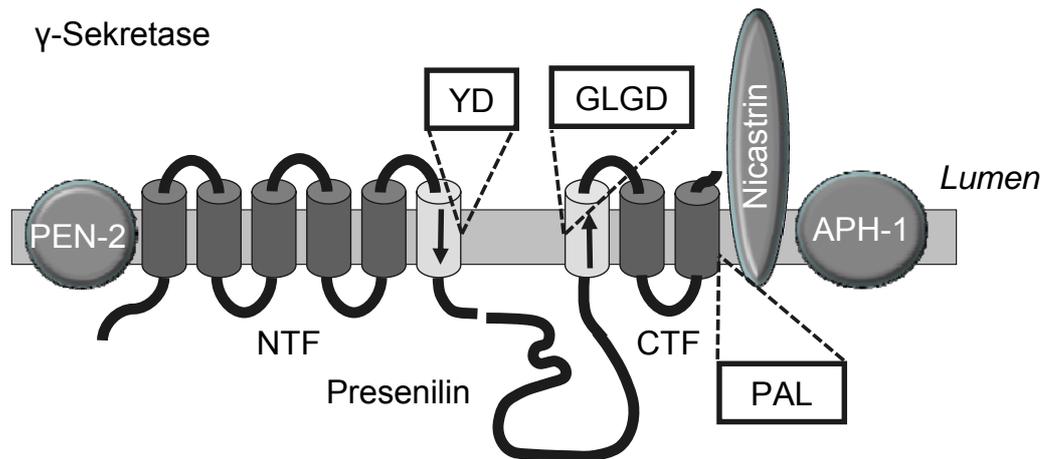


Abbildung 9. Der γ -Sekretase-Komplex. Presenilin, das endoproteolytisch in NTF und CTF prozessiert wird, ist die aktive Untereinheit der γ -Sekretase. Die hochkonservierten YD-, GxGD- und PAL-Motive bilden das aktive Zentrum der Protease. Die Pfeile stellen die Richtung der TMD dar, in denen die beiden kritischen Aspartyl-Reste lokalisiert sind. Die proteolytische Aktivität von Presenilin hängt strikt von der Komplex-Bildung mit PEN-2, Nicastrin und APH-1 ab (siehe Text). Abbildung verändert nach (Fluhrer et al., 2009; Steiner et al., 2008a)

Die Kombination von Nicastrin und PEN-2 mit je einer APH-1-Isoform und entweder PS1 oder PS2 erlaubt den Aufbau von sechs unterschiedlichen γ -Sekretase-Komplexen (Shirotani et al., 2004b). Momentan ist umstritten, ob sich diese γ -Sekretase-Komplexe in ihrer Funktion bzw. Aktivität unterscheiden (Dejaegere et al., 2008; Serneels et al., 2009; Shirotani et al., 2007). In Crosslink- und Co-IP-Studien konnten Interaktionen zwischen PS NTF und PEN-2, PS NTF und PS CTF, PS CTF und APH-1 sowie APH-1 und Nicastrin nachgewiesen werden (Steiner et al., 2008b). Den ersten Schritt der Komplex-Assemblierung stellt die Bindung von Nicastrin an APH-1 dar (Capell et al., 2003; LaVoie et al., 2003; Shirotani et al., 2004a). Dieses Heterodimer ist in der Lage, PS zu binden. Als letzte Komplexkomponente wird PEN-2 eingebaut. Die Assoziation von PEN-2 löst die Endoproteolyse von PS und nachfolgend den Transport zum Golgi-Apparat aus (Kaether et al., 2007; Kim und Sisodia, 2005). Nicastrin wird im Golgi-Apparat glykosyliert und die γ -Sekretase wird zur Plasmamembran und in endosomal/lysosomale Kompartimente transportiert, wo sie proteolytisch aktiv ist (Chyung et al., 2005; Kaether et al., 2006; Kaether et al., 2002; Pasternak et al., 2003).

1.1.3.2 Substratanforderungen der γ -Sekretase

Alle identifizierten Substrate der γ -Sekretase sind Transmembranproteine mit Typ-I-Topologie. Ectodomain-Shedding wird als Voraussetzung für den γ -Sekretase-Schnitt angesehen, da nur Substrate mit kurzer luminaler Domäne mit der γ -Sekretase co-isolieren (Esler et al., 2002). Außerdem korreliert die Schnitteffizienz der γ -Sekretase

negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats (Struhl und Adachi, 2000). γ -Sekretase-Substrate weisen keine offensichtlichen Sequenzhomologien auf (Beel und Sanders, 2008). In Analogie zum Proteasom, das zahlreiche Proteine ohne Sequenzhomologie abbaut, wurde die γ -Sekretase als „Proteasom der Membran“ beschrieben (Kopan und Ilagan, 2004). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Typ-I-Transmembranproteine existieren, die keine Substrate für die γ -Sekretase sind (Hemming et al., 2008). Darüber hinaus wurden kürzlich Sequenzdeterminanten für γ -Sekretase-Substrate beschrieben (Hemming et al., 2008; Ren et al., 2007).

1.1.3.3 Die γ -Sekretase steuert Zelldifferenzierung über die RIP des NOTCH-Rezeptors

Der γ -Sekretase-Komplex ist eine äußerst promiskuitive Intramembranprotease. Mehr als 60 Substrate wurden bislang beschrieben, darunter der NOTCH-Rezeptor (NOTCH) und das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP, siehe 1.1.3.4) (Beel und Sanders, 2008). Da Knockouts der Komplex-Komponenten PS, Nicastrin, APH-1 und PEN-2 in der Maus und in *Caenorhabditis elegans* einen dem NOTCH-Knockout vergleichbaren Pänotyp zeigen (Baumeister et al., 1997; De Strooper et al., 1999; Levitan und Greenwald, 1995; Shen et al., 1997; Wong et al., 1997), ist davon auszugehen, dass die RIP von NOTCH die wichtigste oder früheste Funktion der γ -Sekretase während der Ontogenese darstellt. Nach Prozessierung des NOTCH durch Furin im Golgi-Apparat (S1-Schnitt) wird NOTCH als Heterodimer an die Plasmamembran transportiert (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Dort wird es nach Ligandenbindung Substrat für Ectodomain-Shedding (S2-Schnitt) durch die Disintegrin- und Metalloproteasen (ADAM-Proteasen) ADAM-10 und ADAM-17 (Brou et al., 2000; Hartmann et al., 2002; Wen et al., 1997). Der S2-Schnitt setzt die extrazelluläre Domäne des NOTCH frei. Das Gegenstück, der membranverankerte Teil NEXT (NOTCH extrazellulär trunkiert oder NOTCH Δ E) ist Substrat für die γ -Sekretase (S3-Schnitt). Der Intramembranschnitt löst die Intrazelluläre Domäne (ICD) des NOTCH (NICD) von der Membran ab. Die NICD transloziert in den Zellkern und leitet dort die Transkription der NOTCH-Zielgene ein, beispielsweise von Hes1, Hey1 und Hey2 (Fischer et al., 2004; Kopan und Ilagan, 2009). Die Expression von NOTCH-Zielgenen führt zu wichtigen Zelldifferenzierungsvorgängen, unter anderem von B- und T-Zellen (Bray, 2006; Greenwald, 1994; Hadland et al., 2001). Mutationen in NOTCH führen zu unkontrollierter Zellproliferation und sind mit T-Zell-Lymphomen assoziiert (Aster et al., 2008; Sulis et al., 2008; Weng et al., 2004). Der pathologischen Prozessierung von NOTCH kann durch Inhibition der γ -Sekretase teilweise Einhalt geboten werden. Daher stellen γ -Sekretase-Inhibitoren einen Angriffspunkt zur Behandlung dieser Krebserkrankungen dar (Grosveld, 2009; Real et al., 2009).

1.1.3.4 A β -Peptide sind Produkte der RIP des APP

Zahlreiche Studien über die γ -Sekretase adressieren die RIP des APP, die die Sekretion von A β -Peptiden zur Folge hat (Abbildung 10). Die Aggregation des Schnittprodukts A β zu amyloiden Ablagerungen ist ein neuropathologisches Charakteristikum der Alzheimer-Erkrankung (siehe 1.2.1). Neben dieser amyloidalen Prozessierung des APP existiert auch ein nicht-amyloidogener Weg.

Nicht-amyloidogene APP-Prozessierung Amyloidogene APP-Prozessierung

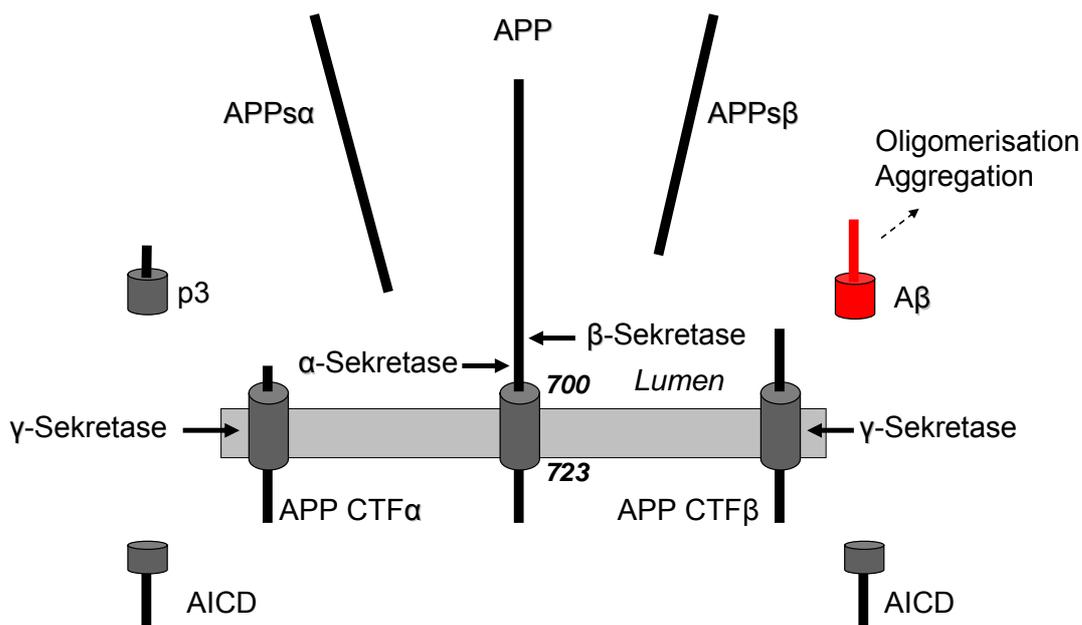


Abbildung 10. RIP des APP. APP-Prozessierung erfolgt entweder im nicht-amyloidogenen oder im amyloidogenen Weg. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird zunächst die lösliche APP-Ektodomäne APPs α durch die α -Sekretase freigesetzt. Die TMD von APP befindet sich im Bereich der Aminosäuren 700-723 des Vollängenproteins. Die Intramembranproteolyse des membranverankerten APP CTF α durch die γ -Sekretase resultiert in p3 und der AICD. Bei der amyloidogenen Prozessierung wird das Ectodomain-Shedding durch die β -Sekretase übernommen. Das entstehende APP CTF β ist Substrat für die γ -Sekretase. Als Produkte entstehen AICD und amyloidogene A β -Peptide, die Hauptbestandteil der für die Alzheimer-Erkrankung charakteristischen Plaques sind. Abbildung verändert nach (Lichtenthaler und Haass, 2004).

Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP zunächst in der Ektodomäne durch die α -Sekretase geschnitten. Als α -Sekretasen wurden unter anderem ADAM-9, ADAM-10 und ADAM-17 beschrieben (Asai et al., 2003; Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999). Der α -Sekretase-Schnitt resultiert in der Freisetzung von APPs α , der löslichen APP-Ektodomäne. Das membranverankerte Gegenstück APP CTF α ist in einem zweiten Prozessierungsschritt Substrat für die γ -Sekretase. Da sich die α -Sekretase-Schnittstelle innerhalb des A β -Peptids befindet, wird beim Schnitt durch die γ -Sekretase kein A β sekretiert. Produkte der Intramembranproteolyse von APP CTF α sind die intrazelluläre Domäne von APP (AICD), die ins Zytoplasma freigesetzt wird, und das in den

extrazellulären Raum sekretierte 3 kDa p3-Peptid (Haass et al., 1993; Kimberly et al., 2001). Die AICD hat eine geringe Halbwertszeit, könnte jedoch nach Assoziation mit Adapterproteinen, z.B. mit Fe65, transkriptionale Wirkung ausüben (Cao und Südhof, 2001; Edbauer et al., 2002; Hebert et al., 2006; Leissring et al., 2002; Pardossi-Piquard et al., 2005). Im amyloidogenen Prozessierungsweg von APP übernimmt die β -Sekretase, das β APP-schneidende Enzym (BACE-1), die Abspaltung der Ektodomäne (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Der BACE-1-Schnitt setzt die lösliche Ektodomäne APPs β frei. Das membranverankerte Gegenstück APP CTF β stellt wiederum ein Substrat für die γ -Sekretase dar. Wie im nicht-amyloidogenen Weg wird AICD ins Zytoplasma entlassen, statt p3 werden jedoch A β -Peptide unterschiedlicher Länge in den extrazellulären Raum sekretiert und können zu amyloiden Plaques aggregieren (Haass und Selkoe, 2007).

1.1.3.5 Signalpeptidpeptidase

Neben der γ -Sekretase ist die Signalpeptidpeptidase (SPP) ein weiterer Vertreter der GxGD-Intramembranaspartylproteasen. SPP weist wie die PS eine polytope Membrantopologie mit neun TMD auf, wobei die hochkonservierten YD-, GxGD- und PAL-Motive in TMD 6, 7 und 9 zu finden sind (Abbildung 11) (Friedmann et al., 2004; Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002).

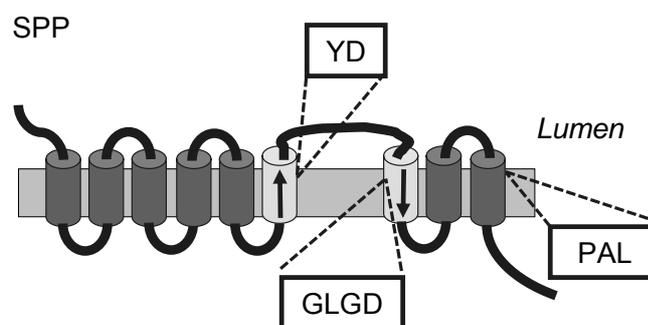


Abbildung 11. Schematischer Aufbau der SPP. SPP besitzt 9 TMD, wobei sich die konservierten YD-, GLGD- und PAL-Motive in TMD 6, 7 und 9 befinden. Die Topologie der SPP ist im Vergleich zu PS in der Membran invertiert (siehe auch Abbildung 7). Die Pfeile stellen die Richtung der TMD dar, in denen die YD- und GLGD-Motive des aktiven Zentrums orientiert sind. Abbildung verändert nach (Fluhrer et al., 2009; Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002).

Proteine, die den sekretorischen Pfad durchlaufen, tragen häufig hydrophobe Signalpeptide, die die Translokation ins ER bzw. die Insertion des Proteins in die ER-Membran bewirken (Blobel, 1980). Diese Signalpeptide nehmen während der Translokation durch das Translokon eine Typ-II-Transmembrantopologie ein und werden durch die Signalpeptidase (SP) abgespalten (Abbildung 12) (Martoglio und Dobberstein,

1998; Paetzel et al., 2002). Durch ihre Hydrophobizität verbleiben die Signalpeptide in der ER-Membran. Für ihren Abbau und die Freisetzung aus der Membran ist SPP verantwortlich, wobei der N-terminale Teil des Signalpeptids ins Zytoplasma und ein C-terminales Peptid ins ER-Lumen sekretiert wird (Abbildung 12) (Weihofen und Martoglio, 2003).

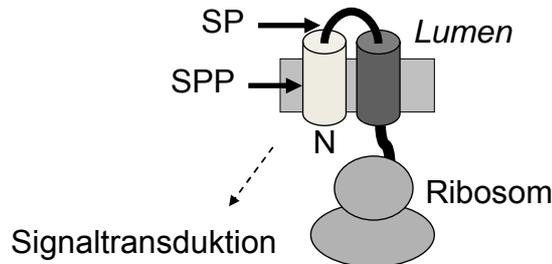


Abbildung 12. RIP von Signalpeptiden. Signalpeptide, die naszierende Proteine in den sekretorischen Pfad führen, werden durch SP im ER-Lumen prozessiert. Die in der ER-Membran verbleibenden Signalpeptide werden im zweiten Schritt innerhalb ihrer hydrophoben Sequenz durch SPP geschnitten. SPP-Spaltprodukte können wichtige Signalfunktionen ausüben (siehe Text).

Die Spaltprodukte der SPP-abhängigen RIP können in einzelnen Fällen wichtige Signalfunktionen übernehmen. Zu diesen Spaltprodukten zählen die N-terminalen Fragmente der Signalpeptide der humanen Leukozyten-Antigene (HLA) HLA-A, -B und -C (Lemberg et al., 2001). Die zunächst ins Zytoplasma abgegebenen Fragmente werden ins ER transportiert und binden dort an HLA-E (Braud et al., 1997). Die Präsentation der Signalpeptidfragmente über HLA-E erlaubt dem adaptiven Immunsystem die Überwachung der Antigenpräsentation einer Zelle. Kommt es, beispielsweise durch virale Infektion, zu einer verminderten Produktion von HLA-A, -B und -C Molekülen, so verringert sich mit der Anzahl ihrer Signalpeptidfragmente auch die Konzentration von HLA-E mit gebundenen HLA-A-, -B- und -C-Signalpeptidfragmenten an der Plasmamembran. Das adaptive Immunsystem überprüft diese Präsentation an der Zelloberfläche, erkennt die virale Umprogrammierung der Zelle und leitet den Zelltod ein (Braud et al., 1998a; Martoglio und Dobberstein, 1998).

Es sind Fälle bekannt, in denen Viren die SPP-Aktivität ausnutzen: Das Polyprotein des Hepatitis-C-Virus wird beispielsweise in einer RIP zunächst von SP und dann von SPP in einer TMD prozessiert. Der SPP-Schnitt ist Voraussetzung für die Maturierung und damit für die Infektiosität des Virus (McLauchlan et al., 2002; Okamoto et al., 2008).

SPP-Aktivität ist für viele Organismen essentiell. In *Caenorhabditis elegans* ist SPP offenbar für die Signalübertragung durch den Cholesterin-Lipoprotein-Rezeptor-Signalübertragungsweg in der Embryonalentwicklung notwendig (Grigorenko et al., 2004). Ähnlich wie in *Caenorhabditis elegans* hat das SPP-Orthologe in *Drosophila*

melanogaster essentielle Funktionen während früher Entwicklungsstadien (Casso et al., 2005). Bemerkenswerterweise wird das *Drosophila melanogaster*-SPP nur in einer limitierten Gruppe von Zellen exprimiert. In *Brachydanio rerio* löst SPP-Knockdown einen massiven Zelltod im zentralen Nervensystem aus (Krawitz et al., 2005). Auch hier hat SPP eine essentielle Funktion in der Frühentwicklung. Im Säugermodell wurden die physiologischen Funktionen von SPP noch nicht untersucht.

1.1.3.6 Signalpeptidpeptidase-homologe Proteasen

Anhand von Datenbankanalysen konnten SPP-homologe GxGD-Intramembranproteasen identifiziert werden (Abbildung 13) (Signalpeptidpeptidase-ähnliche Proteasen, SPPL) (Grigorenko et al., 2002; Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002). Während im humanen Genom SPPL2a, b, c, und SPPL3 gefunden wurden, existiert in *Saccharomyces cerevisiae* zusätzlich SPPL4 (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002). SPPL-Knockdown-Experimente zeigen in *Brachydanio rerio* interessante Phänotypen: Knockdown von SPPL2 resultiert in einer vergrößerten Schwanzvene. Knockdown von SPP oder SPPL3 resultiert in einem massiven Zelltod im ZNS (Krawitz et al., 2005). SPP und SPPL3 könnten damit redundante Funktionen ausüben. Da die SPPL-Proteasen mit dem YD-, GxGD- und dem PAL-Motiv in den TMD 6, 7 und 9 die für die GxGD-Intramembranproteasen charakteristischen Sequenzen besitzen, ist eine Funktion als Intramembranprotease *in vivo* hoch wahrscheinlich, zumal die Expression von inaktiven SPPL-Mutanten in *Brachydanio rerio* in der Phänokopie des jeweiligen Knockdowns resultiert (Krawitz et al., 2005).

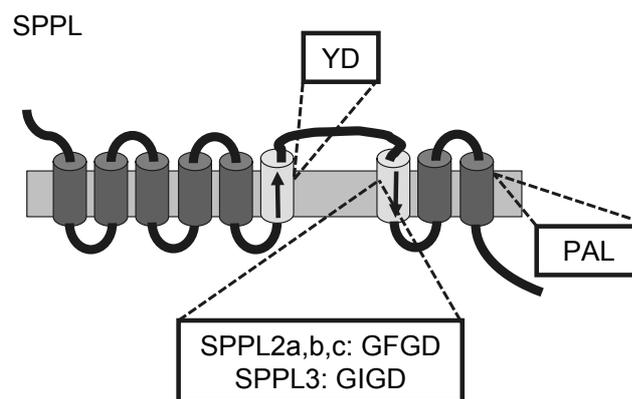


Abbildung 13. Schematischer Aufbau der SPPL-Proteasen. SPPL-Proteasen besitzen 9 TMD, wobei sich die konservierten YD-, GFGD/GIGD- und PAL-Motive in TMD 6, 7 und 9 befinden. Die Topologie der SPPL-Proteasen ist im Vergleich zu PS in der Membran invertiert (siehe auch Abbildung 7). Die Pfeile stellen die Orientierung der YD- und GxGD-Motive des aktiven Zentrums dar. Abbildung verändert nach (Fluhrer et al., 2009; Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002).

Der direkte Nachweis für proteolytische Aktivität wurde bisher für SPPL2a, SPPL2b und SPPL3 erbracht. SPPL2a und SPPL2b schneiden den Tumor-Nekrose-Faktor α sowie den Fas-Liganden (TNF α und FasL) (Fluhrer et al., 2006; Friedmann et al., 2006; Kirkin et al., 2007) (siehe 1.1.3.7). SPPL3 kann in einem *in vitro*-Assay ein SPP-Substrat prozessieren (Nyborg et al., 2006). Die Fähigkeit von SPPL3, ein SPP-Substrat zu spalten, steht in Einklang mit der sehr ähnlichen zellulären Lokalisation der Proteasen im ER (Krawitz et al., 2005). SPPL3 wurde allerdings auch im cis-Golgi-Apparat beschrieben (Friedmann et al., 2006). SPPL2a, b und c sind komplex glykosyliert und wurden im Golgi-Apparat und an der Plasmamembran nachgewiesen (Friedmann et al., 2004; Krawitz et al., 2005). Für SPPL2a und SPPL2b wurde zusätzlich eine endosomal/lysosomale Lokalisation gezeigt (Friedmann et al., 2006; Krawitz et al., 2005) (Abbildung 14). Da Transmembranproteine meist selektiv in unterschiedlichen Kompartimenten vorkommen, schränkt die differentielle Lokalisation einer SPPL-Protease die Anzahl der möglichen Substrate ein (Krawitz et al., 2005).

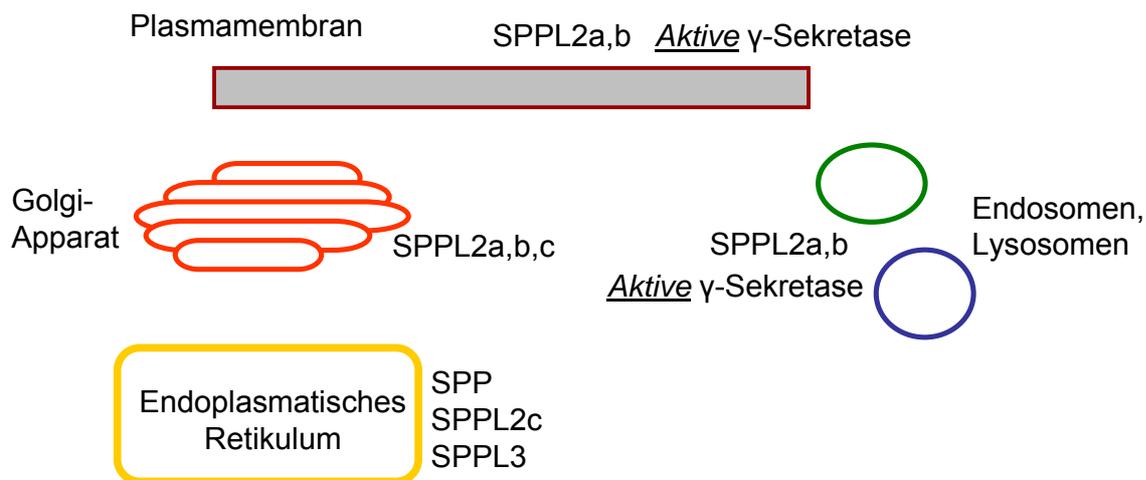


Abbildung 14. Differentielle Lokalisation der SPP/SPPL-Proteasen und Vergleich mit aktiver γ -Sekretase. SPP, SPPL2c und SPPL3 lokalisieren im ER. SPPL2a, b und c wurden im Golgi-Apparat beschrieben. SPPL2a befindet sich auch an der Zelloberfläche. Die Lokalisation von SPPL2b an der Plasmamembran und in endosomal/lysosomalen Kompartimenten ähnelt der des aktiven γ -Sekretase-Komplexes (Zitate siehe Text).

Insbesondere die Lokalisation von SPPL2a und SPPL2b ist der des aktiven γ -Sekretase-Komplexes sehr ähnlich. Daher erlaubt speziell die Analyse von SPPL2a und SPPL2b einen Vergleich mit aktiver γ -Sekretase.

1.1.3.7 Regulierte Intramembranproteolyse des TNF α

Das Typ-II-Transmembranprotein TNF α ist das erste identifizierte Substrat für SPPL-Proteasen (Fluhrer et al., 2006; Friedmann et al., 2006). Die Prozessierung von TNF α ist ein weiteres Beispiel für RIP: TNF α wird in seiner extrazellulären Domäne durch ADAM-17 prozessiert (Black et al., 1997). Die Ektodomäne wird in den extrazellulären Raum sekretiert und übernimmt als proinflammatorisches Zytokin wichtige Aufgaben im Immunsystem. Als Gegenstück verbleibt nach dem ADAM-17-Schnitt ein membranverankertes N-terminales Fragment (TNF α NTF). Das TNF α NTF ist Substrat für Intramembranproteolyse durch SPPL2a und SPPL2b (Abbildung 15). Produkte sind ein sekretiertes C-terminales Peptid (C-Peptid) und eine ICD (Fluhrer et al., 2006). Die Freisetzung der ICD durch SPPL2a bzw. SPPL2b löst die Expression von Interleukin-12 (IL-12) aus (Friedmann et al., 2006). Innerhalb der ICD befinden sich Motive für posttranslationale Modifikationen, beispielsweise ein Phosphorylierungsmotiv für die Casein Kinase I (Watts et al., 1999). Welche Rolle diese Modifikationen spielen und ob die TNF α ICD direkt in den Zellkern transloziert und als Transkriptionsfaktor wirkt oder die ICD die Signaltransduktion auf andere Weise ausübt, ist bislang nicht bekannt (Abbildung 15).

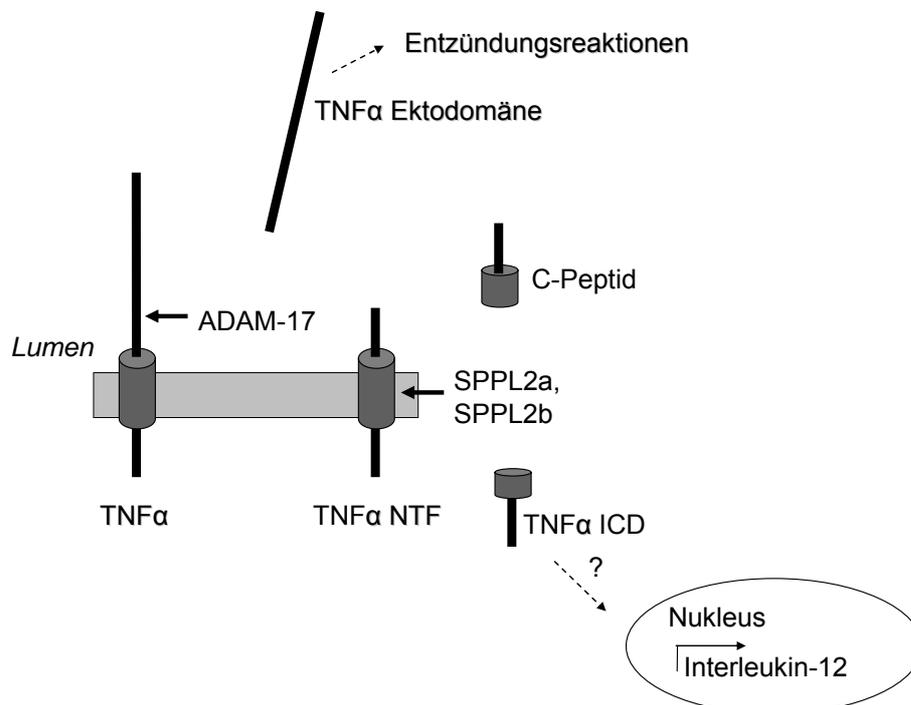


Abbildung 15. RIP von TNF α . TNF α ist Substrat für die Disintegrin und Metalloprotease ADAM-17, die die lösliche Ektodomäne freisetzt. Die Ektodomäne übernimmt als Zytokin wichtige Signalfunktionen bei Entzündungsprozessen. Im zweiten Schnitt prozessieren SPPL2a oder SPPL2b das membranverankerte TNF α NTF. Die Intramembranproteolyse resultiert in der Sekretion des niedermolekularen C-Peptids und der Freisetzung der TNF α ICD ins Zytoplasma. Die TNF α ICD kontrolliert die Interleukin-12-Expression. Ob die TNF α ICD in den Zellkern transloziert oder die transkriptionale Wirkung auf andere Weise ausübt, ist bislang unklar.

Die Identifikation von TNF α als SPPL2b-Substrat erlaubte die vergleichende Analyse des Schnittmechanismus zwischen SPPL2b und der γ -Sekretase. Für beide Proteasen konnte gezeigt werden, dass es sich um mehrere Schnitte innerhalb der TMD des Substrats handelt (Fluhrer et al., 2006; Qi-Takahara et al., 2005; Sastre et al., 2001). Bedeutung gewinnt diese Tatsache bei der Untersuchung der molekularen Pathologie der Alzheimer-Erkrankung (siehe 1.2). Bei Spaltung des APP CTF β generiert die γ -Sekretase A β -Peptide unterschiedlicher Länge. Neben einer Reihe längerer bzw. kürzerer Peptide entstehen vor allem die A β -Spezies A β 38, A β 40 und A β 42 im Verhältnis 1:10:1 (A β 38:40:42) (Page et al., 2008). Die längere A β 42-Spezies ist amyloidogener als die kürzeren Peptide A β 38 und A β 40. Mutationen in PS, die bei vererbten Alzheimer-Erkrankungen auftreten (FAD-Mutationen), verschieben das Schnittmuster der γ -Sekretase in der APP-Prozessierung zu A β 42 (Murayama et al., 1999; Steiner et al., 2000). Anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen wurde für die γ -Sekretase ein sequentieller Schnittmechanismus vorgeschlagen: Die γ -Sekretase schneidet die APP-TMD in mehreren Schritten ausgehend von der zytoplasmatischen Seite in luminaire Richtung, beginnend mit dem ϵ -Schnitt an Position 49. Dieser erste Schnitt setzt die AICD frei. Es folgen der ζ -Schnitt an Position 46 und die γ -Schnitte an den Positionen 38, 40 oder 42 (Abbildung 16) (Qi-Takahara et al., 2005). Für die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse von TNF α wurden gleichermaßen unterschiedliche Schnittprodukte gefunden (Fluhrer et al., 2006). Zellkultur- und *in vitro*-Experimente konnten zeigen, dass im Fall der Substratspaltung durch SPPL2b die Prozessierung vom luminalen Ende der TMD des Substrats in Richtung zytoplasmatischer Seite stattfindet (Abbildung 16). Verglichen mit der γ -Sekretase ist die Schnittrichtung invertiert - genau wie die katalytischen Zentren der beiden GxGD-Proteasen (siehe 1.1.3) (Fluhrer et al., 2009; Friedmann et al., 2004).

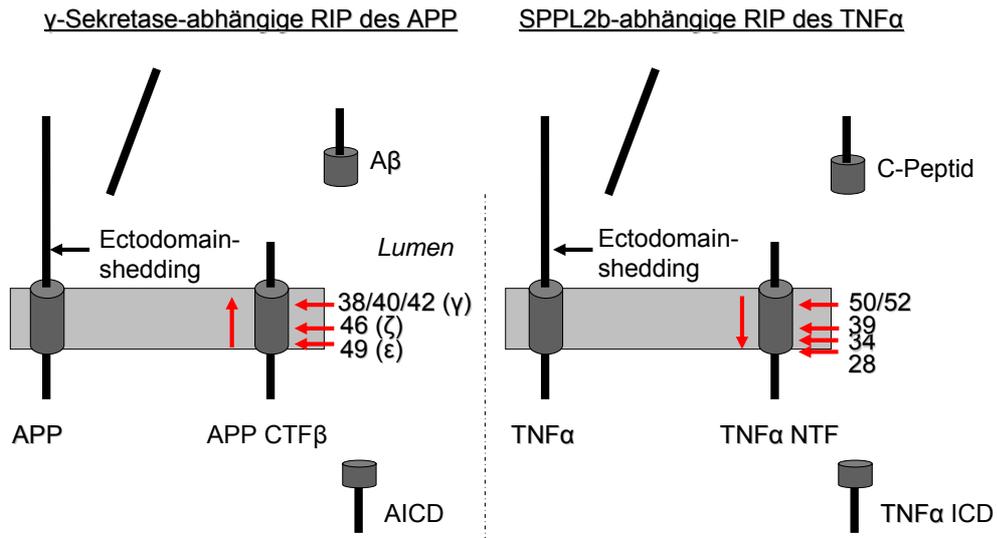


Abbildung 16. Sequentielle Prozessierung des APP durch die γ -Sekretase bzw. des TNF α durch SPPL2b. Sowohl APP als auch TNF α werden mehrfach in der Transmembrandomäne prozessiert. Während die Schnittrichtung (rote vertikale Pfeile) bei der γ -Sekretase-abhängigen Proteolyse in der Richtung vom Zytoplasma zum Lumen verläuft, ist dies bei der SPPL2b-abhängigen Proteolyse invertiert, d.h. für beide Substrate verläuft die Proteolyse vom C-Terminus zum N-Terminus (siehe Text für Details). Abbildung verändert nach (Fluhrer et al., 2008a).

Schwerwiegende FAD-Mutationen in PS, beispielsweise PS1 L166P oder G384A, verlangsamen spezifisch die Produktion von A β 40, nicht aber von A β 42 (Fluhrer et al., 2008a). Dies führt zu einem relativen Anstieg der A β 42-Konzentration. Die FAD-Mutation G384A befindet sich im aktiven Zentrum von Presenilin, aus GLGD wird GLAD. Wird der entsprechende Glycin-Rest in SPPL2b zu einem Alanin-Rest mutiert, so wird auch die Intramembranproteolyse von TNF α durch SPPL2b verlangsamt (Fluhrer et al., 2008a). Dies deutet darauf hin, dass der katalytische Mechanismus von SPPL2b und γ -Sekretase konserviert ist. Eine mögliche Auswirkung dieser Konservierung ist die beobachtete Kreuzreaktivität von γ -Sekretase-Inhibitoren mit SPP/SPPL-Proteasen (Nyborg et al., 2004; Sato et al., 2008b; Sato et al., 2006b).

1.1.3.8 Substratanforderungen von SPP/SPPL-Proteasen

In Einklang mit der invertierten Topologie von SPP/SPPL im Vergleich zu PS schneiden SPP/SPPL-Proteasen bislang nur Substrate mit Typ-II-Transmembrantopologie (siehe 1.1.3). Die Typ-II-Topologie wurde noch nicht experimentell als Voraussetzung für SPP/SPPL-Substrate bewiesen. Nach aktuellem Wissensstand kann sie jedoch als Substratanforderung bezeichnet werden.

Für alle bislang identifizierten SPP/SPPL-Substrate wurde eine Prozessierung in der luminalen Domäne des Substrats beschrieben. Für Signalpeptide wird dieser Schnitt von SP übernommen. Tatsächlich ist die SPP-abhängige Intramembranproteolyse nach

Mutagenese der SP-Schnittstelle stark reduziert, jedoch nicht komplett inhibiert (Lemberg und Martoglio, 2002). Für TNF α und FasL, beides Substrate für SPPL2a und SPPL2b, wurde einerseits Ectodomain-Shedding beschrieben, andererseits co-isoliert eine erhebliche Menge der Volllängen-Proteine mit den Proteasen (Fluhrer et al., 2006). Die Rolle der luminalen Prozessierung ist daher für SPPL-abhängige Intramembranproteolyse unklar.

Weiterhin wurden sogenannte „Helix-Breaker“, also Aminosäuren, die die helikale Ordnung der TMD des Substrats stören, als Voraussetzung für den SPP-Schnitt beschrieben. Jedoch ist auch nach Mutagenese der entsprechenden Aminosäurereste keine vollständige Inhibition des SPP-Schnitts zu beobachten (Lemberg und Martoglio, 2002). Für SPPL-Substrate ist die Rolle von Helix-Breakern unbekannt.

Es ist bislang nicht beschrieben, ob und wie spezifisch SPP/SPPL-Proteasen in Bezug auf die Prozessierung von Substraten sind. Einer Hypothese nach, die für die γ -Sekretase aufgestellt wurde, prozessiert die γ -Sekretase unspezifisch eine große Anzahl an Substraten und fungiert als „Membran-Proteasom“. Sollte dies auch für SPP/SPPL-Proteasen gelten, so stellt sich die Frage, welches allgemeine Attribut von Transmembranproteinen durch die SPP/SPPL-Proteasen erkannt wird.

1.2 Die Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung im Alter (Selkoe, 2001a) und ein zunehmendes sozioökonomisches Problem für alternde westliche Gesellschaften. Nur ca. 5% der diagnostizierten Alzheimer-Fälle sind vererbte Formen der Erkrankung (FAD, Familiäre Alzheimer-Erkrankung). Für die restlichen - sporadischen - Fälle konnten bislang keine bestätigten Ursachen gefunden werden (Haass und Steiner, 2002). Mithilfe von koordinierten psychologischen und neuropathologischen Untersuchungen an der Patientin Auguste Deter stellte Dr. Alois Alzheimer 1907 erstmals einen Zusammenhang zwischen den Krankheitssymptomen wie Gedächtnis- und Orientierungsstörungen sowie Halluzinationen und den pathologischen Befunden her (Alzheimer, 1907).

1.2.1 Neuropathologische Merkmale

Die neuropathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer-Erkrankung sind amyloide Plaques, intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (NFT) und Verlust von Synapsen. Während die Amyloid-Pathologie vorwiegend im Neokortex auftritt, breiten sich die NFT im Verlauf

der Alzheimer-Erkrankung vom limbischen System über den Hippocampus in die Kortexregionen aus (Abbildung 17) (Braak et al., 1996).

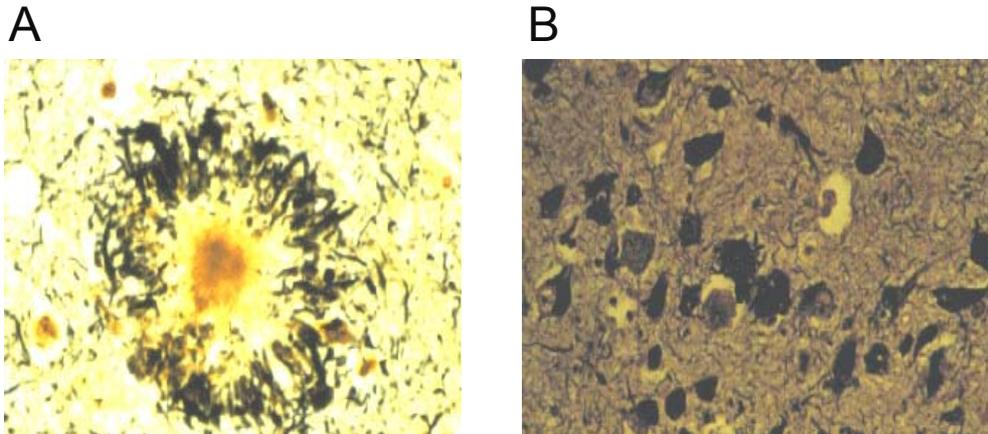


Abbildung 17. Neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung. (A) Histochemische Färbung von amyloiden Plaques (orange), umgeben von dystrophen Neuriten (dunkle Zellkörper). (B) Silber-Färbung von neurofibrillären Bündeln in Zellkörpern (Sisodia und St George-Hyslop, 2002; St George-Hyslop, 2000).

NFT bestehen überwiegend aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, das in aggregierter Form übermäßig phosphoryliert ist und seine physiologische Funktion, die Stabilisierung axonaler Mikrotubuli, nicht mehr wahrnehmen kann (Friedhoff et al., 1998; Grundke-Iqbal et al., 1986). Die destabilisierten Dendriten und Axone werden als dystrophe Neuriten bezeichnet (Goedert et al., 1998). Weshalb es zur Hyperphosphorylierung von Tau kommt, ist bisher nicht eindeutig gezeigt. NFT und dystrophe Neuriten sind nicht auf die Alzheimer-Erkrankung begrenzt, sondern sind auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen bekannt (siehe 1.3.1) (Shaw et al., 2007).

Die amyloiden Plaques, das zweite neuropathologische Merkmal bei Alzheimer-Patienten, treten in unterschiedlichen Formen auf, wobei hauptsächlich zwischen diffusen und neuritischen Plaques unterschieden wird. Diffuse Plaques werden auch in Gehirnen gesunder alter Menschen nachgewiesen, neuritische Plaques sind jedoch spezifisch für Alzheimer-Patienten (Hardy und Selkoe, 2002). Einen Hauptbestandteil der amyloiden Plaques stellen A β -Peptide dar (Haass und Selkoe, 2007). Lösliche, aus Alzheimer-Patienten isolierte oligomere A β -Spezies sind nervenschädigend und lösen Defizite im Erinnerungsvermögen aus (Lesné et al., 2006; Shankar et al., 2008). Mature amyloide Plaques erscheinen weniger neurotoxisch als A β -Oligomere, sie könnten jedoch als Reservoir für die Oligomere dienen und auf diese Weise zur Toxizität der A β -Peptide beitragen.

1.2.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Als molekulare Ursache für die Alzheimer-Erkrankung wurde die sogenannte Amyloid-Kaskade vorgeschlagen, in deren Mittelpunkt A β -Peptide stehen, die durch γ -Sekretase-abhängige RIP entstehen (siehe 1.1.3.4) (Haass und Selkoe, 2007; Hardy und Higgins, 1992; Selkoe, 2001a). A β -Peptide unterschiedlicher Länge werden unter physiologischen Bedingungen von Zellen sekretiert und abgebaut (Haass et al., 1992; Kurochkin und Goto, 1994; Selkoe, 2001b; Shoji et al., 1992). Störungen im A β -Metabolismus wie beispielsweise eine erhöhte A β -Produktion, ein verändertes γ -Sekretase-Schnittmuster oder ein verringerter A β -Abbau führen zur A β -Oligomerisierung. Dies soll Effekte auf die synaptische Funktion der Nervenzellen haben (Haass und Selkoe, 2007). Weiterhin kommt es zu Entzündungsreaktionen und zur Ausbildung erster amyloidogener Plaques. Die fortschreitende Beeinflussung synaptischer Funktionen führt zur Veränderung des neuronalen Ionenhaushalts und oxidativem Zellstress. Tau (siehe 1.2.1) wird hyperphosphoryliert, Mikrotubuli werden destabilisiert (Haass und Selkoe, 2007). Laut der Hypothese ist dies die Ursache für eine umfassende neuronale Dysfunktion mit Defiziten im Neurotransmitterhaushalt. Folge ist ein progressiver Gedächtnisverlust, der mit einer weiteren Bildung von amyloiden Plaques und NFT einhergeht (Haass und Selkoe, 2007). Die Alzheimer-Erkrankung ist zwar die häufigste, aber nicht die einzige neurodegenerative Erkrankung, für die amyloide Ablagerungen beschrieben wurden.

1.3 Familiäre Britische und Dänische Demenz

1.3.1 Auftreten und neuropathologische Merkmale

Die Familiäre Britische Demenz (FBD) wurde erstmals 1933 bei zunächst neun und später zwölf Mitgliedern einer britischen Familie über 3 Generationen beschrieben (Mead et al., 2000; Worster-Drought et al., 1940; Worster-Drought et al., 1933). Ab dem 40. Lebensjahr leiden Betroffene unter einer zerebellären Ataxie sowie fortschreitender spastischer Tetraparese und Demenz. Neuropathologische Untersuchungen bei Patienten aus dieser Familie zeigten eine umfassende Demyelinisierung im Gehirn und das Auftreten von amyloiden Plaques (Griffiths et al., 1982). Gleichmaßen wurden intrazelluläre, Tau-positive neurofibrilläre Bündel nachgewiesen (Mead et al., 2000). Alle untersuchten Fälle zeigten eine erhebliche Amyloidangiopathie im Cortex cerebelli (Griffiths et al., 1982). Die der FBD ähnliche Erkrankung Familiäre Dänische Demenz (FDD) wurde 1970 bei 9 betroffenen Personen über fünf Generationen diagnostiziert (Stromgren et al., 1970). Die Patienten leiden - wie Betroffene der FBD - unter

progressiver Demenz und einer zerebellären Ataxie. Zusätzlich zu den für die FBD beschriebenen Symptomen treten bei FDD-Patienten Taubheit und Katarakte auf (Vidal et al., 2000). Neuropathologische Befunde zeigen bei Patienten und im Tiermodell eine der FBD sehr ähnliche Demyelinisierung im ZNS, eine umfassende Amyloidangiopathie sowie hippocampale Amyloidplaques und Tau-positive neurofibrilläre Strukturen (Rostagno et al., 2002; Vidal et al., 2009; Vidal et al., 2000). Es bestehen folglich auffällige neuropathologische Übereinstimmungen zwischen FBD, FDD und der Alzheimer-Erkrankung. Auf molekularer Ebene ist die Amyloidbildung jedoch unterschiedlich.

1.3.2 Molekulare Grundlagen der Familiären Britischen und Dänischen Demenz im Vergleich zur Alzheimer-Erkrankung

Mit FBD und FDD sind STOP-Codon Mutationen im *itm2b*-Gen assoziiert, das für Bri2 kodiert (Deleersnijder et al., 1996; Vidal et al., 1999). Im Fall der FBD handelt es sich um eine Einzel-Nukleotid-Transversion von TGA (STOP) zu AGA (Arg). Bei FDD wurde in der Region des STOP-Codons eine Duplikation eines Dekamers (10bp) sequenziert, die das Leseraster verschiebt. Beide Mutationen führen zur Verlängerung des Bri2-Proteins am C-Terminus (Abbildung 18). Durch proteolytische Prozessierung des proBri2 zu Bri2 durch Furin und andere Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertasen wird das Propeptid abgespalten und anschließend sekretiert (Choi et al., 2004; Kim et al., 1999). Die Verlängerung des Propeptids erhöht die Schnitteffizienz der Proprotein-Konvertase im Vergleich zum Wildtyp (wt) (Kim et al., 2002). Der durch den Furin-Schnitt neu entstandene N-Terminus der mutierten Propeptide gleicht dem des wt-Propeptids. Durch die Verlängerung des Bri2-Proteins unterscheiden sich jedoch die C-Termini der veränderten Propeptide vom wt-Propeptid. Auch die C-Termini von FBD und FDD untereinander unterscheiden sich, da die Mutationen des STOP-Codons unterschiedlich sind. Die veränderten Propeptide ABRI (bei FBD) und ADAN (bei FDD) sind *in vivo* amyloidogen und können zu höhermolekularen Oligomeren, Fibrillen und schließlich zu muren Plaques aggregieren (Abbildung 18) (Akiyama et al., 2004).

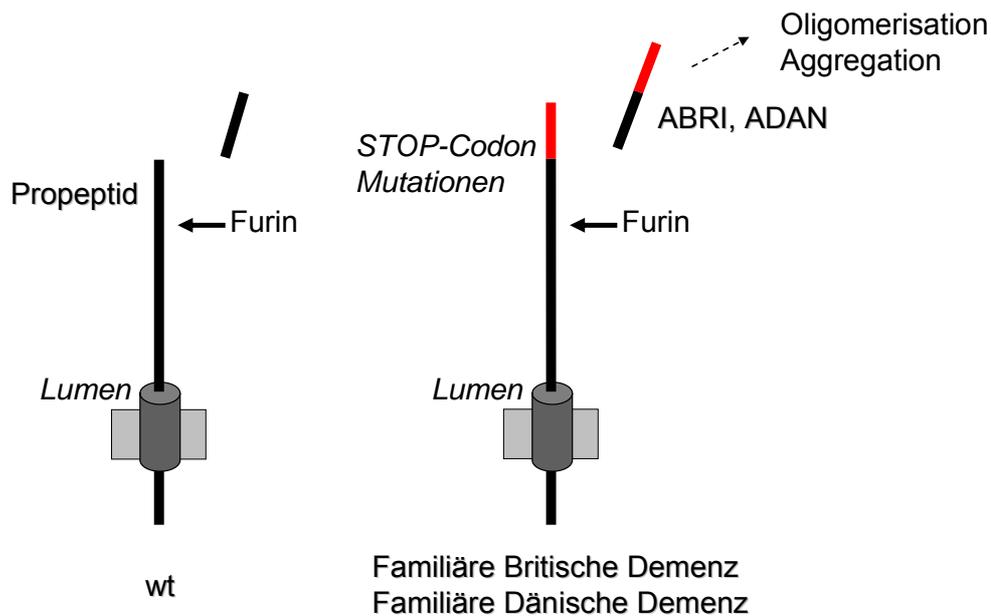


Abbildung 18. Bri2 in FBD und FDD. Das Transmembranprotein Bri2 wird luminal durch die Proprotein-Konvertase Furin prozessiert. Der Furin-Schnitt setzt das Propeptid frei. Patienten der FBD und FDD tragen Mutationen im STOP-Codon des *itm2b*-Gens, das für Bri2 kodiert. Die Mutationen führen zur Verlängerung des Bri2. Folglich werden durch den Furin-Schnitt mutierte, verlängerte Propetide (ABRI bei FBD, ADAN bei FDD) sekretiert. ABRI und ADAN sind amyloidogen und bilden den Hauptbestandteil der Plaques im Gehirn von FBD- und FDD-Patienten.

Als neurotoxische Spezies der Propeptide wurden nicht-amyloide Mono- bzw. Oligomere bestehend aus ABRI bzw. ADAN beschrieben, mature Fibrillen verursachen keine Zytotoxizität (Gibson et al., 2005; Surolija et al., 2008). Bemerkenswert für die FBD, FDD und die Alzheimer-Erkrankung ist die molekulare Analogie der Aggregation eines amyloidogenen monomeren Peptids zum Oligomer, zur Fibrille und zum murenen Plaque mit einhergehender Nervenschädigung.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die γ -Sekretase ist Gegenstand intensiver pharmazeutischer Forschung, da sie für die Entstehung der mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten A β -Peptide verantwortlich ist. Dabei soll durch Inhibition bzw. Modulation der γ -Sekretase die Bildung von A β -Peptiden reduziert werden. Die γ -Sekretase gehört zur Klasse der GxGD-Intramembranproteasen, der auch die SPP/SPPL-Proteine angehören. Innerhalb der Familie der GxGD-Proteasen sind Aminosäuresequenzen konserviert, die für proteolytische Aktivität notwendig sind und die mit großer Wahrscheinlichkeit das aktive Zentrum der Proteasen ausbilden. In der Ähnlichkeit der aktiven Zentren liegt vermutlich die Ursache für die beobachtete Kreuzreaktivität von einigen γ -Sekretase-Inhibitoren mit SPP/SPPL-Proteasen.

Da SPP/SPPL-Proteasen wichtige physiologische Funktionen übernehmen und die Inhibition dieser Proteasen zu erheblichen Nebenwirkungen führen könnte, sind Kreuzreaktivitäten von γ -Sekretase-Inhibitoren mit SPP/SPPL-Proteasen unbedingt zu vermeiden. Ein eingehender Vergleich der SPP/SPPL-abhängigen Proteolyse mit der Substratprozessierung durch die γ -Sekretase könnte es erlauben, die Unterschiede zwischen den Proteasen auszuarbeiten, um selektive Ansätze für die Inhibition der γ -Sekretase zu entwickeln. Für SPP/SPPL-Proteasen konnten bislang jedoch nur wenige Substrate identifiziert werden, was eine Gegenüberstellung der SPP/SPPL-abhängigen Proteolyse mit dem Prozessierungsmechanismus der γ -Sekretase erschwert.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifikation eines neuen Substrats für SPP/SPPL-abhängige Intramembranproteolyse. Als Typ-II Transmembranprotein, das luminal prozessiert wird und mit hoher Wahrscheinlichkeit in Kompartimenten des sekretorischen Pfades lokalisiert ist, ist Bri2 ein Kandidat für SPP/SPPL-abhängige RIP. Falls Bri2 ein Substrat für Intramembranproteolyse darstellt, so gilt es weiterhin festzustellen, ob Bri2 Substrat für eine bestimmte SPP/SPPL-Protease ist, oder ob mehrere SPP/SPPL-Proteasen in der Lage sind, Bri2 zu spalten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob Bri2 Substrat für Ectodomain-Shedding ist, da Ectodomain-Shedding in der Regel einen regulierenden Faktor für die Intramembranproteolyse darstellt. Falls für Bri2 Ectodomain-Shedding nachgewiesen werden sollte, soll die hierfür verantwortliche Protease identifiziert werden und die Lokalisation der Prozessierung des Bri2 in der Zelle bestimmt werden.

Experimente mit der γ -Sekretase zeigen, dass die Schnitteffizienz der Protease negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats korreliert. Um die Substratanforderungen der γ -Sekretase mit denen der SPP/SPPL-Proteasen zu vergleichen, soll anhand von Experimenten mit Bri2 und der SPPL2b-Protease die Frage beantwortet werden, ob auch SPPL2b Substrate effizienter prozessiert, falls diese zuvor durch Ectodomain-

Shedding luminal verkürzt wurden und in welchem Zusammenhang die Länge der Ektodomäne eines Substrats mit der Schnitteffizienz der SPPL2b-Protease steht.

In Anlehnung an die γ -Sekretase, für die zahlreiche Substrate ohne erkennbare Sequenzhomologie identifiziert wurden, kann für die SPPL2b-Protease die Hypothese aufgestellt werden, dass auch SPPL2b nicht sequenzspezifisch schneidet. Damit in Einklang ist die Beobachtung, dass die Konservierung der bislang untersuchten SPPL2b-Substrate auf Ebene der Aminosäuresequenz äußerst gering ist. Es gilt, diese Hypothese zu überprüfen, indem ein Typ-II Transmembranprotein als Substrat für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse getestet wird, das hohe Sequenzhomologie zu einem bekannten Substrat aufweist. Falls dieses zu dem Substrat homologe Protein nicht prozessiert wird, so schneidet SPPL2b mit hoher Wahrscheinlichkeit sequenzspezifisch. Im Zusammenhang mit diesen Experimenten ist der Nachweis wichtig, dass das zu dem Substrat homologe Protein die zellulären Kompartimente erreicht, in denen SPPL2b lokalisiert ist. Weiterhin muss die Fragestellung adressiert werden, ob das homologe Protein wie die bislang identifizierten Substrate in der Ektodomäne prozessiert wird, da fehlendes Ectodomain-Shedding die SPPL2b-abhängige Proteolyse beeinflussen könnte.

Es ist ein weiteres Ziel dieser Dissertation, den Einfluss von intra- bzw. extrazellulären Domänen eines Substrats auf die Effizienz der Prozessierung durch SPPL2b zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Frage soll ein systematischer Austausch der zytoplasmatischen und der luminalen Domänen eines Substrats mit den entsprechenden Domänen eines Nicht-Substrats durchgeführt werden. Eine zielgerichtete Mutagenese der Transmembrandomäne eines Substrats und die Analyse der Schnitteffizienz der SPPL2b-Protease kann weiterhin Aufschluss über die Anforderungen der SPPL2b-Protease an die Transmembrandomäne eines Substrats geben.

Anhand der Ergebnisse wird eine detaillierte Analyse der Substratanforderungen der GxGD-Proteasen mit dem Schwerpunkt einer Gegenüberstellung der SPPL2b-Protease mit der γ -Sekretase möglich. Diese Erkenntnisse könnten Grundlage für die Entwicklung von spezifischen γ -Sekretase-Inhibitoren zur Therapie der Alzheimer-Erkrankung sein.

