

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Christian Haass

Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I Neuregulin 1- β

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

vorgelegt von

Linnea Rabe

aus

Aachen

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Rupert Egensperger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Michael Willem

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

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2013

„Wer sein Ziel kennt, findet seinen Weg“

Laotse

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Die Alzheimer Erkrankung	5
1.2. Ätiologie und Histopathologie der Alzheimer Erkrankung	7
1.2.1. Tau-Hypothese	7
1.2.2. Amyloid-Hypothese	7
1.2.2.1. β -Amyloid-Vorläufer-Protein (β APP)	11
1.2.2.2. β APP-Proteolyse	12
1.3. γ -Sekretase-Aktivität.....	15
1.3.1. Presenilin.....	16
1.3.2. Nicastrin	17
1.3.3. Aph-1	17
1.3.4. PEN-2.....	17
1.3.5. γ -Sekretase-Inhibition- und Modulation als Therapieansatz	18
1.4. α -Sekretase-Aktivität	19
1.4.1. Aktivierung der α -Sekretase als Therapieansatz.....	21
1.5. β -Sekretase-Aktivität	22
1.5.1. BACE1	23
1.5.1.1. Multifaktorielle Regulierung der BACE1-Expression.....	24
1.5.1.2. Substrate von BACE1	25
1.5.2. β -Sekretase-Inhibition als Therapieansatz	25
1.6. Neuregulin.....	26
1.6.1. Funktionen von Neuregulin	27
1.6.1.1. Ausgewählte Funktionen von NRG1	28
1.6.2. Struktur und Nomenklatur der NRG1-Isoformen	29
1.7. Typ I NRG1- β -Isoformen in der vorliegenden Arbeit.....	30
1.8. Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1	31
1.9. NRG/ErbB-Rezeptor-Signaltransduktion	33
1.9.1. ErbB-Rezeptoren.....	33
1.9.2. Signaltransduktion	33
1.9.2.1. Klassischer vorwärtsgerichteter Pathway	33
1.9.2.2. Nicht-klassischer vorwärtsgerichteter Pathway	34
1.9.2.3. Retrograder und bidirektionaler Pathway	35
1.9.2.4. Parakrine und juxtakrine Signaltransduktion.....	37
1.10. Zielsetzung.....	38
2. Material und Methoden.....	39
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
2.1.1. Allgemein.....	39
2.1.2. Molekularbiologische Methoden	40
2.1.3. Zellkultur.....	40
2.1.4. Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.1.5. Fluoreszenzmikroskopie	41
2.1.6. Massenspektrometrie	41
2.2. Enzyme, Versuchssysteme (Kits), Chemikalien	41
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	41
2.2.2. Zellkultur.....	42
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	42
2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie	43
2.3. Puffer, Medien und Lösungen.....	43

3.3.2.	SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β	74
3.3.3.	Bestimmung der BACE1-Schnittstelle von Typ I NRG1- β 1	78
3.3.3.1.	Bestimmung der BACE1-Schnittstelle von Typ I NRG1- β 1 in der MALDI-TOF-MS-Analyse	78
3.3.3.2.	SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β -Schnittstellen-Mutanten	80
3.4.	Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAMs	82
3.4.1.	Stimuliertes Shedding von Typ I NRG1- β	82
3.4.2.	Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAM10	83
3.4.3.	Kompensation des BACE1-abhängigen Sheddings von Typ I NRG1- β 1 durch ADAMs	88
3.4.4.	Die Länge der juxtamembranären Region beeinflusst das Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAMs	89
4.	Diskussion	91
4.1.	Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1- β	92
4.1.1.	Shedding von Typ I NRG1- β	92
4.1.2.	Intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1- β durch den γ -Sekretase-Komplex	93
4.2.	Shedding von Typ I NRG1- β durch BACE1	94
4.2.1.	Typ I NRG1- β 1 und - β 4 sind Substrate von BACE1	94
4.2.2.	BACE1-Schnittstelle	96
4.3.	Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAMs	97
4.3.1.	Stimuliertes Shedding	97
4.3.2.	Shedding durch ADAM10	98
4.3.3.	ADAM-Schnittstelle von Typ I NRG1- β	100
5.	Zusammenfassung und Ausblick	103
6.	Abkürzungsverzeichnis	107
7.	Einbuchstabencode für Aminosäuren	110
8.	Literaturverzeichnis	111
9.	Danksagung	133
10.	Lebenslauf	135
11.	Publikation	136

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer Erkrankung ist die häufigste Form der Demenz und betrifft derzeit etwa 24 Millionen Menschen weltweit. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko, an der Alzheimer Demenz zu erkranken. So sind etwa 1 % der zwischen 60 bis 64 Jährigen und 24 % bis 33 % der über 85 Jährigen in der westlichen Welt von dieser Erkrankung betroffen (Ferri et al. 2005).