3. Material & Methoden

3.1 Geräte und Materialien

<u>Gerät, Material</u>	<u>Firma</u>
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systemec
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	PQELab
CO ₂ -Inkubator (Hera cell)	Heraeus, Kendro
Deckgläschen	Roth
Drucker (p91)	Mitsubishi
Film Entwickler	Agfa
Filme	Fuji
FluorChem™ 8900	Alpha Innotech
Gasbrenner	W _L D-Tec
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Kendro
Gelkammer	Bio-Rad
Heizblock	Liebisch
Inkubator 37 °C	Heraeus
Inkubator 56 °C	Heraeus
Kamera (CCD Video Camera Module)	Raiser
Kühlschrank 4 °C	Elektrolux
Lamina Flow Bench	Heraeus, Kendro
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikrotube (2 ml)	Sarstedt
Mikroskop (Wilovert S 10x 4/10/20)	Hund
Mikrowelle	Bosch
N ₂ -Tank (Chronos)	Messer Griesheim
Pasteur-Pipetten	VWR International
PCR-Maschine (Mastercycler)	Eppendorff
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
Photometer (SmartSpec™ 3000)	Bio-Rad
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Pipetten (P2, P10, P20, P200, P1000)	Gilson
Pipetten steril (2 ml, 5 ml 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen steril mit Filter (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt

Pipettier (Accu-Jet)	Brand
Power supply (Power Pac 300)	Bio-Rad
Quarzküvette (10x10x45 mm)	Hellma
Reaktionsgefäß (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorff
Reaktionsgefäße Falcons (15 ml; 50 ml)	Sarstedt
Waage (Standard)	Ohaus
Scanner: Perfection 4870 Photo	Epson
Schüttler	Edmund Bühler
SDS-PAGE-Kammer	Bio-Rad
Thermo-Schüttler	Eppendorf
UV-Lampe (White/Ultraviolet Transilluminator)	UVP
Vortexer	IKA Labortechnik
Waage (Analytisch)	Ohaus
Wasser Entionisierer (Milli-Q)	Millipore
Wasserbad	GFL
Western Blot Transferkammer	Bio-Rad
Zellkultur-Platten (60x15 mm, 100x17 mm, 12 well)	Nunc
Zentrifuge (Biofuge pico), 4 °C (Biofuge fresco)	Heraeus, Kendro
Zentrifuge (J-20XP), Rotor JA10	Beckman
Zentrifuge/ 4 °C/ Ausschwing-Rotor (Multifuge 3L-R)	Heraeus, Kendro

3.2 Puffer und Lösungen

<u>Puffer / Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Agaroselösung, 1% (2%)	0,4 g Agarose (0,8 g) 400 ml TAE-Puffer Zum Lösen erwärmen
Anodenpuffer (5x) Schägger-Gel	121,1 g Tris mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen pH mit HCl auf 8,9 einstellen
Blotpuffer	151 g Tris 720 g Glycine mit bidest H ₂ O auf 5 l auffüllen
BSA (10x)	5 g BSA ad 50 ml mit bidest H ₂ O
CaCl ₂ -Puffer	50 mM CaCl ₂ 10 mM Tris

	mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen
	pH 8,0 einstellen
Hypoton – Puffer	10 mM Tris pH 7,4
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	ad 500 ml mit bidest H ₂ O
	pH 7,6 einstellen
I-Block	0,4 g Tropix I-Block Reagenz
	0,4 ml Tween-20
	ad 0,4 l mit PBS
Kathodenpuffer (10x) Schägger-Gel	0,1 M Tris
	0,1 M Tricin
	0,1% SDS
	mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen
Laufpuffer (10x)	151 g Tris
	720 g Glycine
	5 ml SDS 20%
	mit bidest H ₂ O auf 5 l auffüllen
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton
	5 g Bacto-Yeast-Extract
	5 g NaCl
	6 g Agar (nur für LB-Agarplatten)
	mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Lower-Tris (4x)	181,7 g Tris
	20 ml SDS 20%
	mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen
	pH 8,8 einstellen
Lyse- und Waschpuffer	1% CHAPSO
Co-Immunpräzipitation	50 mM Tris HCl, pH 7,8
	50 mM Kaliumacetat
	2 mM Magnesiumacetat
	125 mM Sucrose
	1 mM DTT
PBS (10x)	7 mM NaH ₂ PO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl

	pH 7,5 einstellen
PFA (4%)	20 g Paraformaldehyd in 500 ml PBS lösen Unter Rühren erhitzen
Protein-A-Sepharose	1 g Protein-A-Sepharose 20 mg BSA ad 10 ml mit STEN 1 h bei 4°C schütteln
SDS-Probenpuffer (5x)	2,5 ml Upper-Tris 1 g SDS 100 mg DTT 5 ml Glycerin (86%) 8 µg Bromphenolblau auf 10 ml mit bidest H ₂ O auffüllen Zum Lösen auf 95 °C erwärmen
STEN	25 ml 1 M Tris HCl pH 7,6 15 ml 5 M NaCl 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 1 ml NP40, Igepal mit bidest H ₂ O auf 0,5 l auffüllen
TAE (50x)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA pH 8,0 mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen
TBS (10x)	150 g Tris 10 g KCl 400 g NaCl mit bidest H ₂ O auf 5 l auffüllen pH 7,6 mit HCl einstellen
TBST (10x)	875 g NaCl 500 ml 1M Tris pH 7,6 50 ml Tween-20 ad 5 l mit bidest H ₂ O
Tris-Tricine Puffer (10x)	121 g Tris 179 g Tricine 10 g SDS (= 50 ml 20% SDS-Lsg) mit bidest H ₂ O auf 1 l auffüllen
Upper-Tris	30,3 g Tris

10 ml SDS 20%
mit bidest H₂O auf 0,5 l auffüllen
pH 6,8 einstellen

3.3 Reagenzien

<u>Reagenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
(Z-LL) ₂ -Keton, 1, 3-di-(N-benzyloxycarbon-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone	Calbiochem
Acrylamid	Serva
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Merck
APS	Merck
Bacto-Agar	BD
Bacto-Trypton	BD
Bacto-Yeast-Extract	BD
Blasticidin	Invitrogen
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
CHAPSO, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat	Biomol
DAPT, N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin t-butylester	Calbiochem
DMSO, Dimethylsulfoxid	Roth
ECL Western Blot Detektion	Amersham Biosciences
ECL ⁺ Western Blot Detektion	Amersham Biosciences
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Flag M2-Agarose	Sigma
Glycerin (86%)	Merck
Glycin	Biomol
I-Block	Tropix
Kaliumacetat	Sigma
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Lipofectamin2000	Invitrogen

Magensiumacetat	Sigma
NaCl	Roth
NaH ₂ PO ₄	Sigma
NukleoSpin MN-Kit	Macherey-Nagel
NukleoSpin Plasmid-Kit	Macherey-Nagel
Nukleo-Bond PC500	Macherey-Nagel
NP-40	Sigma
Orange G	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA
PFA, Paraformaldehyd	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Protein-A-Sepharose	Sigma
SDS, Natriumdodecyl-Sulfat	Serva
SeeBlue Plus2 Standard	Invitrogen
Sucrose	Sigma
TAPI-1, TNF α Protease Inhibitor-1	Peptides International
TAPI-2, TNF α Protease Inhibitor-2	Peptides International
TEMED	Roth
Tricin	Biomol
Tris	Biomol
Zeozin	Invitrogen

3.4 Modifikation von DNA und mikrobielle Methoden

3.4.1 PCR zur Amplifikation und Mutagenese von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erlaubt die Vervielfältigung und zielgerichtete Mutation von DNA-Fragmenten.

3.4.1.1 PCR Ansatz und Programm

Standardansatz für eine PCR:

- 500 ng Templat DNA
- 2,5-5 u Polymerase
(PFU-Polymerase, 2,5 u/ μ l, Stratagene oder TAQ Polymerase, 5 u/ μ l, Promega)
- Je 250 nM Oligonukleotide / Primer
- 25 μ M dNTPs
- Polymerase-spezifischer Puffer
- Mit autoklaviertem Wasser auf 100 μ l auffüllen.

PCR Standardprogramm

Schritt	Temperatur	Zeit / Wiederholungen
1	T=94 °C	2 min
2	T=94 °C	30 s
3	T=42 °C	30 s
4	T=72 °C	1:30 min
5	GOTO 2	30 Wiederholungen
6	T=94 °C	30 s
7	T=50 °C	30 s
8	T=72 °C	1:30 min
9	GOTO 6	40 Wiederholungen
10	T=72 °C	10 min
HOLD	4 °C	∞

Nach Bedarf wurden die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit den Reaktionsbedingungen angepasst bzw. Gradienten verwendet. PCR-Produkte wurden präparativ durch Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung gereinigt (siehe 3.4.2).

3.4.1.2 cDNA

cDNA wurde von imaGene (Heidelberg) erworben.

<u>Gen</u>	<u>imaGene #</u>	<u>Vektor, Selektion</u>	<u>Referenz</u>
ITM2b, proBri2	IRATp970A0912D	pCMV-Sport, Ampicillin	(Pittois et al., 1998)
ITM2c, proBri3	IRATp970B0843D	pCMV-Sport, Ampicillin	(Deleersnijder et al., 1996)

3.4.1.3 Oligonukleotide und Konstrukte

Tabelle 1 zeigt die hergestellten Konstrukte und die für die jeweilige Klonierung verwendeten Oligonukleotide. Sind Primerpaare für zwei PCRs aufgelistet, so ist für die Klonierung des Zielkonstrukts eine dritte PCR nötig, die den Vorwärts-Primer der ersten PCR, den Rückwärtsprimer der zweiten PCR und als cDNA eine 1:1 Mischung der beiden ersten PCR-Produkte benötigt. Alle Bri-Konstrukte tragen N-terminal einen durch PCR eingefügten Flag-Tag, während C-terminal ein V5 und ein His-Tag im Leserahmen

des pcDNA6.0 V5 His-A (Invitrogen) integriert sind. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen für alle Bri-Konstrukte sind *HindIII* und *XbaI*. Die Resistenz des pcDNA6.0 V5 His-A in *E. coli* ist Ampicillin, in eukaryotischen Zelllinien Zeocin.

<u>Konstrukt</u>	<u>Primer</u>	<u>cDNA</u>
proBri2	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagacgaacaaattaaagttccacggc	ITM2B
Bri2	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagaaaatagtttctctcggttcag	ITM2B
Bri2KK/AA	1. PCR Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' attgctggcttcagctgcctgaataccttaat 2. PCR Vorwärts: 5' attaaaggatttcaggcagctgaagccagcaat Rückwärts: 5' gctctagaaaatagtttctctcggttcag	ITM2B
Bri2ΔE	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagaaatcatctttagtgactttat	ITM2B
Bri3	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagctccagcccgc Rückwärts: 5' gctctagaccggagccggttaggtgtctttccc	ITM2C
Bri3ΔE	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagctccagcccgc Rückwärts: 5' gctctagacacaccacagcgaagaagttatc	
Bri2/3	1. PCR Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gtatgtagacagacaagtagtctcc 2. PCR Vorwärts: 5' ggagcatactgtctgtctacatctac Rückwärts: 5' gctctagaccggagccggttaggtgtctttccc	ITM2B ITM2C
Bri2/3 – 0	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagacaagtagtctctctc	Bri2/3
Bri2/3 – 10	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagaaaagaagaagttatc	Bri2/3
Bri2/3 – 23, Bri2/3ΔE	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagacacaccacagcgaagaagttatc	Bri2/3
Bri2/3 – 59	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagagggcacagccaggttagtcgctc	Bri2/3
Bri2/3 – 91	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagagatgacatagcactgtccagga	Bri2/3
Bri2/3 – 124	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5'	Bri2/3
Bri2/3 – 156	Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' gctctagactggatgatgactctgcggcag	Bri2/3
Bri3/2/2	1. PCR Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagctccagcccgc Rückwärts: 5' caaagcacatgcacatgagccccctct 2. PCR Vorwärts: 5' agaggggggctcatggtcatgtgctttg Rückwärts: 5' gctctagaaaatagtttctctcggttcag	ITM2C ITM2B
Bri2 _{insBri3 45-54}	1. PCR Vorwärts: 5' cccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5' cctctggatcgatgtgtggcacatcatctgggtccttgca 2. PCR Vorwärts: 5' cgatccaagaggggggctcatggtcatgtgctttggacta Rückwärts: 5' gctctagaaaatagtttctctcggttcag	ITM2B ITM2B

Bri2/3/2	1. PCR	ITM2B
	Vorwärts: 5'ccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5'cacgaccatgcccacgacaggtagcacacgccgccacacaccaggctctt	
Bri2 TM G/A	2. PCR	ITM2B
	Vorwärts: 5'gatggcatggctgctgctcatgggctcggttcgctcaaaatatttgc Rückwärts: 5'gctctagaaatagtttctctgcttgag	
Bri2 G67A	1. PCR	ITM2B
	Vorwärts: 5'ccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5'gtatgctgctgctagaataacggctgcaagcataaatgctagtgaagcacaat	
Bri2 G67A	2. PCR	ITM2B
	Vorwärts: 5'atgtgctttgcactagcattatgcttgagccgttattctagcagcagcatac Rückwärts: 5'gctctagaaatagtttctctgcttgag	
Bri2 G67A	1. PCR	ITM2B
	Vorwärts: 5'ccaagcttatggactacaaggacgacgacgacaagggaaggtagcgttcaactcc Rückwärts: 5'tcctagaataacggctgcaagcat	
Bri2 G67A	2. PCR	ITM2B
	Vorwärts: 5'atgcttgagccgttattctagga Rückwärts: 5'gctctagaaatagtttctctgcttgag	

Tabelle 1. Oligonukleotide.

Die ausgetauschten Domänen der chimären Bri-Konstrukte sind in Tabelle 2 gekennzeichnet.

<u>Konstrukt</u>	<u>ICD</u>	<u>TMD</u>	<u>Ektodomäne</u>
Bri2	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri2 76-237
Bri3	Bri3 1-54	Bri3 55-75	Bri3 76-233
Bri2ΔE	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri2 76-98
Bri3ΔE	Bri3 1-54	Bri3 55-75	Bri3 76-98
Bri2/3	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-233
Bri2/3 – 0	Bri2 1-54	Bri2 55-75	-
Bri2/3 – 10	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-86
Bri2/3 – 23	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-98
Bri2/3 – 59	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-134
Bri2/3 – 91	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-166
Bri2/3 – 124	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-199
Bri2/3 – 156	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-233
Bri2/3ΔE	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri3 76-98
Bri3/2/2	Bri3 1-54	Bri2 55-75	Bri2 76-237
Bri2 _{Ins Bri3 45-54}	Bri2 1-44, Bri3 45-54	Bri2 55-75	Bri2 76-237
Bri2/3/2	Bri2 1-54	Bri3 55-75	Bri2 76-237
Bri2 TMD G/A	Bri2 1-54	Bri2, alle G zu A	Bri2 76-237
proBri2	Bri2 1-54	Bri2 55-75	Bri2 76-266

Tabelle 2. Aufbau der Bri2-, Bri3- bzw. chimären Konstrukte. Die Nomenklatur der Aminosäuren entspricht der des jeweiligen Bri-Proteins. Beispiel: Bri2/3 - 10 enthält die zytoplasmatischen Aminosäure-Reste 1-54 des Bri2, die TMD des Bri2 und die Aminosäure-Reste 76-86 von Bri3.

Folgende ADAM-10-Konstrukte wurden verwendet:

<u>Name</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Vektor, Resistenz</u>	<u>Quelle, Referenz</u>
ADAM-10	Bovines ADAM-10, HA-Tag C-terminal	pcDNA3 (Invitrogen) <i>XhoI</i> , <i>XbaI</i> Ampicillin (<i>E. coli</i>) Geneticin (Zelllinien)	Dr. Sven Lammich, PD Dr. Rolf Postina, Prof. Dr. Falk Fahrenholz (Lammich et al., 1999)
ADAM-10 E384A	Bovines inaktives ADAM-10, HA-Tag C-terminal	pcDNA3 (Invitrogen) <i>XhoI</i> , <i>XbaI</i> Ampicillin (<i>E. coli</i>) Geneticin (Zelllinien)	Dr. Sven Lammich, PD Dr. Rolf Postina, Prof. Dr. Falk Fahrenholz (Lammich et al., 1999)

3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese und präparative Reinigung von DNA

Agarose, TAE-Puffer, Ethidiumbromid, DNA-Marker, NucleoSpin MN-Kit

DNA-Analyse erfolgte über 1%ige Agarose durch Gelelektrophorese. DNA-Lösungen wurden vor dem Auftrag mit 5x Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard dienten 1 kBp und 100 Bp Marker (Invitrogen). Für die Trennung von DNA-Fragmenten <500 bp wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Die DNA wurde mittels Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert. Um DNA präparativ zu reinigen, wurde auf den NucleoSpin MN-Kit (Macherey-Nagel) zurückgegriffen. Die zu reinigende DNA wurde nach Protokoll des Herstellers aus dem Agarosegel geschnitten, mit 1 ml Puffer NT versetzt, die Agarose bei 50 °C verflüssigt und über eine Säule gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers in eine neue Eppendorff-Tube in 20 µl Elutions-Puffer oder H₂O.

3.4.3 Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

HindIII, XbaI, TANGO-Puffer, Alkalische Phosphatase, T4-Ligase, Ligationspuffer

Die Spaltung von DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen. Für diese Studie wurden *HindIII* (5'aagctt) und *XbaI* (5'tctaga) (beides Fermentas, 10 u/µl) verwendet. 1-5 µg DNA wurde mit je 1 µl Restriktionsendonuklease sowie 10x TANGO-Puffer (Fermentas) versetzt und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert.

Dephosphorylierung am 3'-Ende von linearisierter DNA verhindert die Autoligation. Für einen Dephosphorylierungsansatz wurde ~1 µg geschnittene DNA mit 2 µl Alkalischer Phosphatase (Roche, 1 u/µl) und 10x Dephosphorylierungspuffer (Roche) gemischt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die Ligation von DNA erfolgte durch das Mischen von zwei mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmenten (1 M Vektor : 5 M Insert) unter Zugabe von T4 DNA-Ligase (Roche, 1000 u/µl) in T4-Ligase-Puffer (Roche). Ligationsansätze wurden bei RT für 1 h inkubiert.

Die Vervielfältigung und Isolierung von positiven Konstrukten erfolgte durch Transformation von kompetenten *E. coli* und Selektion durch 100 µg/ml Ampicillin (Roth).

3.4.4 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

LB-Medium, CaCl₂-Puffer

E. coli DH5α erlaubt die Vervielfältigung exogener Vektoren. Unter Kompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterien, exogene DNA aufzunehmen. Um *E. coli* mit Kompetenz zu versehen, wurden 100 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur

angeimpft. Die Kultur wurde im Schüttelinkubator bei 200 U/min und 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. *E. coli* wurden bei 4 °C mit 1500 g pelletiert und in 15 ml CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert und in 1 ml CaCl₂-Puffer mit 20% Glycerin gelöst und aliquotiert. Kompetente *E. coli* wurden entweder anschließend transformiert oder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

LB-Medium, Ampicillin

100 µl chemisch kompetente *E. coli* DH5α wurden auf Eis aufgetaut und mit 20 µl Ligationsansatz bzw. 0.1-0.5 µg Plasmid versetzt. Die DNA-Zellmischung wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 30-60 s auf 42 °C erhitzt. Im Hitzeschritt erfolgt die Aufnahme der exogenen DNA durch die kompetenten Zellen. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium ohne Selektionsmarker bei 37 °C 30 min im Thermoschüttler inkubiert und bei 8000 U/min für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.4.6 DNA-Präparation in kleinem Maßstab

LB-Medium, Ampicillin, Nucleo-Spin Plasmid

Zur Präparation von geringen Mengen DNA wurden 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft, über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert und bei 8000 U/min abzentrifugiert. Die DNA-Isolation erfolgte mithilfe des Nucleo-Spin Plasmid Kits (Macherey-Nagel) nach Protokoll des Herstellers. Isolierte DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen versetzt (3.4.3) und mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung (3.4.2) analysiert bzw. durch Sequenzierung (3.4.7) verifiziert.

3.4.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach Sanger (Sanger et al., 1977) durch GATC Biotech unter den Richtlinien zur Probepvorbereitung (<https://www.gatc-biotech.com/de/sequencing/requirements.php?navid=29>). Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels VectorNTI9.0 und dem GATC-Viewer1.0 analysiert.

3.4.8 DNA-Präparation in großem Maßstab

LB-Medium, Ampicillin, Nucleo-Bond PC500

200 ml Selektionsmedium wurden mit dem entsprechendem *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 U/min und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Die DNA-Isolation erfolgte mithilfe des Nucleo-Bond PC500 Kits (Macherey-Nagel) nach Protokoll des Herstellers. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde im Spektrometer mithilfe der OD₂₈₀ bestimmt. Dabei absorbiert DNA monochromatisches Licht der Wellenlänge 280 nm. Über die Absorption wird auf die DNA-Konzentration der Lösung rückgerechnet. Isolierte DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen versetzt (3.4.3) und mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung (3.4.2) analysiert.

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zelllinien

In dieser Studie wurden die immortalisierten humanen embryonalen Nierenzelllinien HEK293E bzw. HEK293 TRex (Invitrogen) als Ausgangszelllinien verwendet. HEK293E (HEK293) wurden mit Hilfe des EBNA-Virus immortalisiert. Es handelt sich um Epithelzellen eines Nierenzellkarzinoms, die sich mit exogener DNA transfizieren lassen. Die Kultivierung von HEK293-Zellen erfolgt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und GlutaMax Medium (Invitrogen) mit 10% Fetal Calf Serum (FCS, Invitrogen), versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin. Im Fall von HEK293 TRex wurde Blasticidin (5 µg/ml, Invitrogen) als Selektionsmittel zugesetzt. Um SPP-, SPP D/A bzw. SPPL3 in HEK293 TRex zu induzieren, wurde dem Medium 1 µg/ml Doxycyclin (BD Biosciences) zugegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien finden sich in Tabelle 3. Die Integration des Fremdgens verlangt nach einem zusätzlichen Selektionsmarker, der ebenfalls aufgelistet ist.

<u>Empfänger- Zelllinie</u>	<u>Vektor, Resistenz</u>	<u>Fremdgen</u>	<u>Bezeichnung, Quelle, Referenz</u>
TRex	pcDNA4/TO Zeocin	SPP wt	HEK293- pcDNA4/TO SPP wt-HA (Martin et al., 2008b)
TRex	pcDNA4/TO Zeocin	SPP DA	HEK293- pcDNA4/TO SPP DA-HA (Martin et al., 2008b)
HEK293	pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2a wt	HEK293- pcDNA3.1 SPPL2a wt-HA Dr. Regina Fluhrer, (Martin et al., 2008b)
HEK293	pcDNA3.0 Zeocin	SPPL2a DA	HEK293- pcDNA3.0 SPPL2b DA-HA Dr. Regina Fluhrer, (Martin et al., 2008b)
HEK293	pcDNA3.0 Zeocin	SPPL2b wt	HEK293- pcDNA3.0 SPPL2b wt-HA Dr. Regina Fluhrer, (Martin et al., 2008b)
HEK293	pcDNA3.0 Zeocin	SPPL2b DA	HEK293- pcDNA3.0 SPPL2b DA-HA Dr. Regina Fluhrer, (Martin et al., 2008b)
TRex	pcDNA4/TO Zeocin	SPPL3 wt	HEK293- pcDNA4/TO SPPL3 wt-HA (Martin et al., 2008b)
293	pcDNA3.1 Zeocin	SPPL3 DA	HEK293- pcDNA3.1 SPPL3 DA-HA (Martin et al., 2008b)
HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin	proBri2	HEK293- pcDNA6.0 Flag Bri2 wt V5 His (Martin et al., 2008b)
HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin	Bri2	HEK293- pcDNA6.0 Flag Bri2 Δ FC V5 His (Martin et al., 2008b)

HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin	proBri2	HEK293- pcDNA6.0-Myc Bri2 wt V5 His
HEK293	pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b wt proBri2	HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b wt-HA
HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b wt Bri2	pcDNA6.0-Flag Bri2 wt V5 His (Martin et al., 2008b) HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b wt-HA
HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b DA Bri2	pcDNA6.0 Flag Bri2 Δ FC V5 His (Martin et al., 2008b) HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b DA-HA
HEK293	pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b wt Bri2 Δ D	HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b wt-HA
HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b DA proBri2	pcDNA6.0 Flag Bri2 Δ D V5 His (Martin et al., 2008b) HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b DA-HA
HEK293	pcDNA6.0 pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b DA Bri2	pcDNA6.0 Flag Bri2 wt V5 His HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b DA-HA
HEK293	pcDNA6.0 pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b DA Bri2 Δ D	pcDNA6.0 Flag Bri2 Δ FC V5 His HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b DA-HA
HEK293	pcDNA6.0 Blasticidin	Bri2 Δ D	pcDNA6.0 Flag Bri2 Δ D V5 His HEK293-
HEK293	pcDNA3.1 Zeocin	SPPL2b wt Bri2 Δ D	HEK293- pcDNA3.1 SPPL2b wt-HA
	pcDNA6.0		pcDNA6.0 Flag Bri2 Δ D V5 His

Tabelle 3. Zelllinien.

Andere Zelllinien und deren Kulturbedingungen:

-SH-SY5Y in DMEM plus GlutaMax mit 10% FCS und PenStrep

-SKNBE in HamsF12 (Cambrex) mit 2,5% nicht-essentiellen Aminosäuren (Invitrogen), 10% FCS

-A431 in RPMI 1640 mit 10% FCS und PenStrep

Alle Zellen wurden bei 37 °C unter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.5.2 Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen, poly-L-Lysin, DNA oder siRNA, Lipofectamin2000, OptiMEM

Zu transfizierende HEK293-Zellen wurden in 6 cm bzw. 10 cm poly-L-Lysin beschichtete Petri-Schalen ausgesät und bei ~75% Konfluenz transfiziert. 1-2 µg Plasmid-DNA und je 4 µl Lipofectamin2000 / µg DNA wurden getrennt in je 500 µl OptiMEM vorgelegt und 5 min inkubiert. Danach wurde die Lipofectamin2000-Lösung mit der DNA-Lösung gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Das entsprechende Selektionsmedium wurde gegen antibiotikafreies Medium ausgewechselt und der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. 24 h nach Transfektion wurde das entsprechende Medium gewechselt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder für die Etablierung von stabil-exprimierenden Zelllinien in Selektionsmedium umgesetzt oder abgeschabt. Hierzu wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen und abgeschabt. Die Zellsuspension wurde bei 6000 U/min für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Falls die Weiterverarbeitung der Zellen nicht sofort erfolgte, wurden die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

3.5.3 RNA-Interferenz-Experimente

Für RNA-Interferenz-Experimente wurden 5×10^6 Zellen in poly-L-Lysin beschichtete 6 cm Petri-Schalen ausgesät und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Darauf erfolgte die siRNA-Transfektion analog zur Transfektion mit DNA (siehe 3.5.2). siRNA gegen ADAM-10 und ADAM-17 wurde bei Dharmacon erworben. ADAM-10 siRNA: Katalognummer M-0040503-01. ADAM-17 siRNA: Katalognummer M-003453-00. Unspezifische Kontroll-siRNA: D-001206-13.

3.5.4 Behandlung von HEK293-Zellen mit Inhibitoren

Die Behandlung mit allen Inhibitoren erfolgte 15 h bei 37 °C.

Um Proteasen der SPP-Familie zu inhibieren, wurde 30 µM (Z-LL)₂-Keton (1,3-di-(N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl) aminoacetone) eingesetzt.

Der Vorwärtstransport vom ER zum Golgi-Apparat wurde durch 10 µg/ml Brefeldin A (γ,4-Dihydroxy-2-(6-hydroxy-1-heptenyl)-4-cyclopentanecrotonic acid λ-lactone) blockiert. TAPI-1 und TAPI-2 wurden in DMSO in der Endkonzentration von 50 µM verwendet. Die spezifischeren ADAM-10- bzw. ADAM-17-Inhibitoren GI254023X und GW280264X wurden in DMSO in der Endkonzentration von 5 µM eingesetzt.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Präparation von Zellmembranen

PBS, Hypoton-Puffer, SDS-Probenpuffer

Die in 3.5.2 gewonnenen Zellpellets wurden in 750 µl Hypoton-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde 15-mal durch eine 0,6 mm Kanüle gepresst. Durch die Scherkräfte werden die zuvor aufgeplatzten Zellen zerkleinert. Grobe unlösliche Bestandteile wie der Zellkern und Mitochondrien wurden bei 5000 U/min 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Für die Isolierung von Zellmembranen wurde der Überstand in ein neues Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 U/min und 4 °C nochmals 45 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Membranpellet in 80 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Membranpräparationen bieten sich für den Nachweis von Calnexin, ADAM-10 und ADAM-17 im WB an.

3.6.2 Antikörper

Die in dieser Studie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

<u>Antikörper</u>	<u>Epitop</u>	<u>Organismus</u>	<u>Hersteller</u>
ITM2b NT poly (Erst-AK)	Bri2 ICD	Huhn	Biozol
6908 poly (Erst-AK)	YPYDVPDYA	Hase	Sigma
V5 mono (Erst-AK)	GKPIPPELLGLDST	Maus	Invitrogen
V5 poly (Erst-AK)	GKPIPPELLGLDST	Hase	Chemicon
Flag M2 mono (Erst-AK)	DYKDDDDK	Maus	Roche
APP 22C11 mono (Erst-AK)	Aminosäuren 66-81	Maus	Chemicon
ADAM-10 CT poly (Erst-AK)	Aminosäuren 732-748	Hase	Calbiochem
ADAM-17 poly (Erst-AK)	Aminosäuren 807-823	Hase	Calbiochem
Calnexin poly (Erst-AK)	N-Terminus	Hase	Stressgene
Anti-Maus-HRP (Zweit-AK)	IgG Maus	Maus	Promega
Anti-Hase-HRP (Zweit-AK)	IgG Hase	Maus	Promega
Giantin mono (Erst-AK)	Giantin, ALX-804-600	Maus	Alexa
Alexa 488 anti mouse mono	IgG Maus	Ziege	Alexa
Alexa 555 anti rabbit poly	IgG Hase	Ziege	Alexa

Tabelle 4. Antikörper.

3.6.3 Immunpräzipitation

PBS, STEN-Lysis, STEN, SDS-Probenpuffer

Die in 3.5.2 gewonnenen Zellpellets wurden in 1 ml STEN-Lysis Puffer durch vortexen resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Bei 13000 U/min und 4 °C wurden Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und mit der entsprechenden Antikörperlösung und 15 µl Protein G- bzw. A-Sepharose versetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte 3 h bei 4 °C auf einem Schüttler. Immunpräzipitierte Probe wurde 3x mit STEN gewaschen. Zur Durchführung der Co-Immunpräzipitationen wurde Lyse- und Waschpuffer mit 1% CHAPSO verwendet. Um die exogen exprimierten Bri-Proteine nachzuweisen, empfiehlt sich für N-terminale Fragmente die Immunpräzipitation mit Anti-Flag M2-Agarose. C-terminale Fragmente werden am effizientesten mit dem polyklonalen V5-Antikörper in Anwesenheit von Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert. HA-markierte SPP/SPPL-Proteine können über den polyklonalen HA-Antikörper 6908 und Protein-A-Sepharose isoliert werden.

3.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid, Lower-Tris, Upper-Tris, Laufpuffer, TEMED, APS

Zur Auftrennung von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Methode der Wahl (SDS-PAGE). SDS negiert die Eigenladung von Proteinen und erlaubt daher eine Ladungs-unabhängige Auftrennung der Proteinmischung nach Proteinmasse. Im Sammelgel erfolgt eine erste Ordnung der Proteine, im Trenngel die eigentliche Auftrennung nach Masse. Für den Nachweis von ADAM-10, ADAM-17, Calnexin und SPPL2b wurden 8%ige SDS-Gele verwendet:

<u>Bestandteil</u>	<u>Trenngel (15 ml)</u>	<u>Sammelgel (5 ml)</u>
H ₂ O	7,25 ml	3,25 ml
Acrylamid	4 ml	0,65 ml
Lower-Tris	3,75 ml	1,25 ml

Bri2-Spezies wurden mit Hilfe von Tris/Tricine-Gelen mit Glyceringradienten aufgetrennt (Schagger und von Jagow, 1991). Beim Gießen des Gels dürfen sich Trenn- und Zwischengel nicht vermischen. Im Folgenden sind die Gelzusammensetzungen angegeben. Die Lösungsbestandteile wurden gemischt und mit TEMED und APS (je 5 µl pro Gel) polymerisiert.

<u>Bestandteil</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Zwischengel</u>	<u>Sammelgel</u>
H ₂ O		3,5 ml	4,2 ml
Glycerin	3,5 ml		
Acrylamid	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Schägger-Gelpuffer	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml

Für die Vorbereitung und die Gelelektrophorese wurde das Minigel System von Biorad verwendet. Nach Probenauftrag erfolgt durch Anlegung einer Stromstärke von 120 mA die Auftrennung der Proteine.

3.6.5 Western Blot

Isopropanol, Blotpuffer, I-Block, TBST, ECL-Reagenz

Der Western Blot (WB) dient dem Nachweis von Proteinen auf einem Acrylamid-Gel nach der Gelelektrophorese. Es wurden das Biorad Minigel System und Polyvinylidifluorid (PVDF)-Membranen verwendet. Nach Benetzung der PVDF-Membran mit Isopropanol wurde die Membran in H₂O gewaschen und in Blotpuffer inkubiert. Der

WB wurde wie folgt aufgebaut: Über einen Schwamm wurden unter Ausschluss von Luftblasen 2 Lagen Whatman-Papier, das Gel sowie Membran, wiederum 2 Lagen Whatman-Papier und ein Schwamm gelegt. Da die Proteine durch Anlegen der Spannung zur Anode wandern, muss die PVDF-Membran auf der Anodenseite des Gels liegen. Das Blotting erfolgte 60 min bei 400 mA. Proteinfreie Membranstellen wurden durch 1 h Inkubation in I-Block (Tropix) geblockt. Nach 1 h Behandlung mit Erstantikörperlösung wurde dreimal 10 min in TBST gewaschen, mit Zweitantikörperlösung (Zweitantikörper gekoppelt an Horse-Radish-Peroxidase, Promega) für 30 min inkubiert und wiederum dreimal mit TBST gewaschen. Produkt der Peroxidase-Reaktion mit ECL-Reagenz (GE Healthcare) sind Wasser und Photonen. Die Photonen werden auf Röntgen-Filmen (Fuji) detektiert.

3.6.6 Quantifizierung der Bandenintensität des Western Blots

Die Detektion der Photonen aus der Peroxidase-Reaktion des WB werden zur nachfolgenden Quantifizierung durch eine CCD-Kamera detektiert. Hierfür wird als WB-Detektions-Reagenz ECL⁺ verwendet, da das ECL⁺-Lichtsignal über die Zeit stabiler ist als das Lichtsignal von ECL. Es wurde das Fluorochem8900-System (Alpha Innotec) verwendet. Als Standard wurden die Expositionszeiten 10 s, 30 s, 1 min, 5 min und 10 min gewählt. Es ist darauf zu achten, dass das Signal der zu quantifizierenden Proteinbande im linearen Bereich der CCD-Kamera liegt. Anhand der mitgelieferten Software wurde die Pixelintensität im Bereich der Bande gemessen. Hintergrundsignale wurden durch das Auswählen einer geeigneten Kontrollstelle substrahiert.

3.7 Statistik

Die anhand der Quantifizierung erhaltenen Rohdaten wurden gegen ein Kontrollprotein normalisiert. Für die in 4.1 gezeigten Experimente wurde gegen die Bri2-Volllänge normalisiert, für die Quantifizierungen in 4.4 und 4.5 wurde gegen Calnexin normalisiert. Die Anzahl der prozessierten Experimente ist in der jeweiligen Abbildung angegeben. Die Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte wurden anhand der MITTELWERT-, STABW- und TTEST-Funktionen in Microsoft Excel 2003 berechnet. Die statistische Signifikanz der p-Werte wird im Ergebnisteil durch * ($p < 0,5$), ** ($p < 0,05$) oder *** ($p < 0,005$) ausgedrückt.

3.8 Immunzytochemische Färbung

PBS, 5% BSA, Triton X 100, Erst- und Zweitantikörper, Moviol

HEK293-Zellen wurden auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät und gegebenenfalls transfiziert (siehe 3.5.2). Bevor die Zellen 75%ige Konfluenz erreichten, wurde das Medium abgehoben und die Zellen vorsichtig auf Eis dreimal mit PBS gewaschen. Nach 20 minütiger Fixierung durch 4% PFA auf Eis erfolgte wiederum dreimaliges Waschen mit PBS. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit 0,1% Triton X 100 geöffnet, während für Oberflächenfärbungen keine Triton-Behandlung indiziert ist. Für beide Färbungen erfolgte die Blockierung proteinfreier Stellen auf den Deckgläschen mit 5% BSA für 1 h. Anschließend wurde die Probe 1 h mit dem entsprechenden Erstantikörper (siehe 3.6.2) in PBS inkubiert. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. An den Zweitantikörper (siehe 3.6.2) in PBS, mit dem die Probe für 1 h inkubiert wird, ist ein fluoreszierender Marker angebracht. Weiteres 3x Waschen entfernte überschüssigen Zweitantikörper. Einmaliges Waschen in H₂O entfernt Salzablagerungen des PBS. Die Deckgläschen wurden mit der Oberfläche nach unten mittels Moviol auf einen Objektträger gehaftet. Vor der Fluoreszenzmikroskopie müssen die Proben 1 h bei 4 °C trocknen.

3.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Bildbearbeitung

Bilder von immunzytochemisch gefärbten Zellen wurden mittels einem 510Meta konfokalen Laser-Scan-Mikroskops (Zeiss, Jena) mit einem 100/1.3 Objektiv aufgenommen. Das Fluorophor Alexa 488 wurde mit einem Argon-Laser bei 443 nm, Alexa 555 mit einem Helium/Neon-Laser bei 500 nm angeregt. Die Bildaufnahme erfolgte im Multi-Kanal-Modus mit einer Scan-Geschwindigkeit von 6 und einer Mittelung über vier Aufnahmen. Die Zusammenstellung und Prozessierung der Bilder erfolgte mittels Adobe Illustrator.

4. Ergebnisse

4.1. Bri2 wird in der Ektodomäne prozessiert

Bri2 ist ein Typ-II-Transmembranprotein, dessen Propeptid durch die Proprotein-Konvertase Furin oder durch andere Proteasen des Subtilisin-Typs abgespalten wird (Kim et al., 1999) (siehe 1.3.2). Diese Prozessierung findet im Golgi-Apparat statt (Choi et al., 2004). Nach dem Furin-Schnitt verbleibt matures Bri2 in der Membran. Endogen kann sowohl immatures proBri2 als auch matures Bri2 in Membranpräparationen verschiedener Zelllinien mittels Western Blot (WB) nachgewiesen werden (Abbildung 19). Dies steht in Einklang mit der ubiquitären Expression des Bri2 (Vidal et al., 1999).

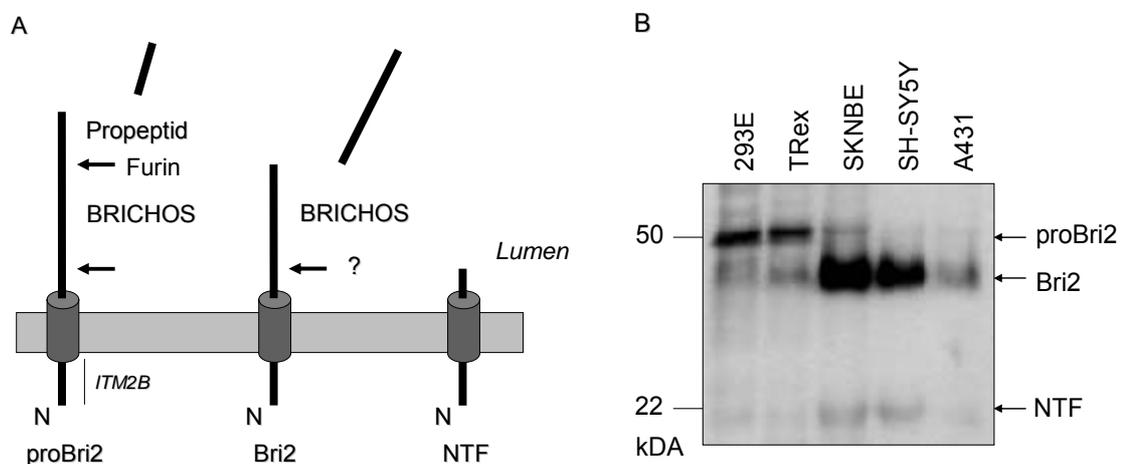


Abbildung 19. Endogene Bri2-Expression. (A) Schematischer Aufbau von proBri2, Bri2 und NTF. proBri2 wird durch Furin zu maturem Bri2 prozessiert. Der ITM2B-Antikörper detektiert die zyttoplasmatische Domäne des proBri2. Der anti-ITM2b WB (B) zeigt die endogene Bri2-Expression in verschiedenen Zelllinien. Neben proBri2 und maturem Bri2 wird in Membranpräparationen NTF detektiert. Vermutlich wird Bri2 daher in der Ektodomäne neben dem Furin-Schnitt ein zweites Mal prozessiert. 293E und TRex, humane Nierenzellen; SKNBE und SH-SY5Y, humane Neuroblastomzellen; A431, humane Hautkarzinomzellen.

Neben dem immaturren proBri2 und dem maturen Bri2 Protein zeigt die Analyse des WB eine zusätzliche Bande bei 22 kDa (Abbildung 19). Da das Epitop des verwendeten ITM2B-Antikörpers in der ICD des Bri2 liegt und das Peptid in Membranpräparationen nachweisbar ist, handelt es sich bei dem detektierten Peptid vermutlich um membranständiges NTF. Ein membranständiges NTF könnte das Resultat einer luminalen Prozessierung des Bri2 darstellen, die einen großen Teil der Ektodomäne freisetzt (Abbildung 19). Neben der Freisetzung des Propeptids findet also vermutlich eine weitere Prozessierung innerhalb der Ektodomäne des Bri2 statt. Es könnte sich bei diesem Prozess um Ectodomain-Shedding handeln, das für zahlreiche Transmembranproteine beschrieben wurde (Huovila et al., 2005). In diesem Fall ist zu

erwarten, dass ein Teil der Ektodomäne sezerniert wird. Es sind jedoch keine Antikörper beschrieben, die Bri2 in der Ektodomäne erkennen. Daher wurde ein Bri2-Konstrukt ohne Propeptid N- und C-terminal mit Flag- bzw. V5- Epitopen markiert (Bri2). Die exogene Expression des markierten Bri2 in HEK293-Zellen erlaubt mittels anti-V5 IP und WB den Nachweis der BRICHOS-Ektodomäne im konditionierten Medium (Abbildung 20). Im Lysat wird durch anti-Flag IP und WB nicht nur das Volllängenprotein bei 50 kDa, sondern auch NTF detektiert, das das membranständige Gegenstück des sezernierten BRICHOS darstellt (Abbildung 20). Bri2 ist folglich Substrat für Ectodomain-Shedding.

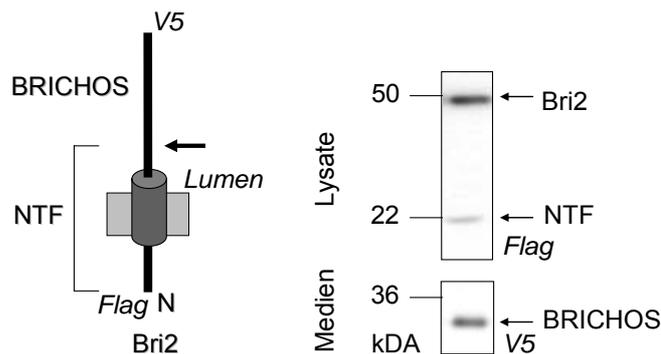


Abbildung 20. Bri2 ist Substrat für Ectodomain-Shedding. HEK293-Zellen wurden mit Bri2 transfiziert, das kein Propeptid mehr enthält. Bri2 wurde N-terminal Flag und C-terminal V5 markiert, um durch Prozessierung entstehende Fragmente durch anti-Flag bzw. anti-V5 IP und WB zu detektieren. Im konditionierten Medium wird über den V5 Tag bei ca. 25 kDa sezerniertes BRICHOS nachgewiesen. Im anti-Flag WB des Zelllysats findet sich bei 50 kDa Bri2. Das NTF bei 22 kDa, das ebenfalls durch den anti-Flag Antikörper nachgewiesen wird, entspricht dem membranverankerten Gegenstück des sekretierten BRICHOS.

4.1.1 Eine Metalloprotease prozessiert Bri2 in der Ektodomäne

Für Ectodomain-Shedding verschiedenster Membranproteine wurden Metalloproteasen der ADAM-Familie beschrieben (Reiss und Saftig, 2008). Um die Identität der Protease, die BRICHOS freisetzt, näher einzugrenzen, wurde zunächst ein pharmakologischer Ansatz gewählt. HEK293-Zellen, die exogenes Bri2 exprimieren, wurden mit den Metalloprotease-Inhibitoren TAPI-1 und TAPI-2 (TNF α -Protease Inhibitor 1 bzw. 2) versetzt (Arribas et al., 1996). Die Behandlung mit beiden Inhibitoren zeigt eine Reduktion in der Freisetzung von BRICHOS um ca. 75% (Abbildung 21). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Bri2 in der Ektodomäne durch eine Metalloprotease prozessiert wird.

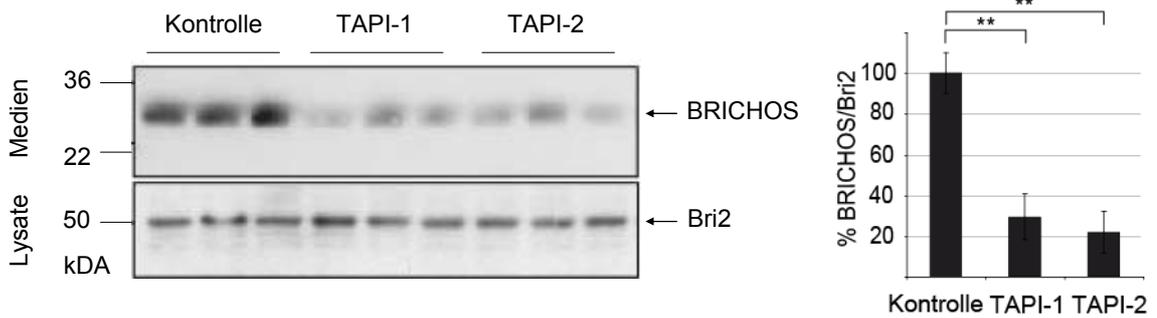


Abbildung 21. Bri2 wird durch eine Metalloprotease geschnitten. HEK293-Zellen, die N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertes Bri2 exprimieren, wurden 15 h mit 50 μ M TAPI-1, 50 μ M TAPI-2 oder DMSO (Kontrolle) behandelt und sowohl Zelllysate als auch konditioniertes Medium analysiert. Sezerniertes BRICHOS wurde über anti-V5 IP und anti-V5 WB, Bri2 über anti-Flag im WB nachgewiesen (Modell siehe Abbildung 20). Im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen zeigt die Quantifizierung von BRICHOS, dass die Sekretion um $71 \pm 11,2\%$ durch TAPI-1 ($n=6$, $p<0,001$) und um $78 \pm 10,2\%$ durch TAPI-2 ($n=6$, $p<0,001$) reduziert ist.

4.1.2 Bri2 ist Substrat für ADAM-10

TAPI-1 und TAPI-2 sind unselektive Inhibitoren von ADAM-Metalloproteasen (Arribas et al., 1996). Für die ADAM-Proteasen ADAM-10 und ADAM-17 wurden die selektiveren Inhibitoren GI254023X und GW280264X entwickelt (Hundhausen et al., 2003). Die Behandlung der Bri2 exprimierenden HEK293-Zellen mit GI254023X und GW280264X führt zu einer Reduktion der BRICHOS-Freisetzung um ca. 80% (Abbildung 22). Eine Akkumulation des Volllängenproteins Bri2 ist jedoch nicht detektierbar, wahrscheinlich, weil die Menge an Volllängenprotein die Menge an BRICHOS um das Vielfache übertrifft und daher die Differenz des Signals im WB zwischen unbehandelten und behandelten Zellen kaum nachzuweisen ist.



Abbildung 22. Bri2 ist Substrat für ADAM-10 oder ADAM-17. HEK293-Zellen, die N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertes Bri2 exprimieren, wurden 15 h mit 5 μ M GI254023X, 5 μ M GW280264X oder DMSO (Kontrolle) behandelt und sowohl Zelllysate als auch konditioniertes Medium analysiert. Sezerniertes BRICHOS im konditioniertem Medium wurde über anti-V5 IP und WB, Bri2 in Zelllysaten mittels anti-Flag WB nachgewiesen (Modell siehe Abbildung 20). Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen zeigt die Quantifizierung von BRICHOS, dass die Sekretion um $73 \pm 8\%$ durch GI254023X (GI, $n=6$, $p<0,010$) und um $83 \pm 3\%$ durch GW280264X (GW, $n=6$, $p<0,015$) reduziert ist.

Anhand des pharmakologischen Profils der Protease, die BRICHOS freisetzt, kann abgeleitet werden, dass es sich vermutlich entweder um ADAM-10 oder um ADAM-17 handelt. Eine Möglichkeit der Unterscheidung zwischen ADAM-10 und ADAM-17 stellt die Technologie der RNA-Interferenz dar (Abbildung 23). Nach selektivem Knockdown von ADAM-10 in HEK293-Zellen wurde die BRICHOS-Sekretion um 60% reduziert, während der Knockdown von ADAM-17 sowie die Transfektion von off-Target siRNA in HEK293-Zellen keinen Effekt auf die Freisetzung von BRICHOS hat (Abbildung 23). Der kombinierte Knockdown von ADAM-10 und ADAM-17 zeigt keine zusätzliche Reduktion der BRICHOS-Sekretion. Folglich wird BRICHOS hauptsächlich durch ADAM-10 freigesetzt.

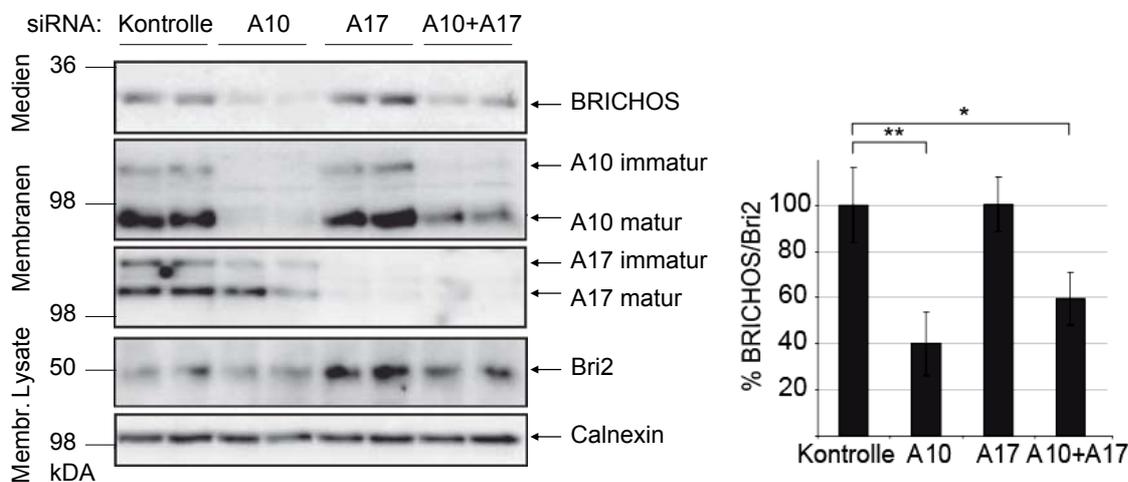


Abbildung 23. ADAM-10 prozessiert Bri2. HEK293-Zellen, die N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertes Bri2 (Modell siehe Abbildung 20) exprimieren, wurden mit siRNA gegen ADAM-10 (A10), ADAM-17 (A17), ADAM-10 und ADAM-17 oder einer unspezifischen siRNA (Kontrolle) transfiziert. Sezerniertes BRICHOS wurde im konditionierten Medium durch anti-V5 IP und WB nachgewiesen. A10, A17 und Calnexin wurden in Membranpräparationen isoliert und mittels der Antikörper anti-ADAM-10 CT, anti-ADAM17 und anti-Calnexin im WB detektiert (siehe 3.6.2.). Bri2 wurde in Zelllysaten über anti-Flag WB nachgewiesen. Das Expressionslevel von ADAM-10 bzw. ADAM-17 zeigt die Effizienz des Knockdowns. Calnexin dient als Ladekontrolle und der Normierung. Der ADAM-10-Knockdown bzw. der Doppel-Knockdown von ADAM-10 und ADAM-17 resultiert in einer starken Reduktion der BRICHOS-Sekretion ($60 \pm 13\%$, $p < 0,001$, $n = 8$ für ADAM-10 und $40 \pm 11\%$, $p < 0,017$, $n = 8$ für ADAM-10 plus ADAM-17). Die Effizienz des ADAM-10-Knockdowns in doppelt transfizierten Zellen ist geringfügig reduziert. Der Knockdown von ADAM-17 oder die Transfektion von off-Target siRNA führt nicht zu einer Änderung der BRICHOS-Freisetzung.

4.2 Intramembranproteolyse des Bri2

4.2.1 Bri2 ist ein Substrat für SPPL2a und SPPL2b

Ectodomain-Shedding-Substrate können Substrate für anschließende Intramembranproteolyse sein. Dabei wird das membranverankerte Produkt des Ectodomain-Sheddings

durch die Intramembranprotease in die zytoplasmatische ICD und ein niedermolekulares, sezerniertes Peptid gespalten. Ectodomain-Shedding findet statt, und es ist somit unwahrscheinlich, dass Bri2 durch Rhomboid prozessiert wird, da Ectodomain-Shedding für Rhomboid-Substrate bislang nicht beschrieben wurde. Für eine mögliche Intramembranproteolyse könnten daher S2P- oder GxGD-Proteasen verantwortlich sein. Bri2 trägt jedoch keine S1P-Erkennungssequenz (siehe 1.1.1.4) und die Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran wäre für ein S2P-Substrat untypisch (siehe 4.2.3 und 4.3.1). Daher stellt Bri2 ein potentielles Substrat für GxGD-Proteasen dar, insbesondere für SPP/SPPL-Proteasen, da Bri2 eine Typ-II-Topologie aufweist und für die γ -Sekretase bislang nur Substrate beschrieben wurden, die eine Typ-I-Topologie tragen. Bei Expression des proBri2 in HEK293-Zellen wird bei ca. 10 kDa ein zytoplasmatisches Fragment nachgewiesen, das möglicherweise die ICD des Bri2 darstellt (Abbildung 24).

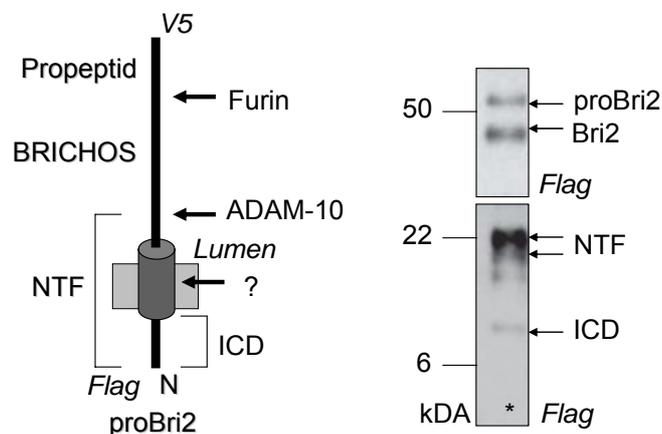


Abbildung 24. Nachweis der Bri2 ICD. Die exogene Expression von N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem proBri2 in HEK293-Zellen resultiert neben der Prozessierung durch Furin zu Bri2 und durch ADAM-10 zu NTF in der Freisetzung einer ca. 10 kDa schweren ICD. Alle Bri2-Fragmente entstehen durch endogene Protease-Aktivität. Bri2 und Bri2-Fragmente wurden über anti-Flag IP und WB nachgewiesen.* kennzeichnet eine längere Exposition des WB im Vergleich zum oberen Blot.

Um festzustellen, ob eine, und falls ja, welche SPP/SPPL-Protease Bri2 prozessiert, wurde proBri2 mit SPP, SPPL2a, SPPL2b oder SPPL3 in HEK293-Zellen co-exprimiert (Abbildung 25). Zusätzlich erfolgte die Co-Expression des proBri2 mit den inaktiven D/A-Mutanten von SPP, SPPL2a, SPPL2b und SPPL3, in denen der Aspartyl-Rest des GxGD-Motivs zu einem Alanin-Rest mutiert wurde. Die Mutagenese des Aspartyl-Restes führt zur Inaktivierung, da eine Aspartylprotease zwei Aspartyl-Reste für enzymatische Aktivität benötigt (siehe 1.1.3). Im WB werden erhebliche Mengen der Bri2 ICD nur im Fall der Co-Expression mit SPPL2a und SPPL2b nachgewiesen. Die Co-Expression von proBri2 mit den katalytisch-inaktiven Mutanten von SPPL2a und SPPL2b führt nicht zu erhöhten Mengen an ICD (Abbildung 25). Die Expressionslevel der SPP/SPPL-Proteine

variieren, wobei SPPL3 bei ca. 40 kDa, SPP bei ca. 50 kDa und SPPL2a und SPPL2b bei ca. 80 bzw. 100 kDa nachgewiesen werden.

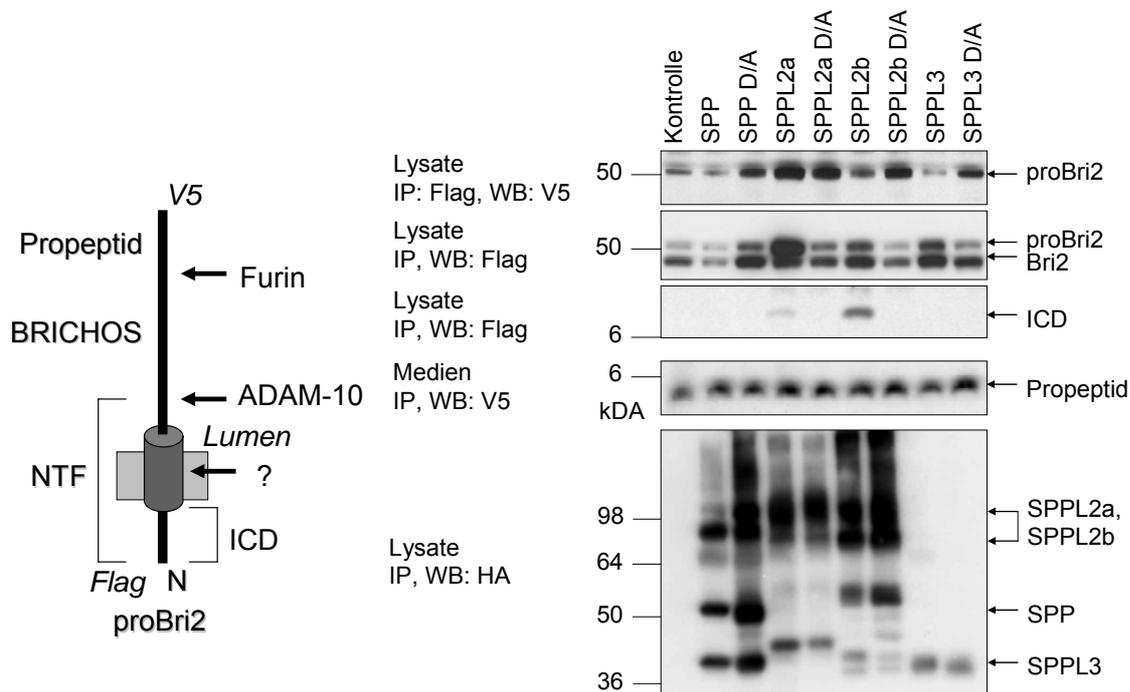


Abbildung 25. SPPL2a und SPPL2b prozessieren Bri2. Co-Expression von N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem proBri2 mit SPP, SPPL2a, SPPL2b und SPPL3 bzw. den jeweiligen inaktiven D/A-Mutanten in HEK293-Zellen. SPP/SPPL-Proteine sind C-terminal mit HA markiert. Bri2-Spezies wurden mittels anti-Flag IP und anti-V5 WB (oberster Blot), anti-Flag IP und anti-Flag WB (zweiter und dritter Blot von oben) oder über anti-V5 IP und anti-V5 WB (vierter Blot von oben) nachgewiesen. SPP/SPPL-Proteasen wurden in isolierten Zellmembranen mittels anti-HA WB detektiert. Im konditionierten Medium aller Zelllinien zeigt sich sekretiertes Propeptid. ICD wird nur nach Co-Expression von proBri2 mit aktiver SPPL2a- und SPPL2b-Protease nachgewiesen. In Lysaten zeigt der anti-V5 WB bei ca. 50 kDa nur eine Bande (proBri2), während der anti-Flag WB neben proBri2 auch Furin-prozessiertes Bri2 detektiert (zweiter Blot von oben). Die Schwankungen in der proBri2-Expression sind vermutlich das Ergebnis unterschiedlicher Transfektions-Effizienzen der jeweiligen Zelllinien.

Um die Interaktion der unterschiedlichen Bri2-Fragmente mit SPPL2a und SPPL2b zu untersuchen, wurde proBri2 mit SPPL2a, SPPL2b bzw. den katalytisch inaktiven D/A-Mutanten co-exprimiert und nach Extraktion der zellulären Membranen in Anwesenheit von CHAPSO co-immunpräzipitiert (Abbildung 26). Das Detergenz CHAPSO führt zur Ausbildung von Micellen, in denen Membranproteinkomplexe stabilisiert werden. Diese Komplexe können dann per Immunpräzipitation isoliert, anhand von SDS-Page aufgetrennt und im WB analysiert werden. Im dargestellten Fall können Bri2 Fragmente nachgewiesen werden, die mit SPPL2a, SPPL2b oder den inaktiven Mutanten SPPL2a D/A bzw SPPL2b D/A co-immunpräzipitieren (Abbildung 26).

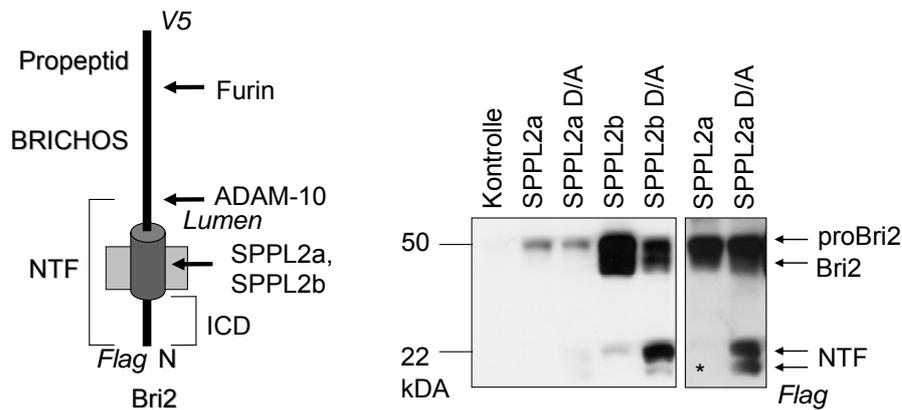


Abbildung 26. Co-Isolierung des Bri2 mit SPPL2a und SPPL2b. HEK293-Zellen, die stabil C-terminal HA markiertes SPPL2a, SPPL2a D/A, SPPL2b bzw. SPPL2b D/A exprimieren, wurden transient mit N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem proBri2 (vgl. Abbildung 25) transfiziert. Nach IP der SPPL-Proteine über den HA Tag und anti-Flag WB gegen Bri2 in Anwesenheit von 1% CHAPSO werden Bri2-Spezies nachgewiesen, die an SPPL2a, SPPL2b bzw. den inaktiven Mutanten binden. NTF akkumuliert mit den inaktiven SPPL2a D/A- und SPPL2b D/A-Mutanten. * kennzeichnet eine längere Blot-Exposition.

Die Analyse nach Immunpräzipitation von SPPL2a und SPPL2b und WB für Bri2 zeigt Bindung des proBri2 und Bri2 an SPPL2a und SPPL2b. Die Expression der inaktiven Mutanten SPPL2a D/A und SPPL2b D/A führt zur Co-Isolierung von NTF. NTF akkumuliert folglich mit den inaktiven Mutanten SPPL2a D/A bzw. SPPL2b D/A. Das Ergebnis, dass das NTF mit den inaktiven Mutanten akkumuliert, während aktive SPPL2a- bzw. SPPL2b-Proteasen kaum in der Lage sind, NTF zu binden, steht im Einklang mit der Hypothese, dass das NTF das direkte Substrat für SPPL2a und SPPL2b darstellt und von den aktiven Proteasen effizient proteolytisch prozessiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Intramembranproteolyse durch Vertreter der SPP-Familie pharmakologisch mit (Z-LL)₂-Keton inhibiert (Weihofen et al., 2000) (Abbildung 27). Nach Behandlung der Bri2- und SPPL2b- co-exprimierenden HEK293-Zellen mit (Z-LL)₂-Keton akkumuliert NTF. Die Akkumulation nach (Z-LL)₂-Keton-Behandlung ist vergleichbar mit der Anreicherung von NTF in Anwesenheit der katalytisch inaktiven Mutante SPPL2b D/A. Der γ -Sekretase Inhibitor DAPT zeigt keinen Einfluss auf die SPPL2b-abhängige ICD Produktion (Abbildung 27). Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass die γ -Sekretase Bri2 prozessiert.

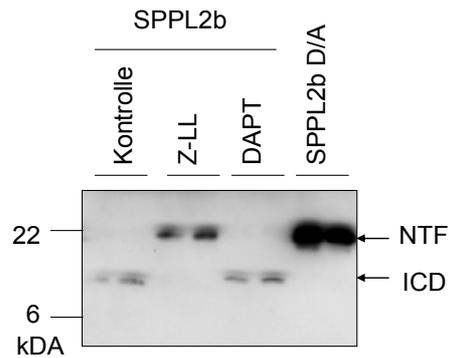


Abbildung 27. Pharmakologische Inhibition von SPPL2b. HEK293-Zellen, die stabil SPPL2b und transient N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertes Bri2 exprimieren, wurden über Nacht mit dem SPP/SPPL-Inhibitor (Z-LL)₂-Keton, dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT oder zur Kontrolle mit DMSO behandelt. HEK293-Zellen, die stabil SPPL2b D/A und transient N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertes Bri2 exprimieren, dienen der Kontrolle. Die Analyse mittels anti-Flag IP und WB zeigt, dass die Behandlung mit (Z-LL)₂-Keton zur Inhibition der Bri2-Prozessierung zur ICD führt, während DAPT hat keinen Einfluss auf die ICD-Produktion hat. Durch die (Z-LL)₂-Keton-Behandlung akkumuliert NTF. Die Akkumulation ist auch in SPPL2b D/A-exprimierenden Zellen zu beobachten. Die NTF-Anreicherung in SPPL2b D/A-exprimierenden Zellen fällt stärker aus, da die Behandlung mit (Z-LL)₂-Keton nur 12 h, die Co-Expression mit SPPL2b D/A jedoch 48 h beträgt.

Die Intramembranproteolyse des Bri2 durch GxGD-Proteasen sollte neben der Freisetzung der löslichen ICD auch zur Sekretion eines niedermolekularen Peptids in den extrazellulären Raum führen (Abbildung 28). Gegen das entsprechende Bri2-Fragment sind keine Antikörper erhältlich. Daher wurde ein luminal verkürztes Bri2-Konstrukt kloniert, welchem BRICHOS fehlt, das jedoch C-terminal mit einem V5-Tag markiert ist (Bri2 Δ E). Nach Co-Expression des Bri2 Δ E mit SPPL2a oder SPPL2b wird ein C-terminales Peptid bei ca. 6 kDa (Bri2 C-Peptid, Abbildung 28) im konditionierten Medium detektiert. Die Sekretion des C-Peptids ist spezifisch für SPPL2a und SPPL2b, da die Co-Expression des Bri2 Δ E mit den katalytisch inaktiven Mutanten SPPL2a D/A und SPPL2b D/A nicht zur Freisetzung des C-Peptids führt.

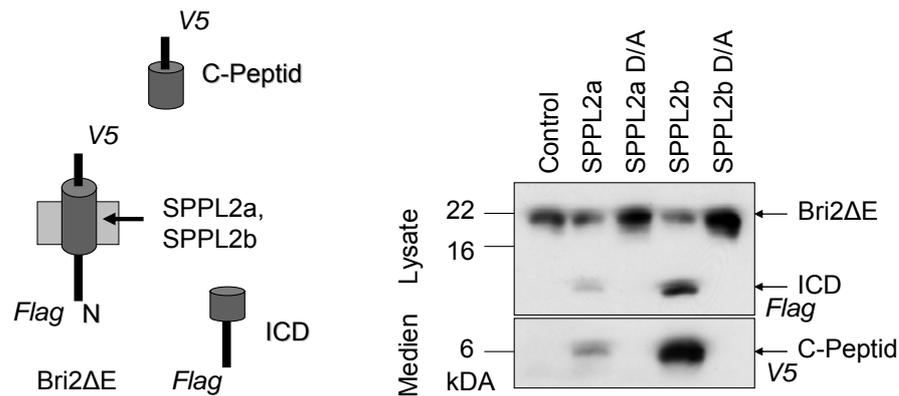


Abbildung 28. Produktion des Bri2 C-Peptids durch SPPL2a und SPPL2b. Die Intramembranproteolyse von NTF sollte neben der intrazellulären Freisetzung der ICD auch zur Sekretion des niedermolekularen C-Peptids führen. Stabil SPPL2a-, SPPL2b- oder deren inaktive Mutanten SPPL2a D/A- oder SPPL2b D/A-exprimierende HEK293-Zellen wurden transient mit N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem Bri2ΔE transfiziert. Bri2ΔE wird durch SPPL2a und SPPL2b zur ICD und zum C-Peptid prozessiert, welches in das konditionierte Medium sezerniert wird und durch anti-V5 IP und WB nachgewiesen werden kann. ICD wird in Zelllysaten mittels anti-Flag IP und WB detektiert. Die katalytisch inaktiven Mutanten SPPL2a D/A und SPPL2b D/A prozessieren Bri2ΔE nicht.

Zusammenfassend wird proBri2 dreifach durch Endoproteasen prozessiert: Der Furin-Schnitt führt zur Maturierung von proBri2 zu Bri2 und zur Sekretion des Propeptids; ADAM-10 schneidet Bri2 in der Ektodomäne und setzt BRICHOS frei, während das NTF in der Membran verankert bleibt. Die SPPL2a- oder SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse spaltet schließlich das NTF in die ICD und das C-Peptid (Abbildung 29).

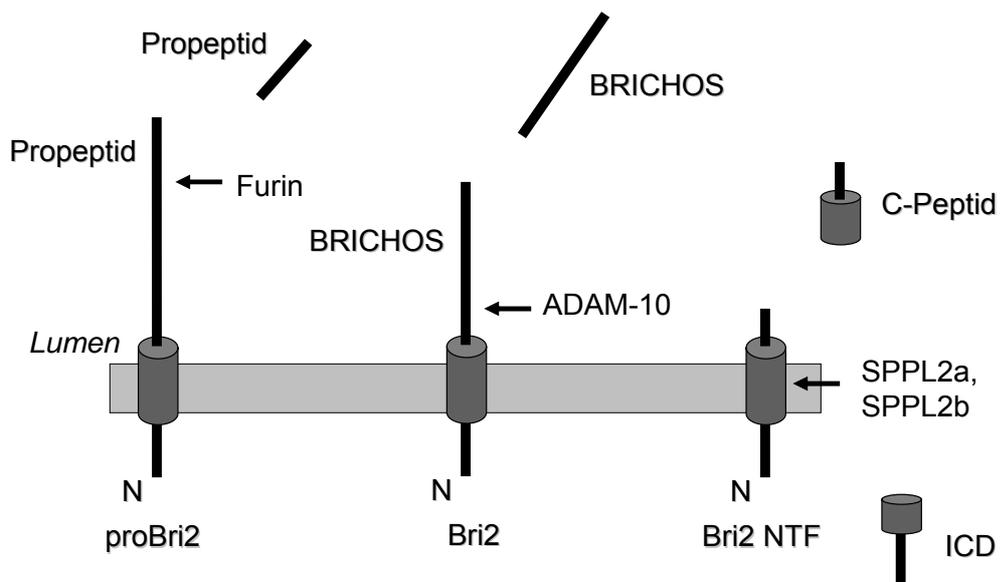


Abbildung 29. Regulierte Intramembranproteolyse des proBri2 durch Furin, ADAM-10 und SPPL2a bzw. SPPL2b. Im ersten Schritt der Prozessierung des proBri2 spaltet Furin das Propeptid ab, das sekretiert wird. BRICHOS wird durch ADAM-10 freigesetzt. Das membranverankerte NTF wird durch SPPL2a und SPPL2b in die zytoplasmatische ICD und das C-Peptid gespalten.

4.2.2 Ectodomain-Shedding und Intramembranproteolyse von proBri2 sind unabhängig vom Furin-Schnitt

Die Prozessierung von proBri2 durch Furin, ADAM-10 und SPPL2a/b zeigt Ähnlichkeit zur RIP des NOTCH-Rezeptors, der ebenfalls von Furin (an S1-Position) und ADAM-Metalloproteasen (an S2-Position) geschnitten wird (Ilagan und Kopan, 2007). Die Intramembranproteolyse (S3) wird bei NOTCH vom γ -Sekretase-Komplex katalysiert (De Strooper et al., 1999; Selkoe und Kopan, 2003). Für NOTCH wird diskutiert, ob der Furin-Schnitt für die RIP durch ADAM-Proteasen und die γ -Sekretase notwendig ist (Kidd und Lieber, 2002; Logeat et al., 1998). Um der Fragestellung nachzugehen, ob der Furin-Schnitt Voraussetzung für die RIP des Bri2 durch ADAM-10 und SPPL2a/b ist, wurde die Furin-Schnittstelle KREA (Aminosäurereste 242-245) in proBri2 zu AAEA mutiert (Bri2 KR/AA). Für das homologe Protein Bri3 wurde gezeigt, dass diese Mutation den Furin-Schnitt verhindert (Wickham et al., 2005). Nach Expression des Bri2 KR/AA in HEK293-Zellen wird bei ca. 50 kDa nur eine Bande detektiert, die Expression von proBri2 resultiert dagegen in der Doppelbande von proBri2 und Bri2 bei 50 kDa (Abbildung 30). Es ist davon auszugehen, dass die eingefügte KR/AA Doppelmutation die Prozessierung durch Furin verhindert, da Bri2 KR/AA nicht zu Bri2 maturiert.

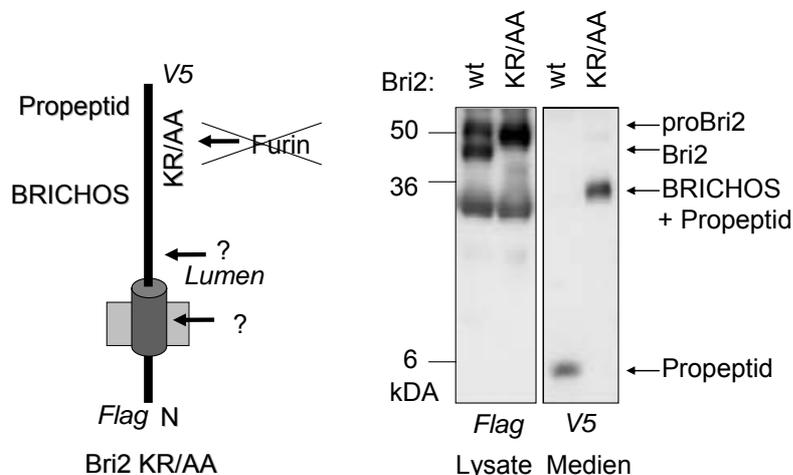


Abbildung 30. Die KR/AA Mutation verhindert den Furin-Schnitt von proBri2. Die Mutation der Aminosäurereste K243 und R244 zu A resultiert in einer Bri2-Mutante (Bri2 KR/AA), die nicht von Furin prozessiert wird. HEK293-Zellen wurden mit N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem proBri2 (wt) oder mit N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem Bri2 KR/AA transfiziert. Zelllysate wurden mittels anti-Flag IP und WB, konditionierte Medien mittels anti-V5 IP und WB auf Bri2-Schnittprodukte analysiert. Im Fall von proBri2 wird das Propeptid nach dem Furin-Schnitt ins Medium sekretiert. Für Bri2 KR/AA ist keine Prozessierung des Propeptids nachweisbar, der Furin-Schnitt findet vermutlich nicht statt. Allerdings wird im konditionierten Medium ein Peptid detektiert, dessen Molekulargewicht der BRICHOS-Domäne plus ungeschnittenem Propeptid entspricht. Dies weist darauf hin, dass Ectodomain-Shedding stattfindet und unabhängig vom Furin-Schnitt erfolgt.

Während die Expression von proBri2 in HEK293-Zellen in der Freisetzung des Propeptids in das konditionierte Medium resultiert (Abbildung 30, vergleiche auch Abbildung 25), wird im Fall des Bri2 KR/AA ein ca. 30 kDa schweres Peptid sekretiert. Das Molekulargewicht dieses sekretierten Peptids würde dem berechneten Molekulargewicht der BRICHOS-Domäne plus Propeptid entsprechen. Es ist daher davon auszugehen, dass Ectodomain-Shedding durch ADAM-10 trotz Inhibition der Propeptid-Freisetzung stattfindet und eine um das Propeptid verlängerte BRICHOS-Domäne sekretiert wird.

Der Nachweis von NTF im Lysat bestätigt, dass ADAM-10 Bri2 KR/AA auch ohne Furin-abhängige Proteolyse prozessiert (Abbildung 31). Bei Co-Expression des Bri2 KR/AA mit SPPL2b in HEK293-Zellen findet Prozessierung zur ICD statt, während bei Expression der katalytisch inaktiven SPPL2b D/A-Mutante NTF akkumuliert und keine ICD-Produktion zu beobachten ist (Abbildung 31). Die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse des Bri2 ist demnach unabhängig von der Furin-Prozessierung.

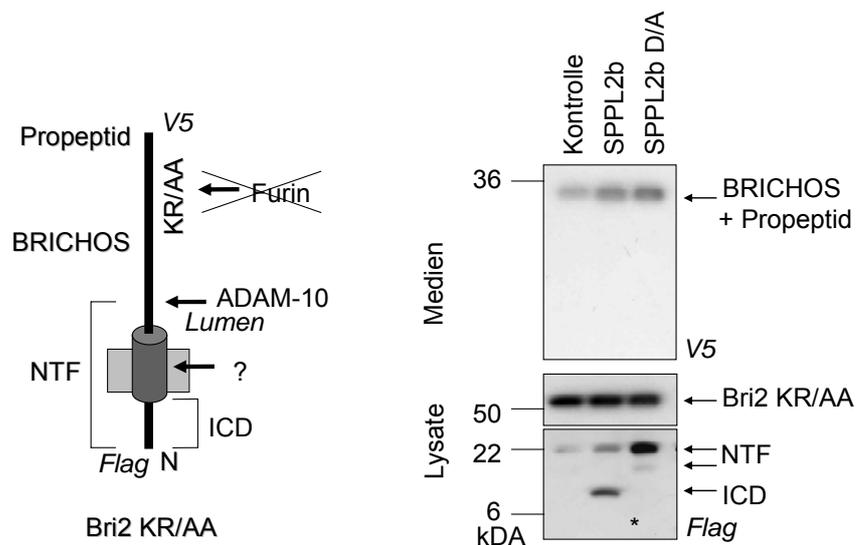


Abbildung 31. Bri2 KR/AA wird unabhängig vom Furin-Schnitt durch SPPL2b und ADAM-10 prozessiert. Stabil SPPL2b- oder SPPL2b D/A-exprimierende Zellen wurden transient mit N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem Bri2 KR/AA transfiziert. Nach anti-V5 IP und WB wird im konditionierten Medium ein Peptid nachgewiesen, das BRICHOS plus Propeptid entspricht (vergleiche Abbildung 30). Zusätzlich zeigt die Detektion von NTF nach anti-Flag IP in Lysaten und WB, dass Ectodomain-Shedding stattfindet. In Abhängigkeit von SPPL2b-Aktivität wird ICD generiert. Die fehlende Prozessierung von Furin beeinflusst daher vermutlich die SPPL2b-abhängige Prozessierung nicht. Sowohl der ADAM-10- als auch der SPPL2b-Schnitt sind folglich unabhängig von der Prozessierung durch Furin.

4.2.3 Co-Lokalisation des Bri2 und SPPL2b

Bri2 wird im Golgi-Apparat von Furin geschnitten (Choi et al., 2004; Kim et al., 1999; Kim et al., 2000). SPPL2b wurde in späten sekretorischen Kompartimenten beschrieben (Fluhrer et al., 2008a; Friedmann et al., 2006; Krawitz et al., 2005). Um die Co-Lokalisation von Protease und Substrat zu untersuchen, wurden Bri2 und SPPL2b

exogen in HEK293-Zellen co-exprimiert. Nach immunzytochemischer Färbung co-lokalisieren die Proteine in einer vesikulären Struktur in der Nähe des Zellkerns (Abbildung 32). Die Co-Lokalisation von sowohl Bri2 als auch SPPL2b mit dem Markerprotein Giantin zeigt, dass die Interaktion von Protease und Substrat wahrscheinlich im Golgi-Apparat stattfindet, wobei eine Prozessierung in späteren Kompartimenten nicht vollständig ausgeschlossen ist.

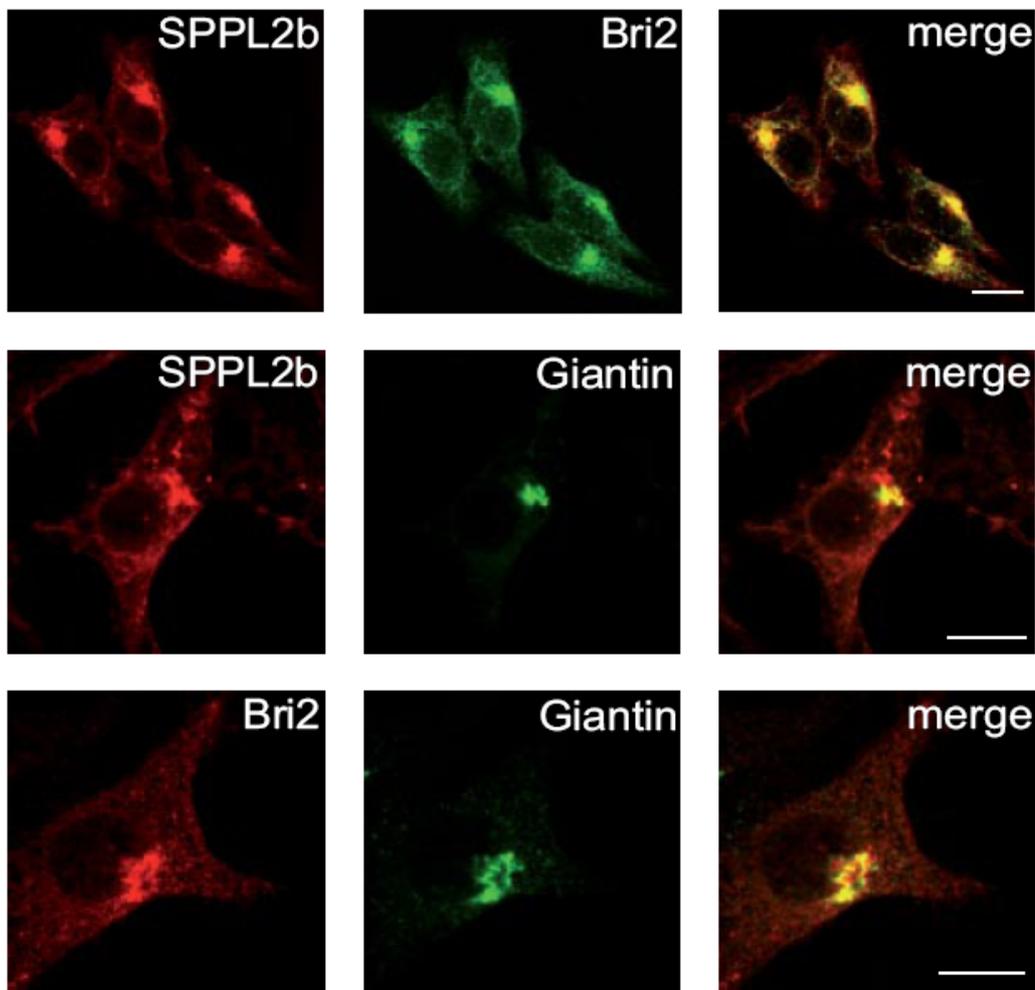


Abbildung 32. Co-Lokalisation des Bri2 und SPPL2b. Stabil Bri2 und SPPL2b exprimierende HEK293-Zellen wurden immunzytochemisch gegen den V5-Tag des Bri2 (C-terminal), gegen den HA-Tag des SPPL2b (C-terminal) und gegen Giantin, einem Markerprotein für den Golgi-Apparat, gefärbt. Bri2 und SPPL2b co-lokalisieren hauptsächlich in einem perinukleärem Kompartiment. Der Maßstab entspricht 10 μ M.

4.2.4 Co-Lokalisation des Bri2 mit SPPL2b ist nicht ausreichend für RIP

Um die Frage zu beantworten, ob die Co-Lokalisation von SPPL2b mit Bri2 in einem späten sekretorischen Kompartiment Voraussetzung für RIP ist, oder ob die Proteolyse auch schon in früheren sekretorischen Kompartimenten wie beispielsweise dem ER stattfinden kann, wurden stabil Bri2 und SPPL2b exprimierende HEK293-Zellen mit Brefeldin A behandelt. Durch Brefeldin A wird das ER mit dem Golgi-Apparat fusioniert

und der Vorwärts-Transport von sekretierten und membranständigen Proteinen blockiert (Klausner et al., 1992; Sciaky et al., 1997). Nach Behandlung mit Brefeldin A werden SPPL2b und Bri2 in diesem Fusionskompartiment zurückgehalten und co-lokalisieren (Abbildung 33, vergleiche zur Kontrolle Abbildung 32).

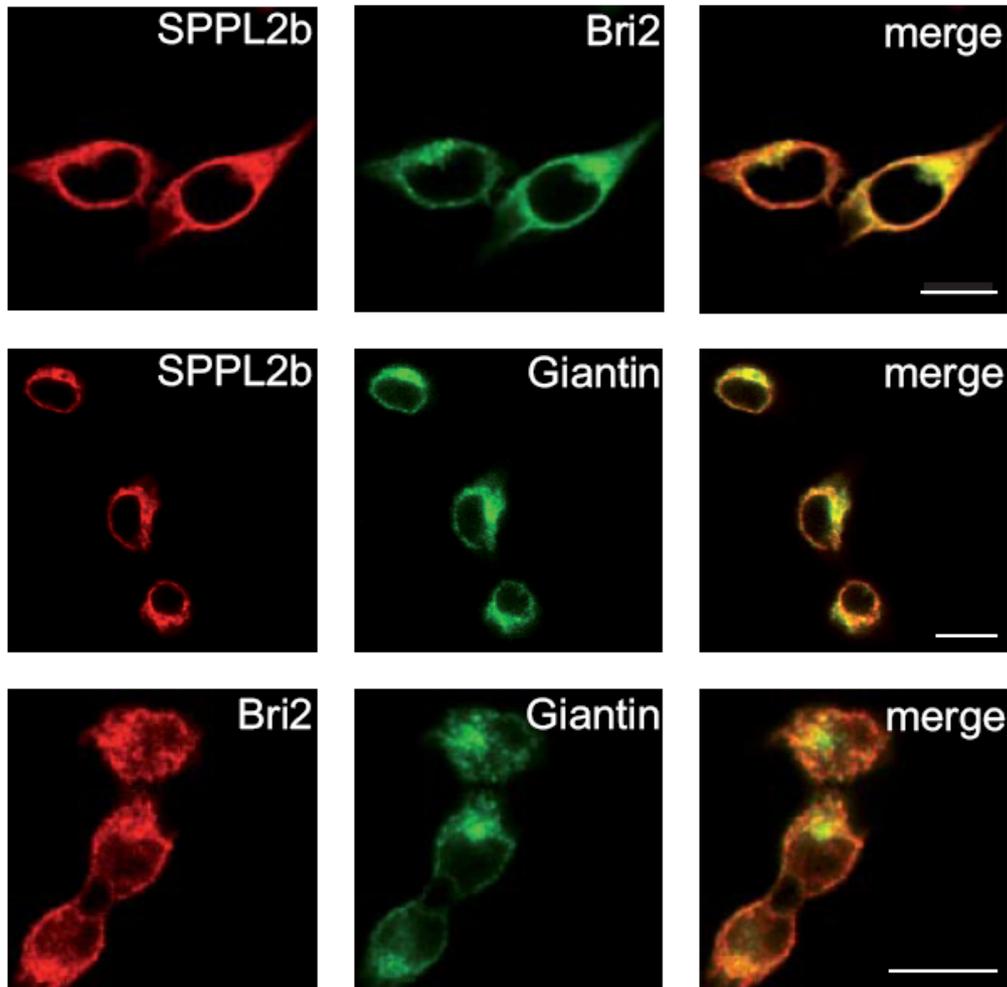


Abbildung 33. Co-Lokalisation des Bri2 und SPPL2b in Brefeldin A-behandelten Zellen. Stabil Bri2 und SPPL2b exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 10 µg/µl Brefeldin A behandelt und immunzytochemisch gegen den V5-Tag (am C-Terminus des Bri2), gegen den HA-Tag (am C-Terminus des SPPL2b) und gegen Giantin gefärbt. Co-Lokalisation des Bri2 und SPPL2b ist in einem ER-Golgi-Fusionskompartiment nachweisbar. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Die WB-Analyse zeigt jedoch, dass die RIP des Bri2 in Brefeldin A-behandelten Zellen nicht stattfindet (Abbildung 34 und 35). Brefeldin A inhibiert die Furin-abhängige Prozessierung von proBri2: Während in unbehandelten HEK293-Zellen die charakteristische Doppelbande des immaturren proBri2 und maturateden Bri2 nachweisbar ist, akkumuliert nach Brefeldin A-Behandlung die immaturre proBri2 Spezies (Abbildung 34). Zusätzlich wird nach Brefeldin A-Behandlung kein Propeptid im konditionierten Medium detektiert. Ebenso wird unter Brefeldin A-Bedingungen kein BRICHOS und NTF detektiert: Der ADAM-10-Schnitt ist inhibiert. Unter Brefeldin A-Behandlung wird

außerdem keine ICD nachgewiesen, was auf eine Inhibition der Intramembranproteolyse durch SPPL2b hinweist.

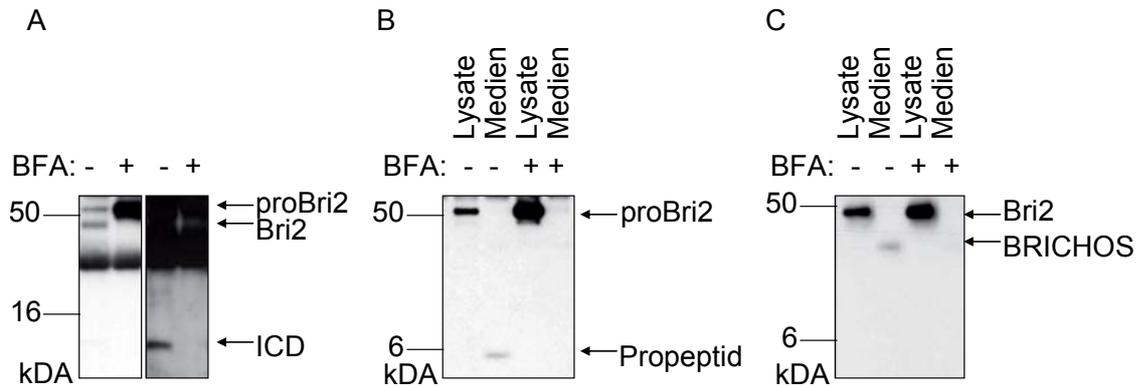


Abbildung 34. Brefeldin A (BFA) inhibiert die RIP des Bri2. proBri2 bzw. Bri2 sind N-terminal Flag und C-terminal V5 markiert. Anti-Flag IP und WB erlaubt den Nachweis von N-terminalen Bri2-Spezies, während C-terminale Bri2-Spezies nach anti-V5 IP und WB detektiert werden. (A) Der SPPL2b-Schnitt wird durch Brefeldin A inhibiert. proBri2- und SPPL2b-exprimierende HEK293-Zellen wurden über Nacht mit 10 µg/µl Brefeldin A behandelt. Im Lysat akkumuliert durch die Brefeldin A-Behandlung proBri2 (links); die SPPL2b-abhängige ICD-Produktion wird blockiert (rechts). (B) Brefeldin A inhibiert die Prozessierung des proBri2 durch Furin. proBri2-exprimierende HEK293-Zellen wurden über Nacht mit 10 µg/µl Brefeldin A behandelt. Während unbehandelte Zellen das Propeptid sekretieren, akkumuliert proBri2 in Brefeldin A-behandelten Zellen. Weder im Lysat noch im konditionierten Medium ist Furin-prozessiertes Propeptid nachweisbar. (C) Brefeldin A unterbindet den ADAM-10-Schnitt. Bri2-exprimierende HEK293-Zellen wurden über Nacht mit 10 µg/µl Brefeldin A behandelt. Während unbehandelte Zellen BRICHOS sezernieren, akkumuliert Bri2 unter Brefeldin A-Behandlung im Lysat. BRICHOS ist nach Brefeldin A-Behandlung nicht nachweisbar. Folglich wird ADAM-10-abhängiges Ectodomain-Shedding des Bri2 durch Brefeldin A inhibiert.

Bri2 wird durch ADAM-10 prozessiert und Ectodomain-Shedding des Bri2 erleichtert die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse erheblich (siehe 4.1.2 und 4.5.3). Folglich könnte es sein, dass fehlendes Ectodomain-Shedding unter Brefeldin A-Bedingungen die Ursache für die ineffiziente Prozessierung durch SPPL2b ist. Um diesen Effekt zu umgehen, wurden HEK293-Zellen mit Bri2ΔE transfiziert. Die Behandlung der Zellen mit Brefeldin A resultiert in der Inhibition des SPPL2b-Schnitts des Bri2ΔE (Abbildung 35). SPPL2b zeigt nach Brefeldin A-Behandlung eine veränderte Maturierung. Es könnte folglich sein, dass die veränderte Maturierung für die fehlende SPPL2b-Aktivität verantwortlich ist.

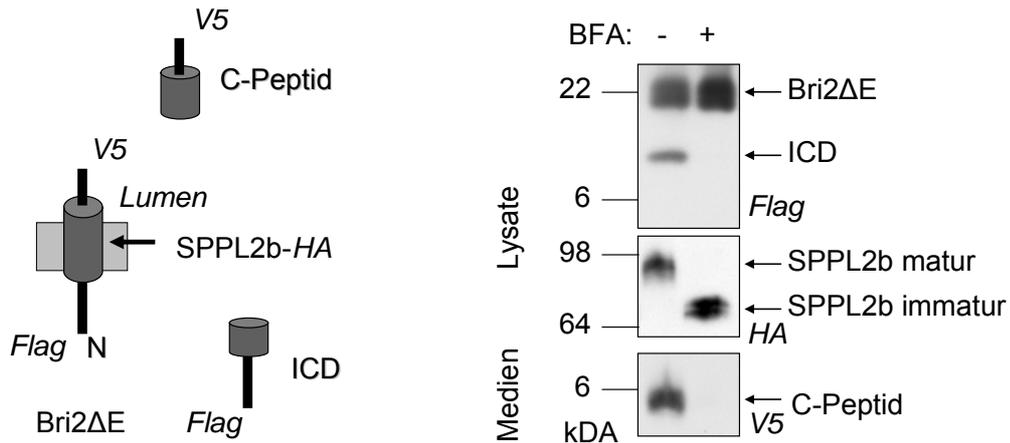


Abbildung 35. SPPL2b-Aktivität wird durch Brefeldin A inhibiert. Bri2ΔE ist N-terminal mit Flag und C-terminal mit V5 markiert. SPPL2b ist C-terminal mit einem HA-Tag versehen. Stabil SPPL2b und transient Bri2ΔE-coexprimierende HEK293-Zellen wurden über Nacht mit 10 µg/ml Brefeldin A behandelt und anhand von anti-Flag IP und WB (Lysate) und anti-V5 IP und WB (Medien) auf Prozessierung des Bri2ΔE untersucht. SPPL2b wurde in isolierten Zellmembranen im WB gegen den HA Tag nachgewiesen. Nach Brefeldin A-Behandlung ist keine ICD-Generierung nachweisbar. Bri2ΔE akkumuliert in den behandelten Zellen. Die Sekretion des C-Peptids in das konditionierte Medium ist blockiert. SPPL2b maturiert unter Brefeldin A-Bedingungen nicht. Die Brefeldin A-induzierte fehlerhafte Maturierung von SPPL2b könnte für die ineffiziente Proteolyse des Bri2ΔE ausschlaggebend zu sein.

4.3 Differentielle Intramembranproteolyse durch SPPL2b

Neben Bri2 wurden auch TNFα und der FasL als Substrate für SPPL2a bzw. SPPL2b beschrieben (Fluhrer et al., 2006; Friedmann et al., 2006; Kirkin et al., 2007). Die Gemeinsamkeit dieser Proteine besteht in der Lokalisation in sekretorischen Kompartimenten, einer Typ-II-Membrantopologie und Prozessierung in der Ektodomäne durch ADAM-Proteasen. Es sind keine Sequenzhomologien erkennbar, die eine Vorhersage ermöglichen, ob ein Protein SPPL2a/b-abhängige Intramembranproteolyse durchläuft. Unklar ist auch, ob das für alle SPPL-Substrate beobachtete Ectodomain-Shedding Voraussetzung für die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse ist. Eine vom Ectodomain-Shedding unabhängige Untersuchung der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse anhand der bekannten Substrate wird durch die katalytische Promiskuität der Sheddase erschwert (Reiss und Saftig, 2008; Sisodia, 1992). Um die Anforderungen an die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse zu analysieren, ist daher ein Vergleich von einem RIP-Substrat mit einem Transmembranprotein, das kein Substrat für RIP ist („Nicht-Substrat“), angezeigt. Durch schrittweisen Austausch von Domänen könnte es möglich sein, Rückschlüsse auf mögliche Determinanten für die Prozessierung durch SPPL2b zu ziehen.

4.3.1 Bri3 ist kein Substrat für RIP

Bri3 ist mit 60% Sequenzähnlichkeit das nächste Homologe zu Bri2. Die Sequenzanalyse zeigt, dass neben der strikten Konservierung von 43% der Aminosäuren (Abbildung 36) auch die Typ-II-Transmembrantopologie erhalten ist. Die höchste Homologie findet sich im Bereich des Propeptids und BRICHOS, während die TMD funktionell, jedoch auf Ebene der Aminosäuresequenz nur gering konserviert ist. Der am geringsten konservierte Bereich zwischen Bri2 und Bri3 befindet sich in der luminalen Juxtamembrandomäne (IJMD) und zwischen den ICD. Bri3 ist eine Aminosäure länger als Bri2 und wird - wie für Bri2 beschrieben - durch Furin prozessiert (Choi et al., 2004; Wickham et al., 2005).

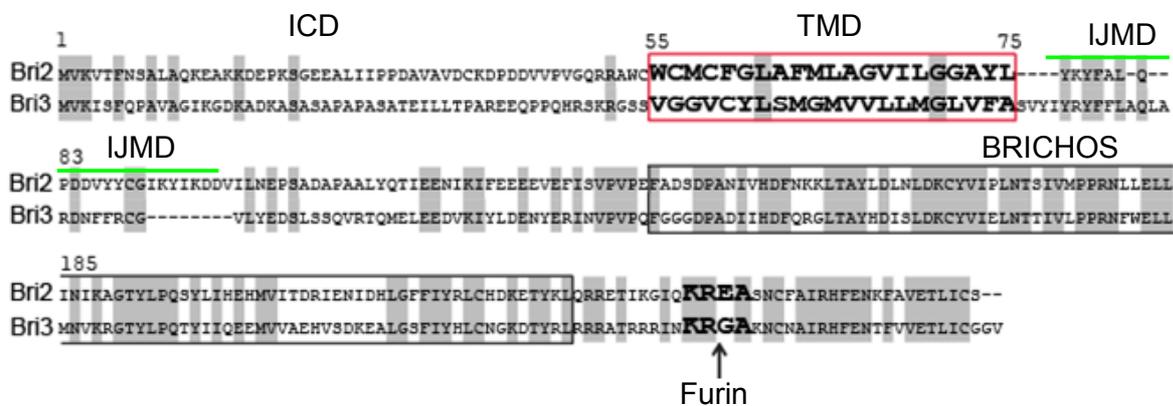


Abbildung 36. Aminosäure-Alignment des Bri2 und Bri3. Die Furin-Schnittstelle und die TMD sind fettgedruckt. Identische Aminosäurereste sind grau unterlegt. 43% der Aminosäuren sind konserviert, 60% sind sich ähnlich. BRICHOS und das Propeptid sind hochkonserviert. Die TMD ist funktionell, jedoch nicht auf Aminosäureebene konserviert. Die niedrigste Homologie befindet sich innerhalb der ICD und der IJMD (in grün). Die Sequenzanalyse erfolgte mit VectorNTI, die Annotation der TMD und von BRICHOS wurde aus der Proteindatenbank UNIPROT übernommen.

Um eine mögliche RIP von Bri3 zu untersuchen, wurde Bri3 exogen in HEK293-Zellen mit SPPL2b co-exprimiert. Zunächst wird ersichtlich, dass kein Bri3 NTF nachgewiesen werden kann (Abbildung 37). Weiterhin wird im konditionierten Medium kein BRICHOS detektiert. Beides steht in Kontrast zu der bereits dargestellten Prozessierung des Bri2, für das sowohl NTF als auch BRICHOS nachgewiesen werden (Abbildungen 20, 24 und 37). Diese Ergebnisse validieren die Daten einer Studie, die nahelegt, dass Bri3 kein Substrat für Ectodomain-Shedding ist (Wickham et al., 2005). Nach Co-Expression mit SPPL2b wird in Bri2-exprimierenden Zellen ICD generiert (Abbildung 37, vergleiche Abbildung 25). Dies ist für Bri3 nicht der Fall (Abbildung 37). Bri3 ist damit trotz hoher Homologie zu Bri2 in HEK293-Zellen kein Substrat für RIP.

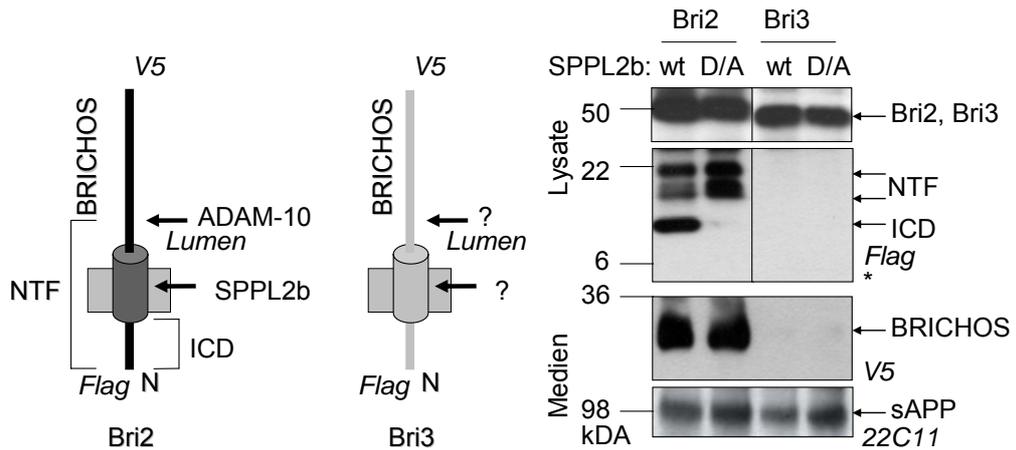


Abbildung 37. Bri3 ist kein Substrat für Ectodomain-Shedding und RIP. Bri2 und Bri3 sind N-terminal mit einem Flag Tag und C-terminal mit einem V5 Tag versehen. Nach Co-Expression des Bri2 oder Bri3 mit SPPL2b oder SPPL2b D/A werden nach anti-Flag IP und WB nur für Bri2 NTF und ICD detektiert. Im konditionierten Medium wird sezerniertes BRICHOS nach anti-V5 IP und WB nur für Bri2 nachgewiesen. Der anti-APP WB mit dem 22C11 Antikörper gegen die sezernierte APP-Ektodomäne (sAPP) zeigt, dass Ectodomain-Shedding *per se* durch die Bri3-Expression nicht beeinflusst wird. * kennzeichnet eine längere WB-Exposition im Vergleich zu den oberen WB, in denen die Volllängensproteine Bri2 bzw. Bri3 nachgewiesen werden.

Die Ursache für die unterschiedliche Prozessierung von Bri3 gegenüber Bri2 liegt nicht in differentieller Lokalisation der Proteine, da Bri3 ebenso wie Bri2 sekretorische Kompartimente durchläuft. Beide Proteine co-lokalisieren in durch TritonX permeabilisierten HEK293-Zellen mit Giantin, einem Markerprotein für den Golgi-Apparat (Linstedt und Hauri, 1993). In nicht-permeabilisierten Zellen werden sowohl Bri3 als auch Bri2 an der Zelloberfläche detektiert (Abbildung 38). Die Lokalisation von Bri3 und Bri2 unterscheidet sich daher nicht wesentlich.

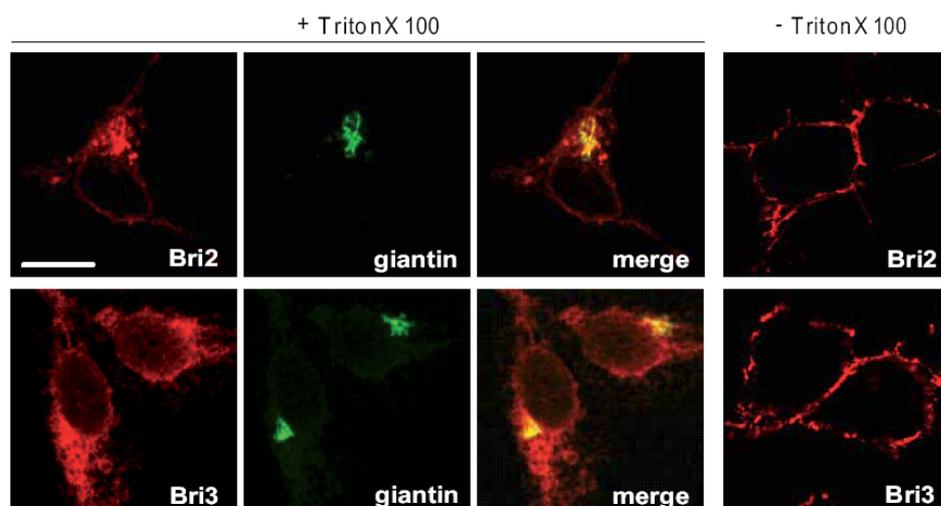


Abbildung 38. Bri3 lokalisiert in späten sekretorischen Kompartimenten. C-terminal V5 markiertes Bri2 oder Bri3 wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert. Nach immunzytochemischer Färbung des V5 Tag (roter Kanal) bzw. des Giantin (grüner Kanal) wird deutlich, dass Bri3 ähnlich wie Bri2 mit Giantin co-lokalisiert (mit TritonX 100 geöffnete Zellen, vergleiche Abbildung 32). Außerdem ist Bri3 wie auch Bri2 an der Plasmamembran lokalisiert (ungeöffnete Zellen, ohne TritonX 100). Der Maßstab entspricht 10 µm.

4.3.2 Ectodomain-Shedding ist nicht ausreichend für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse

Die SPPL2a- und SPPL2b-Substrate Bri2, TNF α und FasL zeigen keine Sequenzähnlichkeiten. Neben ihrer Typ-II-Transmembrantopologie wurde jedoch für alle diese Proteine Ectodomain-Shedding beschrieben (Gearing et al., 1994; Kirkin et al., 2007; Martin et al., 2008b; Schulte et al., 2007). Bri3 wird nicht in der Ektodomäne prozessiert und ist kein Substrat für SPPL2b (Martin et al., 2008a). Die Ursache für die ausbleibende Intramembranproteolyse könnte im fehlenden Ectodomain-Shedding liegen. In diesem Fall sollte ein Bri3-Deletionskonstrukt (Bri3 Δ E), das eine verkürzte Ektodomäne aufweist, von SPPL2b umgesetzt werden. Die Co-Expression von Bri3 Δ E mit SPPL2b zeigt jedoch, dass Bri3 Δ E ebenfalls kein Substrat für SPPL2b darstellt (Abbildung 39). Während Bri2 Δ E in Abhängigkeit von SPPL2b zu ICD prozessiert wird und der SPP/SPPL-Inhibitor (Z-LL)₂-Keton die Prozessierung inhibiert, wird für Bri3 Δ E kein Umsatz detektiert (Abbildung 39).

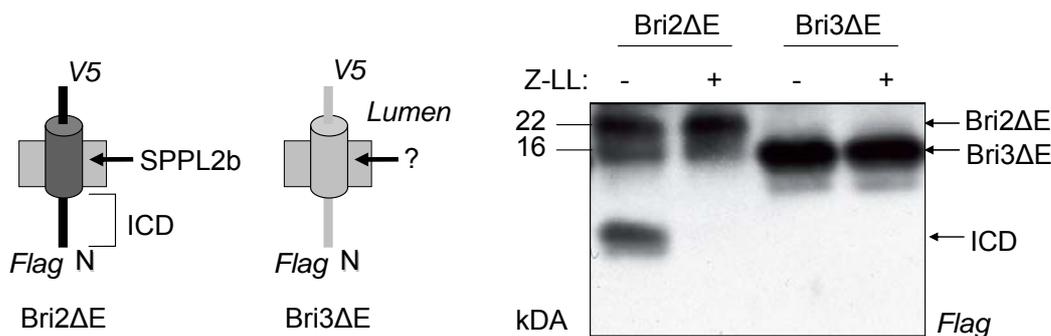


Abbildung 39. Ectodomain-Shedding ist nicht ausreichend für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse. Den Deletionskonstrukten Bri2 Δ E und Bri3 Δ E fehlt die BRICHOS-Domäne, die Prozessierung durch SPPL2b ist daher unabhängig von Ectodomain-Shedding. Bri2 Δ E und Bri3 Δ E sind N-terminal mit Flag und C-terminal mit V5 markiert. Bei Co-Expression des Bri2 Δ E oder Bri3 Δ E mit SPPL2b wird nach anti-Flag IP und WB deutlich, dass Bri2 Δ E zu ICD prozessiert wird, Bri3 Δ E hingegen nicht. Die Behandlung mit (Z-LL)₂-Keton zur Inhibition des SPPL2b-Schnitts des Bri2 Δ E dient der Kontrolle.

Fehlendes Ectodomain-Shedding ist daher nicht ursächlich für die SPPL2b-Schnittineffizienz gegenüber Bri3. Anhand dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass Sequenz- oder Strukturdeterminanten in Bri2 für eine effiziente Prozessierung durch SPPL2b bestehen.

Mithilfe von Domänenaustausch-Experimenten zwischen Bri2 und Bri3 und der Analyse der SPPL2b-Schnitteffizienz der chimären Bri-Proteine können nachfolgend differentiell Substratanforderungen von SPPL2b abgeleitet werden.

4.4 Substratanforderungen für SPPL2b

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Sequenz- bzw. Struktur motive im membranverankerten Bri2 NTF für den SPPL2b-Schnitt verantwortlich sein müssen. Ein Austausch von Domänen des Bri2 mit den entsprechenden Domänen von Bri3 mit nachfolgender Analyse der SPPL2b-Schnitteffizienz kann Aufschluss über den Einfluss bestimmter Aminosäuresequenzen auf die SPPL2b-abhängige Proteolyse geben. Eine schematische Beschreibung der hierfür verwendeten chimären Bri2/Bri3-Proteine findet sich in Abbildung 40.

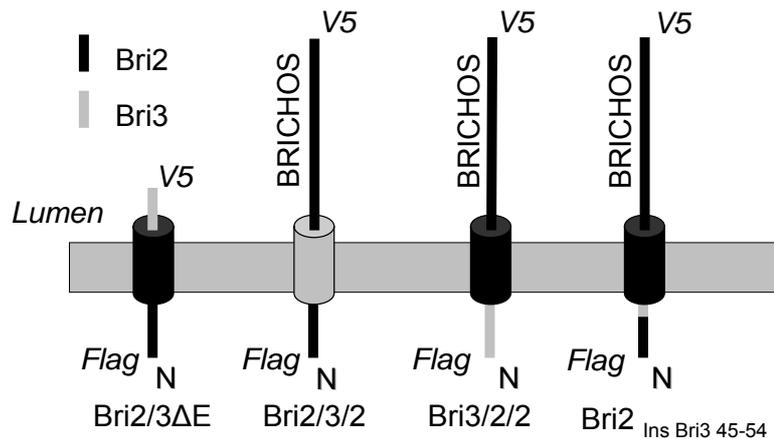


Abbildung 40. Chimäre Bri2 / Bri3-Proteine. Mittels der gezeigten chimären Bri2 / Bri3-Konstrukte soll Aufschluss über den Einfluss bestimmter Aminosäuresequenzen auf die SPPL2b-abhängige Proteolyse gewonnen werden. Das Konstrukt Bri2/3ΔE trägt die ICD und die TMD des Bri2, jedoch die luminale Jxtamembrandomäne des Bri3. Die BRICHOS-Domäne fehlt Bri2/3ΔE. Das Bri2/3/2-Austauschkonstrukt enthält die TMD von Bri3, besteht sonst jedoch aus Bri2. Bri3/2/2 enthält die ICD von Bri3, der restliche Teil besteht aus Bri2. Das Bri2_{ins Bri3 45-54}-Austauschkonstrukt enthält die zehn zytoplasmatischen jxtamembranen Aminosäurereste von Bri3, besteht sonst jedoch aus Bri2. Alle Konstrukte sind N-terminal mit einem Flag Tag und C-terminal mit einem V5 Tag versehen.

4.4.1 Determinanten in der luminalen Jxtamembrandomäne beeinflussen die SPPL2b-Schnitteffizienz

Für Substrate der γ -Sekretase wurde gezeigt, dass die luminale Jxtamembrandomäne (IJMD) Einfluss auf die Intramembranproteolyse hat (Ren et al., 2007). Für SPPL2b kann anhand eines chimären Konstrukts gezeigt werden, dass die IJMD die Schnitteffizienz erheblich beeinflusst: Das Konstrukt Bri2/3ΔE unterscheidet sich von Bri2ΔE im Austausch der IJMD (Abbildung 40, 41). Aus dem Vergleich der SPPL2b-abhängigen Prozessierung des Bri2/3ΔE zu Bri2ΔE kann folglich der Einfluss der IJMD des Bri2 auf die SPPL2b-Aktivität abgeleitet werden. Die Expression des Bri2/3ΔE führt zu geringeren Mengen an ICD als die Expression des Bri2ΔE (Abbildung 41). Die Schnitteffizienz von SPPL2b gegenüber Bri2/3ΔE ist im Vergleich zu Bri2ΔE um 70% verringert (Abbildung

41). Die IJMD eines SPPL2b-Substrats kann folglich erheblichen Einfluss auf die Prozessierung durch SPPL2b haben.

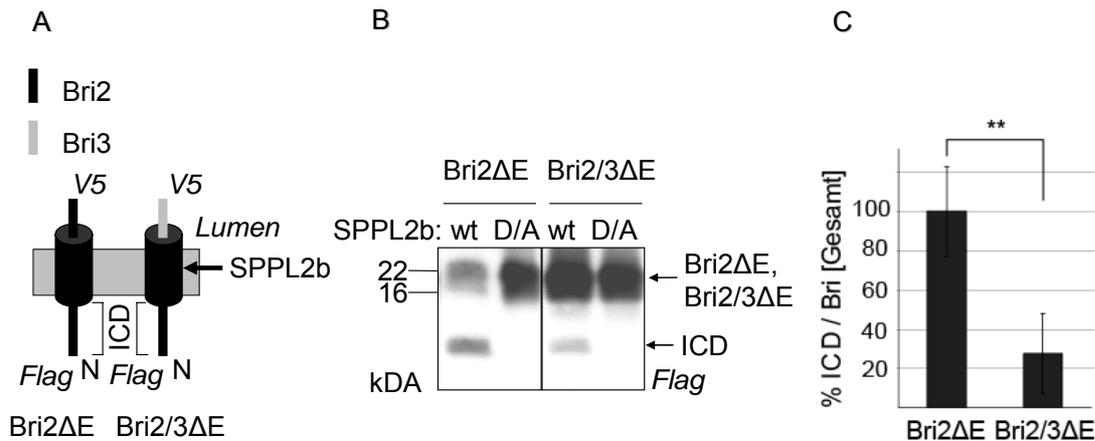


Abbildung 41. Die IJMD beeinflusst die SPPL2b-abhängige Bri2-Prozessierung. (A) Das Konstrukt Bri2/3ΔE trägt die ICD und die TMD des Bri2, jedoch die IJMD des Bri3. Beide Konstrukte sind N-terminal mit einem Flag Tag und C-terminal mit einem V5 Tag versehen. Die BRICHOS-Domäne fehlt den Deletionskonstrukten Bri2ΔE und Bri2/3ΔE. (B) Die Co-Expression des Bri2ΔE oder Bri2/3ΔE mit SPPL2b und nachfolgende Analyse der Zelllysate mittels anti-Flag IP und WB zeigt, dass für Bri2ΔE als auch für Bri2/3ΔE ICD entsteht. Bri2/3ΔE wird jedoch weniger effizient prozessiert als Bri2ΔE. Bei Co-Expression des Bri2ΔE mit SPPL2b D/A akkumuliert Bri2ΔE. Die Akkumulation fällt für Bri2/3ΔE weniger stark aus. (C) Die SPPL2b-Schnitteffizienz wird durch den Austausch der IJMD um 73±20% reduziert (n=9, p<0,001).