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung zunächst als Störung des Kurzzeitgedächtnisses sowie der zeitlichen und räumlichen Orientierung. Später kommt es zum Verlust des Langzeitgedächtnisses, der Urteilsfähigkeit, des logischen Denkens und des Sprachvermögens sowie zu Veränderungen der Persönlichkeit und schließlich zur Bettlägerigkeit und Inkontinenz der Patienten, welche im Durchschnitt neun Jahre nach Diagnosestellung versterben (Ferris und Kluger 1997, Geldmacher und Whitehouse 1997, Bracco et al. 1998, Samuels und Davis 1998). Der Verlauf der Erkrankung als auch die Krankheitsdauer sind jedoch individuell verschieden (Reisberg et al. 1996).

Die Erkrankung wurde 1907 erstmals von dem deutschen Psychiater und Neurologen Alois Alzheimer beschrieben. Ihm gelang es, bei seiner 51 jährigen Patientin Auguste D., post mortem typische morphologische Merkmale im Zentralen Nervensystem nachzuweisen (Alzheimer 1907). Der Nachweis dieser von Alzheimer beschriebenen extrazellulären Amyloidplaques und intrazellulären neurofibrillären Tangles post mortem dient nach wie vor als sicheres Kriterium für die endgültige Diagnosestellung (Terry 2006). Die Amyloidablagerungen und neurofibrillären Tangles sind dabei vor allem im Hippocampus, der Amygdala, sowie in kortikalen und subkortikalen Regionen lokalisiert (Braak et al. 1996, Selkoe 2001). Besonderes Interesse gilt derzeit PET-CT Untersuchungen mit radioaktiven Tracern, welche spezifisch Amyloidplaques detektieren. Diese könnten in Zukunft eine frühere Diagnosestellung ermöglichen, noch bevor kognitive als auch nicht kognitive Symptome zu einer starken Beeinträchtigung des täglichen Lebens der Patienten führen (Rowe et al. 2008, Camus et al. 2012).

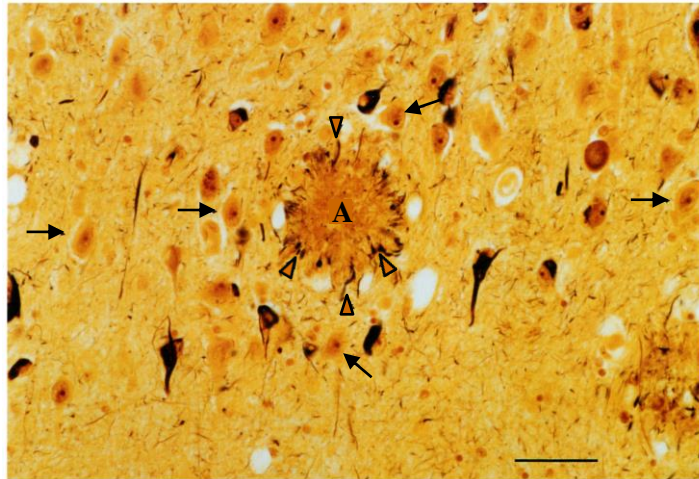


Abbildung modifiziert nach Selkoe, Neurology 6 (1991) 487-98

Abb. 1: Plaques und Tangles. Silberimprägnation nach Bielchowsky eines Schnitts durch die Amygdala eines 69-jährigen Patienten nach sechsjähriger progressiver AD. Darstellung eines Amyloidplaques (A) in der Mitte der Abbildung, der von dystrophen Neuriten (Δ) umgeben ist. Die neurofibrillären Tangles imponieren als intrazelluläre Aggregate, welche fast das gesamte Zytoplasma einiger Neurone einnehmen. Aufgrund der Anfärbung der Tangles in der Silberimprägnation erscheinen die betroffenen Neurone schwarz gefärbt im Gegensatz zu benachbarten normalen Zellen (\rightarrow). Der Balken rechts unten im Bild entspricht einer Größe von 50 μ m.