4.4.2 In der TMD des Bri2 existieren Determinanten für die Prozessierung durch SPPL2b

Bislang wurde nicht untersucht, welche Rolle Sequenzdeterminanten in den TMD von SPPL-Substraten spielen. Um den Einfluss der Bri2 TMD auf die Schnitteffizienz von SPPL2b zu bestimmen, wurde ein Konstrukt kloniert, in dem die TMD des Bri2 durch die TMD von Bri3 ersetzt wurde (Bri2/3/2). Co-Expression des Bri2/3/2 mit SPPL2b in HEK293-Zellen zeigt im Vergleich zu Bri2 eine um 80% reduzierte ICD-Bildung (Abbildung 42). Der Austausch der TMD des Bri2 zu Bri3 zeigt keinen Einfluss auf die Prozessierung in der Ektodomäne, da sich die Mengen an sekretiertem BRICHOS für die beiden Konstrukte nicht unterscheiden (Abbildung 42). Innerhalb der TMD des Bri2 liegen folglich keine Determinanten für die ADAM-10-, jedoch starke Determinanten für die SPPL2b-abhängige Proteolyse.

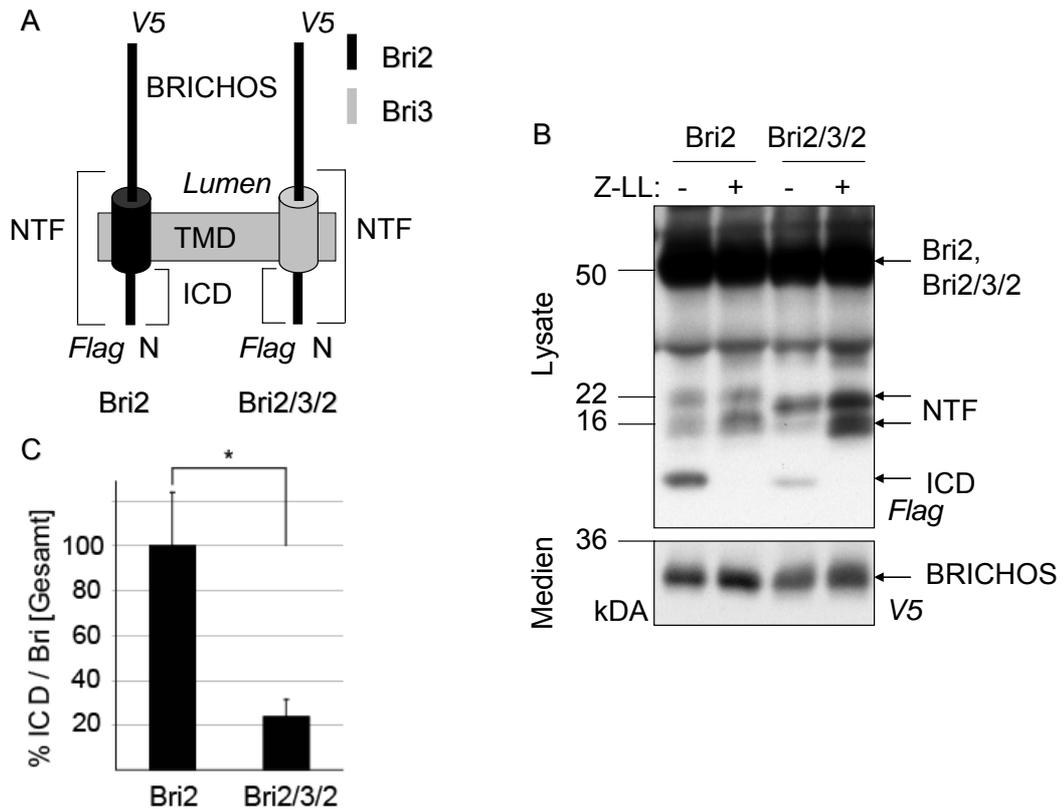


Abbildung 42. Die Bri2 TMD ist entscheidend für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse. (A) Das Bri2/3/2-Austauschkonstrukt enthält die TMD von Bri3, besteht sonst jedoch aus Bri2. Beide Konstrukte sind N-terminal mit einem Flag und C-terminal mit einem V5 Tag versehen. (B) Bri2/3/2 wird weniger effizient von SPPL2b prozessiert als Bri2. Bri2 bzw. Bri2/3/2 wurden mit SPPL2b co-exprimiert und die Zelllysate mittels anti-Flag IP und WB auf proteolytische Prozessierung der Konstrukte untersucht. Behandlung der Zellen mit (Z-LL)₂-Keton dient der Kontrolle für Fragmente, die durch SPPL2b-abhängige Proteolyse entstehen. Sowohl für Bri2 als auch für Bri2/3/2 wird ICD-Generation nachgewiesen, sie fällt für Bri2/3/2 jedoch geringer aus. Das NTF des Bri2/3/2 unterscheidet sich im Laufverhalten vom NTF des Bri2, wahrscheinlich wegen der ungleichen TMD-Sequenzen. Die Sezernierung von BRICHOS wurde mittels anti-V5 IP und WB der konditionierten Medien untersucht. Die BRICHOS-Sezernierung in das konditionierte Medium unterscheidet sich nicht zwischen Bri2/3/2 und Bri2. (C) Co-Expression des Bri2/3/2 mit SPPL2b und Vergleich der Bri2/3/2-ICD-Menge mit der des Bri2 zeigt Reduktion der ICD-Generation um $77 \pm 7,7\%$ ($n=3$, $p<0,05$).

Für Rhomboid- und SPP-Substrate wurden Glycin- und Prolin-Reste in einer TMD als Voraussetzung für effiziente Intramembranproteolyse beschrieben (Lemberg und Martoglio, 2002; Urban und Freeman, 2003). Damit eine Peptidbindung für eine Protease zugänglich ist, muss das α -helikale Rückgrat der TMD an zumindest einer Peptidbindung entwunden werden (Salvesen, 2003). Glycine und Proline können als „Helix-Breaker“ die Faltung einer α -helikalen TMD stören und daher das Entwinden erleichtern (Altmann et al., 1990; Chakrabarty et al., 1991). Ob Helix-Breaker in SPPL-Substraten Voraussetzung für effiziente Intramembranproteolyse sind, ist unklar. Bri2 trägt zwar keine Prolin-, aber vier Glycin-Reste in der TMD (Abbildung 43). Um den Einfluss dieser Glycin-Reste in ihrer Gesamtheit zu untersuchen, wurden sie alle zu Alanin-Resten mutiert (Bri2 TMD G/A). Die Co-Expression des Bri2 TMD G/A mit

SPPL2b erlaubt zwar Prozessierung durch SPPL2b, die Schnitteffizienz ist jedoch um 70% reduziert (Abbildung 43). Die Glycin-Reste in der TMD des Bri2 spielen demnach für die effiziente Prozessierung durch SPPL2b eine wichtige Rolle.

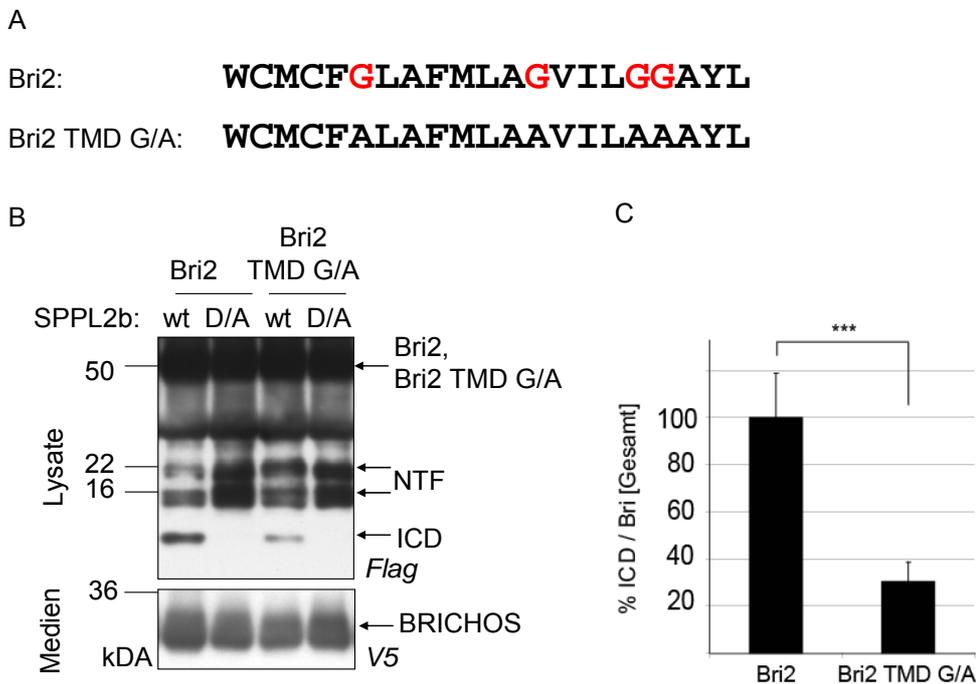


Abbildung 43. Glycin-Reste in der TMD des Bri2 beeinflussen den SPPL2b-Schnitt. (A) Im Konstrukt Bri2 TMD G/A sind die vier Glycin-Reste in der TMD des Bri2 zu Alanin mutiert. (B) Bri2 und Bri2 TMD G/A sind N-terminal mit einem Flag und C-terminal mit einem V5 Tag versehen. Bri2 bzw. Bri2 TMD G/A wurden mit SPPL2b bzw. der inaktiven Mutante SPPL2b D/A co-exprimiert und die Zellysate mittels anti-Flag IP und WB auf proteolytische Prozessierung der Konstrukte untersucht. Die Sezernierung von BRICHOS wurde mittels anti-V5 IP und WB der konditionierten Medien nachgewiesen. Die BRICHOS-Menge in den konditionierten Medien unterscheidet sich nicht zwischen Bri2 TMD G/A und Bri2. (C) Co-Expression des Bri2 TMD G/A mit SPPL2b und Vergleich der ICD-Menge mit der des Bri2 wt zeigt Reduktion der ICD-Generation um $70 \pm 10,5\%$ ($n=6$, $p<0,00015$).

4.4.3 In der ICD des Bri2 existieren Determinanten für SPPL2b

Für Rhomboid- und γ -Sekretase-Substrate wurde gezeigt, dass der intrazelluläre Teil eines Substrats die Intramembranproteolyse beeinflussen kann (Hemming et al., 2008; Urban et al., 2002). Für die SPP/SPPL-abhängige Intramembranproteolyse ist nicht bekannt, ob der intrazelluläre Teil eines Substrats Einfluss auf die Schnitteffizienz hat. Der Austausch der Bri2 ICD mit der Bri3 ICD erlaubt, die Stärke des Einflusses der ICD auf die SPPL2b-Schnitteffizienz zu bestimmen (Bri3/2/2). Die Co-Expression von Bri3/2/2 mit SPPL2b zeigt, dass die Schnitteffizienz von SPPL2b gegenüber Bri3/2/2 im Vergleich zu Bri2 um ca. 60% reduziert ist (Abbildung 44). Die veränderte ICD zeigt dabei keinen Einfluss auf Ectodomain-Shedding durch ADAM-10, da die Menge an sekretiertem BRICHOS sich nicht zwischen Bri3/2/2 und Bri2 unterscheidet.

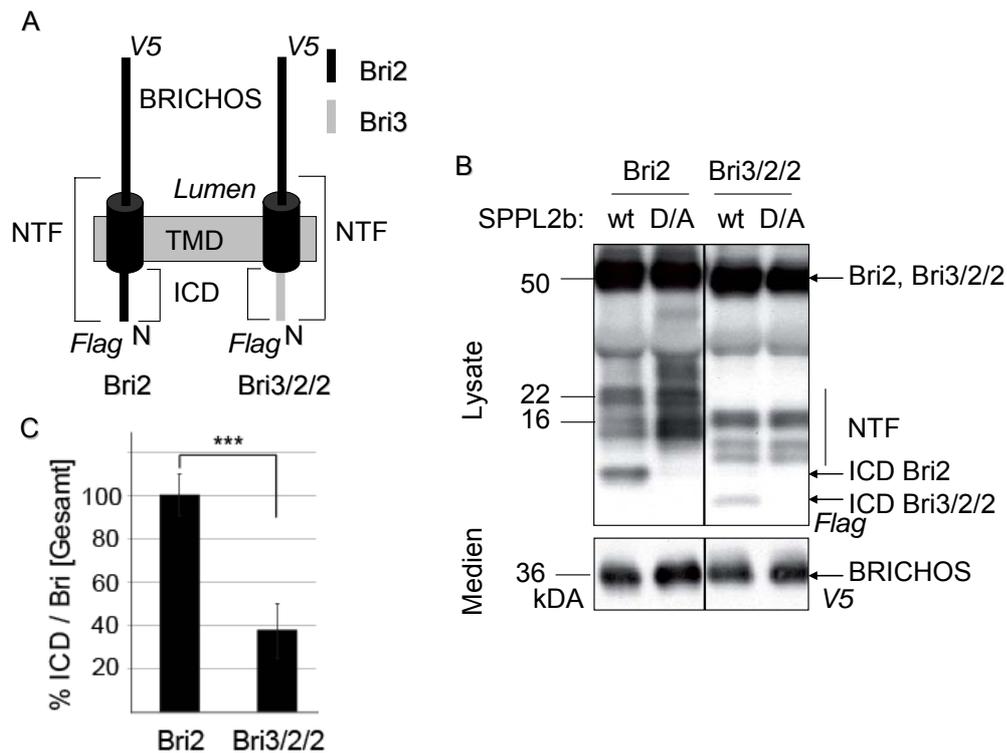


Abbildung 44. Die Bri2-ICD hat Einfluss auf die SPPL2b-abhängige Bri2-Prozessierung. (A) Bri3/2/2 enthält die ICD von Bri3, besteht sonst jedoch aus Bri2. Beide Konstrukte sind N-terminal Flag und C-terminal V5 markiert. (B) Bri2 bzw. Bri3/2/2 wurden mit SPPL2b bzw. der inaktiven Mutante SPPL2b D/A co-exprimiert und die Zelllysate mittels anti-Flag IP und WB auf proteolytische Prozessierung der Konstrukte untersucht. Bri3/2/2 wird schlechter von SPPL2b prozessiert als Bri2. Das Bri3/2/2 NTF unterscheidet sich im Laufverhalten vom Bri2 NTF, Ursache sind vermutlich die ungleichen ICD-Sequenzen. Die Sezernierung von BRICHOS wurde mittels anti-V5 IP und WB der konditionierten Medien untersucht. Die BRICHOS-Sezernierung in das konditionierte Medium unterscheidet sich nicht zwischen Bri3/2/2 und Bri2. (C) Co-Expression von Bri3/2/2 mit SPPL2b und Vergleich der ICD-Menge mit der des Bri2 zeigt eine Reduktion der ICD-Generation um $63 \pm 12,6\%$ ($n=9$, $p < 0,0001$).

Wird der Anteil von Bri3 in der ICD auf zehn juxtamembrane Aminosäuren verkürzt (Bri2_{Ins Bri3 45-54}), zeigt sich eine gleichermaßen starke Abnahme der SPPL2b-Schnitteffizienz (Abbildung 45). Folglich sind mit großer Wahrscheinlichkeit diese zehn Aminosäuren für die 60%ige Reduktion in der Prozessierung durch SPPL2b verantwortlich. Zusammenfassend kann herausgestellt werden, dass Ectodomain-Shedding *per se* nicht ausreichend für eine effiziente SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse des Bri2 ist. Es existieren wichtige Sequenz- bzw. Strukturdeterminanten, die sowohl in der ICD (siehe 4.4.3), der TMD (siehe 4.4.2) als auch der IJMD (siehe 4.4.1) zu finden sind.

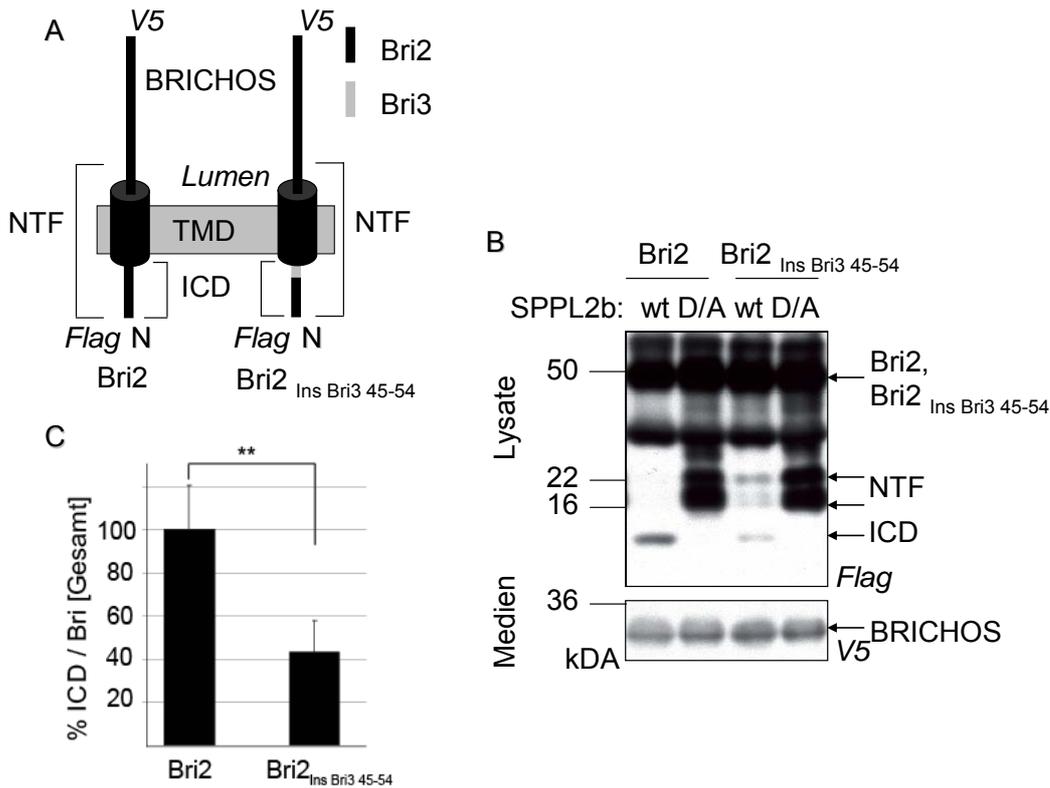


Abbildung 45. 10 Aminosäuren an der Grenze der zytoplasmatischen Domäne zur TMD des Bri2 sind entscheidend für die Substraterkennung durch SPPL2b. (A) Das Bri2_{InsBri3 45-54} - Austauschkonstrukt enthält die zehn zytoplasmatischen juxtamembranen Aminosäurereste von Bri3, besteht sonst jedoch aus Bri2. Beide Konstrukte sind N-terminal Flag und C-terminal V5 markiert. (B) Bri2 bzw. Bri2_{InsBri3 45-54} wurden mit SPPL2b bzw. der inaktiven Mutante SPPL2b D/A in HEK293-Zellen co-exprimiert und die Zelllysate mittels anti-Flag IP und WB auf proteolytische Prozessierung untersucht. Bri2_{InsBri3 45-54} wird weniger effizient von SPPL2b prozessiert als Bri2. Die Sezernierung von BRICHOS wurde mittels anti-V5 IP und WB der konditionierten Medien untersucht, sie unterscheidet sich nicht zwischen Bri2_{InsBri3 45-54} und Bri2. (C) Co-Expression des Bri2_{InsBri3 45-54} mit SPPL2b und Vergleich der ICD-Menge mit der des Bri2 zeigt eine Reduktion der ICD-Generation um $57 \pm 14,6\%$ ($n=6$, $p<0,005$). Die verringerte SPPL2b-Schnitteffizienz gegenüber Bri2_{InsBri3 45-54} ist folglich vergleichbar mit der Reduktion des SPPL2b-Schnitts von Bri3/2/2 (Abbildung 44).

4.5 Die Rolle des Ectodomain-Sheddings für SPPL2b-abhängige Proteolyse

4.5.1 Ectodomain-Shedding ist keine strikte Voraussetzung für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse

Für Bri2, TNF α und den FasL wurde Ectodomain-Shedding beschrieben (Fluhrer et al., 2006; Kirkin et al., 2007; Martin et al., 2008b; Schulte et al., 2007). Die Ektodomäne von Bri3 wird nicht prozessiert (siehe 4.3.1). Dementsprechend erlaubt ein chimäres Bri-Protein, das die ICD und die TMD des Bri2, jedoch die Ektodomäne von Bri3 enthält (Bri2/3, Abbildung 46), die Analyse, ob ein Vollängenprotein Substrat für SPPL2b sein kann. Nach Co-Expression des Bri2/3 mit SPPL2b wird matures Bri2/3 bei 50 kDa detektiert. Entsprechend der Beobachtung, dass Bri3 nicht in der Ektodomäne prozessiert wird, kann für Bri2/3 in konditionierten Medien kein BRICHOS und in den Lysaten kein NTF nachgewiesen werden. Nach längerer Belichtung des Films wird jedoch deutlich, dass in Abhängigkeit von aktivem SPPL2b für Bri2/3 ICD entsteht (Abbildung 46). Dies legt nahe, dass SPPL2b prinzipiell ein Vollängensubstrat schneiden kann. Allerdings ist die erzeugte Menge an Bri2/3 ICD verglichen zu der der Bri2 ICD sehr gering.

HEK293-Zellen, die Bri2 und SPPL2b D/A co-exprimieren, produzieren geringe Mengen ICD (Abbildung 46, lange Exposition des WB). Die Ursache hierfür ist vermutlich endogene SPPL2b-Aktivität. Da Bri2/3 ein schlechteres Substrat für Intramembranproteolyse darstellt, wird für Bri2/3 keine ICD-Produktion durch endogene Intramembranproteasen beobachtet.

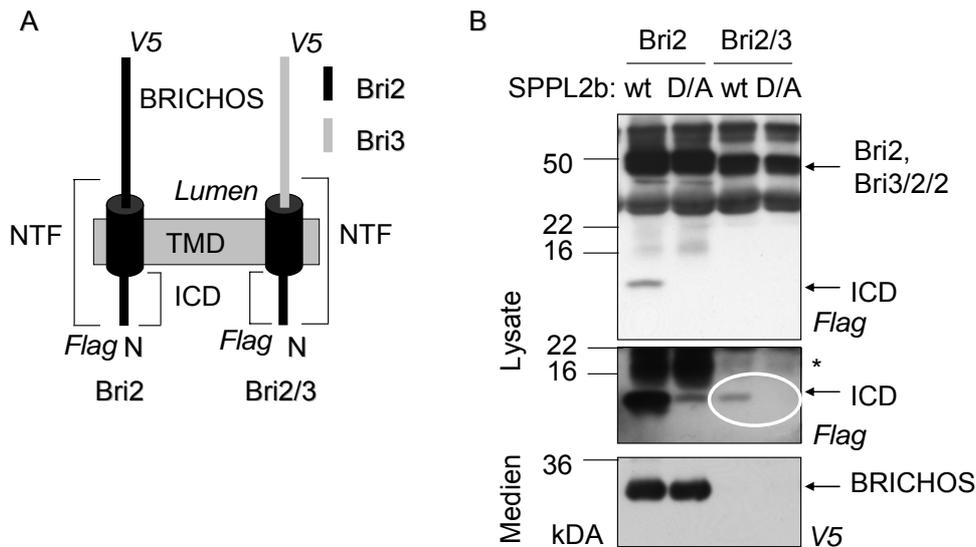


Abbildung 46. Ectodomain-Shedding ist keine strikte Voraussetzung für SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse. (A) Bri2/3 besteht aus der ICD und der TMD des Bri2, die Ektodomäne stammt aus Bri3. Beide Konstrukte sind N-terminal Flag und C-terminal V5 markiert. (B) Bri2 bzw. Bri2/3 wurden mit SPPL2b oder der inaktiven Mutante SPPL2b D/A co-exprimiert und in Zelllysaten mittels anti-Flag IP und WB, in konditionierten Medien mittels anti-V5 IP und WB untersucht. Bri2/3 ist kein Substrat für Ectodomain-Shedding, da weder BRICHOS im konditionierten Medium noch NTF in Lysaten detektierbar ist. Dagegen führt die Expression des Bri2 wt zu erheblichen Mengen an NTF und sezerniertem BRICHOS. Nach längerer Exposition des WB ist bei Co-Expression des Bri2/3 mit SPPL2b ICD-Generation nachweisbar (weißer Kreis). Die ICD-Produktion ist spezifisch für SPPL2b, da die Co-Expression des Bri2/3 mit der inaktiven SPPL2b D/A-Mutante nicht zu ICD-Produktion führt. Die ICD-Menge ist im Vergleich zu Bri2 wt erheblich reduziert. Die längere WB-Exposition zeigt nach Co-Expression des Bri2 wt mit SPPL2b D/A geringe Mengen an ICD. Dies ist wahrscheinlich Resultat endogener SPPL2a- oder SPPL2b-Aktivität. * kennzeichnet eine längere Blot-Exposition als für den oberen Blot.

4.5.2 Die Schnitteffizienz von SPPL2b korreliert negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats

Im Vergleich zur SPPL2b-abhängigen Prozessierung des Bri2 entsteht für Bri2/3 nur wenig ICD. Im Fall des Bri2 kann davon ausgegangen werden, dass das NTF das entscheidende Substrat für SPPL2b darstellt, da es präferentiell an die inaktive SPPL2b D/A-Mutante bindet (siehe 4.2.1). Im Fall des Bri2/3 stellt jedoch das Volllängenprotein das direkte Substrat für SPPL2b dar, da Ectodomain-Shedding nicht stattfindet. Ein Unterschied zwischen den beiden Substraten ist folglich die Länge der Ektodomäne. Es stellt sich daher die Frage, ob die Schnitteffizienz von SPPL2b mit abnehmender Länge der Ektodomäne des Substrats zunimmt, wie es auch bei der γ -Sekretase der Fall ist (Struhl und Adachi, 2000). Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine Serie an Konstrukten kloniert, die alle die ICD und die TMD des Bri2 tragen, luminal jedoch aus Bri3 bestehen, und sich zusätzlich in der Länge ihrer Bri3-Ektodomäne unterscheiden. Die Co-Expression der Konstruktsreihe mit SPPL2b in HEK293-Zellen zeigt, dass kurze Konstrukte mit 0, 10 bzw. 23 luminalen Bri3-Aminosäuren sehr effizient von SPPL2b

umgesetzt werden (Abbildung 47). Substrate, deren Ektodomäne länger als 59 Aminosäurereste ist, werden äußerst ineffizient von SPPL2b prozessiert. Die Quantifizierung zeigt eine exponentielle Abnahme der SPPL2b-Schnitteffizienz mit zunehmender Länge der Ektodomäne des Substrats (Abbildung 47).

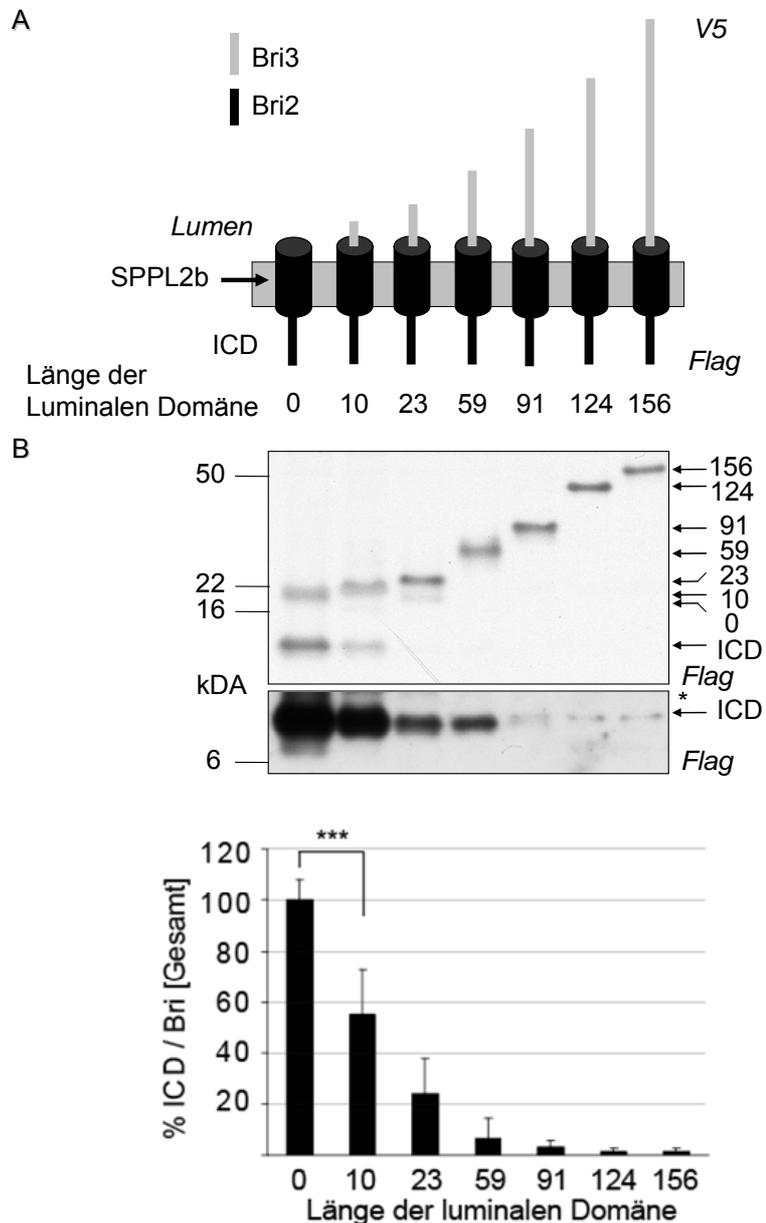


Abbildung 47. SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse korreliert negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats. (A) Alle verwendeten Konstrukte tragen die ICD und die TMD des Bri2 und eine seriell verkürzte Ektodomäne von Bri3. Die Zahlen geben die Anzahl der Bri3-Aminosäurereste an. Alle Konstrukte sind N-terminal mit einem Flag Tag und C-terminal mit einem V5 Tag versehen. (B) Nach Co-Expression der Konstrukte mit SPPL2b und Analyse der Zelllysate mittels anti-Flag IP und WB sind für die beiden kürzesten Konstrukte bereits nach einer kurzen Exposition des WB erhebliche Mengen ICD nachweisbar. * kennzeichnet eine längere WB-Exposition. Die längere Exposition zeigt die Abhängigkeit der SPPL2b-Aktivität von der Länge der Ektodomäne des Substrats. Eine verlängerte Ektodomäne führt zu geringerer ICD-Produktion. Bereits bei Elongation des kürzesten Konstrukts um zehn Aminosäure-Reste ist die SPPL2b-Schnitteffizienz um $45 \pm 17,7\%$ reduziert ($n=9$, $p<0,0001$). Für Konstrukte, deren Ektodomäne länger als 59 Aminosäuren ist, verringert sich die Schnitteffizienz von SPPL2b im Vergleich zum Protein mit der kürzesten Ektodomäne um $>95\%$.

4.5.3 Der ADAM-10 Schnitt reguliert die SPPL2b-abhängige RIP des Bri2

Wie zuvor dargestellt, ist die Intramembranproteolyse eines Volllängenproteins durch SPPL2b prinzipiell möglich (Abbildung 46). Dies wirft die Frage auf, welche Funktion das Ectodomain-Shedding des Bri2 durch ADAM-10 hat (Abbildung 23). Um die Rolle des Ectodomain-Sheddings weitergehend zu untersuchen, wurde Bri2 mit SPPL2b und ADAM-10 bzw. einer inaktiven ADAM-10-Mutante (ADAM-10 E384A) co-exprimiert und auf die Schnittprodukte NTF und ICD analysiert. Die inaktive Mutante ADAM-10 E384A kann das für katalytische Aktivität nötige Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum der Metalloprotease nicht mehr koordinieren (Lammich et al., 1999). Nach Co-Expression des Bri2 und SPPL2b mit wt ADAM-10, aber nicht nach Co-Expression des Bri2 und SPPL2b mit ADAM-10 E384A, ist ein erhöhter Umsatz des Bri2 durch SPPL2b zu beobachten (Abbildung 48). Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor gezeigte negative Korrelation der Länge der Ektodomäne des Substrats mit der Schnitteffizienz von SPPL2b, da es zeigt, dass die ADAM-10-abhängige C-terminale Verkürzung der Bri2-Ektodomäne die Intramembranproteolyse durch SPPL2b erleichtert. Ectodomain-Shedding hat folglich neben den zuvor gezeigten Sequenz- bzw. Struktur determinanten (siehe 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3) großen Einfluss auf die proteolytische Kaskade und stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit einen entscheidenden regulierenden Faktor in der RIP des Bri2 dar.

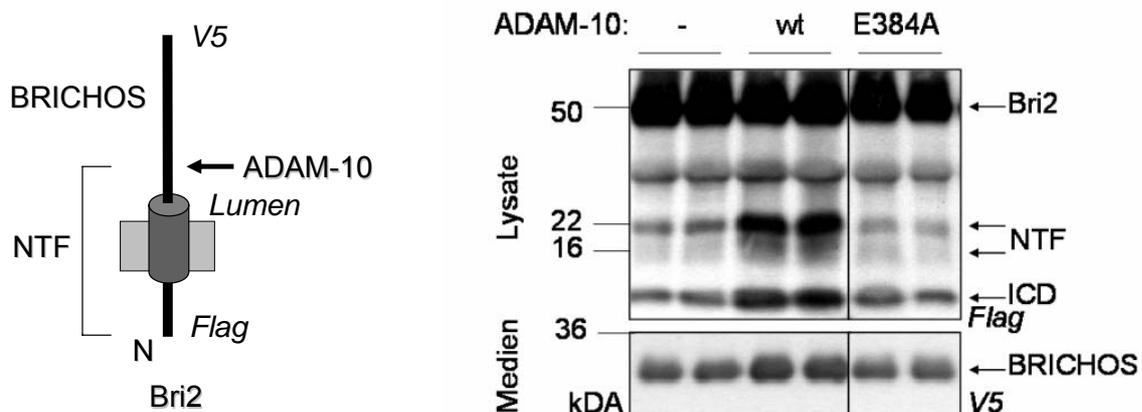


Abbildung 48. Ectodomain-Shedding erleichtert die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse. Die Co-Expression des N-terminal Flag und C-terminal V5 markiertem Bri2 mit wt ADAM-10, aber nicht die Co-Expression mit der inaktiven ADAM-10 E384A-Mutante führt zu erhöhten Mengen an NTF und sezerniertem BRICHOS. Die SPPL2b-abhängige ICD-Produktion ist ebenfalls bei Co-Expression mit wt ADAM-10 erhöht. ADAM-10-abhängiges Ectodomain-Shedding ist somit ein entscheidender regulatorischer Faktor der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse. Bri2-Spezies wurden mittels anti-Flag IP und WB (Lysate) bzw. anti-V5 IP und WB (konditionierte Medien) untersucht.

5. Diskussion

RIP stellt einen Mechanismus für den Abbau von Transmembranproteinen dar. Die durch RIP aus der Membran freigesetzten Fragmente können wichtige Funktionen in Signaltransduktionswegen übernehmen. Während durch S2P beispielsweise die zelluläre Antwort auf ER-Stress und die Lipid-Biosynthese kontrolliert wird, steuert Rhomboid Zelldifferenzierungsprozesse (Weihofen und Martoglio, 2003). Die γ -Sekretase mit PS als katalytisch aktive Untereinheit hat große Bedeutung für die Alzheimer-Erkrankung, da sie durch die Prozessierung von APP CTF β für die Produktion der neurotoxischen A β -Peptide verantwortlich ist (siehe 1.1.3.4) (Haass, 2004; Steiner et al., 2008a; Wolfe und Kopan, 2004). SPP stellt eine zu PS homologe Protease dar, die den Abbau von Signalpeptiden in der ER-Membran übernimmt (Lemberg und Martoglio, 2004; Weihofen et al., 2002). SPP-Schnittprodukte spielen im Immunsystem und für die Prozessierung von viralen Polyproteinen eine wichtige Rolle (Fluhrer et al., 2009; Martoglio und Dobberstein, 1998; McLauchlan et al., 2002). Über die zu SPP homologen SPPL-Proteasen ist wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird Bri2 als neuartiges Substrat für RIP beschrieben. Zusätzlich zum bereits bekannten Furin-Schnitt konnten ADAM-10 und SPPL2a bzw. SPPL2b als Bri2-Proteasen identifiziert werden (Kim et al., 1999; Martin et al., 2008a; Martin et al., 2008b). Die differentielle Prozessierung des zu Bri2 homologen Bri3 erlaubt die Bestimmung von Substratanforderungen für SPPL2b (Martin et al., 2008a).

5.1 RIP des Bri2

5.1.1 Die Funktion des Bri2

Bri2 ist ein Typ-II-Transmembranprotein der ITM2-Familie, der außerdem noch Bri1 und Bri3 angehören. Bri2 wird in *Homo sapiens* auf Chromosom 13 durch *itm2b* kodiert (Deleersnijder et al., 1996; Pittois et al., 1998). Über die physiologische Funktion des Bri2 ist wenig bekannt. Das Interesse an Bri2 wuchs, als gezeigt wurde, dass Mutationen in Bri2 mit den neurodegenerativen Erkrankungen FBD und FDD assoziiert sind (siehe 1.3.1) (Vidal et al., 1999; Vidal et al., 2000). Bei beiden Erkrankungen wird das durch Stop-Codon-Mutationen verlängerte Propetid durch Furin und andere Proprotein-Konvertasen freigesetzt (siehe 1.3.2) (Kim et al., 2002; Kim et al., 1999). Dabei aggregieren die mutierten ABRI- und ADAN-Peptide zu amyloiden Plaques (Ghiso et al., 2001). Zusätzlich wird die Furin-Schnitteffizienz durch die STOP-Codon-Mutationen gesteigert. Die Ergebnisse zeigen, dass die ADAM-10-abhängige Prozessierung und auch die SPPL2b-abhängige Proteolyse des Bri2 unabhängig von der Prozessierung des

Bri2 durch Furin sind (siehe 4.2.2). Es ist folglich unwahrscheinlich, dass Ectodomain-Shedding und Intramembranproteolyse des Bri2 Einfluss auf die molekulare Pathologie von FBD und FDD haben (Kim et al., 2002).

Die Expression des Bri2 erfolgt ubiquitär, wobei erhöhte mRNA-Level im Cerebellum, der Substantia nigra und im Hippocampus nachgewiesen wurden (Vidal et al., 1999). Der in dieser Arbeit durchgeführte Nachweis von endogenem Bri2-Protein in verschiedenen Zelllinien (siehe 4.1) steht in Einklang mit den vorherigen Analysen (Vidal et al., 1999). Auffällig ist, dass sich in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis von immatorem proBri2 zu maturem Bri2 zwischen den Zelllinien unterscheidet (siehe 4.1). Dementsprechend könnte auch die Menge an sekretiertem Propeptid zwischen den Zelllinien verschieden sein. Die Neuroblastozelllinien SKNBE und SH-SY5Y, in denen mehr matures als immatures Bri2 vorliegt, würden mehr Propeptid sekretieren als die Nierenzelllinien HEK293 oder TRex. In der Annahme, dass die STOP-Codon Mutation im *itm2b*-Gen, die mit FBD und FDD assoziiert ist (siehe 1.3.2), das Expressionsmuster und -level des Bri2 nicht verändert, könnte die hohe neuronale Sekretion der mutierten ABRI- und ADAN-Peptide ursächlich dafür sein, dass ABRI und ADAN vor allem im Nervensystem des Patienten amyloide Ablagerungen bilden. Die beschriebene Neurotoxizität von ABRI und ADAN könnte daraufhin zu der in FBD und FDD beobachteten Neurodegeneration führen (Gibson et al., 2005; Surolia et al., 2008). Ein erster Schritt diese Hypothese zu testen wäre der quantitative Nachweis des sekretierten Propeptids in den Zellüberständen unterschiedlicher Zelllinien.

Die Ursache für den beobachteten Unterschied zwischen immatorem proBri2 und maturem Bri2 könnte das Ergebnis einer Sättigung der Furin-Aktivität für die Bri2-Maturierung sein. Eine Analyse der verwendeten Zelllinien auf die Furin-Expression könnte Aufschluss hierüber geben. Neben Furin sind jedoch noch weitere Proprotein-Konvertasen in der Lage, proBri2 zu spalten und weiterhin sind neben Bri2 sehr viele andere Substrate für Proprotein-Konvertasen bekannt (Kim et al., 2002; Rockwell et al., 2002; Thomas, 2002). Die eingeschränkte Maturierung durch die Sättigung der Aktivität der Proprotein-Konvertasen erscheint daher unwahrscheinlich. Andere Faktoren, beispielsweise proBri2-Transportproteine, könnten für die begrenzte proBri2-Prozessierung in Nierenzellen verantwortlich sein. Derartige Transportproteine für proBri2 sind bislang jedoch nicht beschrieben.

Neuronale N2A-Zellen, die mit Bri2 transfiziert wurden, zeigen verlängerte Neuriten (Choi et al., 2004). Außerdem ist die Bri2-Expression in Gehirngewebe unter ischämischem Stress erhöht (Akiyama et al., 2004). Anhand dieser Ergebnisse wurde Bri2 in Signalkaskaden der neuronalen Stressantwort implementiert, wobei mögliche involvierte Proteine jedoch nicht beschrieben wurden (Akiyama et al., 2004). Ob diese

Signal-Funktion des Bri2 auf das Volllängenprotein zurückzuführen ist oder von einem durch die RIP entstandenen Fragment übernommen wird, ist bislang nicht gezeigt (Tsachaki et al., 2008a).

Interessanterweise wird Bri2 in zwei unterschiedlichen Spleißformen exprimiert (Vidal et al., 1999). Während in der vorliegenden Arbeit die lange Spleißform (ITM2BI, entspricht Bri2) verwendet wurde, existiert auch eine kurze Spleißform (ITM2Bs), der durch alternatives Spleißen der Signalanker für die ER-Membraninsertion fehlt. Das alternative Spleißen führt im Fall von ITM2Bs zur Ausbildung einer mitochondrialen Signalsequenz, die in der Bri2-Isoform durch ein zusätzliches Exon unterbrochen ist (Fleischer et al., 2002a). ITM2Bs wird in der vorliegenden Studie nicht detektiert, da das Epitop des für Western Blots verwendeten ITM2B-Antikörpers durch das alternative Spleißen von ITM2Bs nicht ausgebildet wird. ITM2Bs-Expression wird unter Interleukin-2-Mangel in T-Zellen induziert (Fleischer et al., 2002a). Daraufhin lokalisiert ITM2Bs mitochondrial und interagiert durch eine BH3-Domäne mit dem pro-apoptischen Protein Bcl-2 und löst auf diese Weise Apoptose aus (Fleischer et al., 2002b; Fleischer und Rebollo, 2004). Es ist zu beachten, dass die ITM2Bs-Expression induzierbar ist, Bri2 jedoch konstitutiv exprimiert wird (Fleischer et al., 2002a; Lee et al., 2007). Die beiden Spleißformen von *itm2b* scheinen daher unterschiedlich reguliert zu sein. Dies deutet darauf hin, dass die Spleißvarianten unterschiedliche Aufgaben übernehmen (Lee et al., 2007).

Die chromosomale Region 13q14 um *itm2b* ist mit Prostatakrebs assoziiert (Melamed et al., 1997). Da die Expression von *itm2b* in betroffenen Patienten reduziert ist und das Expressionslevel negativ mit dem Fortschreiten des Karzinoms korreliert, wurde *itm2b* als Tumor-Suppressor-Gen vorgeschlagen (Latil et al., 2003). In Einklang mit dieser Hypothese steht die epigenetisch bedingte Reduktion der *itm2b* Expression mit Neoplasien in Zusammenhang (Lee et al., 2007). Über welchen Mechanismus *itm2b* als Tumor-Suppressor-Gen wirkt, ist bislang nicht gezeigt. Es ist vorstellbar, dass die reduzierte *itm2b* Expression über die alternative Spleißvariante ITM2Bs in den Neoplasien die Ursache für eine verringerte Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber apoptotischen Prozessen ist (siehe vorheriger Abschnitt). Anti-apoptotische Prozesse könnten dann, wahrscheinlich in Kombination mit anderen Mutationen, zu unkontrollierter Proliferation und Ausbildung der Neoplasien führen. Da die Datenmenge über Bri2 insgesamt begrenzt ist, sind diese Schlussfolgerungen über die physiologische Funktion des Bri2 jedoch spekulativ. Bri1 und Bri3, die nicht mit FBD oder FDD assoziiert sind, sind Gegenstand von noch weniger Studien als Bri2. Allerdings zeigt eine Studie die Beteiligung von Bri1 an der Entwicklung von Thymus-Zellen. Bri1 könnte folglich in Zelldifferenzierungsvorgängen eine Rolle spielen (Kirchner und Bevan, 1999).

5.1.2 Ectodomain-Shedding des Bri2

Neben der Prozessierung durch Furin wird Bri2 durch ADAM-10 prozessiert und die BRICHOS-Domäne sekretiert (siehe 4.1) (Choi et al., 2004; Kim et al., 2002; Kim et al., 1999; Martin et al., 2008b). Für die Untersuchung, welche Protease Bri2 luminal schneidet, war die Etablierung eines HEK293-Expressionssystems eines markierten Bri2 nötig, da keine Antikörper gegen BRICHOS zur Verfügung stehen. Da Bri2 im HEK293-Expressionssystem überexprimiert wurde, ist davon auszugehen, dass unter den verwendeten Bedingungen die Menge der proteolytischen Schnittprodukte höher ist als im physiologischen System. Über die physiologische Konzentration von sezerniertem BRICHOS kann daher anhand der vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden. Für viele Ectodomain-Shedding-Substrate ist bekannt, dass sie, besonders in überexprimierenden Zellkultursystemen, durch mehrere Sheddasen prozessiert werden können (Le Gall et al., 2009). Verantwortlich zeigen sich insbesondere Mitglieder der Matrix-Metalloproteasen, ADAM-Proteasen und BACE-1 sowie BACE-2 (Reiss und Saftig, 2008). So wurden als APP-Sekretasen beispielsweise BACE-1, BACE-2, ADAM-8, ADAM-9, ADAM-10 und ADAM-17 identifiziert (Asai et al., 2003; Buxbaum et al., 1998; Fluhrer et al., 2002; Lammich et al., 1999; Naus et al., 2006; Vassar et al., 1999). Die Erkenntnis, dass Transmembranproteine luminal durch eine große Anzahl von Proteasen geschnitten werden können, erschwert die Vorhersage, welche Protease Bri2 unter physiologischen Bedingungen schneidet. Die pharmakologische Eingrenzung der Identität der Bri2-Sheddase durch die Metalloprotease-Inhibitoren TAPI-1, TAPI-2 und der ADAM-10- bzw. ADAM-17-spezifischen Inhibitoren GI254023X und GW280264X weisen auf eine Rolle von ADAM-10 bzw. von ADAM-17 in der Bri2-Prozessierung hin (siehe 4.1.1). Eine Kreuzreaktion mit anderen Metalloproteasen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da für keinen dieser Inhibitoren ein komplettes Profil der inhibierten Metalloproteasen vorliegt (Ludwig et al., 2005).

Um zwischen ADAM-10- und ADAM-17-Aktivität bezüglich des Ectodomain-Sheddings des Bri2 zu unterscheiden, wurde ein auf RNAi-Technologie basierender Ansatz gewählt (siehe 4.1.2). Während der ADAM-17-Knockdown keine Änderung in der BRICHOS-Sekretion hervorrief, resultierte der ADAM-10-Knockdown in einer Reduktion der BRICHOS-Sekretion um 40% (siehe 4.1.2). Eine Ursache für die beobachtete Restaktivität könnte sein, dass der ADAM-10-Knockdown nicht komplett ist. In der Tat sind in längeren Expositionszeiten des Western Blots für ADAM-10 geringe Mengen des Enzyms nachweisbar. Darüber hinaus kann eine geringe Aktivität anderer Proteasen in Bezug auf die Prozessierung des Bri2 nicht ausgeschlossen werden. Kürzlich wurde elegant gezeigt, dass viele Proteine prinzipiell sowohl von ADAM-10 als auch von ADAM-17 prozessiert werden können (Le Gall et al., 2009). Die Aktivität der einen

Protease hängt dabei von der Expression der jeweils anderen Protease ab (Le Gall et al., 2009). Während ADAM-17-Aktivität induzierbar ist, scheint die Aktivität von ADAM-10 konstitutiv zu sein (Reiss und Saftig, 2008). Allerdings zeigen andere Studien, dass auch ADAM-10-Aktivität stimuliert werden konnte (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005). Ob der ADAM-10-Schnitt in Bri2 konstitutiv ist oder einen Stimulus benötigt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. Weitere Experimente müssten folglich adressieren, wie die Bri2-Prozessierung in der Ektodomäne reguliert ist. In Analogie zur Prozessierung von NOTCH wäre eine Ligandenbindung an Bri2, die über eine Konformationsänderung die ADAM-10-Schnittstelle in Bri2 freilegt, vorstellbar (Gordon et al., 2007).

BRICHOS-Domänen kommen nicht nur in der Bri-Familie, sondern auch in anderen Typ-II-Transmembranproteinen wie im Surfactant-Protein-C (SP-C) vor (Sanchez-Pulido et al., 2002). SP-C wird auf der Oberfläche von Lungen-Alveolen exprimiert und erhöht dort die Oberflächenspannung, die für einen effizienten Gasaustausch unerlässlich ist. Interessanterweise wird auch SP-C proteolytisch prozessiert. Ob SP-C BRICHOS wie im Fall des Bri2 sekretiert wird, ist bislang nicht untersucht. Bekannt ist, dass Mutationen in SP-C BRICHOS mit schweren Lungenerkrankungen assoziiert sind (Beers und Mulugeta, 2005). Die Mutationen induzieren eine fehlerhafte Faltung des Volllängenproteins und eine perinukleäre Akkumulation von SP-C. Weiterhin lösen sie ER-Stress und apoptotische Prozesse aus (Mulugeta et al., 2005). Folglich könnte BRICHOS für die korrekte Faltung von SP-C notwendig sein. Interessanterweise ist eine niedermolekulare SP-C Domäne ähnlich wie ABRI, ADAN und A β amyloidogen (Magnus et al., 1999). Auf Grundlage dieser Daten wurde postuliert, dass die BRICHOS-Domäne als intramolekulares Chaperon fungiert und der Aggregation von amyloidogenen Domänen im Volllängenprotein vorbeugt (Sanchez-Pulido et al., 2002).

5.1.3 Bri2 und Bri3 werden differentiell prozessiert

Bri2 und Bri3 werden im HEK293-Expressionssystem differentiell in ihrer Ektodomäne prozessiert (siehe 4.3.1), obwohl beide Proteine den Golgi-Apparat und die Plasmamembran erreichen, wo Sheddasen aktiv sind. Eine unterschiedliche Lokalisation ist daher nicht ursächlich für die differentielle Prozessierung (siehe 4.3.1). Vielmehr könnten höhere strukturelle Elemente, wie beispielsweise Dimerisierung, für die unterschiedliche Prozessierung verantwortlich sein (Tsachaki et al., 2008b). Tatsächlich wurde für Bri2 eine Homodimerisierung über einen freien luminalen Cystein-Rest beschrieben (Tsachaki et al., 2008b). Ob dies auch für Bri3 gilt, ist bislang unklar.

Während Bri2 BRICHOS sekretiert wird, verbleibt Bri3 BRICHOS im HEK293-Expressionssystem in der Membran verankert. Die jeweilige BRICHOS-Domäne könnte

folglich unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben: Während BRICHOS der Bri2 endokrine Wirkung ausüben könnte, würde BRICHOS von Bri3 parakrin wirken. Allerdings unterscheidet sich das physiologische Expressionsmuster zwischen Bri2 und Bri3: Bri2 wird ubiquitär exprimiert, die Expression von Bri3 ist dagegen eingeschränkt (Vidal et al., 2001; Vidal et al., 1999). Es ist daher möglich, dass auch Bri3 Substrat für Ectodomain-Shedding ist, die verantwortliche Protease in HEK293-Zellen jedoch nicht exprimiert wird. In der Tat wurde kürzlich nach Überexpression von Bri3 in HeLa-Zellen ein kürzeres N-Terminales Fragment nachgewiesen (Matsuda et al., 2009). Über die Sekretion der Bri3 Ektodomäne oder die Identität der möglichen Sheddase wurden jedoch keine Angaben gemacht.

5.1.4 Bri2 ist Substrat für SPPL2a und SPPL2b

Als Typ-II-Transmembranprotein, das in der Ektodomäne prozessiert wird (siehe 4.1), ist Bri2 Kandidat für SPP/SPPL-abhängige Prozessierung. In der Tat inhibiert der SPP/SPPL-spezifische Inhibitor (Z-LL)₂-Keton die Bildung des C-Peptids und der ICD (siehe 4.2.1). Die Co-Expression des Bri2 mit SPP, SPPL2a, SPPL2b oder SPPL3 bzw. den jeweils inaktiven Mutanten zeigt, dass SPPL2a und SPPL2b in der Lage sind, Bri2 zu prozessieren, SPP und SPPL3 dagegen nicht (siehe 4.2.1). Dies wirft die Frage auf, wie die SPP/SPPL Proteasen Selektivität gegenüber Bri2 ausüben. Eine Möglichkeit besteht in der räumlichen Trennung von Protease und Substrat. Die unterschiedliche Lokalisation von SPP und SPPL3 im ER einerseits und Bri2 im Golgi-Apparat und der Plasmamembran andererseits könnte Substratprozessierung verhindern. Ähnliche Regulationsmechanismen sind für S2P und Rhomboid bekannt (siehe 1.1.1.4 und 1.1.2.3). Da Bri2 und SPPL2b im Golgi-Apparat co-lokalisieren (siehe 4.2.3) und ADAM-10 im Golgi-Apparat aktiviert wird, ist eine dortige Prozessierung wahrscheinlich (Anders et al., 2001). Allerdings sind beide Proteine auch an der Zelloberfläche und SPPL2b zusätzlich in Endosomen und Lysosomen zu finden (siehe 4.3.1) (Krawitz et al., 2005). Folglich könnte Bri2 auch in der Plasmamembran bzw. in endosomal/lysosomalen Kompartimenten prozessiert werden. Eine Prozessierung des Bri2 in frühen sekretorischen Kompartimenten ist unwahrscheinlich, da der ADAM-10-Schnitt als Voraussetzung für effiziente SPPL2b abhängige Proteolyse des Bri2 angesehen werden kann (siehe 4.5.2 und 4.5.3). ADAM-10 wird jedoch erst im trans-Golgi-Apparat durch Furin aktiviert und ist vor allem an der Plasmamembran aktiv (Anders et al., 2001).

Es ist zu beachten, dass sowohl Bri2 als auch SPPL2b in den Immunfluoreszenzstudien mit einem Epitop markiert und exogen exprimiert wurden (siehe 4.2.3 und 4.2.4), da die existierenden Antikörper gegen die endogenen Proteine eine hohe Hintergrundfärbung bzw. eine zu geringe Sensitivität aufwiesen. Die Überexpression kann bei

Immunfluoreszenzstudien von Nachteil sein und ein verzerrtes Bild der Proteinlokalisierung wiedergeben. Sind beispielsweise Transportfaktoren des sekretorischen Pfads limitierend, verschiebt sich die beobachtete Lokalisation zu früheren Kompartimenten. Da sowohl Substrat als auch Protease überexprimiert wurden, kann aus den Immunfluoreszenzdaten nicht direkt auf den Ort der Proteolyse rückgeschlossen werden.

Neben dem ADAM-10-Schnitt könnten auch Maturierungsprozesse von SPPL2b und Bri2 als Voraussetzung für die Prozessierung in Frage kommen. In der Tat wird das membranverankerte Bri2 Δ E, dessen Prozessierung unabhängig von Ectodomain-Shedding ist, unter Brefeldin A-Behandlung von SPPL2b nicht prozessiert (siehe 4.2.4). Die Ursache könnte in der gestörten Maturierung von SPPL2b liegen. Weitere Experimente, beispielsweise die Expression von unglykosylierbaren SPPL2b-Mutanten bzw. eines SPPL2b-Substrats mit einem künstlichen ER-Retentionssignal, könnten zur Lösung dieser Fragestellung hilfreich sein. Sofern das artifiziell im ER-gehaltene Substrat in gleicher Weise geschnitten wird, hätte die Maturierung von SPPL2b bzw. des Substrates keinen Einfluss auf die Intramembranproteolyse.

Die sekretorischen Kompartimente unterscheiden sich unter anderem in ihrem pH-Wert, der für enzymatische Aktivität von Proteasen häufig kritisch ist. Die Brefeldin A-Behandlung fusioniert ER und Golgi-Apparat und stört damit den pH der Kompartimente. Die SPPL2b-Aktivität könnte daher auch durch ungeeignete pH-Werte eingeschränkt sein. Die pH-Optima von GxGD-Proteasen sind mit Ausnahme der γ -Sekretase, die ein pH-Optimum im leicht sauren Milieu aufweist, noch nicht bestimmt (McLendon et al., 2000). pH-abhängige *in vitro*-Analysen der SPPL2b-Aktivität in isolierten Membranen sollten Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation von aktivem SPPL2b erlauben.

Sowohl SPPL2a als auch SPPL2b sind der Lage, Bri2 zu schneiden (siehe 4.2.1). Die exogene Expression im HEK293-System lässt keinen direkten Rückschluss darauf zu, welche der beiden Proteasen Bri2 unter physiologischen Bedingungen prozessiert. Da Bri2 ubiquitär exprimiert wird, sollte auch die zugehörige Intramembranprotease ubiquitär exprimiert werden (Vidal et al., 1999). Dies trifft eher für SPPL2a als für SPPL2b zu, da eine Analyse der SPP/SPPL mRNA-Expression mithilfe Micro-Array für SPPL2b eine restriktivere Expression als für SPPL2a zeigt (Friedmann et al., 2004). So wird SPPL2a mRNA in unterschiedlichen Geweben gefunden, während SPPL2b beispielsweise spezifisch in der Nebennierenrinde und in Brustdrüsengewebe nachgewiesen wird (Friedmann et al., 2004). Eine Möglichkeit zur Unterscheidung der Aktivität beider Proteasen in Bezug auf die Bri2-Prozessierung stellt ein selektiver Knockdown mithilfe der RNAi-Technologie dar. Unter spezifischen Knockdown-Bedingungen von SPPL2a bzw. SPPL2b kann über die Anreicherung von NTF bzw. die Reduktion von ICD gezeigt

werden, welche der beiden Proteasen Bri2 präferentiell schneidet. Allerdings ist der RNAi induzierte Knockdown oftmals nicht vollständig und eine geringe Restexpression des Targets ist meist nachweisbar. Diese Restaktivität könnte ausreichen, Bri2 zu prozessieren.

Die Unterscheidung zwischen SPPL2a und SPPL2b als Bri2-Protease wäre ferner über die Herstellung von SPPL2a- bzw. SPPL2b- Knockout-Mäusen möglich. Nach dem jeweiligen Knockout sollte die Bri2 ICD-Generation gestört sein. Allerdings muss betont werden, dass für viele Proteasen kompensatorische Aktivität von Homologen beschrieben wurde (Blobel, 2005; Herreman et al., 1999; Le Gall et al., 2009). Eine derartige Redundanz würde die Analyse, welches SPPL2 Bri2 *in vivo* prozessiert, erschweren. Zusammengefasst wären die vorgestellten Methoden nicht nur für eine weitergehende Analyse der Bri2-Prozessierung, sondern auch für Untersuchung der RIP von TNF α von Vorteil, da auch TNF α als Substrat von sowohl SPPL2a als auch SPPL2b beschrieben wurde (Fluhrer et al., 2006; Friedmann et al., 2006). Ähnlich wie für Studien zur γ -Sekretase würde jede dieser Methoden in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse des Proteoms zudem die Identifikation neuer SPPL-Substrate erlauben, da durch den Knockdown bzw. den Knockout angereicherte NTFs semiquantitativ nachgewiesen werden können (Hemming et al., 2008).

5.1.5 Die Prozessierung des Bri2 im Vergleich zu NOTCH

Die RIP des Bri2 durch Furin, ADAM-10 und SPPL2a bzw. SPPL2b legt einen Vergleich mit der Prozessierung von NOTCH durch Furin, ADAM-10 und die γ -Sekretase nahe (Abbildung 49). Wie Bri2 enthält auch NOTCH ein Propeptid, das von Furin abgeschnitten wird (Kim et al., 1999; Logeat et al., 1998). Beide Proteine werden in ihrer Ektodomäne durch ADAM-10 prozessiert (Hartmann et al., 2002; Wen et al., 1997). Weiterhin sind beide Proteine Substrat für Intramembranproteolyse. Während NOTCH als Typ-I-Transmembranprotein durch die γ -Sekretase prozessiert wird, ist das Typ-II-Transmembranprotein Bri2 Substrat für SPPL2a und SPPL2b (De Strooper et al., 1999; Martin et al., 2008b). Es ist davon auszugehen, dass die invertierte Topologie der Substrate die Prozessierung durch die unterschiedlichen - ebenso invertierten - Intramembranproteasen bestimmt (siehe 1.1.3 und 5.5.2) (Friedmann et al., 2004).

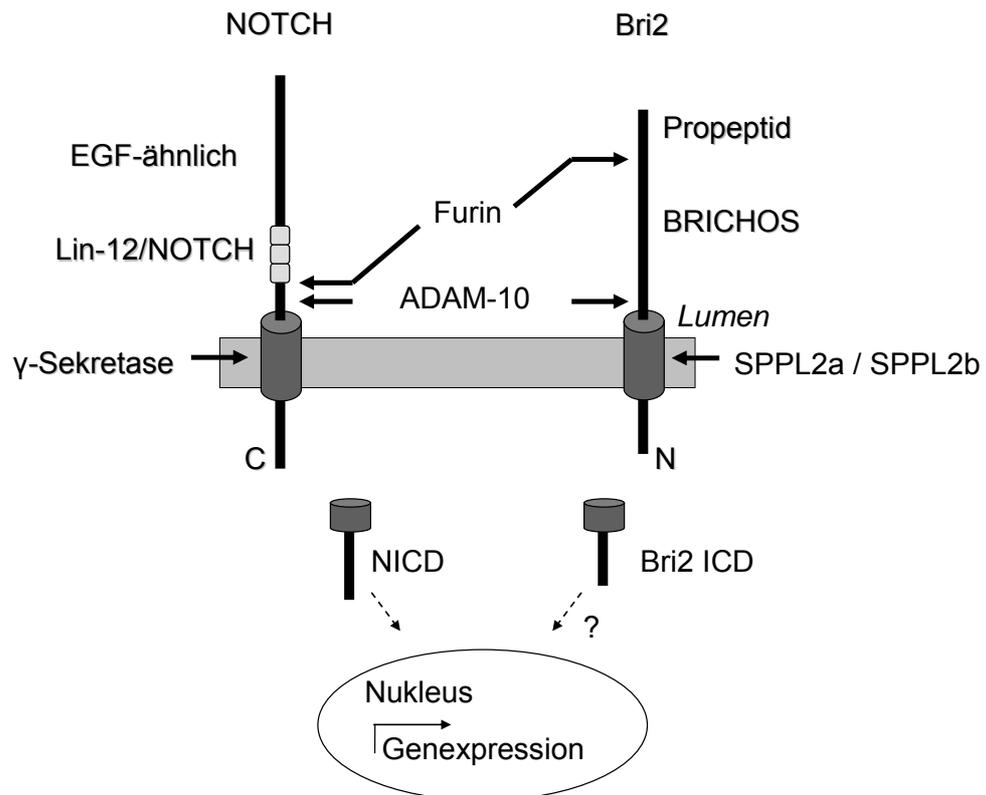


Abbildung 49. Vergleich der Prozessierung des Bri2 und des NOTCH. Sowohl NOTCH als auch Bri2 sind Substrat für Furin- und ADAM-10- und Intramembranproteolyse durch GxGD-Proteasen. Während NOTCH durch die γ -Sekretase prozessiert wird, schneiden SPPL2a und SPPL2b Bri2. NICD transloziert in den Zellkern und löst dort die Transkription von Zielgenen aus. Die Funktion der Bri2 ICD ist unklar.

Im Fall von NOTCH wirkt die NICD als Transkriptionsfaktor. Die Funktion der Bri2 ICD ist bislang nicht untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass SPPL2a bzw. SPPL2b die Membran nur von Bri2 NTF befreit, um die Membranintegrität nicht durch akkumulierende Bri2-Proteinreste zu gefährden und in Folge die ICD und das C-Peptid abgebaut werden, ohne physiologische Funktionen zu übernehmen. In Analogie zu der NICD könnte die Bri2 ICD aber auch durch Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen kontrollieren. Eine Transkriptom-Analyse nach exogener Expression der ICD könnte Aufschluss über eine solche Funktion und mögliche Zielgene geben.

Die Translokation der ICD in andere Kompartimente als den Zellkern soll hier nicht ausgeschlossen werden, da beispielsweise für das N-terminale Produkt des HLA-A Signalpeptids, eines SPP-Substrats, eine Translokation in das ER gezeigt wurde (Braud et al., 1998b) (siehe 1.1.3.5). Durch Fusion der Bri2 ICD mit einem Fluoreszenzmarker könnte nach exogener Expression ihre Lokalisation mikroskopisch aufgeklärt werden. Für andere ICDs, beispielsweise die AICD, wurde eine Interaktion mit Adapterproteinen

gezeigt. Als Adapterprotein für die AICD wurde Fe65 beschrieben und die Interaktion konnte strukturell aufgeklärt werden (Cao und Südhof, 2001; Fiore et al., 1995; Radzimanowski et al., 2008; Walsh et al., 2003). Ob, und falls ja, welche zytoplasmatischen Proteine mit der Bri2 ICD interagieren, ist bislang nicht untersucht. Eine exogene Expression der ICD, native Isolierung und massenspektrometrische Untersuchung sollte die Identifikation von Interaktionspartnern ermöglichen. Über die physiologische Funktion der Interaktionspartner könnte es möglich sein, Rückschlüsse über die Funktion der Bri2 ICD zu ziehen.

Das sekretierte C-Peptid könnte Signalfunktionen übernehmen, beispielsweise als Zytokin. In diesem Fall sollte es möglich sein, das C-Peptid *in vivo* im extrazellulären Raum nachzuweisen und einen Rezeptor zu identifizieren. Interessanterweise ist im sekretierten C-Peptid eine BH3-Domäne konserviert. BH3-Domänen spielen intrazellulär in apoptotischen Prozessen eine wichtige Rolle. Die Rolle von sezernierten BH3-Domänen ist nicht bekannt. Bislang konnte für kein luminales niedermolekulares Produkt der Intramembranproteolyse eine eindeutige physiologische Funktion zugeordnet werden. Aß könnte eine Ausnahme bilden, da es neuronale Hyperaktivität begrenzt (Kamenetz et al., 2003).

5.2 GxGD-Proteasen – Ähnlichkeiten zum Proteasom?

Für die γ -Sekretase wurde eine Proteasom-ähnliche Funktion postuliert (Kopan und Ilagan, 2004). Grundlage für diese Hypothese ist die Beobachtung, dass zahlreiche Typ-II-Transmembranproteine, die keine Sequenzhomologie untereinander aufweisen, Substrate der γ -Sekretase sind (Kopan und Ilagan, 2004). In Analogie hierzu weisen auch Proteasom-Substrate keine Sequenzhomologien untereinander auf. Eine mögliche Funktion der γ -Sekretase wäre daher der unspezifische Abbau von Proteinfragmenten aus der Plasmamembran und endosomal/lysosomalen Kompartimenten, in denen die γ -Sekretase aktiv ist. Die γ -Sekretase würde in diesem Fall der Akkumulation von Proteinfragmenten vorbeugen, die andernfalls möglicherweise die Membranstabilität negativ beeinflussen könnten.

Da auch SPP/SPPL-Substrate keine offensichtlichen Sequenzhomologien zeigen, wurden im Verlauf der experimentellen Arbeit dieser Dissertation SPP/SPPL-Proteasen als Membran-Proteasom für Typ-II-Transmembranproteine vorgeschlagen (Fluhrer et al., 2009; Martin et al., 2008b). Folglich sollten Typ-II-Transmembranproteine, die Kompartimente erreichen, in denen SPPL2a und SPPL2b lokalisiert sind (siehe 4.3.1), Substrate für SPPL2a bzw. SPPL2b sein. Ein potentielles Substrat, Bri3, das wie Bri2 in späten sekretorischen Kompartimenten lokalisiert, ist überraschenderweise jedoch kein

Substrat für SPPL2a- bzw. SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse (Daten für SPPL2a nicht gezeigt; siehe 4.3.1). Die Ursache hierfür liegt nicht im fehlenden Ectodomain-Shedding des Bri3, da das luminal verkürzte niedermolekulare membranständige Fragment Bri3 Δ E ebenso kein Substrat für SPPL2b darstellt, während Bri2 Δ E effizient von SPPL2b umgesetzt wird (siehe 4.3.2). Diese beobachtete Selektivität von SPPL2b spricht gegen eine Membran-Proteasom-ähnliche Funktion von SPPL2b. Auch für die γ -Sekretase wird nach Publikation einer neuen Studie die Funktion als Membran-Proteasom in Frage gestellt, da Substratselektivität beobachtet wurde (Hemming et al., 2008). Nach den Daten dieser Studie sind keineswegs alle Typ-I-Transmembranproteine γ -Sekretase-Substrate.

Eine weitere Eigenschaft der proteasomalen Prozessierung ist die Markierung eines Substrats mit Ubiquitin (Glickman und Ciechanover, 2002). Eine derartige Markierung wurde für die RIP bislang noch nicht beschrieben. Allerdings ist für alle bisher identifizierten RIP-Substrate Ectodomain-Shedding gezeigt. Daher könnte die luminale Verkürzung eines Transmembranproteins die „Markierung“ darstellen, die den späteren GxGD-abhängigen Abbau des Proteinfragments bestimmt. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass prinzipiell auch ein Volllängenprotein von SPPL2b prozessiert werden kann (siehe 4.5.1). Eine „Markierung“ des Substrats durch Ectodomain-Shedding ist deshalb keine absolute Voraussetzung für SPPL2b-abhängige Proteolyse und nicht vergleichbar mit der Ubiquitin-Markierung von Substraten des Proteasoms. Ectodomain-Shedding ist lediglich ein begünstigender Faktor für effiziente Intramembranproteolyse.

Für SPP sind bislang keine Studien veröffentlicht, die eine Proteasom-ähnliche Funktion direkt adressieren. Einige Experimente lassen jedoch Raum für Spekulationen. Einerseits sind Signalsequenzen meist funktional, jedoch wenig sequentiell konserviert (Martoglio und Dobberstein, 1998; Paetzel et al., 2002). In der Annahme, dass SPP in der Lage ist, die Aminosäuresequenz heterogener Signalpeptide zu prozessieren, könnte die SPP-abhängige Proteolyse der proteasomalen Prozessierung ähnlich sein. Andererseits sind Signalpeptide bekannt, die keine SPP-Substrate darstellen (Dultz et al., 2008). Außerdem beeinflussen Mutationen in Signalpeptiden die SPP-Schnitteffizienz beträchtlich (Lemberg und Martoglio, 2002; Okamoto et al., 2008). Sofern davon ausgegangen wird, dass diese Mutationen keine Auswirkung auf die Membraninsertion des Signalpeptids oder auf die Affinität gegenüber SPP haben, sondern nur die SPP-Schnitteffizienz beeinträchtigen, ist auch im Fall von SPP nicht von einer Membranproteasom-ähnlichen Funktion auszugehen.

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass SPPL2b hohe Substratspezifität besitzt und Sequenzdeterminanten für Intramembranproteolyse vorhanden sind. Sofern

dies zutrifft, liegt die Hauptfunktion der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse wahrscheinlich in der Weiterleitung eines Signals durch die proteolytische Freisetzung eines Proteinfragments aus der Membran. In der Folge sollten für membranständige Proteinfragmente, die keine RIP-Substrate sind, andere Abbaumechanismen existieren, beispielsweise die Extraktion des Fragments aus der Membran oder spontane Vesikelabschnürungen (Ploegh, 2007).

5.3 Sequenz- und Struktur determinanten der SPPL2b-abhängigen Proteolyse

5.3.1 Determinanten in der TMD des Substrats

Der Austausch von Bri2- mit Bri3-Domänen mit anschließender Analyse der SPPL2b-Schnitteffizienz zeigt, dass die TMD eines SPPL2b-Substrats die Intramembranproteolyse erheblich beeinflusst (siehe 4.4.2), obwohl bislang keine offensichtlichen Sequenzhomologien zwischen SPPL-Substraten gefunden wurden. Der Austausch der Bri2- mit der Bri3-TMD hatte mit ca. 80% Reduktion einen starken Einfluss auf die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse (siehe 4.4.2). Dennoch ist die Bri3 TMD prinzipiell von SPPL2b prozessierbar, da ca. 20% Restaktivität beobachtet wird (siehe 4.4.2). Dies wirft die Frage auf, welche Merkmale eine TMD haben muss, um effizient durch SPPL2b prozessiert zu werden.

Die Struktur einer TMD ist meist durch α -helikale Bereiche bestimmt (von Heijne, 2006; White et al., 2005). Proteasen sind durch die stereochemische Anordnung der Aminosäuren-Reste limitiert, α -helikale Bereiche zu schneiden, da die zu spaltende Peptidbindung von den axial aus der Helix herausragenden Aminosäure-Resten verdeckt wird. Die α -Helix muss folglich zunächst entfaltet werden, wofür ca. 4 Kcal mol⁻¹ pro Aminosäure-Rest aufgewendet werden müssen (White et al., 2005). Energetisch begünstigt wird die Entfaltung durch Aminosäure-Reste, die die Ordnung der α -Helix stören (sog. Helix-Breaker). Anhand dieser Überlegungen wurde postuliert, dass Helix-Breaker wie beispielsweise Glycin- oder Prolin-Reste in der TMD der Substrate für effiziente Intramembranproteolyse unerlässlich sind (Brown et al., 2000). Glycin zeichnet sich gegenüber anderen natürlich vorkommenden Aminosäuren durch eine höhere strukturelle Flexibilität aus, da Glycin keine Kohlenwasserstoff-Seitenkette besitzt (Ramachandran et al., 1963). Prolin-Reste sind durch ihre Ringstruktur nicht in der Lage, α -Helices auszubilden. Im Fall von SREBP ist ein aus Helix-Breakern bestehendes NP-Motiv in der TMD für S2P-abhängige Intramembranproteolyse entscheidend (Duncan et al., 1998). Mutagenese des NP-Motivs zu Aminosäure-Resten, die keine Helix-Breaker

sind, führt zu reduziertem S2P-Schnitt. Die Mutagenese anderer Aminosäure-Reste in SREBP hat einen geringeren Einfluss auf die Substratprozessierung durch S2P (Duncan et al., 1998). Allerdings wurde nicht gezeigt, dass andere Helix-Breaker das NP-Motiv ersetzen können. In diesem Fall hätte eine Mutagenese des Prolins zu Glycin im NP-Motiv Aufschluss darüber gegeben, ob die spezielle strukturelle Eigenschaft von Helix-Breakern für die Proteolyse durch S2P notwendig ist oder das NP-Motiv eine Sequenzdeterminante in SREBP für die Proteolyse durch S2P darstellt. Auch die Mutagenese von Helix-Breakern in ATF6 führte zu reduzierter Intramembranproteolyse durch S2P (Ye et al., 2000). Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass Helix-Breaker in S2P-Substraten notwendig sind, um die Protease mit hoher Affinität zu binden (Koide et al., 2008). Im Fall von S2P könnten Helix-Breaker im Substrat daher entweder als Sequenzdeterminante der proteolytischen Spaltung oder aber als entscheidendes Element der Bindung an S2P eine Rolle spielen.

Auch für Rhomboid-abhängige RIP wurden Helix-Breaker in der TMD des Substrats Spitz als Voraussetzung beschrieben. Ihre Mutagenese in Spitz führt zur Reduktion der Intramembranproteolyse durch Rhomboid (Urban und Freeman, 2003). Allerdings sind durchaus Typ-I-Transmembranproteine mit Helix-Breakern in der TMD bekannt, die nicht von Rhomboid geschnitten werden (Urban et al., 2002; Urban und Wolfe, 2005). Daher könnten für Rhomboide eher bestimmte Sequenzmotive Voraussetzung für effiziente Intramembranproteolyse verantwortlich sein als die generelle Anwesenheit von Helix-Breakern (Strisovsky et al., 2009).

Die γ -Sekretase hingegen scheint ihre Substrate unabhängig von bestimmten Aminosäure-Motiven in der TMD zu schneiden. Diese Beobachtung resultiert aus der Identifikation zahlreicher γ -Sekretase-Substrate, die sich sehr in der Aminosäuresequenz ihrer TMD unterscheiden (Beel und Sanders, 2008). Allerdings konnten sowohl Phenylalanin-Substitutionen in der APP-TMD als auch die Länge der APP-TMD den γ -Sekretase-Schnitt beeinflussen (Lichtenthaler et al., 2002; Lichtenthaler et al., 1999). Anhand dieser Daten kann spekuliert werden, dass die γ -Sekretase in Bezug auf die Aminosäure-Reste in der TMD der Substrate eine gewisse Flexibilität in der Hinsicht zeigt, welche Peptidbindung gespalten wird.

Für SPP sind, wie für S2P, Helix-Breaker in der TMD des Substrats als Voraussetzung für die Prozessierung beschrieben (Lemberg und Martoglio, 2002). Allerdings wurde nach Mutagenese der Helix-Breaker noch SPP-Aktivität nachgewiesen (Lemberg und Martoglio, 2002). Die Mutation von Nicht-Helix-Breakern in Signalpeptiden kann zudem zu einer ähnlichen Reduktion der SPP-Aktivität führen (Okamoto et al., 2008). Außerdem existieren virale Signalpeptide, die Helix-Breaker tragen und nicht durch SPP abgebaut werden (Dultz et al., 2008). Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss darauf zu, dass

es wahrscheinlich nicht die Anwesenheit des Helix-Breakers *per se* ist, die die Prozessierung durch SPP bedingt. Vielmehr spielen vermutlich andere sequentielle oder strukturelle Aspekte eine übergeordnete Rolle.

Innerhalb der Bri2 TMD befinden sich vier Glycin-Reste und damit potentielle Helix-Breaker (siehe 4.4.2). In Einklang mit der Hypothese, dass Helix-Breaker für die SPP/SPPL-abhängige Prozessierung benötigt werden, ist nach Mutagenese dieser Glycin-Reste zu Alanin-Resten die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse reduziert. Allerdings ist die Restaktivität von SPPL2b mit ca. 40% recht hoch (siehe 4.4.2). Die Anwesenheit der Glycin-Reste kann daher nicht als absolute Voraussetzung für den SPPL2b-Schnitt gewertet werden. Zudem befinden sich auch in der TMD von Bri3, das kein SPPL2b-Substrat darstellt, Glycin-Reste (siehe 4.3.1). Die SPPL2a- bzw. SPPL2b-Substrate TNF α , Bri2 und der FasL unterscheiden sich jedoch in Art und Anzahl der Helix-Breaker in ihren TMD. Folglich könnte der Einfluss der Helix-Breaker je nach Substrat variieren. Die limitierte Mutagenese der Glycin-Reste in der Bri2 TMD zu Alanin-Resten in dieser Arbeit stellt einen ersten Ansatz dar, den Einfluss von Helix-Breakern in der TMD eines Substrats für die SPPL2b-abhängige Proteolyse zu untersuchen (siehe 4.4.2).

Die Glycin-Reste in der Bri2 TMD könnten neben ihrer potentiellen Funktion als Helix-Breaker jedoch noch eine weitere Rolle spielen, nämlich als Bestandteil sogenannter GxxxG-Motive. GxxxG-Motive sind häufig in Transmembranproteinen zu finden und sind sowohl für die Packung als auch für die Interaktion von TMD wichtig, so z. B. für die Dimerisierung von Transmembranproteinen (Senes et al., 2004; White et al., 2005). Interessanterweise wurde Bri2 als Homodimer beschrieben (Tsachaki et al., 2008b). Obwohl für die Bri2-Dimerisierung vor allem ein freier Cystein-Rest in der IJMD verantwortlich gemacht wurde, könnte auch das GxxxG-Motiv in der TMD eine Rolle für die Dimerisierung spielen. Der beobachtete Rückgang in der SPPL2b-Schnitteffizienz nach Mutagenese der Glycin-Reste könnte folglich auch seine Ursache in der Änderung der Dimerisierungseigenschaften des Bri2 Proteins haben. Die Datenlage ist für eine Schlußfolgerung jedoch insgesamt nicht umfassend genug. Der Einfluss von Helix-Breakern und GxxxG-Motiven auf SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse sollte daher Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

5.3.2 Einfluss der zytoplasmatischen und luminalen JMD

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl zytoplasmatische als auch luminal Sequenzen bzw. die durch sie ausgebildeten Strukturen großen Einfluss auf die SPPL2b-Schnitteffizienz haben. Die aus der Untersuchung der RIP des Bri2 Ins Bri3 45-54 erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass der Einfluss zytoplasmatischer

Sequenzen auf 10 Aminosäuren in der JMD eingegrenzt werden kann, da der Verlust der Schnitteffizienz von SPPL2b mit ca. 60% genau so groß ist wie bei einem kompletten Austausch der Bri2 ICD zur Bri3 ICD (siehe 4.4.3). Luminale Sequenzen in Bri2 haben sogar noch einen stärkeren Einfluss auf die SPPL2b-Schnitteffizienz: Nach Austausch der IJMD des Bri2 mit der des Bri3 ergibt sich ein Rückgang in der ICD-Produktion um ca. 70% (siehe 4.4.1).

Interessanterweise konnte auch für die Schnitteffizienz der SPP und der γ -Sekretase eine Abhängigkeit von zytoplasmatischen und luminalen Sequenzen des Substrats gezeigt werden (Hemming et al., 2008; Lemberg und Martoglio, 2002; Ren et al., 2007). Während für S2P bislang keine Sequenzdeterminanten außerhalb der TMD bestimmt wurden, zeigt eine Studie an Rhomboid, dass zytoplasmatische Elemente im Substrat Einfluss auf die Intramembranproteasen haben können (Lohi et al., 2004).

Für Rhomboid, die γ -Sekretase und SPP/SPPL-Proteasen kann anhand der Datenlage folglich eine Substraterkennung im Zytoplasma postuliert werden. SPP/SPPL und die γ -Sekretase erkennen ihre Substrate zusätzlich luminal. Dies ist in Einklang mit elektronenmikroskopischen Daten für die γ -Sekretase, die über beide Grenzen der Membran hinausragt und potenziellen zytoplasmatischen und luminalen Substrat-Bindestellen (Abbildung 50) (Lazarov et al., 2006; Osenkowski et al., 2009).

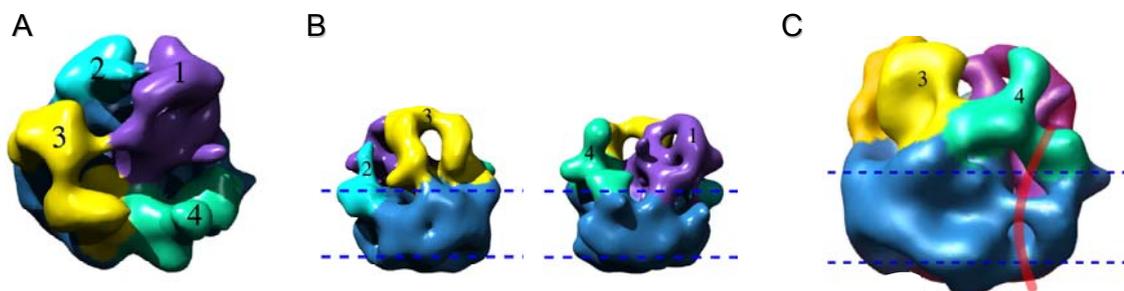


Abbildung 50. Elektronenmikroskopische Strukturanalyse der γ -Sekretase. (A) Ansicht von oben. Die Nummerierung der Domänen entspricht Bereichen mit hoher Elektronendichte, die Unterteilung ist jedoch willkürlich gewählt und die Kolorierung entspricht nicht den vier γ -Sekretase-Komponenten. (B) Seitenansicht γ -Sekretase. Die γ -Sekretase ragt sowohl luminal als auch zytoplasmatisch über die Membrangrenzen hinaus, wobei der luminaler Teil stärker hervorsticht. (C) Seitenansicht mit Substratmodell. Eine vergrößerte Seitenansicht erlaubt die Modellierung einer Substrat-TMD (in rot) in die γ -Sekretase-Struktur. Die Modellierung zeigt, dass ein Substrat vor allem in der Membran, aber auch luminal und zytoplasmatisch durch die γ -Sekretase erkannt werden könnte. Abbildung verändert nach (Osenkowski et al., 2009).

Die zytoplasmatischen bzw. luminalen Domänen der Protease, die aus der Membran herausragen, könnten für die Interaktion der Intramembranprotease mit der zytoplasmatischen bzw. luminalen Domäne des Substrats dienen. Die geringe Auflösung der bislang gelösten γ -Sekretase-Strukturen erlaubt jedoch nicht die Identifikation der Domänen bzw. γ -Sekretase-Untereinheiten, die zur mehrfachen Substraterkennung beitragen. Im Fall der γ -Sekretase könnten neben PS auch APH-1, PEN-2 bzw. Nicastrin

die juxtamembranen zytoplasmatischen oder luminalen Substratinteraktionen übernehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch beobachtet, dass SPPL2b ähnliche Substratanforderungen wie die γ -Sekretase besitzt, obwohl der Protease derartige Co-Faktoren fehlen. Dies lässt die Spekulation zu, dass die multiplen Substratinteraktionen der γ -Sekretase von PS, d.h. der SPP/SPPL-homologen aktiven Untereinheit selbst, übernommen werden.

5.4 Größenselektion, Ectodomain-Shedding und Substraterkennung

5.4.1 Größenselektion, Ectodomain-Shedding und Substraterkennung durch die SPPL2b-Protease und die γ -Sekretase

5.4.1.1 Größenselektionsmechanismus und Ectodomain-Shedding

Eine Gemeinsamkeit der SPPL2a- und SPPL2b-Substrate TNF α , FasL und Bri2 ist die luminaire Verkürzung des Substrats durch Ectodomain-Shedding (Gearing et al., 1994; Martin et al., 2008b; Schulte et al., 2007). Die Ergebnisse zeigen, dass die luminaire Verkürzung des Bri2 keine strikte Voraussetzung für den SPPL2b-Schnitt darstellt, die Intramembranproteolyse jedoch erheblich erleichtert. Dies wird insbesondere durch den Vergleich der Bri2-Prozessierung mit der des Bri2/3-Konstrukts deutlich (siehe 4.5.1). Bri2/3 stellt kein Substrat für Ectodomain-Shedding dar, wird jedoch SPPL2b-abhängig geschnitten. Dabei entstehen deutlich geringere Mengen ICD als im Fall des Bri2 (siehe 4.5.1).

In der Folge wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein durch Ectodomain-Shedding verkürztes Substrat von SPPL2b bevorzugt prozessiert wird. Die Analyse einer Serie von Deletionskonstrukten mit sequentiell verkürzten Ektodomänen bestehend aus Bri3 und ICD und TMD bestehend aus Bri2 bestätigt diese Hypothese: Je kürzer die Ektodomäne des Substrats, desto effizienter schneidet SPPL2b (siehe 4.5.2) (Martin et al., 2008a). Eine ähnliche Größenselektion wurde für die γ -Sekretase beschrieben (Struhl und Adachi, 2000). Für beide Proteasen wurde gezeigt, dass Substrate mit weniger als 50 Aminosäuren in der Ektodomäne am effizientesten prozessiert werden (Martin et al., 2008a; Struhl und Adachi, 2000).

Es soll jedoch an dieser Stelle betont werden, dass Ectodomain-Shedding eines potenziellen Substrats, d.h. eines Typ-II-Transmembranproteins, nicht zwingend Intramembranproteolyse nach sich zieht. Dies verdeutlichen die Ergebnisse mit dem Bri3 Δ E-Deletionskonstrukt: Die Prozessierung des membranverankerten Fragments sollte durch die luminaire Verkürzung unabhängig von Ectodomain-Shedding sein (siehe 4.3.2). Bri3 Δ E wird jedoch nicht von SPPL2b umgesetzt.

Vermehrtes Ectodomain-Shedding führt im Fall des Bri2 zu erhöhten Produktmengen der RIP (siehe 4.5.3). Eine maßgebliche Funktion von Ectodomain-Shedding ist daher die Erleichterung der Intramembranproteolyse. Die Erkennung eines Substrats durch eine Sheddase wird damit zum limitierenden Schritt in der RIP. Dies wirft die Frage auf, wie Sheddasen potenzielle Substrate für RIP selektieren. Mutagenese-Studien zeigen, dass ADAM-Proteasen wenig sequenzspezifisch schneiden, sondern die Schnittstelle im Substrat über einen Größenselektionsmechanismus erkennen: Der Abstand zwischen Membran und Schnittstelle scheint stärker definiert zu sein als die eigentliche Sequenz (Hooper et al., 1997; Sisodia, 1992). Die konzertierte Substratprozessierung erfolgt demnach durch ADAM-Proteasen, die ihre Substrate in geringem Abstand zur Membran prozessieren und der GxGD-Proteasen, die nur Substrate mit weniger als 50 luminalen Aminosäuren effizient umsetzen.

Strukturelle Studien an NOTCH zeigen, wie eine zunächst maskierte ADAM-Schnittstelle durch Ligandenbindung freigelegt werden kann: Mutationen in NOTCH, die mit T-Zell-Lymphomen assoziiert sind, stören die Maskierung und lösen wahrscheinlich auf diese Weise konstitutives, von Ligandenbindung unabhängiges Ectodomain-Shedding aus (Gordon et al., 2008; Gordon et al., 2007). Das entstehende NEXT ist nachfolgend Substrat für die γ -Sekretase. Die lösliche NICD transloziert in den Zellkern und induziert Zellteilungs- und Differenzierungsprozesse. Im Fall der mit T-Zell-Lymphom assoziierten NOTCH-Mutationen kann folglich unbehinderte und damit vermehrte ADAM-Aktivität als ursächlich für die unkontrollierte Zellteilung angesehen werden.

5.4.1.2 Substraterkennung

Für die γ -Sekretase wurde Nicastrin als Substratazeptor beschrieben (Shah et al., 2005). Nicastrin würde damit die Aufgabe der Größenselektion übernehmen. Speziell der Glutaminsäure-Rest an Position 333 in Nicastrin soll über die Ausbildung einer Salzbrücke mit dem durch Ectodomain-Shedding gebildeten neuen N-Terminus des γ -Sekretase-Substrats interagieren (Shah et al., 2005). In Einklang mit dieser Hypothese konnte die ionische Interaktion durch die Mutation des Glutaminsäure-Restes zu einem Alanin-Rest gestört werden. Die Position von E333 in der Nicastrin Ektodomäne würde in diesem Fall den optimalen Abstand des zu erkennenden Substrats zum aktiven Zentrum definieren. In einer weiteren Studie wurde jedoch gezeigt, dass die Mutagenese von Glutaminsäure an Position 333 zu Alanin in Nicastrin nicht zu einer Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität führt, sondern nur zu einer verminderten Maturierung des Komplexes (Chavez-Gutierrez et al., 2008). Die reduzierte Menge an mutierter γ -Sekretase, die die Zelloberfläche erreicht, erzielt jedoch relativ zur wt γ -Sekretase gleiche enzymatische Aktivität. Die Rolle von Nicastrin als γ -Sekretase-Substratazeptor ist daher umstritten

(Steiner et al., 2008a). SPPL2b benötigt für Aktivität kein Nicastrin-ähnlichen Co-Faktor (Fluhrer et al., 2006; Friedmann et al., 2006; Krawitz et al., 2005), prozessiert ihre Substrate aber in äußerst ähnlicher Weise. Dies lässt im Rückschluss auf die Substratselektion der γ -Sekretase vermuten, dass Nicastrin nicht für die Größenselektion von Ectodomain-Shedding Substraten verantwortlich ist.

In Kontrast zur γ -Sekretase, die bevorzugt in ihrer Ektodomäne verkürzte Substrate bindet, co-isoliert das Volllängenprotein Bri2 mit SPPL2a und SPPL2b (siehe 4.2.1) (Esler et al., 2002; Martin et al., 2008b; Thinakaran et al., 1998). Dies ist in Einklang mit Daten für den FasL und TNF α , die ebenso als Volllängenproteine an SPPL2a bzw. SPPL2b binden (Fluhrer et al., 2006; Kirkin et al., 2007). Im Vergleich zu den Volllängenproteinen bindet relativ wenig NTF an aktives SPPL2a und SPPL2b, an den inaktiven Mutanten akkumuliert es jedoch (siehe 4.2.1). Deshalb kann vermutet werden, dass das NTF präferentiell von SPPL2a und SPPL2b umgesetzt wird (Fluhrer et al., 2006). Fraglich ist derzeit, welche Strukturelemente in SPPL2b die zuvor durch Ectodomain-Shedding verkürzten Substrate erkennen. Wahrscheinlich ist, dass luminaire Teile der Proteasen die Erkennung des Substrats übernehmen, beispielsweise der luminaire N-Terminus von SPPL2b oder der große hydrophile Loop zwischen TMD 6 und 7. Der Loop zwischen TMD 6 und 7 ist allerdings innerhalb der SPP/SPPL-Proteasen wenig konserviert und daher wahrscheinlich nicht als Substratazeptor geeignet, sofern die Erkennung über einen innerhalb der SPP/SPPL-Proteasen konservierten Mechanismus stattfindet. Im Fall der γ -Sekretase könnten die zusätzlichen Komplexkomponenten APH-1, PEN-2 oder Nicastrin die Bindung von Volllängenproteinen verhindern. Es soll jedoch betont werden, dass PS gegenüber den SPP/SPPL-Proteasen nur im katalytisch aktiven Zentrum hochkonserviert ist. PS könnte folglich während der Evolution Sequenz- und Strukturänderungen unterlegen haben, die ebenfalls die Bindung von Volllängensubstraten an die γ -Sekretase unterdrücken.

5.4.2 Ectodomain-Shedding, Substraterkennung und Größenselektion durch andere Intramembranproteasen

5.4.2.1 Ectodomain-Shedding, Substraterkennung und Größenselektion durch SPP

Für die SPP-abhängige Intramembranproteolyse wurde gezeigt, dass die Aktivität gegenüber Substraten, die durch Mutagenese der SP-Schnittstelle nicht mehr von SP geschnitten werden können, stark reduziert ist (Lemberg und Martoglio, 2002). Damit entspricht der SP-Schnitt vermutlich dem Ectodomain-Shedding. Da sich die SP-Schnittstelle meist direkt an der luminalen Grenze des Substrats und der Membran

befindet, so könnte man auch für SPP die Vermutung aufstellen, dass Signalpeptide mit kurzen luminalen Sequenzen präferentiell prozessiert werden. Dies ist bislang noch nicht veröffentlicht, ließe sich aber vermutlich durch eine Serie an Deletionskonstrukten eines SPP-Substrats mit mutierter SP-Schnittstelle und unterschiedlich langer luminaler Domäne zeigen. Welche Domänen innerhalb der SPP-Proteasen für die Substraterkennung verantwortlich sind, ist bislang nicht untersucht. Wie bereits für SPPL2b ausgeführt (siehe 5.4.1.2), ist es wahrscheinlich, dass luminale Teile der Proteasen die Erkennung des Substrats übernehmen, beispielsweise der N-Terminus oder der hydrophile Loop zwischen TMD 6 und 7. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass ein N-terminal trunkiertes SPP bestehend aus dem Kernstück mit den TMD 6-9 *in vitro* noch katalytisch aktiv ist (Narayanan et al., 2007). Im Kernstück befinden sich mit dem YD-, dem GxGD- und dem PAL-Motiv die hochkonservierten Bereiche des aktiven Zentrums. In der Annahme, dass das trunkierte SPP-Fragment auch im zellulären Kontext aktiv ist, muss die Substraterkennung von SPP/SPPL-Proteasen damit in einem kleinen Bereich in der Region des aktiven Zentrums liegen. Der N-Terminus als Substratazeptor wäre in der Folge für SPP ausgeschlossen.

5.4.2.2 Ectodomain-Shedding, Substraterkennung und Größenselektion durch S2P

Interessanterweise werden auch S2P-Substrate zuvor in einem ersten Schritt durch S1P prozessiert. S1P schneidet zwar sequenzspezifisch, die S1P-Schnittstelle befindet sich aber in geringem Abstand zur Membran auf der luminalen Seite (Kondo et al., 2005). Mutationen in der S1P-Schnittstelle reduzieren den S2P-Schnitt dramatisch und mutierte Substrate mit einer längeren Ektodomäne werden schlechter durch S2P umgesetzt als Substrate mit einer kurzen Ektodomäne (Shen und Prywes, 2004). Folglich scheint auch S2P einen Größenselektionsmechanismus zur Substraterkennung zu besitzen. Für bakterielle S2P wurde als Strukturelement der Substraterkennung eine PDZ-Domäne beschrieben, die allerdings in eukaryotischen S2P nicht konserviert ist (Inaba et al., 2008; Kanehara et al., 2003). In eukaryotischen S2P müssen daher andere, bislang nicht identifizierte Motive für die Substrat-Erkennung verantwortlich sein.

5.4.2.3 Substraterkennung durch Rhomboid

Weshalb die Serin-Intramembranproteasen Vollängenproteine prozessieren und daher wahrscheinlich keinen Größenselektionsmechanismus für die Auswahl ihrer Substrate nutzen, ist bislang nicht bekannt. Rhomboide könnten jedoch einen unabhängigen Regulationsmechanismus entwickelt haben. So wurden Mitglieder der Rhomboid-Familie

beschrieben, die vermutlich inaktiv sind (iRhoms) (Lemberg und Freeman, 2007b). Da iRhoms mit großer Wahrscheinlichkeit dennoch in der Lage sind, Substrate zu binden, würden sie den Zugang von aktiven Rhomboiden zu Substraten blockieren. Die Expression von iRhoms könnte also die Rhomboid-Aktivität steuern (Lemberg und Freeman, 2007a). In einer ersten Datenbankanalyse im Rahmen dieser Arbeit mit den aktiven GxGD-Proteasen als Template wurden für GxGD-Proteasen keine derartigen Familienmitglieder gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Regulation proteolytischer Aktivität durch Expression von inaktiven Homologen könnte daher einen für Rhomboide spezifischen Regulationsmechanismus darstellen, der die Größenselektion als Mechanismus der Regulation der proteolytischen Aktivität überflüssig machen könnte.

Wie die Substraterkennung und der Größenselektionsmechanismus im Detail funktioniert, muss in weiteren Studien hinterfragt werden. Dennoch stellt die Entwicklung eines Größenselektionsmechanismus sowohl von Aspartyl- als auch von Metallo-Intramembranproteasen einen konvergenten Evolutionsmechanismus innerhalb der RIP dar.

5.5 Gegenüberstellung von SPPL2b mit der γ -Sekretase

Für Inhibitoren der γ -Sekretase wurde eine Kreuzreaktivität mit SPP/SPPL-Proteasen beschrieben (Fluhrer et al., 2006; Sato et al., 2008b). Ein Vergleich der SPP/SPPL-Proteasen mit der γ -Sekretase kann daher für die Entwicklung spezifischer γ -Sekretase-Inhibitoren hilfreich sein. Da in der vorliegenden Studie insbesondere die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse betrachtet wurde, können die Eigenschaften von SPPL2b und der γ -Sekretase einander gegenübergestellt werden (Eine Kurzübersicht findet sich in Tabelle 5).

5.5.1 Gemeinsamkeiten der SPPL2b-Protease und der γ -Sekretase

5.5.1.1 Aktives Zentrum und Schnittmechanismus

Große Übereinstimmung zwischen SPPL2b und der γ -Sekretase besteht im Aufbau des aktiven Zentrums und im Schnittmuster der Proteasen. Sowohl die γ -Sekretase als auch SPPL2b schneiden ihre Substrate mehrmals im Bereich der TMD des Substrates (Abbildung 51) (siehe 1.1.3.7) (Fluhrer et al., 2006; Qi-Takahara et al., 2005). Es kann folglich spekuliert werden, dass ein Substrat das aktive Zentrum der entsprechenden Protease Schritt für Schritt passiert, wobei die räumliche Position des aktiven Zentrums unverändert bleibt. Dieser schrittweise Mechanismus könnte weiterhin die Entfaltung der

α -helikalen TMD unterstützen, die für den Zugang der Protease zur zu spaltenden Peptidbindung erforderlich ist (Fluhrer et al., 2008b; Salvesen, 2003). Nach den vorliegenden Daten ist es wahrscheinlich, dass die Schnitte sequentiell vom C- zum N-Terminus erfolgen (Fluhrer et al., 2008b; Qi-Takahara et al., 2005). Die Substitution eines konservierten Glycins zu einem Alanin im GxGD-Motiv zu GxAD im aktiven Zentrum der Proteasen führt nicht zu qualitativ anderen Schnittprodukten, die Mutation verlangsamt aber die schrittweise Substratprozessierung. In PS ist die GxGD- zu GxAD-Mutation mit FAD assoziiert. Es wurde gezeigt, dass die Verlangsamung der katalytischen Aktivität der γ -Sekretase spezifisch die A β 40-Produktion betrifft, nicht aber die Generierung von A β 42. Dies hat eine relative Erhöhung der Konzentration des amyloidogenen A β 42-Peptids zur Folge (siehe 1.1.3.7), was zu einer früheren A β -Aggregation in FAD Patienten im Vergleich zur sporadischen Alzheimer-Erkrankung führen könnte (Fluhrer et al., 2008a).

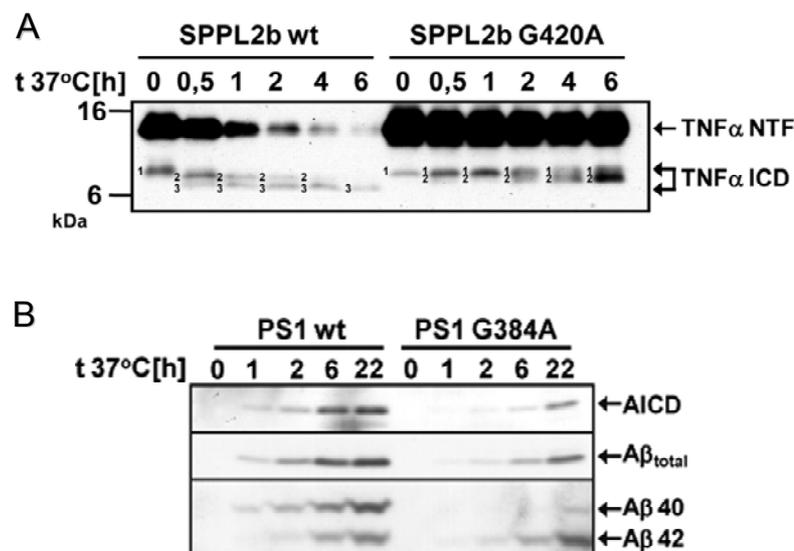


Abbildung 51. Die Mutation von GxGD zu GxAD im aktiven Zentrum der Proteasen SPPL2b und Presenilin verlangsamt die Intramembranproteolyse von SPPL2b und der γ -Sekretase. (A) Das SPPL2b Substrat TNF α NTF wird im *in vitro* Assay (isolierte Zellmembranen) von SPPL2b wt rasch abgebaut, während die Aktivität von SPPL2b G420A deutlich verlangsamt ist. Das Substrat TNF α NTF akkumuliert im Vergleich zur SPPL2b wt Kontrolle in SPPL2b G420A enthaltenden Membranfraktionen. Im Fall von SPPL2b wt werden drei unterschiedliche TNF α -Produkte detektiert. Im Fall von SPPL2b G420A werden nur zwei Produkte detektiert, die in ihrem Laufverhalten in der SDS-PAGE den Produkten 1 und 2 der SPPL2b wt Protease entsprechen. (B) Die A β - und die AICD-Generation durch die γ -Sekretase ist für PS1 G384A im Vergleich zur PS1 wt Kontrolle verlangsamt. Die elektrophoretische Auftrennung der entstandenen A β -Peptide zeigt, dass der relative Anteil von A β 42 im Vergleich zu A β 40 größer ist. Abbildung verändert nach (Fluhrer et al., 2008a).

5.5.1.2 Ectodomain-Shedding und Substratdeterminanten

Sowohl für γ -Sekretase- als auch für SPPL2b-Substrate wurde Ectodomain-Shedding beschrieben (Fluhrer und Haass, 2009; Fluhrer et al., 2009; Selkoe und Wolfe, 2007; Steiner et al., 2008a). Ectodomain-Shedding ist höchstwahrscheinlich ein positiver Regulator der Intramembranproteolyse, da die Schnitteffizienz beider Proteasen negativ mit der Länge der Ektodomäne eines Substrats korreliert (siehe 4.5.2) (Martin et al., 2008a; Struhl und Adachi, 2000). Ectodomain-Shedding bestimmt jedoch nicht allein, ob ein Transmembranprotein durch die γ -Sekretase oder SPPL2b prozessiert wird: Für beide Proteasen wurden Determinanten beschrieben, die sowohl in der ICD, der TMD als auch in der luminalen JMD eines Substrats vorliegen (siehe oben) (Hemming et al., 2008; Martin et al., 2008a; Ren et al., 2007). Da keine offensichtlichen Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Substraten bestehen, liegt nahe, dass es sich hierbei um strukturelle Determinanten handelt. Die Tatsache, dass diese Determinanten bestehen, ist mit dem Konzept eines durch die γ -Sekretase und SPPL-Proteasen gebildeten Membran-Proteasoms kaum vereinbar (Hemming et al., 2008; Martin et al., 2008a). Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Proteasen Substratspezifisch sind.

5.5.1.3 Lokalisation und Lipidkomposition

Eine weitere Gemeinsamkeit der SPPL2b-Protease und aktiver γ -Sekretase ist die Lokalisation in aktiver Form in späten sekretorischen Kompartimenten und an der Plasmamembran. Es ist zu beachten, dass sich die Membranen unterschiedlicher Kompartimente in ihrer Lipidkomposition unterscheiden (Boesze-Battaglia und Schimmel, 1997). Da Intramembranproteasen polytope Transmembranproteine sind, könnte die Lipidkomposition die Aktivität der Intramembranproteasen beeinflussen. In der Tat wurde gezeigt, dass Unterschiede in der Konzentration von Cholesterin und Sphingolipiden die Aktivität der γ -Sekretase beeinflussen (Osenkowski et al., 2008). Auch Rhomboid- und SPP-Aktivität hängt von der Lipid-Umgebung ab (Narayanan et al., 2007; Urban und Wolfe, 2005). Für SPPL2b stehen derartige Untersuchungen noch aus, es kann jedoch vermutet werden, dass auch die SPPL2b-Aktivität von der Lipidkomposition der Membran beeinflusst wird.

Neben diesen außerordentlichen Ähnlichkeiten zwischen SPPL2b und der γ -Sekretase zeigen sich jedoch auch große Unterschiede.

5.5.2 Unterschiede zwischen der SPPL2b-Protease und der γ -Sekretase

5.5.2.1 Substrattopologie

Die Membrantopologie des PS ist gegenüber der des SPPL2b invertiert (Friedmann et al., 2004). Anhand der Analyse der Membrantopologien der γ -Sekretase und SPP/SPPL bzw. den jeweiligen Substraten wurde postuliert, dass die γ -Sekretase nur Typ-I-, SPP/SPPL jedoch nur Typ-II-Transmembranproteine prozessiert. Dies wirft die Frage auf, wie die Proteasen die Topologie ihrer Substrate erkennen. Diese Frage schien beantwortet, als gezeigt wurde, dass die Ektodomäne von Nicastrin über die Seitenkette der Glutaminsäure E333 lumenale N-Termini von potentiellen Substraten binden kann (Shah et al., 2005). Es wurde angenommen, dass die Interaktion über eine Salzbrücke der unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Carboxy-Gruppe von E333 mit der positiven Ladung der Aminogruppe des Substrats stattfindet. Da freie lumenale N-Termini nur bei Typ-I-Transmembranproteinen auftreten, wäre Nicastrin auf diese Weise in der Lage, zwischen Typ-I- und Typ-II-Proteinen zu unterscheiden. Allerdings ist die Funktion von Nicastrin als Substratazeptor umstritten, da in einer weiteren Veröffentlichung die Mutation E333A nicht zu einer geringeren Aktivität der γ -Sekretase, aber zu einer verminderten Maturierung der γ -Sekretase führte (siehe 5.4.1.2) (Chavez-Gutierrez et al., 2008). Im Fall der von Shah et al. erhobenen Daten könnte daher die verminderte Maturierung der γ -Sekretase und nicht die verminderte Substratbindung den beobachteten Rückgang der γ -Sekretase-Aktivität verursacht haben. Der in (4.5.2) vorgestellte Größenselektionsmechanismus von SPPL2b spricht weiterhin gegen die von Shah et al. vorgeschlagene Funktion von Nicastrin, da SPPL2b nicht mit einem Nicastrin-ähnlichen Protein interagiert, aber genauso wie die γ -Sekretase Substrate nach Größen der Substrat-Ektodomäne auswählt (Chavez-Gutierrez et al., 2008; Martin et al., 2008a). Weiterhin würde die Hypothese, dass Nicastrin eine Salzbrücke zu luminalen N-Termini ausbildet zwar erklären, warum die γ -Sekretase nur Typ-I-Proteine prozessiert, nicht aber, weshalb SPP/SPPL-Proteasen nur Typ-II-Proteine als Substrate erkennen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die invertierte Topologie des aktiven Zentrums zur Substratselektion beiträgt. In der Tat konnte für PS1 gezeigt werden, dass das aktive Zentrum direkt an der Substraterkennung beteiligt ist (Kornilova et al., 2005; Yamasaki et al., 2006).

Lösliche Peptide können in Lösung frei rotieren, während membranständige Peptide durch die Membranverankerung eine Topologie besitzen. Das gleiche gilt für die membranständigen Proteasen. Im Fall der Intramembranproteolyse sind also sowohl Protease als auch Substrat in ihrer dreidimensionalen Bewegung eingeschränkt. Da membranständige Peptide sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Topologie annehmen, war die

Entwicklung von topologisch unterschiedlich gerichteten Proteasen wahrscheinlich eine Anforderung an die Substrat-Prozessierung. Aus evolutionärer Perspektive könnte dies der Grund für die Entstehung der γ -Sekretase und der SPP/SPPL-Proteine mit ihren invertierten aktiven Zentren sein.

Auch für andere Intramembranproteasen wurde jeweils nur eine Substrattopologie beschrieben. So schneidet eukaryotische S2P nur die TMD ihrer Substrate, wenn deren N-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist, das Substrat also eine Typ-II-Topologie einnimmt. Interessanterweise ist die bakterielle S2P SpoIVFB gegenüber den eukaryotischen S2P invertiert und prozessiert mit σ^k ein Typ-I Transmembranprotein, das als Transkriptionsfaktor für die Sporenbildung verantwortlich ist (Rudner et al., 1999). Dies impliziert wiederum, dass das katalytische Zentrum der Intramembranprotease der Orientierung des Substrats entsprechend ausgerichtet sein muss (Wolfe, 2009a).

Typische Rhomboid-Substrate sind Typ-I-Transmembranproteine. Allerdings konnten Rhomboide identifiziert werden, die sich in der Anzahl der TMD vor dem aktiven Zentrum unterscheiden (Lemberg und Freeman, 2007b). Wenn sich die Zahl der TMD in der Sequenz N-terminal von dem aktiven Zentrum der Rhomboide unterscheidet, nimmt dadurch der übrige Proteinteil, inklusive aktivem Zentrum, die invertierte Topologie ein (Abbildung 52). Es ist zu betonen, dass die Vorhersage der Anzahl der TMD bislang ausschließlich auf bioinformatischen Methoden basiert, deren prognostischer Wert begrenzt ist (Ott und Lingappa, 2002). Experimentell wurde die Topologie dieser neuartigen Rhomboide noch nicht untersucht. Mit Star konnte allerdings ein Typ-II-Transmembranprotein identifiziert werden, das ein Rhomboid-Substrat darstellt (Tsruya et al., 2007). Von welchem Rhomboid es geschnitten wird, ist bislang nicht beschrieben. Sollte sich die Prozessierung von Star bestätigen, müsste es hypothetisch von einem Rhomboid mit einer zusätzlichen TMD vor dem aktiven Zentrum geschnitten werden (Abbildung 52).

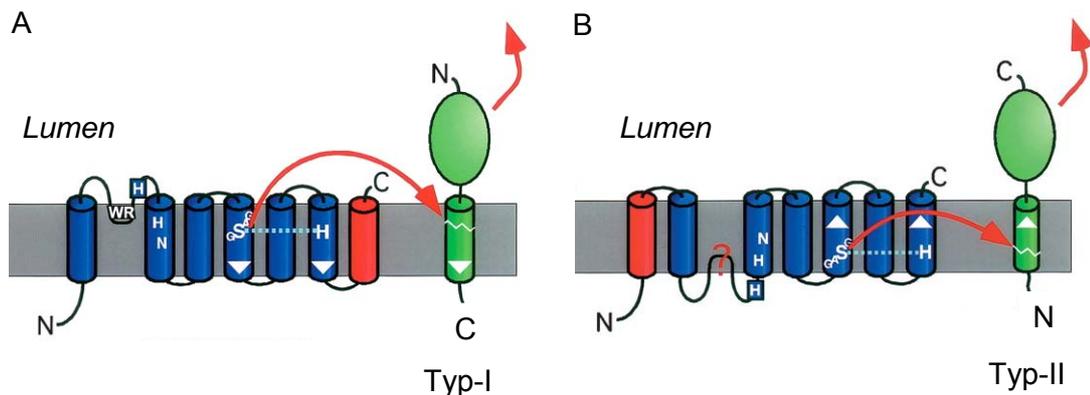


Abbildung 52. Rhomboide können sich in der Anzahl der TMD vor dem aktiven Zentrum unterscheiden. (A) Modell des Rhomboid-1 aus *Drosophila melanogaster*, das ein Typ-I Transmembranprotein prozessiert. Die katalytisch aktiven Aminosäure-Reste Serin und Histidin befinden sich in den TMD 4 und 6. Die Richtung der TMD 4 und 6 ist durch die weißen Pfeile dargestellt. Es wird angenommen, dass diese Art von Rhomboid nur Typ-I Transmembranproteine (grün) prozessiert. (B) Modell des Rhomboid-7 aus *Drosophila melanogaster*. Rhomboid-7 ist anhand von bioinformatischen Methoden eine zusätzliche TMD am N-Terminus vorhergesagt (rot). Die katalytisch aktiven Aminosäure-Reste befinden sich daher in den TMD 5 und 7, die Topologie der beteiligten TMDs (Pfeilrichtung) ist im Vergleich zu (A) invertiert. Das prozessierte Substrat (grün) ist in der Folge ein Typ-II Transmembranprotein. Abbildung verändert nach (Lemberg und Freeman, 2007b).

5.5.2.2 Anzahl der prozessierten Substrate

Für die γ -Sekretase wurden deutlich mehr Substrate identifiziert als für SPPL2b (Beel und Sanders, 2008; Fluhrer und Haass, 2009; Fluhrer et al., 2009). Hierfür sind mehrere Ursachen möglich. Auf der einen Seite könnte die γ -Sekretase durchaus eine größere Anzahl an Substraten prozessieren als SPPL2b. In Einklang mit dieser Hypothese steht die Beobachtung, dass deutlich mehr Typ-I-Transmembranproteine existieren als Typ-II-Transmembranproteine und dass ein großer Teil dieser Typ-I-Transmembranproteine aufgrund seiner Lokalisation in späten sekretorischen Kompartimenten als γ -Sekretase-Substrat in Frage kommt². Auf der anderen Seite ist die γ -Sekretase aufgrund ihrer Bedeutung für die Alzheimer-Erkrankung seit vielen Jahren Objekt intensiver Forschung, während SPPL2b eine wenig untersuchte Protease darstellt. Es könnte daher sein, dass SPPL2b ähnlich viele Substrate umsetzt wie die γ -Sekretase, diese aber noch nicht bekannt sind. Eine massenspektrometrische Analyse des Proteoms nach Knockdown bzw. Knockout von SPPL2b, wie sie bereits für die γ -Sekretase beschrieben wurde, könnte Aufschluss über die mögliche Anzahl an SPPL2b-Substraten geben, da Substrate in diesem experimentellen Ansatz akkumulieren würden (Hemming et al., 2008).