Meist tritt die Erkrankung sporadisch auf und nur 5 % bis 10 % der Fälle werden autosomal dominant als so genannte familiäre Form der Alzheimer Demenz (Familial Alzheimer's Disease, FAD) vererbt (Selkoe 2001). Beide Formen unterscheiden sich hinsichtlich des Zeitpunkts des Auftretens der Krankheitssymptome, nicht jedoch bezüglich ihrer Histopathologie (Selkoe 2001). So manifestiert sich die sporadische Form erst nach dem 65. Lebensjahr, die familiäre Form dagegen bereits zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr oder sogar früher (Selkoe 1999, Selkoe 2001, Haass und Selkoe 2007).

Die familiäre Form der Alzheimer Erkrankung wird bedingt durch Mutationen, welche drei verschiedene Gene betreffen können (Hardy 1997, Tilley et al. 1998). Diese beeinflussen die A β -Produktion und resultieren somit in einer gesteigerten A β -Aggregation, was wiederum zur vorzeitigen Entstehung der Amyloid-Plaques führt (Haass und Steiner 2002). Hauptrisikofaktor der häufigeren sporadischen Variante ist das Alter. In einigen Fällen besteht jedoch auch ein genetischer Risikofaktor. Das Allel ϵ 4 (APOE4) des für das plasmatische Apolipoprotein E (apoE) kodierenden Gens APOE scheint einen für die sporadische AD prädisponierenden Faktor darzustellen. Denn zum einen besteht eine starke genetische Assoziation zwischen Allel ϵ 4 und sporadischer AD, zum anderen weisen homozygote Träger des Allels ϵ 4 eine vermehrte A β -Ablagerung in

zerebralen und vaskulären Plaques auf (Corder et al. 1993, Saunders et al. 1993, Schmechel 1993).

1.2. Ätiologie und Histopathologie der Alzheimer Erkrankung

1.2.1. Tau-Hypothese

Neurofibrilläre Bündel („Tangles“) sind neben den Amyloidplaques die histopathologischen Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung (Alzheimer 1907). Sie entstehen intrazellulär durch die Aggregation von gepaarten helikalen Filamenten im somatodendritischen Kompartiment als auch in Axonen von Neuriten (Terry et al. 1964). Die Filamente bestehen vor allem aus hyperphosphorylierten Formen des mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Grundke-Iqbal et al. 1986, Goedert 1993). Dieses ist physiologischerweise für die Stabilisierung und Dynamik der axonalen Mikrotubuli verantwortlich (Friedhoff et al. 2000). Die Hyperphosphorylierung von Tau resultiert aus dem Ungleichgewicht verschiedener Phosphatasen und Kinasen (Mandelkow und Mandelkow 1998) und vermindert die Polymerisationsgeschwindigkeit der Mikrotubuli (Garver et al. 1996). Die Aggregation helikaler Filamente schädigt Axone und Dendriten, sodass dystrophe Neuriten entstehen (Crowther und Goedert 2000). Sterben diese Neuronen ab, werden die neurofibrillären Tangles aufgrund ihrer hohen Stabilität nicht abgebaut, sondern im ZNS abgelagert (Bondareff et al. 1994).

Zwar korrelieren Anzahl und Verteilung der Tangles mit der klinischen Symptomatik (Goedert 1993, Braak et al. 1997), doch sind sie im Gegensatz zu den senilen Plaques nicht spezifisch für die Alzheimer Demenz. Sie treten auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Frontallappen-Demenz oder der subakuten sklerosierenden Panencephalitis auf (Wisniewski et al. 1979, Lee und Trojanowski 1999, Morris et al. 2001). Mutationen im Tau kodierenden Gen führen darüber hinaus zu parkinsonähnlichen Erkrankungen (Hutton et al. 1998).

1.2.2. Amyloid-Hypothese

Amyloidplaques werden als extrazelluläre Ablagerungen hauptsächlich im Gehirnparenchym, jedoch in geringerem Maße auch in Wänden zerebraler Gefäße gefunden (Selkoe 1999). Hauptkomponente dieser Plaques ist das β -Amyloid ($A\beta$), welches 1984 erstmals aus zerebralen Gefäßablagerungen (Glenner und Wong 1984) und kurze Zeit später aus Amyloidplaques im ZNS isoliert werden konnte (Masters et al. 1985 a).