² Eine Analyse der Uniprot-Proteindatenbank nach Proteinen, die die Membran einmal durchspannen liefert ca. doppelt so viele Typ-I- wie Typ-II-Transmembranproteine.

5.5.2.3 Komplexbildung

Ein großer Unterschied zwischen der γ -Sekretase und SPPL2b besteht in der Komplexbildung von PS mit Nicastrin, APH-1 und PEN-2, die für γ -Sekretase-Aktivität zwingend erforderlich, für SPPL2b jedoch keine Voraussetzung für Aktivität ist (Edbauer et al., 2003; Fluhrer et al., 2006; Weihofen et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie über die Substratanforderungen von SPPL2b lassen den Schluss zu, dass wahrscheinlich alle für proteolytische Aktivität verantwortlichen Merkmale der γ -Sekretase in PS zu finden sind. Grund hierfür ist die beobachtete Ähnlichkeit der Substratprozessierung durch SPP/SPPL-Proteasen gegenüber der Substratprozessierung durch die γ -Sekretase, obwohl eine Komplexbildung mit anderen Proteinen für SPP/SPPL-Aktivität nicht notwendig ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass PS einzelne für γ -Sekretase-Aktivität nötige Eigenschaften an die Co-Faktoren APH-1, PEN-2 oder Nicastrin abgegeben hat. Einen weiteren Grund für die Komplexbildung könnten Protease-unabhängige Funktionen der γ -Sekretase darstellen. In der Tat wurde die γ -Sekretase mit einer Reihe von zellulären Funktionen assoziiert, die unabhängig von Protease-Aktivität sind. Beispiele hierfür sind die Ausschüttung von Neurotransmittern, Ca^{2+} -Kanal-Aktivität, Transport von Membranproteinen, Autophagie oder Aktivierung der Erk-abhängigen Signaltransduktion (Esselens et al., 2004; Kang et al., 2005; Naruse et al., 1998a; Tu et al., 2006; Wang et al., 2006b; Zhang et al., 2009). Allerdings muss beachtet werden, dass in allen Studien PS und nicht die anderen Komplexfaktoren für die jeweilige γ -Sekretase-unabhängige Funktion verantwortlich gemacht wurde. Im Rückschluss dieser Ergebnisse wäre es möglich, dass auch SPPL2b Protease-unabhängige Funktionen hat.

Die Komplexbildung der γ -Sekretase stellt einen energetisch sehr aufwendigen Prozess dar, der zudem als Reaktion vierter Ordnung extrem langsam ist. Die Frage, warum Zellen viel Energie in die Bildung des γ -Sekretase-Komplexes investieren, lässt Raum für Spekulationen. Die Antwort könnte in der zentralen Bedeutung der γ -Sekretase liegen. In der γ -Sekretase finden unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Zelldifferenzierung, der Abbau von Transmembranproteinen und Protease-unabhängige Funktionen zusammen. Nur über einen korrekt aufgebauten γ -Sekretase-Komplex kann gewährleistet werden, dass alle diese Prozesse fehlerfrei ablaufen. In diesem Sinne kann die Regulation der γ -Sekretase-Aktivität über die Komplexbildung als eine prinzipielle zelluläre Qualitätskontrolle angesehen werden.

5.5.2.4 Endoproteolyse

Im letzten Schritt der Komplexbildung wird PS endoproteolytisch in seinem hydrophilen Loop zwischen TMD 6 und 7 gespalten, wobei PS NTF und PS CTF assoziiert bleiben (Capell et al., 1998; Thinakaran et al., 1996). Die Mutagenese eines Aspartyl-Restes im aktiven Zentrum von PS verhindert die Endoproteolyse. Daher wird davon ausgegangen, dass es sich um einen autoproteolytischen Prozess handelt (Wolfe et al., 1999). Dies ist allerdings noch nicht experimentell nachgewiesen. Erst nach Endoproteolyse von PS ist die γ -Sekretase aktiv, wobei jedoch auch PS1-Mutationen bekannt sind, z. B. die Δ Exon9-Mutante, die zwar keine Endoproteolyse, aber dennoch Aktivität zeigen (Baumeister et al., 1997; Levitan et al., 1996; Perez-Tur et al., 1995; Steiner et al., 1999a; Steiner et al., 1999b; Thinakaran et al., 1996). Möglicherweise ist die Struktur dieser PS1-Mutanten der Struktur des endoproteolytisch prozessierten wt PS1 sehr ähnlich, sodass die Maturierung vollständig verläuft und ein aktiver γ -Sekretase-Komplex gebildet werden kann (Capell et al., 1998). Die γ -Sekretase kann folglich als Zymogen angesehen werden (De Strooper, 2000). Die Expression von Proteasen als zymogene Vorläuferproteine, die dann durch Proteolyse aktiviert werden, ist bei löslichen Proteasen weit verbreitet (Berg et al., 2002).

SPPL2b ist dagegen als Volllängenprotein aktiv und auch die anderen SPP/SPPL-Proteine werden nicht endoproteolytisch gespalten (Friedmann et al., 2004; Krawitz et al., 2005). Da SPP/SPPL-Proteasen nicht endoproteolytisch gespalten werden, ähnelt die γ -Sekretase in diesem Aspekt eher den löslichen Proteasen als den übrigen GxGD-Intramembranproteasen. Die Voraussetzung der Endoproteolyse von PS für γ -Sekretase-Aktivität könnte einen Regulationsmechanismus darstellen, der von SPP/SPPL-Proteasen nicht genutzt wird. Die endoproteolytische Prozessierung von PS könnte in der Folge eine Möglichkeit darstellen, die γ -Sekretase zu inhibieren, ohne eine Kreuzreaktion mit SPP/SPPL-Proteasen hervorzurufen.

5.5.2.5 Glykosylierung

Im Gegensatz zu PS ist SPPL2b komplex glykosyliert (Krawitz et al., 2005). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Maturierung für SPPL2b-Aktivität notwendig ist, da das kurze membranverankerte Fragment Bri2 Δ E, dessen Prozessierung unabhängig von Ectodomain-Shedding ist, unter Brefeldin A-Behandlung nicht umgesetzt wird (siehe 4.2.4). Es besteht daher die Möglichkeit, dass SPPL2b durch die Glykosylierung aktiviert wird. Allerdings werden durch die Brefeldin A-Behandlung weitere zelluläre Faktoren verändert, die für effiziente Proteolyse entscheidend sein könnten, beispielsweise der pH

der Kompartimente. Um den Effekt der Glykosylierung auf die SPPL2b-Aktivität zu untersuchen, sind daher weiterführende Experimente nötig.

<u>Merkmal</u>	<u>Kurzbeschreibung</u>	<u>Referenz</u>
Substrate	<ul style="list-style-type: none"> • γ-Sekretase: >60, (u.a. APP, NOTCH) • SPPL2b: TNFα, Bri2, FasL 	(Beel und Sanders, 2008) (Weihofen und Martoglio, 2003) (McLauchlan et al., 2002) (Robakis et al., 2008) (Kirkin et al., 2007) (Fluhrer et al., 2006) (Martin et al., 2008b)
Substrattopologie	<ul style="list-style-type: none"> • Typ-I für γ-Sekretase • Typ-II für SPPL2b³ 	(Selkoe und Wolfe, 2007) (Weihofen et al., 2002) (Friedmann et al., 2004)
Endoproteolyse	<ul style="list-style-type: none"> • Erforderlich für Maturierung und Aktivität der γ-Sekretase⁴ • Nicht erforderlich für SPPL2b-Aktivität 	(Thinakaran et al., 1996) (Krawitz et al., 2005) (Narayanan et al., 2007)
Komplexbildung	<ul style="list-style-type: none"> • Für γ-Sekretase strikt erforderlich für Aktivität • SPPL2b: Für Aktivität kein Komplex erforderlich, Dimerisierung wird diskutiert 	(Edbauer et al., 2003) (Weihofen et al., 2002) (Fluhrer et al., 2006) (Nyborg et al., 2004) (Narayanan et al., 2007)
Docking-Site	<ul style="list-style-type: none"> • Für γ-Sekretase in PS1 CTF • Nicht untersucht für SPPL2b 	(Kornilova et al., 2005) (Sato et al., 2008b)
Lokalisation	<ul style="list-style-type: none"> • Aktive γ-Sekretase und SPPL2b befinden sich an der Plasmamembran und in endosomal/lysosomalen Kompartimenten • SPPL2b ist zudem im Golgi-Apparat lokalisiert 	(Kaether et al., 2002) (Pasternak et al., 2003) (Chyung et al., 2005) (Friedmann et al., 2004) (Friedmann et al., 2006) (Krawitz et al., 2005) (Martin et al., 2008b) (Weihofen et al., 2002)
Ectdodomain-Shedding	<ul style="list-style-type: none"> • Für alle γ-Sekretase- und SPPL2b-Substrate beschrieben • Wahrscheinlich Voraussetzung für Bindung und Prozessierung durch die γ-Sekretase • Keine Voraussetzung für Bindung an SPPL2b, aber deutliche Erleichterung der Prozessierung 	(Esler et al., 2002) (Selkoe und Wolfe, 2007) (Lemberg und Martoglio, 2002) (Martin et al., 2008a)

³ Nicht experimentell nachgewiesen

⁴ Es existieren jedoch Ausnahmen. Gewisse PS1-Mutanten zeigen Aktivität (wenn auch gegenüber PS wt reduziert), jedoch keine Endoproteolyse.

Größenselektion	<ul style="list-style-type: none"> Die Schnitteffizienz der γ-Sekretase- und SPPL2b-Protease korreliert negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats. 	(Struhl und Adachi, 2000) (Martin et al., 2008a)
Substratselektion	<ul style="list-style-type: none"> Für die γ-Sekretase wird Nicastrin als erster Substrat-Akzeptor diskutiert, zweite Selektion erfolgt durch das GxGD-Motiv in PS Für SPPL2b bislang nicht beschrieben 	(Shah et al., 2005) (Chavez-Gutierrez et al., 2008) (Yamasaki et al., 2006) (Hemming et al., 2008) (Narayanan et al., 2007)
Sequenz-determinanten im Substrat	<ul style="list-style-type: none"> Für γ-Sekretase- und SPPL2b: Innerhalb der TMD sowie der luminalen und zytoplasmatischen JMD. 	(Lichtenthaler et al., 1999) (Ren et al., 2007) (Lemberg und Martoglio, 2002) (Okamoto et al., 2008) (Martin et al., 2008a)
Funktion als Membran-Proteasom	<ul style="list-style-type: none"> Nicht der Fall für SPPL2b, diskutiert für die γ-Sekretase 	(Kopan und Ilagan, 2004) (Hemming et al., 2008) (Martin et al., 2008a)

Tabelle 5. Gemeinsamkeiten und Unterschiede von SPPL2b und der γ -Sekretase. Die Auflistung der Merkmale mit einer Kurzbeschreibung und den wichtigsten Referenzen gibt einen Überblick über die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede der SPPL2b- und γ -Sekretase-abhängigen Intramembranproteolyse.

5.5.3 Implikationen für die Entwicklung von spezifischen γ -Sekretase-Inhibitoren

Die Aktivität von Proteasen kann durch verschiedenste Mechanismen kontrolliert werden, beispielsweise durch Regulation der Genexpression, Lokalisation, post-translationale Modifikationen, durch die Aktivierung der jeweiligen inaktiven Zymogene oder durch Inhibitoren (Lopez-Otin und Bond, 2008). Die γ -Sekretase ist Gegenstand intensiver pharmazeutischer Forschung, da die Inhibition der γ -Sekretase die Reduktion von neurotoxischen A β -Peptiden ermöglicht (Haass und Selkoe, 2007). Viele der beschriebenen γ -Sekretase-Inhibitoren haben das aktive Zentrum der γ -Sekretase als Zielstruktur, das in SPP/SPPL hochkonserviert ist. In der Tat ist für eine Reihe von γ -Sekretase-Inhibitoren Kreuzreaktivität mit SPP/SPPL bekannt (Fluhrer et al., 2006; Iben et al., 2007; Nyborg et al., 2004; Sato et al., 2006b; Weihofen et al., 2003). Da SPP/SPPL-Proteasen wichtige physiologische Funktionen z.B. im Immunsystem oder bei der Ausschüttung von Zytokinen einnehmen, muss bei der Entwicklung von γ -Sekretase-Inhibitoren Kreuzreaktivität mit SPP/SPPL vermieden werden (Weihofen et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen unter anderem, dass neben dem aktiven Zentrum weitere Merkmale der γ -Sekretase-abhängigen RIP in SPPL2b

konserviert sind: So verwenden beide Proteasen einen Größenerkennungsmechanismus zur Substratselektion (Martin et al., 2008a; Struhl und Adachi, 2000). Außerdem bestehen für beide Proteasen Determinanten in der ICD, der TMD und der IJMD eines Substrats. Inhibitoren, die die Substraterkennung der γ -Sekretase als Target haben, könnten daher mit SPP/SPPL-Proteasen kreuzreagieren.

Für die Entwicklung selektiver γ -Sekretase-Inhibitoren bieten sich die Merkmale der Protease als Angriffspunkte an, die die γ -Sekretase von SPP/SPPL-Proteasen unterscheiden. Eine Möglichkeit bestünde in der Störung der Komplexbildung der γ -Sekretase durch kleine Moleküle, die die Bindung der Komplexpartner untereinander inhibieren. Weitere Angriffspunkte stellen die endoproteolytische Prozessierung von PS sowie regulatorische Interaktionspartner wie Transportproteine dar. So könnte im Fall der Alzheimer-Erkrankung ein verminderter Transport der γ -Sekretase in späte sekretorische Kompartimente ausreichen, die die Konzentration an sekretierten A β -Peptiden derartig zu senken, dass es nicht zur Aggregation kommt. Da die γ -Sekretase jedoch neben APP viele weitere Substrate prozessiert, ist es zusätzlich wünschenswert, Ansätze zu entwickeln, die spezifisch den Umsatz von APP reduzieren. Ein möglicher Ansatz bestünde beispielsweise in einem Screen nach kleinen Molekülen, die selektiv die Interaktion von APP mit der γ -Sekretase inhibieren.

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt die RIP des Bri2 und die Substratanforderungen von SPPL2b. Obwohl in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte in der Erforschung der Wirkungsweise und der Regulation der Intramembranaspartylproteasen gemacht wurden, bleiben noch viele Fragen ungelöst.

5.6.1 Strukturelle Analyse

Während für Rhomboid und S2P die atomare Struktur bekannt ist, fehlt die Struktur einer Intramembranaspartylprotease (Urban und Shi, 2008). Die strukturell gewonnenen Daten könnten die Grundlage für die Entwicklung von spezifischen γ -Sekretase-Inhibitoren für die Behandlung der Alzheimer-Erkrankung bilden. Da kristallographische Untersuchungen der γ -Sekretase durch ihre Größe und ihre Hydrophobizität erschwert sind, könnte ein anderes Mitglied der GxGD-Familie, beispielsweise die vermeintlich einfachste Intramembranaspartylprotease SPPL3, als Ausgangspunkt für kristallographische Untersuchungen dienen. Aber auch die Strukturanalyse eines SPP/SPPL-Fragments per NMR könnte erfolgreich sein (Narayanan et al., 2007).

Anhand einer Struktur könnten weitere wichtige Fragestellungen erörtert werden, beispielsweise ob es allosterische Mechanismen zur Regulation der Proteasen gibt oder wie der Zugang des Substrats zur Protease reguliert ist. Vorstellbar wäre in Analogie zur Rhomboid-abhängigen RIP ein Lateral-Gating Mechanismus, in dem die TMD eines Substrats durch eine seitliche Öffnung der Protease zum aktiven Zentrum geführt wird (Abbildung 53) (Baker et al., 2007; Wang et al., 2006c).

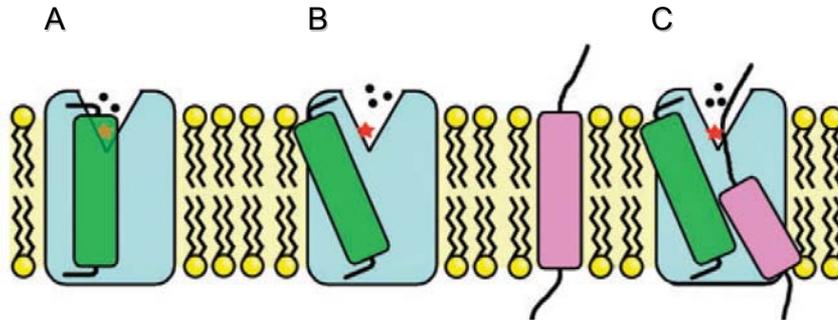


Abbildung 53. Modell eines generellen Mechanismus der Substratbindung von Intramembranproteasen. (A) Die Protease verfügt über eine hydrophile Aussparung, die von einer hydrophoben Domäne, in diesem Fall von einer TMD (grün), blockiert wird. Die Aussparung befindet sich je nach Protease auf der luminalen oder auf der zytoplasmatischen Seite der Membran und enthält das aktive Zentrum der Protease (Stern). (B) Damit Proteolyse stattfinden kann, kommt es zu einer strukturellen Umlagerung der hydrophoben Domäne. Es entsteht eine seitliche Öffnung (Lateral Gate), die die Bindung des Substrats (rosa) ermöglicht. Das für die Proteolyse benötigte Wasser kann in die Öffnung eindringen. (C) Die TMD des Substrats wird teilweise entwunden, damit die katalytisch aktiven Reste die zu spaltende Peptidbindung erreichen und es zur Prozessierung kommen kann. Abbildung verändert nach (Wu et al., 2006).

Schließlich sollte die Co-Kristallstruktur einer GxGD-Protease mit einem Substrat oder einem Inhibitor des aktiven Zentrums Aufschluss über die Substratbindung geben. Die strukturelle Anordnung des YD-, GxGD- und des PAL-Motivs könnte Hinweise auf den enzymatischen Mechanismus der GxGD-Proteasen liefern. Da die Motive im aktiven Zentrum der GxGD-Proteasen in löslichen Proteasen nicht konserviert sind, handelt es sich womöglich um einen neuartigen enzymatischen Mechanismus (Carter et al., 2008; Steiner et al., 2000).

5.6.2 Differentielle Substratanforderungen der SPP/SPPL-Proteasen

Momentan ist es nicht möglich, anhand der Sequenz eines Transmembranproteins vorherzusagen, ob es Substrat für RIP ist. Auf der Basis von einer größeren Anzahl an neuen Substraten und dem Vergleich zu bestehenden Daten könnten Kriterien erstellt werden, die eine Vorhersage ermöglichen. Hierbei sollte besonders Wert darauf gelegt werden, Substrate für diejenigen Intramembranproteasen zu identifizieren, für die noch keine Substrate bekannt sind, beispielsweise für SPPL2c oder SPPL3. Womöglich können durch den Vergleich dieser Substrate mit Bri2 und TNF α Antworten auf die

Frage gefunden werden, wie die SPP/SPPL-Proteasen in der Lage sind, ihre Substrate zu unterscheiden. Wichtige Anhaltspunkte für die unterschiedliche Substraterkennung könnten die Lokalisation und die differentielle Glykosylierung der SPP/SPPL-Proteine geben (Krawitz et al., 2005).

5.6.3 Netzwerke von Intramembranproteasen

Die vergleichende Analyse der RIP sollte sich jedoch nicht auf SPP/SPPL beschränken. Vielmehr wird es wichtig sein, ein mögliches Zusammenspiel unterschiedlicher Klassen von Intramembranproteasen zu untersuchen. Eventuell existieren Substrate, die - je nach Zustand der Zelle - durch unterschiedliche Intramembranproteasen prozessiert werden. Es könnten beispielsweise Substrate existieren, die sowohl von Rhomboid als auch von GxGD-Proteasen prozessiert werden können. Die nach der RIP jeweilig unterschiedliche Lokalisation der entstehenden Fragmente könnte die zelluläre Antwort über unterschiedliche Signalwege steuern.

5.6.4 Regulation der GxGD-Proteasen durch Transportfaktoren

Die Regulation der Aktivität der GxGD-Proteasen ist bislang unzureichend untersucht. Sie ist jedoch von großer klinischer Bedeutung, da es durch unkontrollierte Aktivität zu schwerwiegenden Erkrankungen kommen kann. Im Fall des NOTCH-Proteins führt ungesteuerte Prozessierung zu unkontrollierter Zellproliferation und damit zu Krebs (Kopan und Ilagan, 2009). Transportproteine bzw. andere Interaktoren könnten zur Steuerung der Protease-Aktivität eine wichtige Rolle spielen. Für die γ -Sekretase wurden mit CD147 und TMP21 bereits erste transiente Interaktoren beschrieben (Chen und Glabe, 2006; Zhou et al., 2005). Diese Proteine verschieben die Lokalisation der γ -Sekretase in der Hinsicht, dass weniger A β produziert wird. Die Identifizierung solcher Interaktoren wäre über einen RNAi-Screen mit anschließendem SPP/SPPL-Aktivitätsassay möglich.

5.6.5 Endogene Inhibitoren

Für viele Proteasen, wie z.B. für die Gruppe der MMP- oder ADAM-Enzyme, wurden endogene Inhibitoren beschrieben (Bode et al., 1999). Die differentielle Expression und unterschiedliche Affinitäten dieser Inhibitoren erlaubt die Gewebe-spezifische Regulation der Proteasen. Für die GxGD-Familie sind endogene Inhibitoren noch nicht beschrieben. Eventuell existieren Inhibitoren, die unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen Mitglieder der GxGD-Familie aufweisen. Würde ein endogener γ -Sekretase-Inhibitor

existieren, der keine Wirkung auf SPP/SPPL-Proteine zeigt, könnte die medikamentöse Gabe dieses Inhibitors die A β -Generation verringern. In diesem Fall müsste beachtet werden, dass die verabreichte Menge des Inhibitors nicht zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung über die Blockierung des NOTCH-Signalwegs führt.

5.6.6 Inaktive GxGD-Proteasen

Weiterhin wurden Mitglieder der Rhomboid-Familie beschrieben, die Mutationen im aktiven Zentrum tragen und vermutlich inaktiv sind (iRhoms) (Lemberg und Freeman, 2007b). Da iRhoms wahrscheinlich trotzdem in der Lage sind, Substrate zu binden, würden sie den Zugang von aktiven Rhomboiden zu Substraten blockieren. Die Expression von iRhoms könnte also die Rhomboid-Aktivität negativ beeinflussen (Lemberg und Freeman, 2007a). Ob für GxGD-Proteasen inaktive Familienmitglieder existieren, die ähnliche Funktionen übernehmen könnten, ist unklar. In einer ersten Datenbankanalyse im Rahmen dieser Arbeit mit den aktiven GxGD-Proteasen als Templates wurden keine derartigen Familienmitglieder gefunden (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch vorstellbar, dass inaktive Rhomboide auch Substrate der GxGD-Proteasen binden und die Prozessierung verhindern.

5.6.7 Protease-unabhängige Funktionen der SPP/SPPL-Proteasen

Für die γ -Sekretase wurden zahlreiche Protease-unabhängige Funktionen beschrieben (siehe 5.5.2.3) (Esselens et al., 2004; Kang et al., 2005; McCarthy et al., 2009; Naruse et al., 1998b; Tu et al., 2006; Wang et al., 2006b). SPP wurde eine Rolle in der ER-Dislokation von Transmembranproteinen zugewiesen (Loureiro et al., 2006). Außerdem könnte SPP neben dem Signalpeptidabbau auch eine Chaperon-artige Funktion haben (Crawshaw et al., 2004). Ob SPPL-Proteine Protease-unabhängige Funktionen übernehmen, ist bislang unklar. Die Generierung von Knockout Mäusen für die einzelnen Familienmitglieder könnte jedoch Phänotypen liefern, für die ein Rescue mit inaktiven SPPL-Proteasen möglich ist. Falls der Rescue gelingt, könnten die Phänotypen Hinweise zu Protease-unabhängigen SPPL-Funktionen geben.

5.6.8 Funktion der Bri-Proteine

Schließlich gilt es, die Funktion der Bri-Proteine zu untersuchen. Für Bri2 existieren bereits Knockout Mäuse, die jedoch unzureichend charakterisiert wurden (Matsuda et al., 2008). Eingehendere Untersuchungen dieser Mäuse könnten Hinweise auf die Funktion

des Bri2 geben. Falls ein Phänotyp existiert, sollten Rescue-Experimente mit unterschiedlichen Domänen des Bri2 durchgeführt werden, um Anhaltspunkte für die physiologische Rolle der RIP des Bri2 zu gewinnen.

6. Literatur

- Akiyama, H., Kondo, H., Arai, T., Ikeda, K., Kato, M., Iseki, E., Schwab, C., and McGeer, P. L. (2004). Expression of BRI, the normal precursor of the amyloid protein of familial British dementia, in human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 107, 53-58.
- Altmann, K. H., Wójcik, J., Vásquez, M., and Scheraga, H. A. (1990). Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XXIII. Proline parameters from random poly(hydroxybutylglutamine-2-2 L-proline). *Biopolymers* 30, 107-120.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtl Med* 64, 146-148.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., and Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J*, 01-0007fje.
- Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T. K., Rose-John, S., and Massague, J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 271, 11376-11382.
- Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S.-i., and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP [alpha]-secretase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 231-235.
- Aster, J. C., Pear, W. S., and Blacklow, S. C. (2008). Notch Signaling in Leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 3, 587-613.
- Bailey, D., Barreca, C., and O'Hare, P. (2007). Trafficking of the bZIP Transmembrane Transcription Factor CREB-H into Alternate Pathways of ERAD and Stress-Regulated Intramembrane Proteolysis. *Traffic* 8, 1796-1814.
- Baker, R. P., Young, K., Feng, L., Shi, Y., and Urban, S. (2007). Enzymatic analysis of a rhomboid intramembrane protease implicates transmembrane helix 5 as the lateral substrate gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8257-8262.
- Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grunberg, J., and Haass, C. (1997). Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct* 1, 149-159.
- Beel, A., and Sanders, C. (2008). Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 65, 1311-1334.
- Beers, M. F., and Mulugeta, S. (2005). Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annual Review of Physiology* 67, 663-696.
- Ben-Shem, A., Fass, D., and Bibi, E. (2007). Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 462-466.
- Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. WH Freeman and Co.
- 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., *et al.* (1997). A

- metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-[alpha] from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell* 90, 281-291.
- Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 1496-1500.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Grams, F., Gomis-Rüth, F., Nagase, H., Tschesche, H., and Maskos, K. (1999). Insights into MMP-TIMP Interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 878, 73-91.
- Boesze-Battaglia, K., and Schimmel, R. (1997). Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J Exp Biol* 200, 2927-2936.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., and Reintjes, R. (1996). Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 210, 87-90.
- Braud, V. E., Jones, Y., and McMichael, A. J. (1997). The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *European Journal of Immunology* 27, 1164-1169.
- Braud, V. M., Allan, D. S. J., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., *et al.* (1998a). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.
- Braud, V. M., Allan, D. S. J., Wilson, D., and McMichael, A. J. (1998b). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Current Biology* 8, 1-10.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.
- Brossier, F., Jewett, T. J., Sibley, L. D., and Urban, S. (2005). A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4146-4151.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11041-11048.
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.

- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-27767.
- Cao, X., and Südhof, T. C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J., and 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, 3205-3211.
- Capell, A., Kaether, C., Edbauer, D., Shirotani, K., Merkl, S., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem* 278, 52519-52523.
- Carter, D., Dunn, E., Pauley, A., McKinley, D., Fleck, T., Ellerbrook, B., Stratman, N., Zhou, X., Himes, C., Nye, J., *et al.* (2008). Changes in gamma-secretase activity and specificity caused by the introduction of consensus aspartyl protease active motif in Presenilin 1. *Molecular Neurodegeneration* 3, 6.
- Casso, D. J., Tanda, S., Biehs, B., Martoglio, B., and Kornberg, T. B. (2005). Drosophila Signal Peptide Peptidase Is an Essential Protease for Larval Development. *Genetics* 170, 139-148.
- Chakrabarty, A., Schellman, J. A., and Baldwin, R. L. (1991). Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* 351, 586-588.
- Chavez-Gutierrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P. C., and de Strooper, B. (2008). Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem* 283, 20096-20105.
- Chen, Y. R., and Glabe, C. G. (2006). Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem* 281, 24414-24422.
- Choi, S. I., Vidal, R., Frangione, B., and Levy, E. (2004). Axonal transport of British and Danish amyloid peptides via secretory vesicles. *Faseb J* 18, 373-375.
- Chyung, J. H., Raper, D. M., and Selkoe, D. J. (2005). Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280, 4383-4392.
- Crawshaw, S. G., Martoglio, B., Meacock, S. L., and High, S. (2004). A misassembled transmembrane domain of a polytopic protein associates with signal peptide peptidase. *Biochem J* 384, 9-17.
- De Strooper, B. (2000). Alzheimer's disease: Closing in on [gamma]-secretase. *Nature* 405, 627-628.
- 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., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.

Dejaegere, T., Serneels, L., Schäfer, M. K., Van Biervliet, J., Horrè, K., Depboylu, C., Alvarez-Fischer, D., Herreman, A., Willem, M., Haass, C., *et al.* (2008). Deficiency of Aph1B/C-Gamma-secretase disturbs Nrg1 cleavage and sensorimotor gating that can be reversed with antipsychotic treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9775-9780.

Deleersnijder, W., Hong, G., Cortvrindt, R., Poirier, C., Tylzanowski, P., Pittois, K., Van Marck, E., and Merregaert, J. (1996). Isolation of Markers for Chondro-osteogenic Differentiation Using cDNA Library Subtraction. Molecular Cloning and Characterization of a Gene Belonging to a Novel Multigene Family of Integral Membrane Proteins. *J Biol Chem* 271, 19475-19482.

Dultz, E., Hildenbeutel, M., Martoglio, B., Hochman, J., Dobberstein, B., and Kapp, K. (2008). The Signal Peptide of the Mouse Mammary Tumor Virus Rem Protein Is Released from the Endoplasmic Reticulum Membrane and Accumulates in Nucleoli. *J Biol Chem* 283, 9966-9976.

Duncan, E. A., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Sakai, J. (1997). *J Biol Chem* 272, 12778-12785.

Duncan, E. A., Dave, U. P., Sakai, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998). Second-site Cleavage in Sterol Regulatory Element-binding Protein Occurs at Transmembrane Junction as Determined by Cysteine Panning. *J Biol Chem* 273, 17801-17809.

Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem* 277, 13389-13393.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.

Ekici, O., Paetzel, M., and Dalbey, R. (2008). Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science* 17, 2023-2037.

Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Diehl, T. S., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2002). Activity-dependent isolation of the presenilin- γ -secretase complex reveals nicastrin and a γ substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2720-2725.

Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J., and Annaert, W. (2004). Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway. *J Cell Biol* 166, 1041-1054.

Feng, L., Yan, H., Wu, Z., Yan, N., Wang, Z., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2007). Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. *Science* 318, 1608-1612.

Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., and Russo, T. (1995). The Regions of the Fe65 Protein Homologous to the Phosphotyrosine Interaction/Phosphotyrosine Binding Domain of Shc Bind the Intracellular Domain of the Alzheimer's Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 270, 30853-30856.

Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., and Gessler, M. (2004). The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes & Development* 18, 901-911.

- Fleischer, A., Ayllón, V., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., and Rebollo, A. (2002a). Proapoptotic activity of ITM2Bs, a BH3-only protein induced upon IL-2-deprivation which interacts with Bcl-2. *Oncogene* 21, 3181-3189.
- Fleischer, A., Ayllon, V., and Rebollo, A. (2002b). ITM2Bs regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. *European Journal of Immunology* 32, 3498-3505.
- Fleischer, A., and Rebollo, A. (2004). Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. *FEBS letters* 557, 283-287.
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., and Walter, J. (2002). A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J Neurochem* 81, 1011-1020.
- Fluhrer, R., Fukumori, A., Martin, L., Grammer, G., Haug-Kroper, M., Klier, B., Winkler, E., Kremmer, E., Condrón, M. M., Teplow, D. B., *et al.* (2008a). Intramembrane proteolysis of GxGD-type aspartyl proteases is slowed by a familial Alzheimer disease-like mutation. *J Biol Chem*.
- Fluhrer, R., Grammer, G., Israel, L., Condrón, M. M., Haffner, C., Friedmann, E., Bohland, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplow, D. B., and Haass, C. (2006). A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNF α by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol* 8, 894-896.
- Fluhrer, R., and Haass, C. (2007). Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family? *Neurodegener Dis* 4, 112-116.
- Fluhrer, R., and Haass, C. (2009). Intramembrane Proteolysis by gamma-Secretase and Signal Peptide Peptidases, In *Intracellular Traffic and Neurodegenerative Disorders*. (Springer Verlag).
- Fluhrer, R., Steiner, H., and Haass, C. (2008b). Intramembrane Proteolysis by gamma-Secretase and related GxGD-type Aspartylproteases. *J Biol Chem in press*.
- Fluhrer, R., Steiner, H., and Haass, C. (2009). Intramembrane Proteolysis by Signal Peptide Peptidases: A Comparative Discussion of GXGD-type Aspartyl Proteases. *J Biol Chem* 284, 13975-13979.
- Foltenyi, K., Greenspan, R. J., and Newport, J. W. (2007). Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 10, 1160-1167.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3, 85-97.
- Freeman, M. (2008). Rhomboid Proteases and their Biological Functions. *Annual Review of Genetics* 42, 191-210.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Davies, P., and Mandelkow, E. (1998). A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15712-15717.
- Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleege, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2006). SPPL2a and SPPL2b

promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol* 8, 843-848.

Friedmann, E., Lemberg, M. K., Weihofen, A., Dev, K. K., Dengler, U., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2004). Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem* 279, 50790-50798.

Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., and et al. (1994). Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557.

Ghiso, J. A., Holton, J., Miravalle, L., Calero, M., Lashley, T., Vidal, R., Houlden, H., Wood, N., Neubert, T. A., Rostagno, A., et al. (2001). Systemic Amyloid Deposits in Familial British Dementia. *J Biol Chem* 276, 43909-43914.

Gibson, G., El-Agnaf, O. M. A., Anwar, Z., Sidera, C., Isbister, A., and Austen, B. M. (2005). Structure and neurotoxicity of novel amyloids derived from the BRI gene. *Biochem Soc Trans* 33, 1111-1112.

Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Goedert, M., Crowther, R. A., and Spillantini, M. G. (1998). Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21, 955-958.

Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., and Brown, M. S. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell* 124, 35-46.

Gordon, W. R., Roy, M., Vardar-Ulu, D., Garfinkel, M., Mansour, M. R., Aster, J. C., and Blacklow, S. C. (2008). Structure of the Notch1 negative regulatory region: Implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood*, blood-2008-2008-174748.

Gordon, W. R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J. C., and Blacklow, S. C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14, 295-300.

Goutte, C., Hepler, W., Mickey, K. M., and Priess, J. R. (2000). *aph-2* encodes a novel extracellular protein required for GLP-1-mediated signaling. *Development* 127, 2481-2492.

Greenwald, I. (1994). *Curr Opin Genet Dev* 4, 556-562.

Griffiths, R. A., Mortimer, T. F., Oppenheimer, D. R., and Spalding, J. M. K. (1982). Congophilic angiopathy of the brain: a clinical and pathological report in two siblings. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 45, 396-408.

Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Korovaitseva, G. I., and Rogaev, E. I. (2002). Novel class of polytopic proteins with domains associated with putative protease activity. *Biochemistry (Mosc)* 67, 826-835.

Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Soto, M. C., Mello, C. C., and Rogaev, E. I. (2004). The *Caenorhabditis elegans* IMPAS gene, *imp-2*, is essential for development and is functionally distinct from related presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14955-14960.

Grosveld, G. C. (2009). γ -secretase inhibitors: Notch so bad. *Nat Med* 15, 20-21.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and 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, 4913-4917.

Haass, C. (2004). Take five-BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO J* 23, 483-488.

Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024.

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., and Selkoe, D. J. (1992). Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.

Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.

Haass, C., and Steiner, H. (2002). Alzheimer disease γ -secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 12, 556-562.

Hadland, B., Manley, N., Su, D. M., Longmore, G., Moore, C., Wolfe, M., Schroeter, E., and Kopan, R. (2001). γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7487-7491.

Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.

Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11, 2615-2624.

Hasegawa, H., Sanjo, N., Chen, F., Gu, Y. J., Shier, C., Petit, A., Kawarai, T., Katayama, T., Schmidt, S. D., Mathews, P. M., *et al.* (2004). Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J Biol Chem* 279, 46455-46463.

Hebert, S. S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M. A., Muller, U., and De Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep* 7, 739-745.

Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., and Selkoe, D. J. (2008). Proteomic Profiling of gamma-Secretase Substrates and Mapping of Substrate Requirements. *PLoS Biology* 6, e257.

Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F. d. r., Vanderstichele, H., *et al.* (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1

- deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11872-11877.
- Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem J* 321 (Pt 2), 265-279.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., *et al.* (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102, 1186-1195.
- Huovila, A.-P. J., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., and Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 413-422.
- Iben, L. G., Olson, R. E., Balanda, L. A., Jayachandra, S., Robertson, B. J., Hay, V., Corradi, J., Prasad, C. V., Zaczek, R., Albright, C. F., and Toyn, J. H. (2007). Signal peptide peptidase and gamma-secretase share equivalent inhibitor binding pharmacology. *J Biol Chem* 282, 36829-36836.
- Ilagan, M. X. G., and Kopan, R. (2007). SnapShot: Notch Signaling Pathway. *Cell* 128, 1246.e1241-1246.e1242.
- Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K.-i., Akiyama, S., Ito, K., and Akiyama, Y. (2008). A Pair of Circularly Permutated PDZ Domains Control RseP, the S2P Family Intramembrane Protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283, 35042-35052.
- Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2006). Assembly, trafficking and function of γ -secretase. *Neurodegener Dis* 3, 187-312.
- Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol* 158, 551-561.
- Kaether, C., Scheuermann, J., Fassler, M., Zilow, S., Shirotani, K., Valkova, C., Novak, B., Kacmar, S., Steiner, H., and Haass, C. (2007). Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1. *EMBO Rep* 8, 743-748.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.
- Kanehara, K., Ito, K., and Akiyama, Y. (2003). YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO Journal* 22, 6389-6398.
- Kang, D. E., Yoon, I. S., Repetto, E., Busse, T., Yermian, N., Ie, L., and Koo, E. H. (2005). Presenilins Mediate Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT and ERK Activation via Select Signaling Receptors: Selectivity of PS2 in Platelet-derived Growth Factor Signaling. *J Biol Chem* 280, 31537-31547.
- Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y., and Arnold, S. M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 411-421.
- Kidd, S., and Lieber, T. (2002). Furin cleavage is not a requirement for *Drosophila* Notch function. *Mechanisms of Development* 115, 41-51.

- Kim, S. H., Creemers, J. W., Chu, S., Thinakaran, G., and Sisodia, S. S. (2002). Proteolytic processing of familial British dementia-associated BRI variants: Evidence for enhanced intracellular accumulation of amyloidogenic peptides. *J Biol Chem* 277, 1872-1877.
- Kim, S. H., and Sisodia, S. S. (2005). A Sequence within the First Transmembrane Domain of PEN-2 Is Critical for PEN-2-mediated Endoproteolysis of Presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 1992-2001.
- Kim, S. H., Wang, R., Gordon, D. J., Bass, J., Steiner, D. F., Lynn, D. G., Thinakaran, G., Meredith, S. C., and Sisodia, S. S. (1999). Furin mediates enhanced production of fibrillogenic ABri peptides in familial British dementia. *Nat Neurosci* 2, 984-988.
- Kim, S. H., Wang, R., Gordon, D. J., Bass, J., Steiner, D. F., Thinakaran, G., Lynn, D. G., Meredith, S. C., and Sisodia, S. S. (2000). Familial British dementia: expression and metabolism of BRI. *Ann N Y Acad Sci* 920, 93-99.
- Kimberly, W., Zheng, J., Guenette, S., and Selkoe, D. (2001). The Intracellular Domain of the β -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner. *Journal of Biol Chemistry* 276, 40288-40292.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003). γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6382-6387.
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *J Biol Chem* 275, 3173-3178.
- Kirchner, J., and Bevan, M. J. (1999). ITM2A Is Induced during Thymocyte Selection and T Cell Activation and Causes Downregulation of CD8 when Overexpressed in CD4+CD8+ Double Positive Thymocytes. *J Exp Med* 190, 217-228.
- Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W. S., Martoglio, B., Hueber, A. O., and Zornig, M. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*.
- Kirn, T., Lafferty, M., Sandoe, C., and Taylor, R. (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 35, 896-910.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116, 1071-1080.
- Koide, K., Ito, K., and Akiyama, Y. (2008). Substrate Recognition and Binding by RseP, an *Escherichia coli* Intramembrane Protease. *J Biol Chem* 283, 9562-9570.
- Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 7, 186-194.
- Kondo, S., Saito, A., Hino, S.-i., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., and Imaizumi, K. (2007). BBF2H7, a Novel

Transmembrane bZIP Transcription Factor, Is a New Type of Endoplasmic Reticulum Stress Transducer. *Mol Cell Biol* 27, 1716-1729.

Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 499-504.

Kopan, R., and Ilagan, M. X. G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *137*, 216-233.

Kornilova, A. Y., Bihel, F., Das, C., and Wolfe, M. S. (2005). The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3230-3235.

Kramer, A., Yang, F.-C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T. E., Davis, F. C., and Weitz, C. J. (2001). Regulation of Daily Locomotor Activity and Sleep by Hypothalamic EGF Receptor Signaling. *Science* 294, 2511-2515.

Krawitz, P., Haffner, C., Fluhrer, R., Steiner, H., Schmid, B., and Haass, C. (2005). Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J Biol Chem* 280, 39515-39523.

Kurochkin, I. V., and Goto, S. (1994). Alzheimer's [beta]-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Letters* 345, 33-37.

Lai, M. T., Chen, E., Crouthamel, M. C., DiMuzio-Mower, J., Xu, M., Huang, Q., Price, E., Register, R. B., Shi, X. P., Donoviel, D. B., *et al.* (2003). Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping γ -secretase activities. *J Biol Chem* 278, 22475-22481.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3922-3927.

LaPointe, C. F., and Taylor, R. K. (2000). The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J Biol Chem* 275, 1502-1510.

Latil, A., Chêne, L., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003). Extensive analysis of the 13q14 region in human prostate tumors: DNA analysis and quantitative expression of genes lying in the interval of deletion. *The Prostate* 57, 39-50.

Laudon, H., Hansson, E. M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M. R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Naslund, J. (2005). A Nine-transmembrane Domain Topology for Presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 35352-35360.

LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003). Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-37222.

Lazarov, V. K., Fraering, P. C., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., and Li, H. (2006). From the Cover: Electron microscopic structure of purified, active {gamma}-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6889-6894.

Le Gall, S. M., Bobe, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., and Blobel, C. P. (2009). ADAMs 10 and 17 Represent

Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins such as TGF{alpha}, L-Selectin and TNF{alpha}. *Mol Biol Cell*, E08-11-1135.

Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., and Freeman, M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control egf signal activation in drosophila. *Cell* 107, 161-171.

Lee, S., Jeong, J., Majewski, T., Scherer, S. E., Kim, M.-S., Tuziak, T., Tang, K. S., Baggerly, K., Grossman, H. B., Zhou, J.-H., *et al.* (2007). Forerunner genes contiguous to RB1 contribute to the development of in situ neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 13732-13737.

Leissring, M. A., Murphy, M. P., Mead, T. R., Akbari, Y., Sugarman, M. C., Jannatipour, M., Anliker, B., Mueller, U., Saftig, P., De Strooper, B., *et al.* (2002). A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4697-4702.

Lemberg, M., and Martoglio, B. (2004). On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS letters* 564, 213-218.

Lemberg, M. K., Bland, F. A., Weihofen, A., Braud, V. M., and Martoglio, B. (2001). Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J Immunol* 167, 6441-6446.

Lemberg, M. K., and Freeman, M. (2007a). Cutting Proteins within Lipid Bilayers: Rhomboid Structure and Mechanism. *Mol Cell* 28, 930-940.

Lemberg, M. K., and Freeman, M. (2007b). Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Res* 17, 1634-1646.

Lemberg, M. K., and Martoglio, B. (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell* 10, 735-744.

Lemieux, M. J., Fischer, S. J., Cherney, M. M., Bateman, K. S., and James, M. N. (2007). The crystal structure of the rhomboid peptidase from *Haemophilus influenzae* provides insight into intramembrane proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 750-754.

Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352-357.

Levitan, D., Doyle, T. G., Brousseau, D., Lee, M. K., Thinakaran, G., Slunt, H. H., Sisodia, S. S., and Greenwald, I. (1996). Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 14940-14944.

Levitan, D., and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377, 351-354.

Liang, G., Audas, T. E., Li, Y., Cockram, G. P., Dean, J. D., Martyn, A. C., Kokame, K., and Lu, R. (2006). Luman/CREB3 Induces Transcription of the Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response Protein Herp through an ER Stress Response Element. *Mol Cell Biol* 26, 7999-8010.

Lichtenthaler, S., and Haass, C. (2004). Amyloid at the cutting edge: activation of α -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113, 1384-1387

Lichtenthaler, S. F., Beher, D., Grimm, H. S., Wang, R., Shearman, M. S., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (2002). The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 1365-1370.

Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1999). Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease γ -secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3053-3058.

Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1456-1460.

Linstedt, A. D., and Hauri, H. P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell* 4, 679-693.

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8108-8112.

Lohi, O., Urban, S., and Freeman, M. (2004). Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids. *Curr Biol* 14, 236-241.

Lopez-Otin, C., and Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J Biol Chem* 283, 30433-30437.

Loureiro, J., Lilley, B. N., Spooner, E., Noriega, V., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2006). Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature* 441, 894-897.

Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M., Broadway, N., Andrews, R., Bickett, D., Leesnitzer, M., and Becherer, J. (2005). Metalloproteinase Inhibitors for the Disintegrin-Like Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that Differentially Block Constitutive and Phorbol Ester-Inducible Shedding of Cell Surface Molecules. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* (11), pp.161-171.

Magnus, G., Johan, T., Jan, N. s., Erik, E., and Jan, J. (1999). Amyloid fibril formation by pulmonary surfactant protein C. *FEBS letters* 464, 138-142.

Makinoshima, H., and Glickman, M. S. (2005). Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* 436, 406-409.

Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9182-9187.

Martin, L., Fluhrer, R., and Haass, C. (2008a). Substrate requirements for SPPL2b dependent regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem* 284 5662-5670.

- Martin, L., Fluhrer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P., and Haass, C. (2008b). Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem* 283, 1644-1652.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8, 410-415.
- Matsuda, S., Giliberto, L., Matsuda, Y., McGowan, E. M., and D'Adamio, L. (2008). BRI2 Inhibits Amyloid {beta}-Peptide Precursor Protein Processing by Interfering with the Docking of Secretases to the Substrate. *J Neurosci* 28, 8668-8676.
- Matsuda, S., Matsuda, Y., and D'Adamio, L. (2009). BRI3 Inhibits Amyloid Precursor Protein Processing in a Mechanistically Distinct Manner from Its Homologue Dementia Gene BRI2. *J Biol Chem* 284, 15815-15825.
- Mayer, U., and Nüsslein-Volhard, C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the Drosophila embryo. *Genes & Development* 2, 1496-1511.
- McCarthy, J., Twomey, C., and Wujek, P. (2009). Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and γ -secretase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J* 21, 3980-3988.
- McLendon, C., Xin, T., Ziani-Cherif, C., Murphy, M. P., Findlay, K. A., Lewis, P. A., Pinnix, I., Sambamurti, K., Wang, R., Fauq, A., and Golde, T. E. (2000). Cell-free assays for γ -secretase activity. *Faseb J* 14, 2383-2386.
- McQuibban, G. A., Saurya, S., and Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.
- Mead, S., James-Galton, M., Revesz, T., Doshi, R. B., Harwood, G., Pan, E. L., Ghiso, J., Frangione, B., and Plant, G. (2000). Familial British dementia with amyloid angiopathy: early clinical, neuropsychological and imaging findings. *Brain* 123 (Pt 5), 975-991.
- Melamed, J., Einhorn, J. M., and Ittmann, M. M. (1997). Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 3, 1867-1872.
- Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muniswamy, M., and Beers, M. F. (2005). A Surfactant Protein C Precursor Protein BRICHOS Domain Mutation Causes Endoplasmic Reticulum Stress, Proteasome Dysfunction, and Caspase 3 Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 521-530.
- Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., Iwatsubo, T., and Takashima, A. (1999). Enhancement of amyloid β 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 265, 61-63.
- Narayanan, S., Sato, T., and Wolfe, M. S. (2007). A C-terminal region of signal peptide peptidase defines a functional domain for intramembrane aspartic protease catalysis. *J Biol Chem* 282, 20172-20179.
- Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J.-J., Kusiak, J. W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X., Ginty, D. D., Price, D. L., Borchelt, D. R., *et al.* (1998a). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. *J Biol Chem* 273, 12113-12121.

- Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J. J., Kusiak, J. W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X., Ginty, D. D., Price, D. L., Borchelt, D. R., *et al.* (1998b). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21, 1213-1221.
- Naus, S., Reipschlaeger, S., Wildeboer, D., Lichtenthaler, S. F., Mitterreiter, S., Guan, Z., Moss, M. L., and Bartsch, J. W. (2006). Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin ADAM8. *Biological Chemistry* 387, 337-346.
- Nyborg, A. C., Kornilova, A. Y., Jansen, K., Ladd, T. B., Wolfe, M. S., and Golde, T. E. (2004). Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor. *J Biol Chem* 279, 15153-15160.
- Nyborg, A. C., Ladd, T. B., Jansen, K., Kukar, T., and Golde, T. E. (2006). Intramembrane proteolytic cleavage by human signal peptide peptidase like 3 and malaria signal peptide peptidase. *Faseb J* 20, 1671-1679.
- O'Donnell, R. A., Hackett, F., Howell, S. A., Treeck, M., Struck, N., Krnajski, Z., Withers-Martinez, C., Gilberger, T. W., and Blackman, M. J. (2006). Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J Cell Biol* 174, 1023-1033.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2008). Intramembrane Processing by Signal Peptide Peptidase Regulates the Membrane Localization of Hepatitis C Virus Core Protein and Viral Propagation. *J Virol* 82, 8349-8361.
- Osenkowski, P., Li, H., Ye, W., Li, D., Aeschbach, L., Fraering, P. C., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., and Li, H. (2009). Cryoelectron Microscopy Structure of Purified [gamma]-Secretase at 12 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 385, 642-652.
- Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2008). Direct and Potent Regulation of {gamma}-Secretase by Its Lipid Microenvironment. *J Biol Chem* 283, 22529-22540.
- Ott, C. M., and Lingappa, V. R. (2002). Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *J Cell Sci* 115, 2003-2009.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C., and Dalbey, R. E. (2002). Signal peptidases. *Chem Rev* 102, 4549-4580.
- Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Perez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008). Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *J Biol Chem* 283, 677-683.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Muller, U., *et al.* (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-554.
- Pasternak, S. H., Bagshaw, R. D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C. A., Pak, B. J., Callahan, J. W., and Mahuran, D. J. (2003). Presenilin-1, nicastrin, APP and γ -secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem*.

- Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., Clark, R. F., and et al. (1995). A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 7, 297-301.
- Pittois, K., Deleersnijder, W., and Merregaert, J. (1998). cDNA sequence analysis, chromosomal assignment and expression pattern of the gene coding for integral membrane protein 2B. *Gene* 217, 141-149.
- Ploegh, H. L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.
- Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., and Golde, T. E. (2002). Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet* 11, 1037-1044.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 23255-23261.
- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4, 544-558.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirokoshi, Y., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T. C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445.
- Radzimanowski, J., Simon, B., Sattler, M., K, B., Sinning, I., and Wild, K. (2008). Structure of the intracellular domain of the amyloid precursor protein in complex with Fe65-PTB2 *EMBO reports* 9, 1134-1140.
- Ramachandran, G., Ramakrishnan, C., and Sasikharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* 7, 95-99.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., and Barrett, A. J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucl Acids Res* 34, D270-272.
- Real, P. J., Tosello, V., Palomero, T., Castillo, M., Hernando, E., de Stanchina, E., Sulis, M. L., Barnes, K., Sawai, C., Homminga, I., et al. (2009). [gamma]-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 15, 50-58.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J* 24, 742-752.
- Reiss, K., and Saftig, P. (2008). The "A Disintegrin, Metalloprotease" (ADAM) family of Sheddases: Physiological and Cellular Functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *In Press, Accepted Manuscript*.
- Ren, Z., Schenk, D., Basi, G. S., and Shapiro, I. P. (2007). Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages. *J Biol Chem* 282, 35350-35360.
- Robakis, T., Bak, B., Lin, S.-h., Bernard, D. J., and Scheiffele, P. (2008). An internal signal sequence directs intramembrane proteolysis of a cellular immunoglobulin-domain protein. *J Biol Chem* 283, 36369-36376.

- Rockwell, N. C., Krysan, D. J., Komiyama, T., and Fuller, R. S. (2002). Precursor Processing by Kex2/Furin Proteases. *Chemical Reviews* 102, 4525-4548.
- Rostagno, A., Revesz, T., Lashley, T., Tomidokoro, Y., Magnotti, L., Braendgaard, H., Plant, G., Bojsen-Moller, M., Holton, J., Frangione, B., and Ghiso, J. (2002). Complement Activation in Chromosome 13 Dementias. Similarities with Alzheimer's Disease. *J Biol Chem* 277, 49782-49790.
- Rudner, D. Z., Fawcett, P., and Losick, R. (1999). A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14765-14770.
- Salvesen, G. (2003). Signalling scissors: New perspectives on proteases. *Nature, Horizon Symposium summary*.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., and Valencia, A. (2002). BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci* 27, 329-332.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2, 835-841.
- Sato, C., Morohashi, Y., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2006a). Structure of the catalytic pore of gamma-secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci* 26, 12081-12088.
- Sato, C., Takagi, S., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2008a). The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the gamma-secretase. *J Neurosci* 28, 6264-6271.
- Sato, T., Ananda, K., Cheng, C. I., Suh, E. J., Narayanan, S., and Wolfe, M. S. (2008b). Distinct Pharmacological Effects of Inhibitors of Signal Peptide Peptidase and $\{\gamma\}$ -Secretase. *J Biol Chem* 283, 33287-33295.
- Sato, T., Diehl, T. S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M. S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* 282, 33985-33993.
- Sato, T., Nyborg, A. C., Iwata, N., Diehl, T. S., Saido, T. C., Golde, T. E., and Wolfe, M. S. (2006b). Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Biochemistry* 45, 8649-8656.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231.
- Schlondorff, J., and Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112 (Pt 21), 3603-3617.

- Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Maretzky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., de Strooper, B., Janssen, O., and Saftig, P. (2007). ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* 14, 1040-1049.
- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K. J. M., Cole, N., Moreira, J. E., Terasaki, M., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Golgi Tubule Traffic and the Effects of Brefeldin A Visualized in Living Cells. *J Cell Biol* 139, 1137-1155.
- Selkoe, D., and Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-597.
- Selkoe, D. J. (2001a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D. J. (2001b). Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron* 32, 177-180.
- Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 131, 215-221.
- Senes, A., Engel, D. E., and DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Current Opinion in Structural Biology* 14, 465-479.
- Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horre, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M. K., Berezovska, O., *et al.* (2009). γ -Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease. *Science* 324, 639-642.
- Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., *et al.* (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837-842.
- Shaw, L. M., Korecka, M., Clark, C. M., Lee, V. M. Y., and Trojanowski, J. Q. (2007). Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 295-303.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-639.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002a). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *J Biol Chem* 277, 99-111.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002b). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev Cell* 3, 99-111.
- Shen, J., and Prywes, R. (2004). Dependence of Site-2 Protease Cleavage of ATF6 on Prior Site-1 Protease Digestion Is Determined by the Size of the Luminal Domain of ATF6. *J Biol Chem* 279, 43046-43051.

- Shirotani, K., Edbauer, D., Kostka, M., Steiner, H., and Haass, C. (2004a). Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin - identification of nicastrin mutants which selectively interact with APH-1. *J Neurochem in press*.
- Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C., and Steiner, H. (2004b). Identification of distinct gamma -secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem*.
- Shirotani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., and Steiner, H. (2007). Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis* 27, 102-107.
- 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., and et al. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.
- Sisodia, S. S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6075-6079.
- Sisodia, S. S., and St George-Hyslop, P. H. (2002). [gamma]-Secretase, notch, A[beta] and alzheimer's disease: Where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3, 281-290.
- Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., and Annaert, W. (2006). Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* 281, 26569-26577.
- St George-Hyslop, P. (2000). Piecing together Alzheimer's. *Sci Am* 283, 76-83.
- Steiner, H., Fluhrer, R., and Haass, C. (2008a). Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem*.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. G., Baumeister, R., *et al.* (2000). Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nat Cell Biol* 2, 848-851.
- Steiner, H., Romig, H., Grim, M. G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R., and Haass, C. (1999a). The biological and pathological function of the presenilin-1 Δ exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 7615-7618.
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H., and Haass, C. (1999b). Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* 38, 14600-14605.
- Steiner, H., Winkler, E., and Haass, C. (2008b). Chemical Cross-linking Provides a Model of the {gamma}-Secretase Complex Subunit Architecture and Evidence for Close Proximity of the C-terminal Fragment of Presenilin with APH-1. *J Biol Chem* 283, 34677-34686.
- Strisovsky, K., Sharpe, H. J., and Freeman, M. (2009). Sequence-Specific Intramembrane Proteolysis: Identification of a Recognition Motif in Rhomboid Substrates. *Molecular Cell* 36, 1048-1059.
- Stromgren, E., Dalby, A., Dalby, M. A., and Ranheim, B. (1970). Cataracts, deafness, cerebellar ataxia, psychosis, and dementia--a new syndrome. *Acta Neurol Scand*

46 (suppl. 43), 261-262.

Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.

Sulis, M. L., Williams, O., Palomero, T., Tosello, V., Pallikuppam, S., Real, P. J., Barnes, K., Zuurbier, L., Meijerink, J. P., and Ferrando, A. A. (2008). NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood* 112, 733-740.

Surolia, I., Sarkar, D. P., and Sinha, S. (2008). Form and dimensions of aggregates dictate cytotoxicities of Danish dementia peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372, 62-66.

Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., *et al.* (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-190.