Das A β -Peptid, welches aus dem β -Amyloid-Vorläufer-Protein (β -amyloid-precursor-protein, β APP) durch Proteolyse mittels verschiedener Proteasen entsteht, weist aufgrund deren Schnittstellenvariabilität eine N- und C-terminale Heterogenität auf, sodass unterschiedlich lange A β -Peptid-Formen existieren (Glennner und Wong 1984, Masters et al. 1985b, Wang et al. 1996, Steiner et al. 2008). A β_{42} scheint dabei die pathogene A β -Spezies zu sein, obwohl sie nur etwa 10 % der insgesamt sezernierten A β -Peptide ausmacht (Vassar und Citron 2000). Im Gegensatz zu dem weniger amyloidogenen A β_{40} besitzt A β_{42} zwei zusätzliche Aminosäuren, Isoleucin und Alanin, welche diesem stärkere hydrophobe Eigenschaften verleihen, aufgrund derer A β_{42} stärker aggregieren kann (Jarrett et al. 1993, Selkoe 1999).

Im Besonderen verdeutlichen die für die FAD (Familiäre Alzheimer Demenz) verantwortlichen autosomal dominanten Mutationen der für β APP oder PS-1 und PS-2 (der katalytisch aktiven Komponenten der γ -Sekretase; Vgl. Kapitel 1.3.1.) kodierenden Gene die Schlüsselrolle von A β bei der Pathogenese der AD. In 70 % bis 80 % der Fälle sind Mutationen von PSEN 1 auf Chromosom 14 (Sherrington et al. 1995), welches für Presenilin1 (PS-1) kodiert, ursächlich für die FAD, gefolgt von Mutationen des für Presenilin 2 (PS-2) kodierenden Gens PSEN2 auf Chromosom 1 (Rogaev et al. 1995, Levy-Lahad et al. 1995 a, Levy-Lahad et al. 1995 b). Mutationen des für β APP kodierenden Gens auf Chromosom 21 sind dagegen nur in 2 % bis 3 % der Fälle Ursache der familiären Alzheimer Erkrankung (Goate et al. 1991). Sie sind innerhalb oder eng benachbart zur A β -Domäne im Bereich der Protease-Schnittstellen lokalisiert (Selkoe 1996). Fast alle FAD assoziierten Mutationen erhöhen die spezifische A β_{42} -Produktion. Aufgrund der starken Hydrophobizität von A β_{42} kommt es über eine gesteigerte A β -Aggregation zur vorzeitigen Entstehung der Amyloid-Plaques (Selkoe 2001, Haass und Steiner 2002).

Jedoch nicht nur Mutationen dieser drei Gene, sondern auch eine Veränderung der Gendosis des β APP-Gens kann familiäre Formen der Alzheimer Demenz verursachen. So besitzen Down-Syndrom-Patienten mit ihrem zusätzlichen Chromosom 21 ein zusätzliches Allel für β APP. Es wird angenommen, dass die bereits im mittleren Lebensalter bei diesen Patienten auftretende typische Alzheimerpathologie auf einem Dosiseffekt des β APP-Gens beruht (Oyama et al. 1994, Tanzi 1996). Hiermit übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass eine Duplikation des β APP-Gen-Lokus zur Akkumulierung von A β führt, welche wiederum die Manifestation einer autosomal

dominanten Form der AD mit schwerer Amyloid-Angiopathie verursacht (Rovelet-Lecrux et al. 2006).

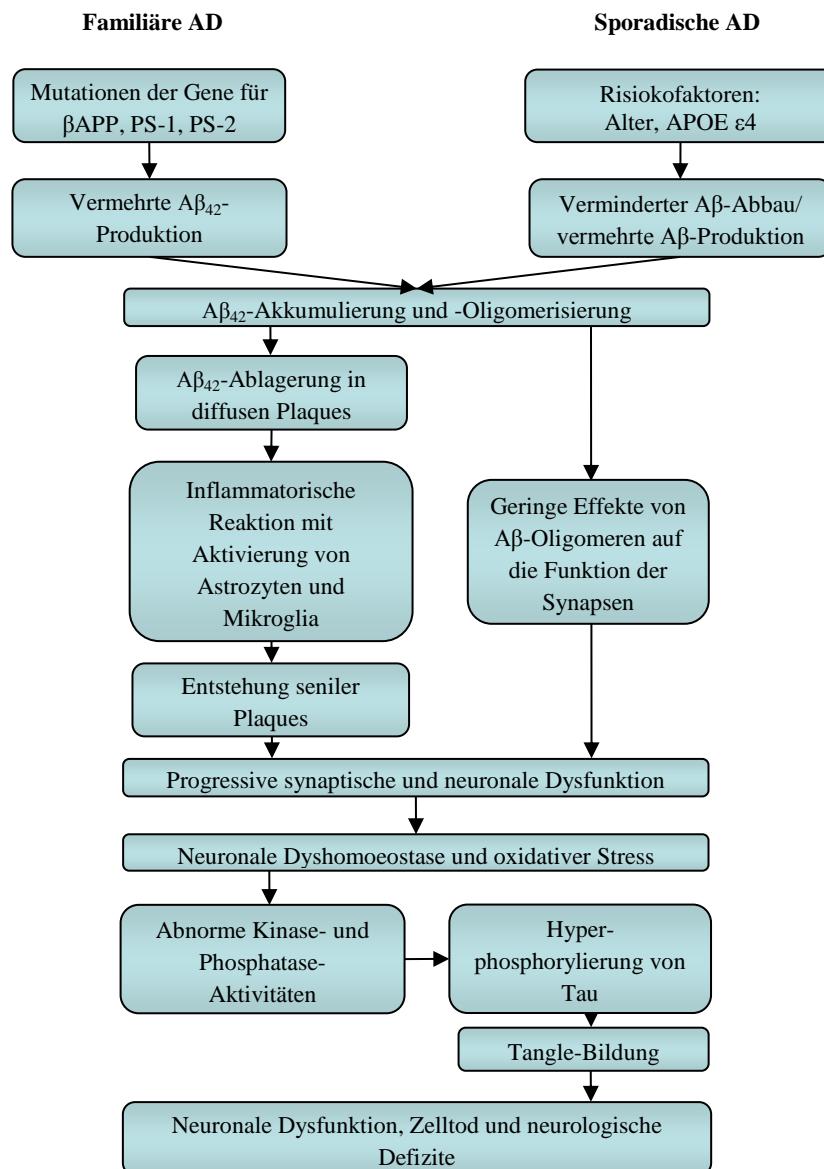
Beweisend für die Amyloid-Hypothese ist jedoch der Nachweis einer Mutation von β APP, welche vor der Erkrankung an der Alzheimer-Demenz schützt (Jonsson et al. 2012). Bei dieser Mutation ist Alanin durch Threonin an Position 673 von β APP ersetzt (A673T). Sie ist benachbart zur BACE1-Schnittstelle von β APP lokalisiert und reduziert in vitro das Shedding von β APP durch BACE1 um 40 % im Vergleich zu Wildtyp- β APP, sodass die Produktion der amyloidogenen Peptide $A\beta_{x-40}$ und $A\beta_{x-42}$ um bis zu 40 % reduziert wird. Diese Mutation wird bei älteren Menschen ohne AD signifikant häufiger nachgewiesen als bei AD-Patienten (Jonsson et al. 2012).

Die sowohl für die sporadische als auch für die familiären Formen der AD typischen Plaques setzen sich zwar hauptsächlich aus dem amyloidogenen fibrillären $A\beta_{42}$ und in geringerem Ausmaß aus $A\beta_{40}$ zusammen, weisen aber als weitere Bestandteile zusätzlich noch andere $A\beta$ -Formen, das Apolipoprotein E und J, α 1-Antitrypsin sowie Proteoglykane auf (Dickson 1997, Selkoe 2001). Je nach Zusammensetzung der Amyloidplaques und ihrer lokalen zellulären Veränderungen, werden senile von diffusen Amyloidplaques unterschieden. Während senile Plaques (auch als neuritische Plaques bezeichnet) spezifisch für die Alzheimer Erkrankung sind, kommen diffuse Plaques auch bei nicht dementen alten Menschen vor und scheinen die Vorstufe der senilen Plaques darzustellen (Selkoe 2001, Hardy und Selkoe 2002, Haass und Selkoe 2007). Senile Plaques besitzen den für die Amyloidplaques von Alzheimerpatienten typischen dichten Amyloid-Kern („amyloid-core“), welcher aus fibrillärem $A\beta$ besteht und von degenerierten Axonen und Neuriten sowie von aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten umgeben ist (Selkoe 1991, Pike et al. 1994, Braak et al. 1996).