Thinakaran, G., Regard, J. B., Bouton, C. M., Harris, C. L., Price, D. L., Borchelt, D. R., and Sisodia, S. S. (1998). Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol Dis* 4, 438-453.

Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.

Tolia, A., Chavez-Gutierrez, L., and De Strooper, B. (2006). Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 281, 27633-27642.

Tolia, A., Horre, K., and De Strooper, B. (2008). Transmembrane domain 9 of presenilin determines the dynamic conformation of the catalytic site of gamma-secretase. *J Biol Chem* 283, 19793-19803.

Tsachaki, M., Ghiso, J., and Efthimiopoulos, S. (2008a). BRI2 as a central protein involved in neurodegeneration. *Biotechnology Journal* 3, 1548-1554.

Tsachaki, M., Ghiso, J., Rostagno, A., and Efthimiopoulos, S. (2008b). BRI2 homodimerizes with the involvement of intermolecular disulfide bonds. *Neurobiol Aging*.

Tsruya, R., Wojtalla, A., Carmon, S., Yogev, S., Reich, A., Bibi, E., Merdes, G., Schejter, E., and Shilo, B. (2007). Rhomboid cleaves Star to regulate the levels of secreted Spitz. *EMBO J* 26, 1211-1220.

Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S. F., Hao, Y. H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981-993.

Urban, S., and Freeman, M. (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell* 11, 1425-1434.

Urban, S., Lee, J. R., and Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107, 173-182.

Urban, S., Schlieper, D., and Freeman, M. (2002). Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. *Curr Biol* 12, 1507-1512.

Urban, S., and Shi, Y. (2008). Core principles of intramembrane proteolysis: comparison of rhomboid and site-2 family proteases. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 432-441.

Urban, S., and Wolfe, M. S. (2005). Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1883-1888.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999). β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Vidal, R., Barbeito, A. G., Miravalle, L., and Ghetti, B. (2009). Cerebral Amyloid Angiopathy and Parenchymal Amyloid Deposition in Transgenic Mice Expressing the Danish Mutant Form of Human BRI2. *Brain Pathology* 19, 58-68.

Vidal, R., Calero, M., Revesz, T., Plant, G., Ghiso, J., and Frangione, B. (2001). Sequence, genomic structure and tissue expression of Human BRI3, a member of the BRI gene family. *Gene* 266, 95-102.

Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G., and Ghiso, J. (1999). A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* 399, 776-781.

Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J. L., Bek, T., Bojsen-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J., and Frangione, B. (2000). A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4920-4925.

von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 909-918.

Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., Wasco, W., and Selkoe, D. J. (2003). γ -Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* 42, 6664-6673.

Wang, J., Beher, D., Nyborg, A. C., Shearman, M. S., Golde, T. E., and Goate, A. (2006a). C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem* 96, 218-227.

Wang, J., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Walker, E., and Goate, A. (2004). Conserved "PAL" sequence in presenilins is essential for gamma-secretase activity, but not required for formation or stabilization of gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis* 15, 654-666.

Wang, R., Tang, P., Wang, P., Boissy, R. E., and Zheng, H. (2006b). Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilins: Partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 353-358.

Wang, Y., Zhang, Y., and Ha, Y. (2006c). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444, 179-180.

Wasserman, J. D., and Freeman, M. (1997). Control of EGF receptor activation in *Drosophila*. *Trends Cell Biol* 7, 431-436.

- Watts, A., Hunt, N., Wanigasekara, Y., G. B., Wallach, D., Roufogalis, B., and Chaudhri, G. (1999). A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO Journal* 18, 2119–2126.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296, 2215-2218.
- Weihofen, A., Lemberg, M. K., Friedmann, E., Rueeger, H., Schmitz, A., Paganetti, P., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2003). Targeting Presenilin-type Aspartic Protease Signal Peptide Peptidase with gamma -Secretase Inhibitors. *J Biol Chem* 278, 16528-16533.
- Weihofen, A., Lemberg, M. K., Ploegh, H. L., Bogyo, M., and Martoglio, B. (2000). Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor. *J Biol Chem* 275, 30951-30956.
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of functional proteins and peptides from membranes. *Trends Cell Biol* 13, 71-78.
- Wen, C., Metzstein, M. M., and Greenwald, I. (1997). SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* 124, 4759-4767.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. I. V., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., and Aster, J. C. (2004). Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* 306, 269-271.
- White, S., Hessa, T., and von Heijne, G. (2005). Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks; Tamm, Lukas K. (Hrsg.). Wiley-VCH, Weinheim.
- Wickham, L., Benjannet, S., Marcinkiewicz, E., Chretien, M., and Seidah, N. (2005). Beta-Amyloid protein converting enzyme 1 and brain-specific type II membrane protein BRI3: binding partners processed by furin. *Journal of Neurochemistry* 92, 93-102.
- Wolfe, M. S. (2009a). Intramembrane-cleaving proteases. *J Biol Chem*, R800039200.
- Wolfe, M. S. (2009b). Intramembrane Proteolysis. *Chemical Reviews* 109, 1599-1612.
- Wolfe, M. S., and Kopan, R. (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 305, 1119-1123.
- Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2002). BIOCHEMISTRY: Intramembrane Proteases--Mixing Oil and Water. *Science* 296, 2156-2157.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J. S., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H. T., and Sisodia, S. S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch 1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288-292.

Worster-Drought, C., Greenfield, J. G., and McMenemey, W. H. (1940). A form of familial presenile dementia with spastic paralysis (including the pathological examination of a case). *Brain* 63, 237-254.

Worster-Drought, C., Hill, T. R., and McMenemey, W. H. (1933). Familial presenile dementia with spastic paralysis. . *J Neurol Psychopath* 14, 27-34.

Wu, Z., Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R. P., Gu, L., Jeffrey, P. D., Urban, S., and Shi, Y. (2006). Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat Struct Mol Biol*.

Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006). The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase. *J Neurosci* 26, 3821-3828.

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., *et al.* (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* 402, 533-537.

Ye, J., Davis, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2000). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by Site-2 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5123-5128.

Zhang, C., Wu, B., Beglopoulos, V., Wines-Samuels, M., Zhang, D., Dragatsis, I., Sudhof, T. C., and Shen, J. (2009). Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature* 460, 632-636.

Zhou, S., Zhou, H., Walian, P. J., and Jap, B. K. (2005). CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7499-7504.

Danksagung

Voraussetzung für diese Dissertation war die intensive wissenschaftliche Betreuung durch PD Dr. Regina Fluhrer und Prof. Dr. Christian Haass. Durch die gemeinschaftliche Entwicklung der Projekte ist im Nachhinein nicht exakt festzustellen, wer zu welchem Zeitpunkt welche Idee beigetragen hat, aber die Gesamtheit der Vorschläge und deren experimentelle Überprüfung führte zum Erfolg. Ich danke daher PD Dr. Regina Fluhrer und Prof. Dr. Christian Haass für ihr außerordentliches Engagement, die Bereitstellung erstklassiger Arbeitsbedingungen sowie für die Überlassung des Dissertations-Themas. Ich bedanke mich bei PD Dr. Konstanze Winklhofer für die Betreuung und Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München.

Viele Mitarbeiter des Lehrstuhls für Stoffwechselbiochemie der Ludwigs-Maximilians-Universität hatten durch ihre wissenschaftliche Kreativität, aber auch durch kritische Fragen starken Einfluss auf den Verlauf der Arbeit. Hervorzuheben sind Prof. Dr. Harald Steiner, Dr. Michael Willem, Dr. Anja Capell, Dr. Richard Page, Dr. Peer-Hendrik Kuhn, Dr. Blanca Pérez-Revuelta, Dr. Tim Bartels, Dr. Angelika Rambold, Ulf Dettmer und Manuel Lehm.

Da der Laboralltag nicht nur von guten Ergebnissen, sondern häufig von Enttäuschungen geprägt ist, ist eine starke Gemeinschaft Voraussetzung für eine gelungene experimentelle Dissertation. Hierfür bedanke ich mich besonders bei Martina Haug-Kröper, Gudula Grammer und Bärbel Klier.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Karina Reiss, Prof. Dr. Elisabeth Kremmer, Prof. Dr. Paul Saftig, Dr. Sven Lammich, PD Dr. Rolf Postina und Prof. Dr. Falk Fahrenholz für die wissenschaftliche Kooperation und die Bereitstellung von Reagenzien.

Meine Eltern haben mich immer unterstützt – das ist nur eine kurze Zeile, aber ich danke Euch sehr!

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenprogramm „Protein Dynamics in Health and Disease“ im Rahmen des Elite Netzwerks Bayern, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Projekt HA 1737/11-1) und dem Bayerisch-Kalifornischen Hochschulzentrum BaCaTeC gefördert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Martin, Lucas
Geburtstag: 14. April 1980
Geburtsort: Mannheim, Deutschland
Adresse Bänschstr. 79, 10247 Berlin

Berufserfahrung

03.2009 – Bayer AG; Global Drug Discovery; Laborleiter im Bereich Diagnostische Bildgebung in der Abteilung CNS-Imaging Research & New Fields

Promotion

03.2006 – 02.2009 Dissertation: „Regulierte Intramembranproteolyse des Bri2-Proteins“; Betreuer: Prof. Dr. C. Haass, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie, LMU München
Promotionsprüfung am 01.06.2010.

Studium

10.2003 – 01.2006 Biochemie TU München, Master of Science, *summa cum laude*
Master Thesis: „Effekte der Toxizität von Hefeprion-Proteinen auf Säuger-Zellen“; Betreuer: Prof. Dr. H. Schätzl, Institut für Virologie, TU München

10.2000 – 07.2003 Biochemie TU München, Bachelor of Science, *cum laude*
Bachelor Thesis: „HD-Zip Transkriptionsfaktoren in *Zea Mays*“; Betreuer: Prof. Dr. A. Gierl, Lehrstuhl für Genetik, TU München

Praktika und Auslandsaufenthalte während des Studiums

04.2005 – 07.2005 BASF Corp, Agricultural Products, NC, USA

11.2004 – 02.2005 TU München, Institut für Biotechnologie

03.2004 – 07.2004 Auslandssemester an der ETH Zürich, Schweiz

10.2003 – 12.2003 MPI für Biophysikalische Chemie, Abteilung Zelluläre Biochemie, Göttingen

Schulische Ausbildung

1990 - 1999 Lessing-Gymnasium Mannheim, Abitur, Note: 1,5

1986 - 1990 Oststadt Grundschule Mannheim

Mitgliedschaften

Internationales Graduierten Programm „Protein Dynamics in Health and Disease“
Elite Netzwerk Bayern

Graduiertenprogramm des SFB596 Neurodegenerative Erkrankungen

McKinsey & Company Capstone Programm

Publikationen, Posterpräsentationen, bibliographisch zitierfähige Abstracts und Vorträge

Publikation: **Martin L.**, Fluhrer, R., Reiss K., Kremmer E., Saftig P., and Haass C.
Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/b
Journal of Biological Chemistry, October 25, 2007

Publikation: Fluhrer R., Fukumori A., **Martin L.**, Grammer G., Haug-Kröper M., Klier B.,
Winkler E., Kremmer E., Condron M., Teplow D., Steiner S., and Haass C.
*Intramembrane proteolysis of GxGD-type aspartyl proteases is slowed by a familial
Alzheimer disease-like mutation*
Journal of Biological Chemistry, September 3, 2008

Publikation: **Martin L.**, Fluhrer, R., and Haass C.
Substrate requirements for SPPL2b dependent intramembrane proteolysis
Journal of Biological Chemistry, December 29, 2008

Poster: **Martin, L.**, Fluhrer, R., Reiss, K., Saftig P. and Haass, C.
7th Eibsee conference on molecular mechanisms of Alzheimer's disease
Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 by ADAM10 and SPPL2a and SPPL2b.

Poster: Haass, C., **Martin, L.**, Fukumori, A., Steiner, H., Fluhrer R.
International Conference on Alzheimer's Disease 2009
*P1-168: Substrate requirements and mechanisms of intramembrane proteolysis by
gamma-secretase and related proteases*

Abstract: Fluhrer R., Fukumori A., **Martin L.**, Teplow D.B., Steiner H., and Haass C.
*Intramembrane cleavage of TNF α by SPPL2b carrying a familial Alzheimer's disease-like
mutation*
Alzheimer's & Dementia, Volume 4, Issue 4, July 2008, Page T726, P4-188

Vortrag: **Martin L.**

Gordon Research Conference "Proteolytic Enzymes and their Inhibitors" 2008.
Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 by ADAM10 and SPPL2a and SPPL2b.

Anhang – Nomenklatur der Intramembranproteasen

Die Klassifizierung und Nomenklatur erfolgt anhand der MEROPS Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Danach sind die Aspartylintramembranproteasen den Familien A22A (PS) und A22B (SPP/SPPL) zugeordnet. Die MEROPS-Zugangsnummern entsprechen den *Homo sapiens* - Proteinen.

Gruppe, ID	Name(n)	MEROPS #
A22A, A22.001	Presenilin 1, PS1, PSEN1, Minilin, γ-secretase component	MER005221
A22A, A22.002	Presenilin 2, PS2, PSEN2, γ-secretase component	MER005223
A22B, A22.003	Signal peptide peptidase, SPP Intramembrane protease 1, IMP1 Minor histocompatibility antigen H13, Presenilin homologue-3, PSH3 Impas 1 peptidase	MER019701
A22B, A22.007	Signal peptide peptidase-like 2a, SPPL2a Intramembrane protease 3, IMP3 Presenilin homologue-5, PSH5 Impas 3	MER019711
A22B, A22.003	Signal peptide peptidase-like 2b, SPPL2b Intramembrane protease 4, IMP4 Presenilin homologue-4, PSH3 Impas 4	MER019715
A22B, A22.005	Signal peptide peptidase-like 3, SPPL3 Intramembrane protease 2, IMP2 Presenilin homologue-1, PSH1 Impas 2	MER019708
A22B, A22.006	Signal peptide peptidase-like 2c, SPPL2c Intramembrane protease 5, IMP5 Presenilin homologue-2, PSH2 Impas 5	MER019712

Anhang – Publikationen

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b*

Received for publication, August 10, 2007, and in revised form, October 1, 2007. Published, JBC Papers in Press, October 25, 2007, DOI 10.1074/jbc.M706661200

Lucas Martin^{†1,2}, Regina Fluhrer^{†1}, Karina Reiss⁵, Elisabeth Kremmer⁹, Paul Saftig⁵, and Christian Haass^{†3}

From the [†]Center for Integrated Protein Science Munich and the Adolf Butenandt Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Neurodegenerative Disease Research, Ludwig Maximilians University, 80336 Munich, Germany, the ⁵Biochemical Institute, University of Kiel, 24098 Kiel, Germany, and ⁹Gesellschaft für Strahlenforschung-Forschungszentrum, Institute for Molecular Immunology, 81377 Munich, Germany

Presenilin, the catalytic component of the γ -secretase complex, type IV prepilin peptidases, and signal peptide peptidase (SPP) are the founding members of the family of intramembrane-cleaving G_XGD aspartyl proteases. SPP-like (SPPL) proteases, such as SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c, and SPPL3, also belong to the G_XGD family. In contrast to γ -secretase, for which numerous substrates have been identified, very few *in vivo* substrates are known for SPP and SPPLs. Here we demonstrate that Bri2 (Itm2b), a type II-oriented transmembrane protein associated with familial British and Danish dementia, undergoes regulated intramembrane proteolysis. In addition to the previously described ectodomain processing by furin and related proteases, we now describe that the Bri2 protein, similar to γ -secretase substrates, undergoes an additional cleavage by ADAM10 in its ectodomain. This cleavage releases a soluble variant of Bri2, the BRICHOS domain, which is secreted into the extracellular space. Upon this shedding event, a membrane-bound Bri2 N-terminal fragment remains, which undergoes intramembrane proteolysis to produce an intracellular domain as well as a secreted low molecular weight C-terminal peptide. By expressing all known SPP/SPPL family members as well as their loss of function variants, we demonstrate that selectively SPPL2a and SPPL2b mediate the intramembrane cleavage, whereas neither SPP nor SPPL3 is capable of processing the Bri2 N-terminal fragment.

Regulated intramembrane proteolysis (RIP)⁴ describes a novel cellular mechanism that explains how type I or type II

transmembrane proteins are proteolytically processed (1, 2). RIP is required for reverse signaling and degradation of membrane-retained stubs of certain substrates (1). In a typical example, RIP describes two proteolytic processing steps. First, a large part of the ectodomain is shed and secreted. Subsequently, intramembrane proteolysis cleaves the remaining membrane-bound fragment into two peptides, the intracellular domain (ICD) and a small peptide, which is secreted. Until recently, proteolysis within the membrane was believed to be rather impossible because water molecules, known to be required for hydrolysis of peptide bonds, may have difficulties to penetrate the hydrophobic membrane. However, currently members of three different intramembrane-cleaving protease families are known. All are polytopic proteins with their catalytic sites most likely embedded within their transmembrane domains (1). Intramembrane-cleaving metalloproteases are represented by the site-2 protease (3–5). Site-2 protease (S2P) is required for the regulation of cholesterol and fatty acid biosynthesis via the liberation of the membrane-bound transcription factor sterol regulatory element-binding protein (SREBP) by intramembrane proteolysis. In addition, site-2 protease is also involved in intramembrane processing of ATF6, a protein required for chaperone expression during unfolded protein response. Prior to intramembrane cleavage, both substrates are first shed by a luminal cleavage via site-1 protease (6).

Intramembrane-cleaving serine proteases are represented by the growing family of rhomboids. At least *Drosophila* rhomboids are known to be involved in intramembrane proteolysis of Spitz, Gurken, and Keren. Their cleavage is required for epidermal growth factor receptor signaling (7–9), but an initiating shedding event is apparently not required. Rhomboids are the first intramembrane-cleaving proteases for which crystal structures could be resolved (10–14). The crystal structures suggest that their catalytically active Ser-His dyad and water molecules are indeed embedded within the interior of the membrane.

The family of intramembrane-cleaving aspartyl proteases is represented by γ -secretase, the signal peptide peptidase (SPP) (15), its homologues the SPP-like (SPPL) proteases (1, 16–18), and the bacterial type IV prepilin peptidases, which cleave very close to or right at the membrane (19).

signal peptide peptidase; SPPL, SPP-like; ER, endoplasmic reticulum; TNF α , tumor necrosis factor α ; siRNA, small interfering RNA; HEK, human embryonic kidney; BFA, brefeldin A; HA, hemagglutinin.

* This work was supported in part by the Leibniz Award of Deutsche Forschungsgemeinschaft (to C. H.), Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant HA1737-11-1 (to C. H. and R. F.), Sonderforschungsbereich Grants SFB 415 (to P. S. and K. R.) and SFB 596 (to C. H. and E. K.), and the Center for Integrated Protein Science Munich. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Member of the Elitenetzwerk Bayern Graduate Program "Protein Dynamics in Health and Disease."

³ Supported by a "Forschungsprofessur" grant from the Ludwig Maximilians University. To whom correspondence should be addressed. E-mail: chaass@med.uni-muenchen.de.

⁴ The abbreviations used are: RIP, regulated intramembrane proteolysis; Bri2, British dementia protein-2; Itm2b, integral membrane protein 2b; ABri, amyloid British dementia protein; ICD, intracellular domain; NTF, N-terminal fragment; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; (Z-LL)₂-ketone, 1, 3-di-(N-benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone; DAPT, N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester; SPP,

γ -Secretase is a complex composed of presenilin-1 or presenilin-2, nicastrin, APH-1 (anterior pharynx defective-1), and PEN-2 (presenilin enhancer-2) (20). Presenilin is the catalytically active component of the γ -secretase complex (21) and contains the GXGD protease active site motif (22). γ -Secretase cleaves numerous type I substrates including Notch and the β -amyloid precursor protein (20, 23, 24). In both cases, the ICDs of the substrates are released to the cytosol. Although the Notch ICD is required for reverse signaling, a functional role of the β -amyloid precursor protein ICD is currently under debate (20, 24), and for a number of other substrates the function of the ICD is unknown. Besides the ICDs, γ -secretase also liberates the amyloid β -peptide and the corresponding Notch β -peptide (25). Amyloid β -peptide accumulates in amyloid plaques and vascular deposits characteristic for Alzheimer disease. Although γ -secretase only accepts type I-oriented substrates, members of the SPP family are required for intramembrane proteolysis of type II transmembrane proteins (1). SPP family members are differentially located within the cells (26, 27). SPP and SPPL3 are predominantly observed within the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi, whereas SPPL2a and SPPL2b are additionally found in late Golgi compartments and endosomes/lysosomes (26). Consistent with its subcellular localization, SPP is required for the removal of signal peptides from the ER membrane (15). Beside its function in removal of signal peptides, SPP is also involved in immune surveillance and intramembrane cleavage of the hepatitis C viral core protein (15, 28). No substrate has so far been identified for the ER/Golgi located SPPL3. For SPPL2a and SPPL2b currently two *in vivo* substrates, tumor necrosis factor α (TNF α) and the Fas ligand, are known (27, 29, 30).

The ectodomains of both substrates undergo shedding by members of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family. TNF α is further processed by intramembrane cleavages of SPPL2a/SPPL2b to produce the TNF α ICD and the secreted TNF α C domain (29). The TNF α ICD triggers expression of the pro-inflammatory cytokine interleukin-12 in dendritic cells (27). Because of the restricted cell and tissue specific expression of TNF α and FasL, additional substrates for SPPL2a/SPPL2b are to be expected.

We therefore investigated the type II-oriented transmembrane protein Bri2, also known as Itm2b, which is the precursor of the ABri amyloid protein (31). For clarity, we will use the term Bri2 throughout the manuscript. Bri2 undergoes processing by furin and related proteases within its ectodomain (32, 33), which leads to the release of its 4-kDa C-terminal propeptide. Mutations of the stop codon in the *bri2* (*itm2b*) gene are responsible for the generation of a longer open reading frame, therefore causing the release of a longer propeptide by furin-mediated proteolysis (31–33). The mutant Bri2 amyloid propeptides (ABri) tend to aggregate into oligomers, protofibrils, and further into amyloid deposits and cause familial British (31) and Danish dementia (34), which are autosomal dominant neurodegenerative diseases characterized by amyloid angiopathy, plaques, and neurofibrillar tangles (33, 35).

We have now investigated the proteolytic processing of Bri2. Surprisingly, in addition to the furin-mediated release of the C-terminal propeptide, a large part of the remaining ectodo-

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

main, the so-called BRICHOS domain, is shed by ADAM10 and released to the extracellular space. The remaining membrane-associated N-terminal fragment (NTF) undergoes intramembrane proteolysis mediated by SPPL2a or SPPL2b. This cleavage generates the Bri2 ICD, which is liberated into the cytosol and the secreted Bri2 C domain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture, cDNAs, and Transfection—HEK293EBNA, HEK293TR, and SH-SY5Y cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). SNKBE cells were cultured in Ham's F-12 medium (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) supplemented with 2.5% non-essential amino acids (Invitrogen) and 10% fetal calf serum. A-431 cells were cultured in Advanced RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 0.5% penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum. Using PCR, a C-terminal HA tag (AYPYDVPDYA) was added to all constructs. SPPL2a, SPPL2a D412A, SPPL2b, SPPL2b D421A, and SPPL3 D272A were subcloned into the NheI and NotI or EcoRI and XhoI sites of pcDNA 3.1. Zeo⁻ (Invitrogen) and stably transfected into HEK293EBNA cells. SPP, SPP D265A, and SPPL3 were subcloned into the EcoRI and XhoI sites of pcDNA 4/TO A (Invitrogen) and stably transfected into HEK293 TR cells (Invitrogen). Transfection of cells was carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and single cell clones were generated by selection in 200 μ g/ml zeocin (Invitrogen). To induce expression of SPP, SPP D265A, and SPPL3, cells were incubated with 1 μ g/ml doxycycline (BD Biosciences) added to the cell culture medium for at least 48 h.

Bri2 cDNA was purchased from RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin, Germany). After the starting methionine an N-terminal FLAG tag (DYKDDDDK) and, at the C terminus of the protein, a V5 tag (GKPIPPLGLDST) were added, and the PCR product was subcloned into the HindIII and XbaI sites of pcDNA6.0-V5-His A (Invitrogen). The Bri2 Δ E and the Bri2 Δ FC constructs were generated by deleting the C-terminal part of the protein after amino acids 94 and 240, respectively. The Bri2 KR 243/244 AA (KR/AA) construct was generated by PCR mutagenesis. These Bri2 constructs also contain an N-terminal FLAG tag and a C-terminal V5 tag and were subcloned into the HindIII and XbaI sites of pcDNA6.0-V5-His A (Invitrogen). All cDNA constructs were sequenced for verification. Bri2 cDNAs were either transiently or stably expressed in cell lines stably expressing SPPs or SPPLs as described above.

Antibodies, Immunoprecipitation, and Immunoblotting—The anti-HA peroxidase-coupled 3F10 antibody was obtained from Roche Diagnostics. The monoclonal anti-FLAG M2 and the polyclonal HA 6908 antibody were obtained from Sigma. Polyclonal and monoclonal V5 antibodies were purchased from Chemicon (Schwalbach, Germany) and Invitrogen, respectively. The polyclonal antibodies against ADAM10, Calnexin, and ADAM17 (TACE) were purchased from Calbiochem, Stressgene/Biomol (Hamburg, Germany), and Oncogene, respectively. The polyclonal anti-Bri2 antibody (ITM2b

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

ab14307) directed against the first 60 amino acids of human Bri2 was obtained from Abcam (Cambridge, UK). The monoclonal SPPL2b-specific antibody CADG-3F9 directed against amino acids 518–535 of the protein was established by Dr. Elisabeth Kremmer (GSF-Forschungszentrum, Munich). Anti-mouse, anti-rabbit, and anti-chicken peroxidase secondary antibodies were purchased from Promega (Madison). Immunoprecipitation assays, gel electrophoresis, immunoblotting experiments, and co-immunoprecipitation assays were carried out as described previously (26, 29).

Immunocytochemistry and Confocal Imaging—The indicated cell lines were grown on polylysine-coated glass coverslips to 50–80% confluence and processed for immunofluorescence as described before (26). Confocal images were obtained with Zeiss 510Meta confocal laser scanning microscope system equipped with a 100/1.3 objective described previously (36). Images were assembled and processed using Adobe Illustrator.

Inhibitor Treatment and RNA Interference—To inhibit SPPL2b, cells were treated overnight with a final concentration of 15 μM (Z-LL)₂-ketone (Calbiochem), a known SPP inhibitor (37). As a control, cells were treated with 3 μM γ -secretase inhibitor DAPT (38) or the respective carrier.

To block specific metalloprotease activities, cells were grown in a 6-well format and treated overnight with either 50 μM TAPI-1 (Peptides International) or 50 μM TAPI-2 (Peptides International). Hydroxamate-based inhibitors GW280264 (5 μM) and GI254023 (5 μM) are described elsewhere (39).

For quantification, proteins were immunoblotted as described above and detected using the enhanced chemiluminescence technique (GE Healthcare). The chemiluminescence signals of at least three independent experiments were measured with a CD camera-based imaging system (Alpha-Innotec, Kasendorf, Germany). Statistical significance was determined with Student's *t* test. Statistically significant *p* values of <0.05 or <0.005 are represented by or, respectively.

RNA interference experiments were carried out as follows. 1×10^6 cells/well were plated in a polylysine-coated 6-well format. After a 2-h incubation, cells were transfected with the indicated small interfering RNA (siRNA) (Dharmacon siRNA SMARTpools: catalog numbers M-0040503-01 (ADAM10), M-003453-00 (ADAM17), and D-001206-13 (non-targeting control)), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 24 h after transfection, the medium was exchanged, and cells were harvested 48 h after transfection. Five independent experiments were quantified as described above. BRICHOS and Bri2 Δ FC levels were first normalized to the calnexin expression level, and then the ratio of BRICHOS to Bri2 Δ FC was determined. Resulting data for control siRNA were set to 100%.

Where indicated cells were treated overnight with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ brefeldin A (BFA; Sigma-Aldrich). As a control, cells were incubated with the respective carrier.

RESULTS

Shedding of Bri2 by ADAM10—The Bri2 protein is a type II transmembrane protein, known to be processed within its ectodomain by furin and related proteases (Fig. 1A, *proBri2*) (32, 33, 40). Consequently, a membrane-bound fragment, con-

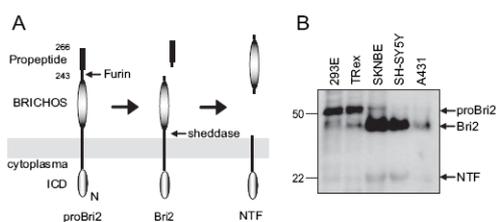


FIGURE 1. Proteolytic processing of Bri2. A, schematic presentation of Bri2 processing by furin (or related proteases) and a sheddase. B, proteolytic processing of endogenous Bri2. Membrane preparations of human embryonic kidney cells (HEK293/TRex), SKNBE cells, SH-SY5Y cells, and A431 cells were analyzed using the anti-Bri2 antibody (ITM2b ab14307) directed against the first 60 amino acids of human Bri2. Besides the expected Bri2 variants (pro-Bri2/Bri2), an additional Bri2 NTF of ~ 22 kDa was detected in all cell lines.

taining the so-called BRICHOS domain, remains after this initial processing (Fig. 1A, *Bri2*). As expected, Bri2 containing the propeptide (*pro-Bri2*) was detected at a molecular mass of ~ 50 kDa in all cell lines tested. The mature Bri2 variant lacking the propeptide (*Bri2*) was detected at a slightly lower molecular weight and was most prominently visible in cell lines of neuronal origin (Fig. 1B, *SKNBE*, *SH-SY5Y*). However, besides these expected Bri2 species, we additionally detected a lower molecular mass Bri2 NTF of ~ 22 kDa in all cell lines investigated (Fig. 1B). We therefore assumed that Bri2 might undergo shedding because such a proteolytic processing step would result in the generation of a small membrane retained stub (Fig. 1A, *NTF*).

If such a shedding event takes place, one would expect a secreted counterpart containing the BRICHOS domain (see Fig. 1A). To allow identification of such a secreted domain, we inserted a V5 tag directly at the C terminus of the BRICHOS domain generating Bri2 Δ FC (Fig. 2A). Upon expression of this cDNA construct, we indeed detected the ~ 25 -kDa BRICHOS domain as a secreted species in the conditioned medium (Fig. 2B). Similar to cells expressing endogenous Bri2 (Fig. 1B), NTF was observed within the cell lysate (Fig. 2B). This suggests that the BRICHOS domain and the Bri2 NTF are generated by a novel shedding event of Bri2 and may explain the observation of a N-terminal Bri2 fragment of unknown origin by Choi *et al.* (40). In analogy to many γ -secretase substrates, which require shedding by proteases of the ADAM family, we investigated whether a member of this protease family is involved in shedding of Bri2. Broad ADAM protease inhibitors, such as TAPI-1 and TAPI-2 (41), strongly reduced the secretion of the BRICHOS domain (Fig. 2C). The nature of the metalloprotease activity was narrowed down using two hydroxamate-based inhibitors that differ in their inhibitory profile. The inhibitor GW280264X has been shown to block ADAM17 and ADAM10, whereas the compound GI254023X preferentially blocks ADAM10 (39). Both inhibitors strongly blocked secretion of the BRICHOS domain (Fig. 2D). To finally determine which of the two proteases is required for shedding of Bri2, we selectively knocked down ADAM10 and ADAM17 using RNA interference techniques. Upon transient knockdown of ADAM10, secretion of the BRICHOS domain was significantly reduced compared with cells treated with a control RNA interference oligonucleotide. The knockdown of ADAM17 on the

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

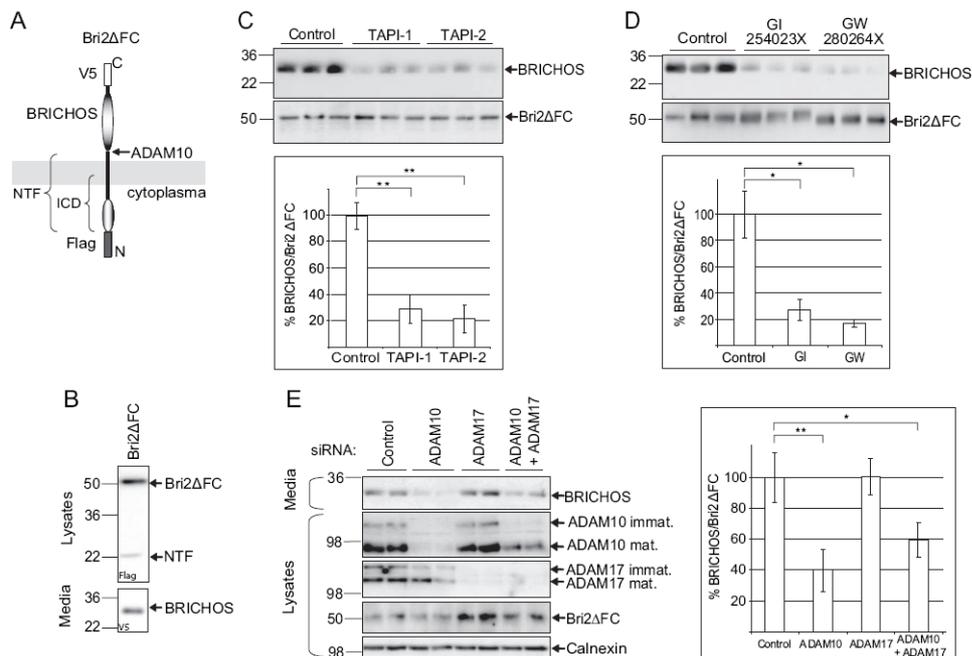


FIGURE 2. Shedding of Bri2 by ADAM10. A, schematic presentation of Bri2 Δ FC. Bri2 Δ FC lacks the C-terminal propeptide. The V5 tag was inserted at amino acid 240 of Bri2. B, proteolytic processing of Bri2 Δ FC. Cell lysates and the conditioned medium of HEK293 cells stably expressing Bri2 Δ FC were analyzed for the indicated processing products. Bri2 Δ FC was detected as a single band of ~50 kDa using the anti-FLAG antibody. In addition the above described (Fig. 1B) NTF of ~22-kDa was detected in the cell lysate. The potentially N-glycosylated BRICHOS domain was observed in the conditioned medium as an ~25-kDa peptide using the V5 antibody. C, TAPI treatment reduces BRICHOS secretion. HEK293 cells stably expressing Bri2 Δ FC were treated with 50 μ M TAPI-1 or TAPI-2 overnight. Control cells were treated with carrier (Me₂SO) only. Compared with controls, cells treated with the TAPI-1 and TAPI-2 show a significantly reduced ($71 \pm 11.2\%$, $p < 0.001$, and $78 \pm 10.2\%$, $p < 0.001$, respectively) BRICHOS secretion. Detection of Bri2 Δ FC was used as a loading control (lower panel). D, selective ADAM10/ADAM17 inhibitors reduce BRICHOS secretion. HEK293 cells stably expressing Bri2 Δ FC were treated with 5 μ M ADAM10 or ADAM10- and ADAM17-specific inhibitor GI254023X or GW280264X, respectively, overnight. GI254023X and GW280264X cause a significantly reduced liberation of the BRICHOS domain ($73 \pm 8\%$, $p < 0.010$, and $83 \pm 3\%$, $p < 0.015$, respectively). E, ADAM10 is the BRICHOS sheddase. HEK293 cells stably expressing Bri2 Δ FC were transfected with specific siRNA against ADAM10, ADAM17, or a nonspecific siRNA as a control. Knockdown efficiency was proven by immunoblotting for ADAM10 and ADAM17. Detection of calnexin serves as a loading control. BRICHOS liberation was strongly reduced upon knockdown of ADAM10 or both ADAM10 and ADAM17 ($60 \pm 13\%$, $p < 0.001$, and $40 \pm 11\%$, $p < 0.017$, respectively). Knockdown of ADAM17 alone does not reduce the secretion of the BRICHOS domain, indicating that ADAM10 is the major Bri2 sheddase. Note that the knockdown efficiency of ADAM10 in double knockdown experiments is slightly reduced, allowing a stronger BRICHOS secretion compared with the single ADAM10 knockdown.

other hand did not have a significant effect on the secretion of the BRICHOS domain. A combined knockdown of ADAM10 and ADAM17 failed to further reduce BRICHOS secretion (Fig. 2E). Taken together, these data demonstrate that Bri2 undergoes ectodomain shedding via proteolytic processing by ADAM10.

Bri2 Is a Substrate for Intramembrane Proteolysis by SPPL2a and SPPL2b—Ectodomain shedding produces membrane-retained stubs that frequently undergo additional processing within their transmembrane domains to either remove the membrane-bound stub or to induce nuclear signaling (see Introduction). To investigate whether Bri2 is also a substrate for intramembrane proteolysis, we expressed the full-length pro-Bri2 protein in HEK293 cells and investigated the proteolytic processing by an immunoprecipitation analysis (Fig. 3B). Interestingly, in addition to pro-Bri2, Bri2, and NTF, we

detected a fragment of ~10 kDa (ICD) in the cell lysate (Fig. 3B) suggesting that the NTF may be further processed. Importantly, NTF and ICD generation occurs via processing by endogenous proteases, and the Bri2 substrate has not been modified at any cleavage site. ICD generation suggests that Bri2 undergoes proteolysis by an intramembrane-cleaving protease. Because Bri2 is a type II-oriented protein, obvious candidates for intramembrane proteolysis are the members of the SPP/SPPL family. To determine whether any of the SPP family members could mediate intramembrane proteolysis of Bri2, we co-expressed SPP, SPPL2a, SPPL2b, and SPPL3 with the full-length Bri2 protein in HEK293 cells. In addition, the catalytically inactive variants with the corresponding TM7 aspartate mutated to alanine (D/A mutants) (26) were also investigated. The pro-Bri2 protein was expressed with a C-terminal V5 tag and an N-terminal FLAG tag to allow detection of

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

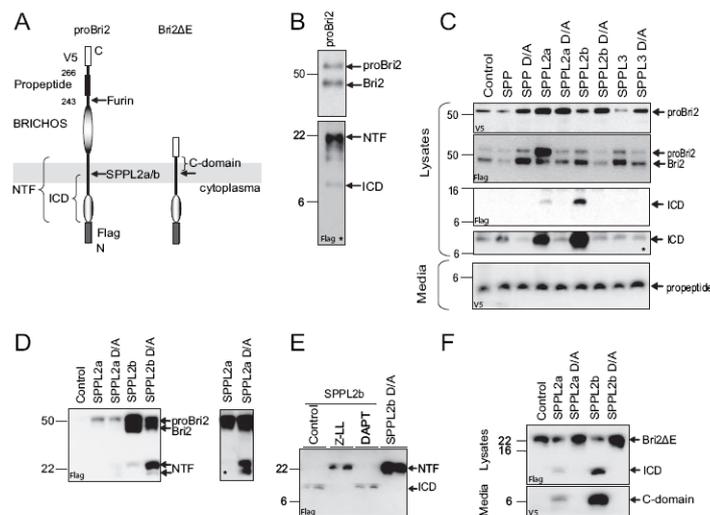


FIGURE 3. Bri2 is a substrate for intramembrane proteolysis by SPPL2a and SPPL2b. A, schematic presentation of pro-Bri2 and Bri2 Δ E. Bri2 constructs are N-terminally FLAG-tagged and C-terminally V5-tagged. The Bri2 Δ E construct lacks the BRICHOS ectodomain and the propeptide. B, detection of a 10-kDa N-terminal intracellular fragment. Pro-Bri2 was stably overexpressed in HEK293 cells. Cell lysates were immunoprecipitated using the anti-FLAG antibody and were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. As described in the legends for Figs. 1B and 2B, a NTF of ~22 kDa was detected. In addition, another intracellular fragment of about 10 kDa (ICD) was detected after longer exposure. Note that the proteolytic products of Bri2 (NTF, ICD; mature Bri2) were generated by endogenous proteases. C, proteolytic processing of Bri2 by SPPL2a and SPPL2b. HEK293 cells stably expressing SPP, SPPL2a, SPPL2b, and SPPL3, or the respective catalytically inactive D/A mutants were transiently transfected with pro-Bri2. Cell lysates and the conditioned media were immunoprecipitated using antibodies against the FLAG tag and the V5 tag, respectively, and were subsequently subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. The indicated Bri2 fragments were detected using antibodies against the indicated tags. In all cell lines, the propeptide was secreted into the conditioned medium. Using an antibody against the C-terminal V5 tag, pro-Bri2 was detected as a single band in the cell lysates, whereas pro-Bri2 and the furin-processed mature Bri2 were detected as a double band with an antibody directed against the N-terminal FLAG tag. An additional ~10-kDa anti-FLAG positive band (Bri2 ICD) was detected in cells expressing SPPL2a or SPPL2b but not in cells expressing SPP, SPPL3, or the catalytically inactive mutants. Upon longer exposure, the endogenously produced ICD was also detected as shown in B. D, co-immunoprecipitation of Bri2 and SPPL2a/SPPL2b. HEK293 cells expressing SPPL2a/SPPL2b or the inactive mutants SPPL2a/SPPL2b D/A were transiently transfected with pro-Bri2. Immunoprecipitation of SPPL2a or SPPL2b, using an anti-HA antibody, and detection of Bri2, using an anti-FLAG antibody, revealed binding of pro-Bri2, Bri2, and the Bri2 NTF to SPPL2a (longer exposure) and SPPL2b. E, pharmacological inhibition of SPPL2b prevents Bri2 ICD generation. HEK293 cells stably expressing the indicated SPPL variants and pro-Bri2 were treated as indicated with 15 μ M (Z-LL)₂-ketone or 3 μ M DAPT overnight. Control cells were treated with Me₂SO. Bri2 ICD formation was inhibited by the SPP/SPPL-specific inhibitor (Z-LL)₂-ketone but not by the γ -secretase inhibitor DAPT. Note the accumulation of the NTF upon (Z-LL)₂-ketone treatment and expression of catalytically inactive SPPL2b variant (SPPL2b D/A). F, proteolytic processing of Bri2 Δ E by SPPL2a and SPPL2b. HEK293 cells stably expressing the indicated SPPL variants were transiently transfected with Bri2 Δ E. Cell lysates and conditioned media were analyzed for Bri2-specific fragments using antibodies against the FLAG tag and the V5 tag, respectively. The Bri2 Δ E construct was processed by SPPL2a and SPPL2b, giving rise to the Bri2 ICD and a secreted C domain. The catalytically inactive mutants do not process Bri2 Δ E and fail to generate the ICD and the C domain.

proteolytic processing products from both ends (Fig. 3A). Consistent with previous findings, the prodomain of Bri2 is proteolytically removed (32, 33). Immunoblotting of cell lysates with an antibody to the N-terminal FLAG tag revealed both Bri2, lacking the C-terminal propeptide, and pro-Bri2 still containing the propeptide (Fig. 3C). In contrast, the antibody to the C-terminal V5 tag selectively detects pro-Bri2 in the cell lysate (Fig. 3C, upper panel). In addition, the tagged 5-kDa propeptide was found to be released and secreted into the media of all cell lines (Fig. 3C). Removal of the prodomain occurs independently of whether and which SPP/SPPL was expressed or

not (Fig. 3C). Robust amounts of the 10-kDa N-terminal fragment corresponding to the ICD of Bri2 were detected in cell lysates only upon expression of SPPL2a and SPPL2b (Fig. 3C). In contrast, no increase in ICD generation above the background level was detectable upon expression of SPP or SPPL3 (Fig. 3C). Increased amount of ICD was only produced in the presence of catalytically active SPPL2a/SPPL2b, and its production was abolished upon expression of the catalytically inactive D/A mutants of SPPL2a and SPPL2b (Fig. 3C). Note that longer exposure reveals the ICD generated by endogenous processing (compare Fig. 3, B and C). We concluded that this fragment might be produced via intramembrane proteolysis by SPPL2a and SPPL2b, and therefore we investigated whether SPPL2a/SPPL2b may directly interact with the Bri2 substrate. Co-immunoprecipitation allowed the co-isolation of the 22-kDa NTF as well as of the furin-generated Bri2 protein and the full-length pro-Bri2 together with SPPL2a/SPPL2b (Fig. 3D). NTF co-immunoprecipitated at high levels when the inactive D/A mutation of SPPL2a or SPPL2b was co-expressed (Fig. 3D), which is similar to the accumulating C-terminal fragments of γ -secretase substrates upon its inhibition (42). In line with these findings, the NTF accumulated upon treatment with (Z-LL)₂-ketone, a selective SPP/SPPL inhibitor (15), but not with the γ -secretase inhibitor DAPT (38). Furthermore, (Z-LL)₂-ketone inhibits ICD generation, as does expression of the catalytically inactive SPPL2b D/A mutant (Fig. 3E).

To prove whether Bri2 lacking its ectodomain is sufficient for SPPL2 cleavage, we generated a recombinant Bri2 NTF (Fig. 3A, Bri2 Δ E) corresponding to the Notch Δ E construct previously used to investigate γ -secretase function (43). Expression of this construct was sufficient to allow SPPL2a/SPPL2b-dependent ICD formation of Bri2 (Fig. 3F). Moreover, in the conditioned medium of cells expressing Bri2 Δ E, we detected the secreted counterpart of the ICD, which we called Bri2 C domain (Fig. 3, A and F). Both, ICD and C domain generation are blocked upon expression of the D/A mutants of SPPL2a/SPPL2b (Fig. 3F).

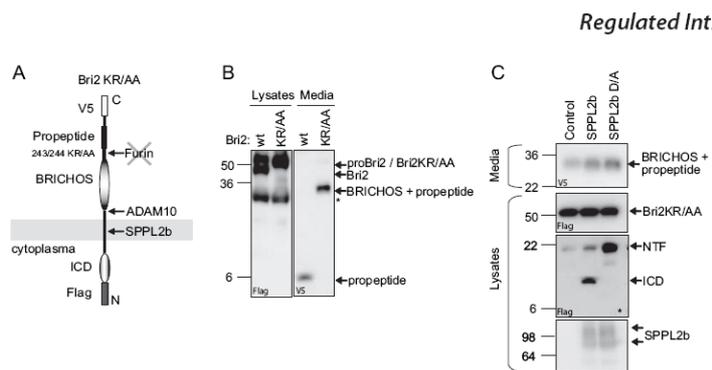


FIGURE 4. Shedding by ADAM10 and intramembrane cleavage by SPPL2b occur independently of a prior cleavage of Bri2 by furin. *A*, schematic presentation of Bri2KR/AA. The residues Lys-243 and Arg-244 were both mutated to alanine, resulting in a furin-uncleavable Bri2 variant. *B*, Bri2KR/AA was not processed by furin. Cells stably expressing the indicated Bri2 variants were analyzed for the indicated cleavage products as described in the legend to Fig. 3C. In cell lines expressing Bri2KR/AA, the BRICHOS domain containing the uncleaved propeptide was secreted into the conditioned medium, whereas no liberated propeptide was detected. In cell lines expressing wild-type (wt) Bri2, the secreted BRICHOS domain was not detected because the V5 tag was removed by furin-mediated processing. In cell lysates, Bri2KR/AA was detected as a single protein of ~50 kDa, indicating that Bri2KR/AA cannot be processed by furin. *C*, Bri2KR/AA was processed by SPPL2b and ADAM10. Cells stably expressing the indicated SPPL2b variants and Bri2KR/AA were analyzed for the indicated processing products as described in the legend to Fig. 3C. In all cell lines, the BRICHOS domain containing the uncleaved propeptide was secreted into the conditioned media. In cells expressing the active SPPL2b, the Bri ICD (10 kDa) was detected additionally. Asterisk indicates longer blot exposure.

Shedding by ADAM10 and Intramembrane Cleavage by SPPL2b Occur Independently of a Prior Cleavage of Bri2 by Furin—Next, we investigated whether shedding of Bri2 by ADAM10 requires a previous cut by furin. Therefore we blocked the furin cleavage of Bri2 by mutagenizing the corresponding cleavage site at amino acid 243/244 (33) generating Bri2KR/AA (Fig. 4A). In cells expressing the mutant Bri2KR/AA protein, no propeptide was detected in the conditioned medium, but an ~30-kDa fragment corresponding to a peptide containing the BRICHOS domain and the propeptide was observed (Fig. 4B). In the corresponding lysates, only one single band representing the FL Bri2KR/AA protein was detected (Fig. 4B), confirming that propeptide cleavage was abolished in the mutant Bri2 variant. The mutant Bri2 substrate was then co-expressed with SPPL2b and the inactive SPPL2b D/A mutant (Fig. 4C). Secretion of the BRICHOS domain (including the propeptide) was independent of the biological activity of SPPL2b (Fig. 4C). Thus these data demonstrate that shedding of Bri2 by ADAM10 occurs independent of furin-mediated processing. Moreover, furin-mediated processing of Bri2 was not required for its subsequent intramembrane proteolysis by SPPL2b as demonstrated by the ICD generation in Fig. 4C. This was also supported by the accumulation of the Bri2 NTF upon expression of the catalytically inactive SPPL2b D/A mutant (Fig. 4C).

Subcellular Localization of Bri2 and SPPL2b—The above described results demonstrate that preferentially SPPL2a and SPPL2b process Bri2. To investigate in which cellular compartment Bri2 and SPPL2b interact, we performed immunocytochemical experiments. Bri2 and SPPL2b co-localize within a vesicular structure close to the nucleus (Fig. 5A). Co-localization studies using antibodies against the V5 or HA tag (for Bri2 or SPPL2b, respectively) and Giantin revealed that the

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

protease and its substrate are both co-expressed within the Golgi (Fig. 5A). Additional co-staining within later secretory compartments, like endosomes, cannot be excluded. This suggests that proteolytic processing of Bri2 may be initiated upon its arrival in the Golgi. However, co-localization by itself is not sufficient for RIP of Bri2. This is demonstrated by BFA treatment that blocks forward transport from the ER to the Golgi (44). Under these conditions, SPPL2b and Bri2 fully co-localize within an ER/Golgi fusion compartment (Fig. 5B). Interestingly, the co-localization under these conditions does not allow processing of Bri2 by SPPL2b because production of the Bri2 ICD is blocked (Fig. 5C). Consistent with previous findings, furin-mediated processing was also abrogated under these conditions (40) as demonstrated by the accumulation of

pro-Bri2 in the cell lysate (Fig. 5, C and D). Upon BFA treatment, we were also not able to detect the propeptide in either the medium or the corresponding lysate (Fig. 5D). In addition, BFA treatment of cells expressing Bri2 Δ FC (see Fig. 2A) reduced the secretion of the BRICHOS domain below the detection level, and the BRICHOS domain was also not detected in the corresponding lysate (Fig. 5E). Taken together, these data suggest that co-localization of Bri2 with its proteases alone is not sufficient for RIP of Bri2.

DISCUSSION

We have demonstrated that Bri2 is a novel substrate for RIP. In contrast to previous knowledge, we could demonstrate that Bri2 is processed not only by furin or related proteases but also by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b (Fig. 6). The ADAM10 cleavage liberates the BRICHOS domain, which, like the ectodomains of many other proteins, is secreted. The function of the BRICHOS domain is unclear (45). Interestingly, the Bri2 homologues, Bri1 and Bri3 (Itm2A and Itm2C, respectively), also contain a conserved BRICHOS domain. Whether BRICHOS is secreted in these proteins remains to be verified. The secretion of the complete Bri2 BRICHOS domain strongly suggests that this domain may have a physiological function within the extracellular space and probably even far away from its producing cell. Moreover, in analogy to Notch signaling, one may expect a receptor/ligand interaction inducing shedding and intramembrane proteolysis (46). Interestingly, proteolytic processing of Notch and Bri2 share some remarkable similarities. Both contain a propeptide that is removed by furin or related proteases (32, 33, 46). Furthermore, in both cases, the ectodomain undergoes shedding via a protease of the ADAM family (46). Finally, both proteins undergo intramembrane proteolysis to produce an ICD (43) and a small secreted peptide (Fig. 6 and Ref. 47).

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

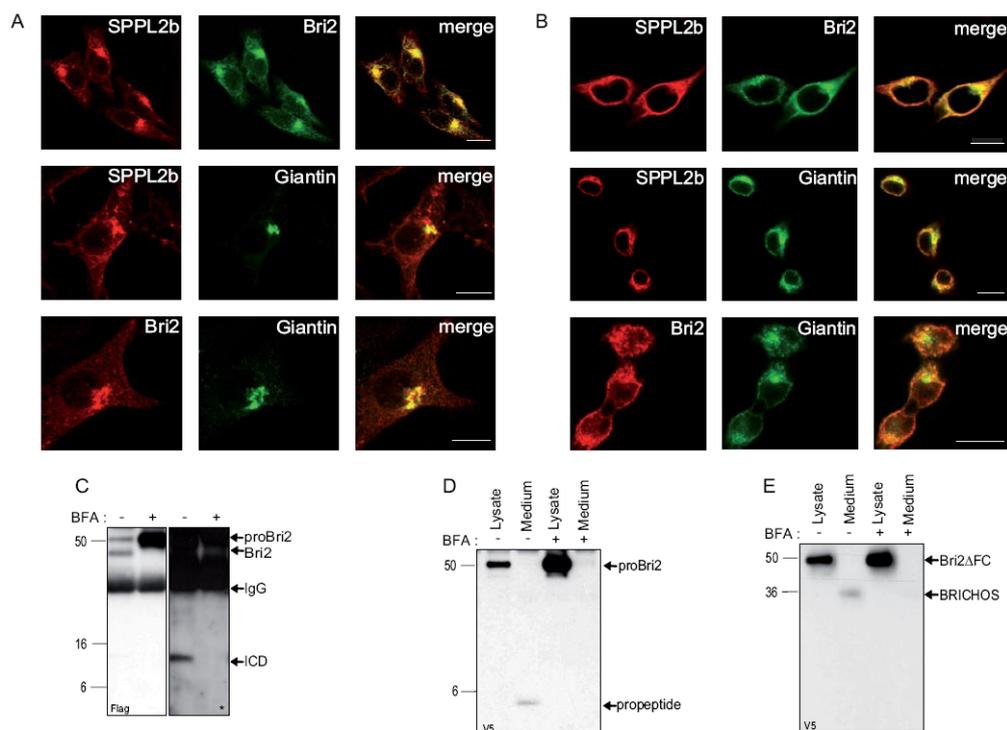


FIGURE 5. Subcellular localization of Bri2 and SPPL2b. *A*, co-localization of Bri2 and SPPL2b. HEK293 cells stably expressing SPPL2b and Bri2 were stained with antibodies against the HA or V5 tag, respectively. Bri2 and SPPL2b are co-localized. SPPL2b as well as Bri2 partially co-stain in the same subcellular structure with the Golgi resident protein Giantin, indicating that SPPL2b and Bri2 interact in the Golgi. *B*, co-localization of Bri2 and SPPL2b in BFA-treated cells. Cells described in *A* were treated with 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BFA overnight and stained as described in *A*. Co-staining of SPPL2b and Bri2 was observed in an ER/Golgi fusion compartment that surrounds the nucleus. The scale bars in *A* and *B* indicate 10 μm . *C*, SPPL2b cleavage was inhibited upon BFA treatment. Cell lysates of cells stably expressing SPPL2b and Bri2 were analyzed for Bri2 fragments using the anti-FLAG antibody. Upon BFA treatment, pro-Bri2 accumulates, whereas Bri2 and Bri2 ICD are no longer produced (*asterisk* indicates longer blot exposure). *D*, lack of furin cleavage of Bri2 in BFA-treated cells. Cells stably expressing SPPL2b and Bri2 were treated with BFA or carrier only (control) as described in *B*. Upon BFA treatment, pro-Bri2 accumulates (as also shown in *C*). Consistent with the accumulation of pro-Bri2 in cell lysates, no propeptide was detected in either cell lysates or the corresponding conditioned media. *E*, ADAM10 does not cleave Bri2 in BFA-treated cells. Cells stably expressing Bri2 ΔFC were treated as described in the legend Fig. 3C, and the indicated processing products of Bri2 were analyzed. Note that BFA treatment blocks BRICHOS generation in the conditioned medium as well as in the corresponding lysates, indicating that ADAM10 does not cleave Bri2 under these conditions.

Intramembrane proteolysis is again mediated by proteases of the same family, the GXGD proteases. Although these are striking similarities, some obvious differences are observed as well. The substrate proteins, such as Notch and Bri2, have opposite membrane orientation. This is reflected by the corresponding orientations of the catalytically active sites within presenilin and the SPPL2 (1, 15). Furthermore, γ -secretase is a protein complex that absolutely requires four components for its activity (48), whereas SPP and SPPLs apparently do not (29, 37). This is even more surprising if one compares the very similar processing pathways of Notch and Bri2. One of the components of the γ -secretase complex, nicastrin, is required as a substrate-docking site, which accepts only previously shed substrates (49). Shedding also occurs for Bri2, and we could demonstrate that the NTF of Bri2 co-isolates with SPPL2a/SPPL2b. However, in contrast to γ -secretase, which does not bind full-length

substrate (50, 51), we and others (29, 30) found that the full-length substrates (Fas ligand, Bri2, and TNF α) also co-precipitate with SPPL2a/SPPL2b. Apparently, the NTF is preferentially turned over because relatively low levels are bound to proteolytically active SPPL2a/SPPL2b, as compared with the full-length protein (see Fig. 3D and Ref. 29). In contrast, when proteolytically inactive SPPL2a/SPPL2b variants are expressed, higher levels of the NTF co-precipitate (see Fig. 3D and Ref. 29). This suggests that NTFs may be the preferred substrates of SPPL2a/SPPL2b. However, because of the potential lack of an additional cofactor such as nicastrin, less preferred full-length substrates were also bound. One may hypothesize that processing of such longer substrates could apparently be less efficient. Therefore, proteins like nicastrin may have evolved to exclude their binding. In addition to nicastrin, complex stabilization factors and proteins

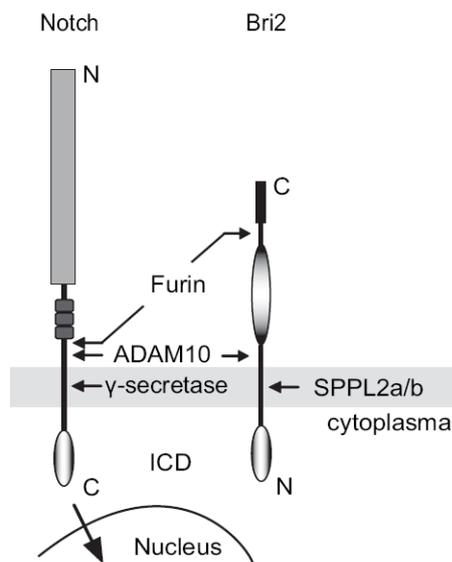


FIGURE 6. Bri2 processing resembles Notch processing. Schematic model of Bri2 and Notch processing. Notch and Bri2 are processed by furin, ADAM10, and γ -secretase or SPPL2a/SPPL2b, respectively.

that could transfer the substrate from the docking site to the catalytic center may have evolved. These proteins could be represented by PEN-2 and APH-1 (20).

Another major question is how substrates are selectively recognized by the SPP family members because Fas ligand, TNF α , and Bri2 are preferentially processed by SPPL2a and SPPL2b but not by the highly similar SPP or SPPL3 (29, 30) (Fig. 3C). This may be explained by their differential subcellular localization (26). Although SPP and SPPL3 are restricted to the endoplasmic reticulum, SPPL2a/SPPL2b occur in the Golgi and later secretory compartments such as endosomes/lysosomes (26, 27). Thus the spatial separation of the enzymes and their substrates may contribute to substrate selectivity. However, co-localization by itself is not sufficient for the processing of Bri2 by SPPL2b as demonstrated by the complete inhibition of Bri2 ICD generation upon BFA treatment. Because under these conditions propeptide removal and ectodomain shedding are blocked as well, this suggests three possible explanations for the lack of proteolytic activity of SPPL2b in this compartment: 1) maturation and folding of SPPL2b is incomplete in the ER/Golgi fusion compartment, 2) the pH in this artificial compartment is not optimal for SPPL2b activity, or 3) Bri2 NTF and not Bri2 itself is the preferred substrate for SPPL2b cleavage.

RIP is becoming an increasingly important cellular pathway as the liberated ICDs may have important functions in cellular signaling. The perhaps best understood example is the RIP of Notch, in which the Notch ICD serves as a transcription factor (46). It will be important to determine whether the Bri2 ICD also serves as a part of a signaling cascade. Besides signaling,

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

intramembrane proteolysis also plays a major role in the removal and subsequent degradation of membrane-retained fragments, which are produced by the initial shedding event (52). A similar membrane proteasome-like function may be taken over by some SPP family members to remove type II-oriented stubs from membranes.

Acknowledgments—We thank Drs. Bruno Martoglio and Christof Haffner for providing SPP/SPPL cDNAs and Gudula Grammer, Martina Haug-Kröper, and Bärbel Klier for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 71–78
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000) *Cell* **100**, 391–398
- Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) *Cell* **85**, 1037–1046
- Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X., and Goldstein, J. L. (1994) *Cell* **77**, 53–62
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) *Mol. Cell* **1**, 47–57
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000) *Mol. Cell* **6**, 1355–1364
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., and Freeman, M. (2001) *Cell* **107**, 161–171
- Urban, S., Lee, J. R., and Freeman, M. (2001) *Cell* **107**, 173–182
- Foltényi, K., Greenspan, R. J., and Newport, J. W. (2007) *Nat. Neurosci.* **10**, 1160–1167
- Wang, Y., Zhang, Y., and Ha, Y. (2006) *Nature* **444**, 179–180
- Wu, Z., Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R. P., Gu, L., Jeffrey, P. D., Urban, S., and Shi, Y. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1084–1091
- Ben-Shem, A., Fass, D., and Bibi, E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 462–466
- Lemieux, M. J., Fischer, S. J., Cherney, M. M., Bateman, K. S., and James, M. N. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 750–754
- Wang, Y., and Ha, Y. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2098–2102
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002) *Science* **296**, 2215–2218
- Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., and Golde, T. E. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1037–1044
- Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Korovaitseva, G. I., and Rogava, E. I. (2002) *Biochemistry (Mosc.)* **67**, 826–835
- Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Trends Cell Biol.* **12**, 556–562
- LaPointe, C. F., and Taylor, R. K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1502–1510
- Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**, 513–517
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. G., Baumeister, R., Fichteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000) *Dev. Biol.* **228**, 151–165
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., and De Strooper, B. (2006) *J. Neurochem.* **96**, 732–742
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002) *EMBO J.* **21**, 5408–5416
- Krawitz, P., Haffner, C., Fluhrer, R., Steiner, H., Schmid, B., and Haass, C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 39515–39523
- Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schlegler, S., Vreugde, S., Lichtenhaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 843–848
- Loureiro, J., Lilley, B. N., Spooner, E., Noriega, V., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2006) *Nature* **441**, 894–897
- Fluhrer, R., Grammer, G., Israel, L., Condrón, M. M., Haffner, C., Fried-

Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2

- mann, E., Bohland, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplow, D. B., and Haass, C. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 894–896
30. Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W. S., Martoglio, B., Hueber, A. O., and Zornig, M. (2007) *Cell Death Differ.* **14**, 1678–1687
31. Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G., and Ghiso, J. (1999) *Nature* **399**, 776–781
32. Kim, S. H., Creemers, J. W., Chu, S., Thinakaran, G., and Sisodia, S. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1872–1877
33. Kim, S. H., Wang, R., Gordon, D. J., Bass, J., Steiner, D. F., Lynn, D. G., Thinakaran, G., Meredith, S. C., and Sisodia, S. S. (1999) *Nat. Neurosci.* **2**, 984–988
34. Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J. L., Bek, T., Bojse-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J., and Frangione, B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4920–4925
35. Plant, G. T., Revesz, T., Barnard, R. O., Harding, A. E., and Gautier-Smith, P. C. (1990) *Brain* **113**, 721–747
36. Kaether, C., Capell, A., Edbauer, D., Winkler, E., Novak, B., Steiner, H., and Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 4738–4748
37. Weihofen, A., Lemberg, M. K., Ploegh, H. L., Bogoy, M., and Martoglio, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30951–30956
38. Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztyńska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M., Thorsett, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Allstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., and Audia, J. E. (2001) *J. Neurochem.* **76**, 173–181
39. Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K. J., Rose-John, S., and Ludwig, A. (2003) *Blood* **102**, 1186–1195
40. Choi, S. I., Vidal, R., Frangione, B., and Levy, E. (2004) *FASEB J.* **18**, 373–375
41. Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T. K., Rose-John, S., and Massague, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11376–11382
42. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998) *Nature* **391**, 387–390
43. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999) *Nature* **398**, 518–522
44. Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 1071–1080
45. Sanchez-Pulido, L., Devos, D., and Valencia, A. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**, 329–332
46. Selkoe, D., and Kopan, R. (2003) *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 565–597
47. Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002) *EMBO J.* **21**, 5408–5416
48. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488
49. Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., III, Sudhof, T., and Yu, G. (2005) *Cell* **122**, 435–447
50. Thinakaran, G., Regard, J. B., Bouton, C. M., Harris, C. L., Price, D. L., Borchelt, D. R., and Sisodia, S. S. (1998) *Neurobiol. Dis.* **4**, 438–453
51. Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Diehl, T. S., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2720–2725
52. Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 499–504

Downloaded from www.jbc.org at 27652440, on December 13, 2009

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

jbcb

Substrate Requirements for SPPL2b-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis^{*[5]}

Received for publication, September 26, 2008, and in revised form, December 8, 2008. Published, JBC Papers in Press, December 29, 2008, DOI 10.1074/jbc.M807485200

Lucas Martin¹, Regina Fluhrer², and Christian Haass³

From the Center for Integrated Protein Science Munich and Adolf-Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Neurodegenerative Disease Research, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany

Intramembrane proteolysis is now widely recognized as an important physiological pathway required for reverse signaling and membrane protein degradation. Aspartyl intramembrane cleaving proteases of the GXGD-type play an important regulatory role in health and disease. Besides γ -secretase/presenilin, signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like (SPPL) peptidases also belong to the family of GXGD-type aspartyl proteases. Although recently the first SPPL2a/b substrates have been identified, very little is known about substrate requirements, which allow them to be efficiently processed within the membrane. We demonstrate that similar to γ -secretase substrates, intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) is greatly facilitated by an initial shedding event mediated by ADAM-10. Serial deletions revealed that the length of the ectodomain negatively correlates with efficient intramembrane proteolysis. Bri3 (Itm2c), which is highly homologous to Bri2, fails to be shed. Failure of shedding of Bri3 is accompanied by a lack of intramembrane proteolysis by SPPL2b. Surprisingly, a low molecular weight membrane-retained stub of Bri3 also fails to be processed by SPPL2b, indicating that shedding *per se* is not sufficient for subsequent intramembrane proteolysis. Extensive domain swapping analysis reveals that primary sequence determinants within the intracellular domain and the transmembrane domain together with short luminal juxtamembrane sequences are required for efficient intramembrane proteolysis.

Signal peptide peptidase (SPP)⁴ (1), its homologues, the SPP-like peptidases (SPPL) SPPL2a, b, and c and SPPL3 (2, 3) as well

as the Alzheimer's disease-associated presenilins (PS1 or PS2) are intramembrane-cleaving proteases (ICLIps) of the GXGD-type aspartyl protease family (4, 5). GXGD designates a novel active site motif located within transmembrane domain (TMD) 7 of all known intramembrane-cleaving aspartyl proteases (6). The GXGD motif contains one of the two critical aspartyl residues conserved in all GXGD-type proteases. The second aspartyl residue is part of a conserved YD motif located in TMD 6. Both motifs share no homologies with conventional aspartyl proteases (6). SPP/SPPLs and PSs only share very limited sequence homologies (2); however, besides the YD and GXGD domain, a third more C-terminal PAL sequence is conserved among all members of the GXGD proteases (2). Recently it has been shown that the PAL motif may not only present a binding site for transition state inhibitors of γ -secretase and SPP (7), but, at least in the case of PS1, may interact with the N-terminal critical aspartate located within TMD 6 (8, 9). In line with data from electron microscopy (10, 11) and cysteine scanning mutagenesis (12, 13), these findings suggest a water-filled cavity harboring the catalytic center of γ -secretase. For SPP/SPPL family members, no such analyses have been performed yet; therefore it is too early to speculate whether similar structural features as observed for PS1 also apply. Although SPP/SPPLs apparently exert protease function in the absence of additional essential co-factors (1, 14, 15) and can even be functionally expressed in bacteria (16), γ -secretase is a protease complex composed of PS and three additional proteins, Nicastrin (NCT), APH-1 (APH-1a L/S or APH-1b), and PEN-2 (17). All four proteins are necessary and sufficient for authentic γ -secretase function (18). PS harbors the active site aspartyl residues and the interacting PAL motif, whereas NCT is discussed as a substrate receptor (19), and PEN-2 is discussed as a stabilizing factor keeping the auto-proteolytically generated PS fragments in close contact (20, 21). No function has so far been assigned to APH-1.

SPP was discovered as an ICLiP responsible for removing hydrophobic signal peptides liberated from the N terminus of secreted or transmembrane proteins by signal peptidase (SP) cleavage during their co-translocation into the endoplasmic reticulum (1). In addition to signal peptide degradation, SPP is also required for the generation of cell surface histocompatibility antigen-E epitopes and processing of the hepatitis C virus polyprotein (5). A data base search for SPP homologues revealed SPPL2a, b, and c and SPPL3 (2, 3). Currently, little is

domain; PS, presenilin; NCT, Nicastrin; wt, wild type; APP, β -amyloid precursor protein.

* This work is supported by the Leibniz Award of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to C. H.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant HA1737-11-1 (to C. H. and R. F.), Sonderforschungsbereich Grant SFB 596 (to C. H.), the Center for Integrated Protein Science Munich (CIPS^M), and the Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1.

¹ Member of the Elitenetzwerk Bayern Graduate Program "Protein Dynamics in Health and Disease."

² To whom correspondence may be addressed. E-mail: rfluhrer@med.uni-muenchen.de.

³ Supported by a "Forschungsprofessur" of the Ludwig-Maximilians-University. To whom correspondence may be addressed. E-mail: chaass@med.uni-muenchen.de.

⁴ The abbreviations used are: SPP, signal peptide peptidase; SP, signal peptidase; SPPL, SPP-like; ADAM-10, A disintegrin and metalloprotease-10; ICD, intracellular domain; ICLiP, intramembrane cleaving protease; JMD, juxtamembrane domain; NTF, N-terminal fragment; (Z-L), -ketone, 1,3-di-(N-benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone; TMD, transmembrane

known about the function of SPPL family members. No physiological substrates are known for SPPL3 and SPPL2c. In contrast, three substrates have been identified to be processed by SPPL2a/b. These include tumor necrosis factor α (14, 22), the Fas ligand (FasL) (23), and Bri2 (Itm2b) (24). In the case of tumor necrosis factor α , reverse signaling has been observed upon liberation of the intracellular domain (ICD) by SPPL2a and SPPL2b (22). The tumor necrosis factor α ICD regulates expression of interleukin-12 probably via nuclear signaling (22). Similarly, the ICD of FasL negatively regulates gene transcription (23). Consistent with its predominant function in signal peptide removal, SPP is located within the endoplasmic reticulum (15, 22) and probably retained by a KKXX retention signal. SPPL3 (15) and SPPL2c (22) are also located within the endoplasmic reticulum, and it is tempting to speculate that they are involved in signal peptide removal like SPP. In contrast, SPPL2a and SPPL2b occur throughout the secretory pathway including the plasma membrane and endosomes/lysosomes (15). This suggests that the differential subcellular localization of SPPL proteases restricts the number of available substrates. In contrast to γ -secretase, which only accepts type 1 transmembrane proteins as substrates for intramembrane proteolysis (17, 25), all currently known SPP/SPPL substrates are in type 2 orientation (1, 5, 14, 22–24). For γ -secretase and other ICLiPs, it has been shown that intramembrane proteolysis strictly follows a previous ectodomain shedding event. Shedding removes the bulk of the ectodomain and leaves behind a small membrane-retained stub. In the case of γ -secretase, substrates with an ectodomain shorter than \sim 50 amino acids are preferentially processed (26). Moreover, only pre-shed substrates bind to γ -secretase (27), whereas full-length proteins are most likely not recognized. Substrate recognition via its free N terminus is apparently mediated by NCT through a conserved glutamate residue (19), although this finding has recently been challenged (28). SPP may also require precleavage of its substrate by SP (1, 29); however, even upon mutagenesis of the SP recognition site, some residual intramembrane proteolysis still occurs (29). In line with the possibility that full-length substrates may be cleaved at least to some extent, SPPL2b was shown to co-immunoprecipitate both the truncated substrate and the full-length precursor (14, 24). However, the fact that substantially more full-length protein co-immunoprecipitates with the active SPPL2b protein as compared with the truncated fragment suggested that the latter may be preferentially turned over by intramembrane proteolysis (14, 24). It is also not known whether primary sequences within the TMD or adjacent domains of SPPL2b substrates are critical for substrate recognition and turnover.

Bri3 as well as Bri2, which is genetically associated with Familial British and Danish dementia, belong to the family of highly homologous Bri proteins (30). We demonstrate that, although very homologous to Bri2, Bri3 is not a substrate for regulated intramembrane proteolysis. This finding allowed us to study intramembrane proteolysis independent of ectodomain shedding. We demonstrate that shedding greatly facilitates subsequent intramembrane proteolysis. However, truncation of the ectodomain of a potential SPPL2b substrate is surprisingly not sufficient to allow intramembrane proteolysis,

TABLE 1

Generation of chimeric Bri variants and deletions

The numbers represent the corresponding amino acids of Bri2 and Bri3, respectively.

Construct	ICD	TMD	Ectodomain
Bri2	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri2 76–237
Bri3	Bri3 1–54	Bri3 55–75	Bri3 76–233
Bri2 Δ E	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri2 76–98
Bri3 Δ E	Bri3 1–54	Bri3 55–75	Bri3 76–98
Bri2/3	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–233
Bri2/3 - 0	Bri2 1–54	Bri2 55–75	
Bri2/3 - 10	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–86
Bri2/3 - 23	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–98
Bri2/3 - 59	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–134
Bri2/3 - 91	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–166
Bri2/3 - 124	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–199
Bri2/3 - 156	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–233
Bri2/3 Δ E	Bri2 1–54	Bri2 55–75	Bri3 76–98
Bri3/2/2	Bri3 1–54	Bri2 55–75	Bri2 76–237
Bri2 _{ins Bri3 45–54}	Bri2 1–44, Bri3 45–54	Bri2 55–75	Bri2 76–237
Bri2/3/2	Bri2 1–54	Bri3 55–75	Bri2 76–237

because in addition to removal of the bulk of the ectodomain, sequence determinants within the ICD, the TMD, and the luminal juxtamembrane domain (JMD) are also required.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture, cDNAs, and Transfection—HEK-293EBNA (HEK-293) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). HEK-293 single cell clones stably expressing SPPL2b or SPPL2b D421A containing a C-terminal hemagglutinin tag (AYPYDVPDYA) have been described before (24). Bri2 and Bri3 cDNAs were purchased from Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin, Germany). cDNAs encoding chimeric proteins (Table 1) were generated by PCR. For all constructs the propeptide at the C terminus was removed, and a N-terminal FLAG tag (DYKDDDDK) as well as a C-terminal V5 tag (GKPIPPLGLDST) was added. Sequences of the oligonucleotides used for PCR are available upon request. PCR products were subcloned into the HindIII and XbaI sites of pcDNA6.0-V5-His A (Invitrogen). All of the cDNA constructs were verified by sequencing. Transient transfection of HEK-293 cell lines stably expressing the indicated SPPL2b variants was carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The bovine ADAM-10 wt and ADAM-10 E384A constructs are a generous gift from Dr. Rolf Postina.

Antibodies, Immunoprecipitation, and Immunoblotting—The monoclonal anti-FLAG M2 and the polyclonal hemagglutinin 6908 antibody were obtained from Sigma; the poly- and monoclonal V5 antibodies were purchased from Chemicon (Schwalbach, Germany) and Invitrogen, respectively. The polyclonal antibodies against ADAM-10 and calnexin were purchased from Calbiochem and Stressgene/Biomol (Hamburg, Germany). The monoclonal anti-Giantin antibody (ALX-804–600) was obtained from Alexa (AXXORA Deutschland GmbH, Lörach, Germany). 22C11 antibody recognizing the N terminus of APP was purchased from Chemicon (Schwalbach, Germany). Anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Promega (Madison, WI). Immunoprecipitation assays, gel electrophoresis, immunoblotting experi-

Substrate Requirements for SPPL2b

ments, and assays were carried out as described previously (14, 15).

Immunocytochemistry and Confocal Imaging—The indicated cell lines were grown on polylysine-coated glass coverslips to 60–80% confluence and processed for immunofluorescence as described before (15). Cells were treated with 0.1% Triton to perform co-staining with the Golgi marker giantin or were left untreated to perform surface stainings. Confocal images were obtained with Zeiss 510Meta confocal laser scanning microscope system equipped with a 100/1.3 objective described previously (31). The images were assembled and processed using Adobe Illustrator.

Inhibitor Treatment and Quantification—To inhibit SPPL2b, the cells were treated overnight with a final concentration of 30 μM (Z-LL)₂-ketone (Calbiochem), a known SPP/SPPL inhibitor (32). For quantification, the proteins were immunoblotted as described above and detected using the enhanced chemiluminescence technique (GE Healthcare). The chemiluminescence signals of at least three independent experiments were measured with a CD camera-based imaging system (Alpha Innotech). Statistical significance was determined with Student's *t* test. Statistical significant *p* values <0.05, <0.005, and <0.0005 are represented by *, **, and ***, respectively.

Alignment and Sequence Analysis—Bri2 and Bri3 protein sequences were aligned using VectorNTI9 (Invitrogen). Amino acid identity and similarity were calculated using EMBOSS pairwise alignment algorithms.

RESULTS

Differential Shedding of Bri2 and Bri3—Although substrate requirements for γ -secretase (Ref. 26; summarized in Refs. 17 and 33) and SPP (29) are at least partially described, very little is known about determinants that allow SPPLs to recognize their appropriate protein substrates. Therefore we specifically searched for substrate requirements of SPPL2b, an ICLiP of the GXGD-type located within the late secretory compartments including plasma membrane and endosomes, because this may allow a direct comparison of the properties of γ -secretase with those of the SPPLs. Recently we and others have identified three substrates, tumor necrosis factor α (14, 22), Bri2 (24), and the FasL (23), for intramembrane proteolysis by SPPL2a/b. We now compared the processing of two homologous Bri proteins, Bri2 and Bri3 (30, 34) (Fig. 1A). cDNAs encoding the Bri2 or the Bri3 protein were transfected into HEK-293 cell lines stably expressing either wt SPPL2b or the functional inactive SPPL2b D/A (15) mutant. As described previously (24), the BRICHOS domain was efficiently shed upon transfection of Bri2 (Fig. 1B). Shedding occurred independent of the expression of wt SPPL2b or nonfunctional SPPL2b D/A. As expected, we also detected the Bri2 N-terminal fragment (Bri2 NTF) generated by the shedding event within the cell lysate (Fig. 1B). As observed before (24), the shedding event appeared to be heterogeneous because multiple NTFs of slightly different molecular weight are detected. The Bri2 ICD was efficiently generated upon co-expression of the proteolytically active SPPL2b (Fig. 1B). In contrast, upon expression of the inactive SPPL2b D/A variant, the Bri2 NTF accumulated, and no Bri2 ICD was generated (Fig. 1B) (24). Interestingly, when we expressed the homologous

Bri3, no secretion of the Bri3 BRICHOS domain was observed (Fig. 1B). This is in line with previous findings that also suggested that Bri3 fails to undergo shedding (35). Intramembrane proteolysis by SPPL2b was also not observed, as shown by the lack of detectable Bri3 ICD even after long exposure (Fig. 1B). This suggests that although Bri2 and Bri3 share substantial sequence similarities throughout their ectodomains (Fig. 1A), the shedding protease discriminates between these similar substrates. However, another possibility would be that Bri2 and Bri3 are differentially targeted and Bri3 does not reach shed-dase/SPPL2b containing cellular compartments. To prove this possibility, we investigated the subcellular distribution of Bri2 and Bri3 by immunohistochemistry. This revealed that both Bri2 and Bri3 are similarly targeted through the secretory pathway and occur within giantin-positive Golgi compartments and on the plasma membrane (Fig. 1C), and thus both co-localize with SPPL2b (24). From these experiments we conclude that Bri3, although it is quite homologous to Bri2 and occurs within the same subcellular compartments, fails to undergo shedding as well as intramembrane proteolysis.

Ectodomain Shedding Is Not Sufficient for Intramembrane Proteolysis—In line with data obtained for substrate requirements of γ -secretase (26), we postulated that Bri2 and Bri3 variants lacking large parts of their ectodomains may allow efficient intramembrane proteolysis. We therefore generated Bri2 and Bri3 variants lacking almost the entire ectodomain (Bri2 Δ E and Bri3 Δ E). Upon co-expression with SPPL2b, Bri2 Δ E underwent intramembrane proteolysis and allowed production of robust levels of the Bri2 ICD (Fig. 2A) (24). The Bri2 ICD was not generated upon treatment with the SPPL2b inhibitor (Z-LL)₂-ketone as expected (Fig. 2A) (24). Surprisingly, when we expressed Bri3 Δ E, no intramembrane proteolysis was detectable (Fig. 2A), although the ectodomain should have been sufficiently truncated to allow constitutive intramembrane proteolysis independent of a previous shedding event. This suggests that intramembrane proteolysis may occur only to a very limited level, which, however, is beyond the detection limit for the Bri3 ICD. From these findings we conclude that shedding *per se* is not sufficient to allow constitutive intramembrane proteolysis. Therefore, sequence elements within the small NTF of SPPL2b substrates are additionally required to trigger intramembrane proteolysis. To further pursue the influence of ectodomain shedding on SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis, we generated a cDNA construct encoding a Bri variant containing the Bri2 ICD and TMD fused to the Bri3 ectodomain (Bri2/3; Fig. 2B). This variant was expressed in HEK-293 cells together with wt SPPL2b or the nonfunctional SPPL2b D/A. Upon expression of Bri2/3, no shedding was detected (Fig. 2B and supplemental Fig. S1), confirming again that Bri2 and Bri3 are differentially processed within their ectodomain. Differential targeting of Bri2/3 was excluded, because this chimeric variant is observed throughout the secretory pathway, including a giantin-positive Golgi compartment and the plasma membrane (Fig. 2C). Surprisingly, although no shedding occurs as monitored by the lack of the NTF in the cell lysate and the BRICHOS domain in the conditioned medium, SPPL2b-dependent ICD generation was observed to some extent (Fig. 2B). It should be noted, however, that ICD genera-

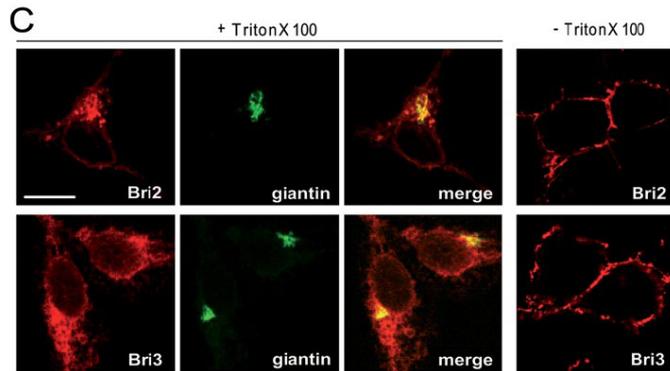
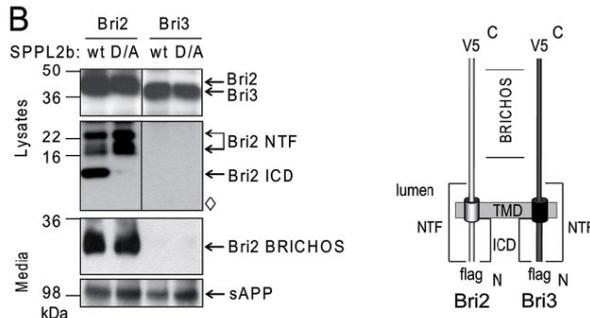
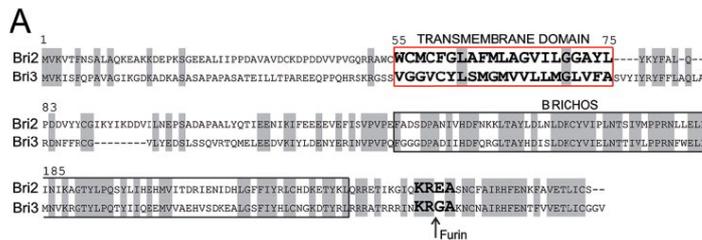


FIGURE 1. The Bri2 homologue Bri3 is not a substrate for regulated intramembrane proteolysis by SPPL2b. *A*, amino acid sequence alignment of Bri2 and Bri3. The Furin cleavage site and the transmembrane domain are shown in **bold**, and identical residues are highlighted in *gray*. Sequence identity and similarity are 43 and 60%, respectively. *B*, Bri3 neither undergoes ectodomain shedding nor intramembrane proteolysis by SPPL2b. Upon co-expression of SPPL2b with Bri2 or Bri3 in HEK-293 cells, NTF and ICD generation are observed only for Bri2. Note that Bri2 ICD generation is abolished upon co-expression of the catalytic inactive SPPL2b D/A mutant. The soluble ectodomain (BRICHOS) in conditioned medium is detected for Bri2, but not for Bri3 expressing cells. Full-length Bri as well as the NTFs and ICDs were detected using the anti-FLAG antibody. The corresponding BRICHOS domains were visualized with an anti-V5 antibody. Reprobing for soluble APP with 22C11 antibody shows that ectodomain shedding in general is not affected upon expression of Bri3. The expression levels of SPPL2b were similar in Bri2/Bri3 expressing cells (data not shown). \diamond indicates longer blot exposure. *C*, Bri3 is present in late secretory compartments. Immunohistochemistry of HEK-293 cells transfected with Bri3 reveals localization at the plasma membrane (stainings without Triton X-100) as well as co-localization with the Golgi compartment marker giantin (stainings with Triton X-100). Bri2 and Bri3 were detected using the anti-V5 antibody. The localization of Bri3 and Bri2 is similar. The scale bar represents 10 μ m.

tion of Bri2/3 was substantially lower as compared with wt Bri2 (Fig. 2*B*). Taken together these findings indicate that shedding facilitates intramembrane proteolysis but is not absolutely required for ICD generation.

Shedding by ADAM-10 Facilitates Intramembrane Proteolysis—To further confirm that shedding facilitates intramembrane proteolysis of a natural substrate, we co-expressed ADAM-10, the major sheddase known to process Bri2 (24), or its catalytically inactive variant ADAM-10 E384A (36) with wt Bri2 and SPPL2b. Enhanced expression of wt ADAM-10 results in elevated levels of the Bri2 NTF in the cell lysate and BRICHOS in the conditioned media, respectively (Fig. 3). Moreover, elevation of shedding caused enhanced ICD generation (Fig. 3), demonstrating that shedding indeed facilitates subsequent intramembrane proteolysis. To further prove this hypothesis, we compared intramembrane proteolysis of full-length Bri2 and Bri2 Δ E. In line with the finding that shedding is a rate-limiting step, Bri2 Δ E is more efficiently endoproteolyzed by SPPL2b than the full-length protein (data not shown).

Intramembrane Proteolysis Negatively Correlates with the Size of the Ectodomain—A size-selecting mechanism is known as a key step in substrate recognition by γ -secretase. Here the appropriately truncated substrate is apparently identified by NCT (19), and substrates with ectodomains smaller than 50 amino acids are preferentially processed (26). However, in the absence of NCT, no such mechanisms would be expected for SPPL2b, although, surprisingly, we observed that shedding facilitates subsequent intramembrane proteolysis. This may indeed suggest a size-selecting mechanism similar to that reported for γ -secretase. We therefore generated fusion proteins of the Bri2 ICD and TMD with Bri3 ectodomains of increasing length (Fig. 4*A*). This strategy allowed us to investigate whether there is a size selecting process, because the Bri3 ectodomain does not allow shedding (Fig. 1*B*). Surprisingly, we found a strong negative correlation of ICD generation with the size of the ectodomain (Fig. 4, *B* and *C*). Substantial ICD production was observed only upon expression of substrates with less than 59 amino acids in their ectodomain. Most efficient intramem-

Substrate Requirements for SPPL2b

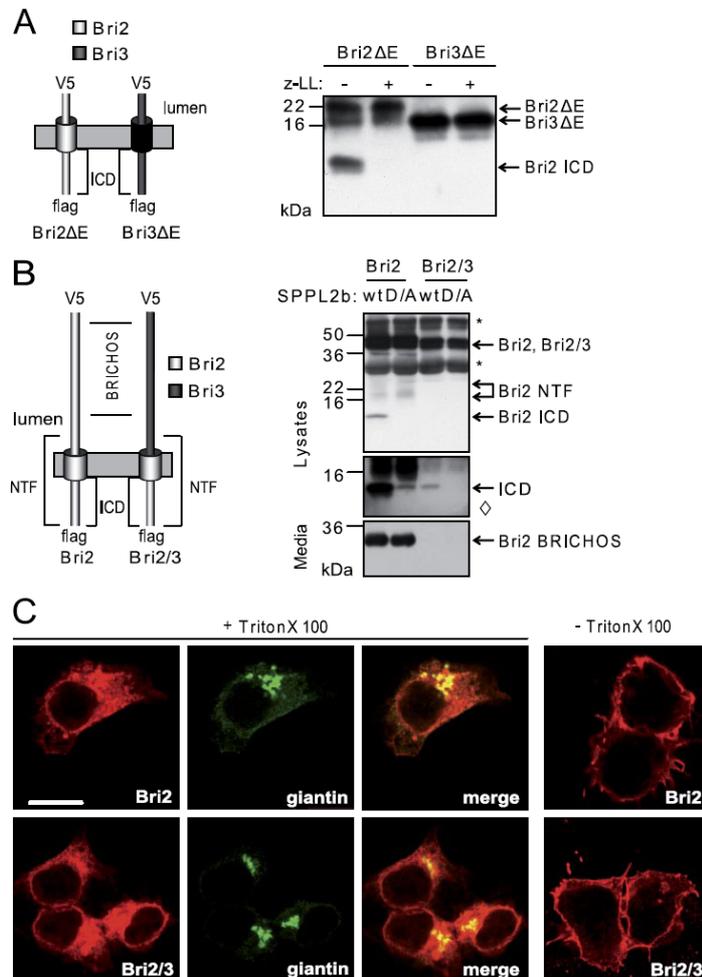


FIGURE 2. Influence of ectodomain shedding on SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. *A*, shedding per se is not sufficient for SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. Co-expression of SPPL2b with Bri2 or Bri3 mutants lacking the BRICHOS ectodomain (Bri2ΔE or Bri3ΔE) in HEK-293 cells allows SPPL2b-dependent ICD generation for Bri2. Bri2ΔE and Bri3ΔE were detected using the anti-FLAG antibody. Treatment with (Z-LL)₂-ketone inhibits Bri2 ICD generation. Bri3ΔE is not processed by SPPL2b. *B*, ectodomain shedding is not a prerequisite for SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. Upon co-expression of Bri2/3 with SPPL2b, both BRICHOS in the conditioned media and NTF in cell lysates are not detected. For detection of full-length Bri2, Bri2/3, or N-terminal processing products an anti-FLAG antibody was used. The corresponding BRICHOS domains were visualized with an anti-V5 antibody. Bri2/3 does not undergo ectodomain shedding. However, note that low amounts of ICD are generated in a SPPL2b-dependent manner. The remaining Bri2 ICD derived from wt Bri2 upon expression of the nonfunctional D/A SPPL2b mutant is most likely caused by a low level expression of endogenous SPPL2b. Asterisks indicate IP antibody cross-reaction, ◇ indicates longer blot exposure. *C*, Bri2/3 is transported to late secretory compartments. Immunohistochemistry of HEK-293 cells transfected with Bri2/3 reveals localization at the plasma membrane (stainings without Triton X-100) as well as co-localization with the Golgi compartment marker giantin (stainings with Triton X-100). Bri2 and Bri2/3 were detected using an anti-V5 antibody. The localization of Bri2 and Bri2/3 is similar. The scale bar represents 10 μm.

brane proteolysis occurred with substrates having less than 23 luminal amino acids (Fig. 4, *B* and *C*), which is surprisingly similar to findings made with γ -secretase substrates (26).

Sequence Determinants in All Three Subdomains of the Bri2 NTF Are Required for Intramembrane Proteolysis—The results shown above suggest that in addition to a size selection mechanism, sequence determinants within the NTF of the substrate must also influence SPPL2b cleavage efficiency, because ectodomain truncation of Bri3 is not sufficient to convert Bri3 into a SPPL2b substrate (Fig. 2*A*). Therefore, we first investigated the influence of the luminal JMD on intramembrane proteolysis. We generated Bri Δ E constructs that contained 23 amino acids of the luminal domain of either Bri2 or Bri3 fused to the TMD and ICD of Bri2 (Bri2ΔE and Bri2/3ΔE; Fig. 5*A*) and directly compared the efficiency of SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. This revealed that Bri2/3ΔE is turned over with ~70% less efficiency compared with Bri2ΔE (Fig. 5, *B* and *C*). This is reflected not only by a significant reduction of ICD formation but also by a lack of substrate accumulation upon expression of the nonfunctional SPPL2b D/A mutant (Fig. 5*B*). Thus the luminal 23 amino acid JMD of Bri2 contributes important determinants required for SPPL2b-dependent cleavage.

We next investigated whether the ICD also contributes to intramembrane proteolysis. To do so we fused the Bri3 ICD to the TMD and ectodomain of Bri2, creating Bri3/2/2 (Fig. 6*A*). Expression of Bri3/2/2 revealed about 60% less ICD generation compared with that from the wt Bri2 (Fig. 6, *B* and *C*). This suggests that sequences within the ICD influence intramembrane proteolysis by SPPL2b. To further map the sequence requirements within the cytoplasmic tail, we inserted 10 amino acids of the Bri3 cytosolic juxtamembrane domain into the Bri2 ICD creating Bri2_{ins} Bri3_{45–54} (Fig. 6*D*).

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/content/suppl/2008/12/30/M807485200.DC1.html>

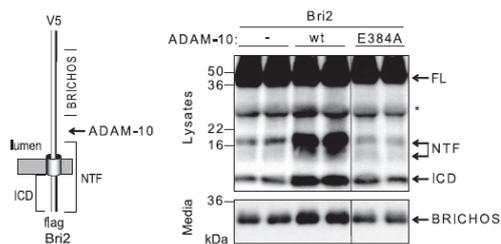


FIGURE 3. Ectodomain shedding facilitates intramembrane proteolysis. ADAM-10 enhances SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. Co-expression of Bri2 with wt ADAM-10, but not with the inactive E384A ADAM-10 mutant in HEK-293 cells, leads to increased amount of NTF in cell lysates and BRICHOS secretion into the conditioned medium. Bri2 and its N-terminal processing products were detected using an anti-FLAG antibody. The corresponding BRICHOS domain was visualized with an anti-V5 antibody. ICD levels are increased in cells expressing wt ADAM-10, showing that ectodomain shedding facilitates SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. The asterisk indicates IP antibody cross-reaction.

Expression of Bri2_{Ins Bri3 45–54} revealed an ~60% reduction of ICD formation (Fig. 6, E and F) very similar to the reduced intramembrane proteolysis upon expression of Bri3/2/2 (Fig. 6, B and C). Thus it is likely that the 10 amino acids of the juxtamembrane domain immediately beyond the membrane play a major role for substrate recognition.

The above-described experiments (Fig. 2A) suggest that the TMD may also be important for subsequent intramembrane proteolysis, because the Bri2/3 variant allowed at least some intramembrane proteolysis, whereas Bri3ΔE failed to undergo cleavage by SPPL2b (Fig. 2A). To further support this hypothesis, we replaced the TMD of Bri2 by that of Bri3, generating the Bri2/3/2 variant (Fig. 7A). Bri2 and Bri2/3/2 were expressed with SPPL2b in HEK-293 cells. Substantial amounts of Bri2 ICD were generated from wt Bri2 as expected (Fig. 7B). However, upon expression of Bri2/3/2, we observed an ~80% reduction of ICD formation (Fig. 7, B and C). This suggests that, in addition to the luminal JMD and the ICD, the TMD of Bri2 also provides very important sequence determinants.

DISCUSSION

Intramembrane proteolysis is becoming an increasingly important cellular mechanism involved in numerous signaling pathways as well as in protein degradation. Furthermore, some of these proteases such as γ -secretase are major players in abundant diseases, including Alzheimer disease. γ -Secretase together with SPP and the SPPLs represent the currently known eukaryotic GXGD-type aspartyl proteases. We have now investigated the substrate requirements of SPPL2b. As described above, SPPL2b, like the other members of the SPP/SPPL family, does not require additional co-factors for activity like γ -secretase. We therefore expected that SPPL2b may have some fundamentally different substrate requirements as compared with γ -secretase. For example, one would have expected that SPPL2b may not depend on trimming of its substrates by shedding, because a size-selecting substrate receptor like NCT is not required, and SPPL2a and SPPL2b are biologically active on their own (14, 15, 22–24). Surprisingly, we found some substantial similarities in substrate selection of

Substrate Requirements for SPPL2b

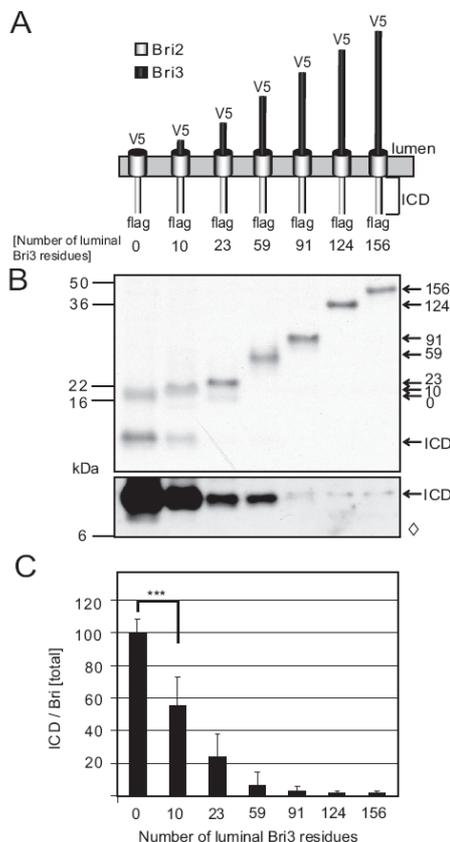


FIGURE 4. Intramembrane proteolysis negatively correlates with the size of the ectodomain. A, model of the Bri2/3 fusion proteins. All constructs contain the ICD and the TMD of Bri2 but contain increasing parts of the Bri3 luminal domain. B, a short luminal domain of the substrate increases SPPL2b cleavage efficiency. HEK-293 cells stably expressing SPPL2b were transfected with the Bri2/3 fusion constructs shown in A. All fusion proteins were detected using an anti-FLAG antibody. Robust generation of ICD is observed only for the two shortest constructs (none or 10 luminal Bri3 residues). Increasing the size of the luminal domain leads to decreased amounts of ICD. \diamond indicates longer blot exposure. C, quantitative analysis of experiment shown in B. The data represent the means \pm S.D. of nine independent experiments. The relative signal intensity of ICD compared with full-length protein was measured for each construct, normalized to calnexin, and set to 100% for the shortest construct. The addition of 10 luminal Bri3 residues to the shortest construct leads to a 45% decrease in SPPL2b-dependent cleavage efficiency ($p = 0.00009$). Increasing the length of the luminal domain further reduces the amount of ICD.

γ -secretase and SPPL2b. Clearly, SPPL2b-mediated endo-proteolysis is greatly facilitated by previous shedding of the ectodomain of the substrate. In line with this notion, intramembrane proteolysis by SPPL2b is enhanced by expression of ADAM-10, the major Bri2 cleaving sheddase, or by sequentially truncating the ectodomain of the substrate. Very similar to γ -secretase, which only efficiently

Substrate Requirements for SPPL2b

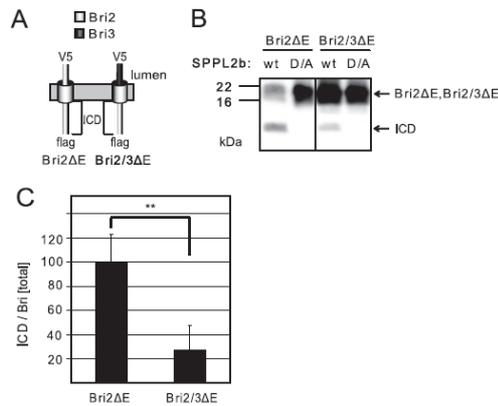


FIGURE 5. The luminal JMD contributes to substrate recognition for intramembrane proteolysis by SPPL2b. *A*, model of the chimeric Bri2/3ΔE variant. Only the luminal JMD of Bri2 is replaced by Bri3. *B*, Bri2/3ΔE is less efficiently processed by SPPL2b. Co-expression of Bri2/3ΔE with SPPL2b or SPPL2b D/A reveals reduced SPPL2b-dependent ICD generation compared with co-expression with Bri2ΔE. Chimeric Bri constructs were detected using an anti-FLAG antibody. *C*, quantitative analysis of experiment shown in *B*. The data represent the means \pm S.D. of nine independent experiments. The relative signal intensity of ICD compared with full-length protein was measured, normalized to calnexin, and set to 100% for Bri2ΔE. SPPL2b-dependent ICD generation for Bri2/3ΔE is reduced to 27% compared with Bri2ΔE ($p = 0.0007$).

processes substrates with an ectodomain smaller than 50 amino acids (26), SPPL2b-mediated cleavage is more efficient the shorter the ectodomain is. Even the preferred size of the ectodomain is similar for SPPL2b and γ -secretase (26). However, the size of the ectodomain is an important, but not exclusive, determinant for a SPPL2b substrate. This is rather surprising, because SPPL2b does not interact with a NCT-like protein, which could serve as a substrate receptor and size selector. This raises the question of whether a domain within SPPL2b itself could mediate substrate selection. The only domains that may protrude into the luminal space could be the hydrophilic loop between TMD 6 and TMD 7 and the N-terminal domain of SPPL2b. The N-terminal domain prior to TMD 1 is likely to be functionally irrelevant, because SPP itself functions in the absence of its N-terminal domain (16). The hydrophilic loop between TMD 6 and TMD 7 is rather short and not well conserved, suggesting that it is probably not suitable as a substrate receptor for GXGD-aspartyl proteases. However, although the model that NCT serves as the size-selecting substrate acceptor is very attractive, more recently it has been shown that a critical glutamate thought to directly interact via a salt bridge with the free N terminus of the shedded substrate could be mutagenized to glutamine without significantly affecting γ -secretase activity (28). Thus NCT may not be the substrate selecting subunit within the γ -secretase complex. Based on the similar substrate requirements in terms of the length of the ectodomain of γ -secretase and SPPL2b, one may argue that PS itself could also harbor both a substrate binding site and the size selector.

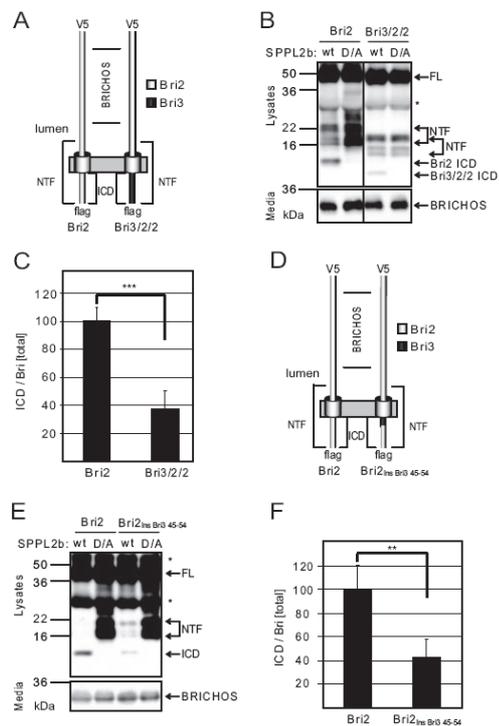


FIGURE 6. The intracellular domain contributes to substrate recognition for intramembrane proteolysis by SPPL2b. *A*, model of the chimeric Bri3/2/2 variant. The ICD of Bri2 is replaced by that of Bri3. *B*, Bri3/2/2 is less efficiently processed than Bri2. Co-expression of Bri3/2/2 or Bri2 with SPPL2b or the inactive SPPL2b D/A variant shows reduced ICD generation for Bri3/2/2. Full-length Bri2 and Bri3/2/2 and their N-terminal processing products were detected using the anti-FLAG antibody. The corresponding BRICHOS domains were visualized with an anti-V5 antibody. The Bri3/2/2 NTF and the ICD show an altered running behavior, probably caused by the difference in the ICD sequence. Analysis of conditioned media shows normal BRICHOS secretion and thus no influence on the ectodomain shedding by the Bri3 ICD. *C*, quantitative analysis of experiment shown in *B*. The data represent the means \pm S.D. of eight independent experiments. The relative signal intensity of ICD compared with full-length protein and NTF was measured for both constructs, normalized to calnexin, and set to 100% for Bri2. SPPL2b-dependent ICD generation is reduced to 37% for Bri3/2/2 ($p = 0.00009$). *D*, model of the chimeric Bri2^{Ins} Bri3⁴⁵⁻⁵⁴ variant. 10 amino acids of the cytosolic juxtamembrane domain of Bri2 have been replaced by those of Bri3. *E*, Bri2^{Ins} Bri3⁴⁵⁻⁵⁴ is less efficiently processed than Bri2. Co-expression of Bri2^{Ins} Bri3⁴⁵⁻⁵⁴ or Bri2 with SPPL2b or the inactive SPPL2b D/A variant shows reduced ICD generation for Bri2^{Ins} Bri3⁴⁵⁻⁵⁴ comparable with Bri3/2/2. Full-length Bri2 and Bri2^{Ins} Bri3⁴⁵⁻⁵⁴ and their N-terminal processing products were detected using the anti-FLAG antibody. The corresponding BRICHOS domains were visualized with an anti-V5 antibody. Analysis of conditioned media shows normal BRICHOS secretion and thus no influence on the ectodomain shedding by the Bri3 juxtamembrane domain. *F*, quantitative analysis of experiment shown in *E*. The data represent the means \pm S.D. of six independent experiments. The relative signal intensity of ICD compared with full-length protein and NTF was measured for both constructs, normalized to calnexin and set to 100% for Bri2. SPPL2b-dependent ICD generation is reduced to 43% for Bri2^{Ins} Bri3⁴⁵⁻⁵⁴ ($p = 0.00154$).

Although shedding greatly facilitates subsequent intramembrane proteolysis, it is by itself not sufficient for SPPL2b-mediated endoproteolysis. This is reflected by the facts that (i)

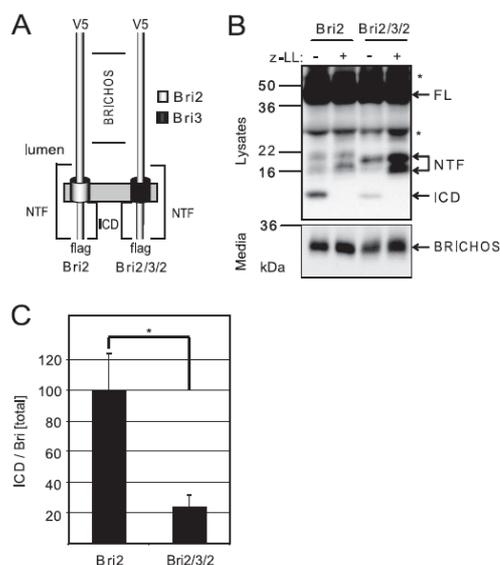


FIGURE 7. The transmembrane domain sequence is critical for SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis. *A*, model of the chimeric Bri2/3/2 variant. The TMD of Bri2 is replaced by Bri3. *B*, Bri2/3/2 is less efficiently processed than Bri2. Co-expression of Bri2/3/2 or Bri2 with SPPL2b or the inactive SPPL2b D/A variant shows a reduction in ICD formation for Bri2/3/2. Full-length Bri2 and Bri2/3/2 and their N-terminal processing products were detected using the anti-FLAG antibody. The corresponding BRICHOS domains were visualized with an anti-V5 antibody. The Bri2/3/2 NTF shows an altered running behavior, probably caused by the difference in the TMD sequence. The apparent molecular weight of the Bri2/3/2 ICD is similar to that of Bri2. Analysis of conditioned medium shows normal BRICHOS secretion and thus no influence on the ectodomain shedding by the Bri3 TMD. *C*, quantitative analysis of experiment shown in *B*. The data represent the means \pm S.D. of three independent experiments. The relative signal intensity of ICD compared with full-length protein plus NTF was measured for both constructs, normalized to calnexin, and set to 100% for Bri2. Replacement of Bri2 TMD with Bri3 TMD leads to a reduction of SPPL2b cleavage efficiency to 23% ($p = 0.02$).

Bri3 Δ E undergoes inefficient endoproteolysis and (ii) fusing the ICD and TMD of Bri2 to the ectodomain of Bri3 allows at least some intramembrane proteolysis, although shedding is prevented.

The TMD provides additional substrate requirements that are important for SPPL2b-mediated intramembrane proteolysis. This may be in contrast to γ -secretase, where so far it appears that numerous C-terminal fragments upon removal of their ectodomains are substrates for the "membrane proteasome function" of γ -secretase (37). On the other hand, phenylalanine scanning of the TMD of the β -amyloid precursor protein (APP) revealed at least some sequence specificity for γ -secretase (38). This is also supported by a mutagenesis analysis of the GXGD domain within PS1, which suggests at least some substrate specificity of PS1 itself (39). For SPP, it has been described that the TMD requires helix-breaking residues to allow intramembrane cleavage (29). However, the TMD of Bri3 also contains multiple helix-breaking residues but fails to be processed efficiently by SPPL2b even upon removal of the Bri3

ectodomain. In line with this finding, intramembrane cleavage still took place at least to some extent upon mutagenesis of the helix-breaking residue within a SPP substrate (29). A very recent study also suggests that amino acids not having a helix breaking potential critically influence intramembrane proteolysis by SPP (40). In addition to the TMD, we found that both the luminal 23 amino acid of the JMD and the ICD also contribute to the cleavability of Bri2. This is in line with the recent observation that the JMD of APP is also required for efficient γ -secretase-mediated proteolysis (41). Furthermore, Hemming *et al.* (42) recently described substrate requirements for γ -secretase substrates. Similar to the substrate requirements for SPPL2b, they found that not only shedding of the ectodomain but also a permissive transmembrane and cytoplasmic domain is required. Moreover, in this study a very restricted substrate selection was observed, which also challenges the idea that γ -secretase functions like a membrane proteasome (37).

Interestingly, the very homologous Bri2 and Bri3 proteins differ dramatically in terms of shedding. Whereas Bri2 is efficiently shedded, Bri3 fails to be processed efficiently by a shedding activity. This is specifically surprising, because sheddases of the ADAM family exhibit no clear sequence specificity but may rather recognize cleavage sites a short distance from the plasma membrane (43). In that regard it is important to note that both proteins reach the plasma membrane. Thus other determinants such as dimerization and/or tertiary structure may play a role. Indeed, β -secretase, another shedding protease, preferentially processes dimerized APP (44–46).

In conclusion SPPL2b has the following substrate requirements: (i) a significantly truncated ectodomain, (ii) an appropriate TMD, (iii) a suitable JMD, and (iv) an appropriate sequence in the ICD. Only a combination of all these determinants allows efficient intramembrane proteolysis. In addition a type 2 orientation of the substrate may be important, because at least so far no type 1-oriented protein was identified as a SPPL2b substrate.

Based on these findings and the similar substrate requirements of γ -secretase, we propose multiple substrate/enzyme interactions within both juxtamembrane regions and the TMD. This model may be supported by the recent findings that γ -secretase protrudes into the extracellular and to some extent also into the cytoplasmic space (11).

Acknowledgments—We thank Drs. Sven Lammich, Rolf Postina, and Falk Fahrenholz for providing cDNAs and Gudula Grammer, Martina Haug-Kröper, and Bärbel Klier for excellent technical assistance. We thank Drs. Stefan Lichtenthaler and Harald Steiner for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002) *Science* **296**, 2215–2218
- Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., and Golde, T. E. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1037–1044
- Martoglio, B., and Golde, T. E. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 201–206
- Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Trends Cell Biol.* **12**, 556–562
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 71–78
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. G., Baumeister, R., Fichteler, K., and Haass, C.

Substrate Requirements for SPPL2b

- (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
7. Wang, J., Behr, D., Nyborg, A. C., Shearman, M. S., Golde, T. E., and Goate, A. (2006) *J. Neurochem.* **96**, 218–227
8. Tolia, A., Horré, K., and De Strooper, B. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 19793–19803
9. Sato, C., Takagi, S., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 6264–6271
10. Lazarov, V. K., Fraering, P. C., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., and Li, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6889–6894
11. Osenkowski, P., Li, H., Ye, W., Li, D., Aeschbach, L., Fraering, P. C., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., and Li, H. (2008) *J. Mol. Biol.* **385**, 642–652
12. Tolia, A., Chavez-Gutierrez, L., and De Strooper, B. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 27633–27642
13. Sato, C., Morohashi, Y., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 12081–12088
14. Flührer, R., Grammer, G., Israel, L., Condrón, M. M., Haffner, C., Friedmann, E., Bohland, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplow, D. B., and Haass, C. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 894–896
15. Kravitz, P., Haffner, C., Flührer, R., Steiner, H., Schmid, B., and Haass, C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 39515–39523
16. Narayanan, S., Sato, T., and Wolfe, M. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 20172–20179
17. Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
18. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488
19. Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005) *Cell* **122**, 435–447
20. Prokop, S., Shirohani, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 23255–23261
21. Hasegawa, H., Sanjo, N., Chen, F., Gu, Y. J., Shier, C., Petit, A., Kawarai, T., Katayama, T., Schmidt, S. D., Mathews, P. M., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E., and St George-Hyslop, P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 46455–46463
22. Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schlegler, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 843–848
23. Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W. S., Martoglio, B., Hueber, A. O., and Zornig, M. (2007) *Cell Death Differ.* **14**, 1678–1687
24. Martin, L., Flührer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 1644–1652
25. Steiner, H. (2008) *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 147–157
26. Struhl, G., and Adachi, A. (2000) *Mol. Cell* **6**, 625–636
27. Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Diehl, T. S., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2720–2725
28. Chavez-Gutierrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P. C., and de Strooper, B. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 20096–20105
29. Lemberg, M. K., and Martoglio, B. (2002) *Mol. Cell* **10**, 735–744
30. Choi, S. C., Kim, J., Kim, T. H., Cho, S. Y., Park, S. S., Kim, K. D., and Lee, S. H. (2001) *Mol. Cell* **12**, 391–397
31. Kaether, C., Capell, A., Edbauer, D., Winkler, E., Novak, B., Steiner, H., and Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 4738–4748
32. Weihofen, A., Lemberg, M. K., Ploegh, H. L., Bogyo, M., and Martoglio, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30951–30956
33. Steiner, H., Flührer, R., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29627–29631
34. Pittois, K., Deleersnijder, W., and Merregaert, J. (1998) *Gene (Amst.)* **217**, 141–149
35. Wickham, L., Benjannet, S., Marcinkiewicz, E., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2005) *J. Neurochem.* **92**, 93–102
36. Lamnich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3922–3927
37. Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2004) *Nat Rev Mol. Cell Biol.* **5**, 499–504
38. Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3053–3058
39. Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 3821–3828
40. Okamoto, T., Omori, H., Kaname, Y., Abe, T., Nishimura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T., Yoshimori, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2008) *J. Virol.* **82**, 3480–3489
41. Ren, Z., Schenk, D., Basi, G. S., and Shapiro, I. P. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 35350–35360
42. Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., and Selkoe, D. J. (2008) *PLoS Biol.* **6**, 2314–2328
43. Sisodia, S. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6075–6079
44. Kaden, D., Munter, L. M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., Voigt, P., Schaefer, M., Beyermann, M., Reif, B., and Multhaup, G. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 7271–7279
45. Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Behr, D., Bayer, T. A., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33923–33929
46. Munter, L. M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., and Multhaup, G. (2007) *EMBO J.* **26**, 1702–1712

Supplementary Figure 1

Bri2/3 does not undergo ectodomain shedding. Upon expression of Bri2 or Bri2/3 in HEK-293 cells and quantitative protein precipitation of the conditioned media with trichloroacetic acid (TCA), ectodomain shedding is only detected upon expression of Bri2, but not of Bri2/3. \diamond indicates longer blot exposure. Reprobing for soluble APP with 22C11 antibody shows secretion of secretase generated soluble APP (sAPP). Full-length Bri2 and Bri2/3 were detected using the anti-flag antibody. BRICHOS was visualized with an anti-V5 antibody.