Wurde zunächst nur von den senilen Plaques eine beeinträchtigende Wirkung auf die Funktion der Synapsen angenommen (Selkoe 1991, Hardy 1992, Selkoe 1999), so konnte mittlerweile auch für die löslichen oligomeren Formen des $A\beta_{42}$ -Peptids nachgewiesen werden, dass diese neurotoxische Eigenschaften besitzen (Lambert et al. 1998, Hartley et al. 1999, Dahlgren et al. 2002, Walsh et al. 2002, Haass und Selkoe 2007). Bereits vor dem Verlust von Neuronen lösen sie eine Fehlfunktion der Synapsen aus, u.a. durch Inhibition der Induktion von LTP (long-term potentiation), d.h. der lang andauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung, welche eine Form der synaptischen Plastizität darstellt (Mucke et al. 2000, Selkoe 2002, Walsh et al. 2002). Die synaptische Fehlfunktion scheint den frühen Gedächtnisstörungen zugrunde zu liegen (Selkoe 2002),

wobei der Verlust von Synapsen mit der Menge löslicher zerebraler A β -Peptide korreliert (Lue et al. 1999, Mucke et al. 2000). So korrelieren die kognitiven Defizite besser mit der Menge an löslichem A β als mit der Plaqueanzahl (Naslund et al. 2000).

Es wird angenommen, dass die Amyloidplaques nur Speicher für reaktive A β -Oligomere



Schema modifiziert nach Haass & Selkoe, Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.8 (2007) 101-112

Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloid-Kaskade. Ein Ungleichgewicht zwischen Aβ₄₂-Produktion und -Abbau mit konsekutiv erhöhten Aβ₄₂-Leveln resultiert in einer verstärkten Aβ₄₂-Oligomerisierung. Dies verursacht zunächst leichte, dann schwere und dauerhafte Veränderungen der synaptischen Funktion und der Neurone. Gleichzeitig kommt es über die Bildung von diffusen Amyloidplaques zur Entstehung seniler Plaques, was eine lokale Entzündungsreaktion hervorruft. Die progressive neuronale Dysfunktion ist begleitet von oxidativem Stress und neuronaler Dyshomoeostase. Diese führen letztendlich zur Tangle-Bildung, welche die Progression der neuronalen Dysfunktion noch weiter unterstützt. Klinisches Korrelat ist eine progressive Demenz, welche mit ausgeprägten Aβ-Plaques und Tangles assoziiert ist.

darstellen (Kawasumi et al. 2002, Walsh et al. 2002, Haass und Selkoe 2007).

Fibrilläres A β dagegen induziert eine Kaskade, welche in der Tangle-Bildung gipfelt (Busciglio et al. 1995, Gotz et al. 2001, Hardy und Selkoe 2002). Es ist ferner anzunehmen, dass die Amyloidablagerungen zeitlich vor der Tau-Pathologie auftreten und für die Tangle-Bildung mit verantwortlich sind (Oddo et al. 2003). Zudem weisen Studien von Patienten Tau-Mutations-bedingter Fronto-temporaler Demenz mit Parkinsonismus sowie Studien mit Tau-transgenen Mäusen darauf hin, dass die Tau-Pathologie nicht für die Entstehung von Amyloid-Plaques ursächlich zu sein scheint (Hardy et al. 1998, Lewis et al. 2000).

1.2.2.1. β -Amyloid-Vorläufer-Protein (β APP)

β APP ist ein Typ I Transmembranprotein, welches neben seiner Transmembrandomäne (TMD) eine große N-terminale Ektodomäne, die A β -Domäne, sowie eine kurze zytoplasmatische Domäne besitzt. N-terminal befindet sich das 17 AS lange Signalpeptid, welches für die Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) benötigt wird (Kang et al. 1987, Tanzi et al. 1987). Während des Transports vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an die Zelloberfläche erfolgt dessen posttranslationale Maturierung durch N- und O-Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung (Selkoe 2001, Thinakaran und Koo 2008). Nach Erreichen der Zelloberfläche wird β APP in Endosomen reinternalisiert. Von dort kann β APP entweder zurück an die Zelloberfläche (Recycling Pathway) oder aber zur Degradierung in Lysosomen transportiert werden (Haass et al. 1992 a, Yamazaki et al. 1996). Sowohl während des Transports durch den sekretorischen Pathway als auch danach kann β APP prozessiert werden, wobei lösliche Derivate ins Lumen freigesetzt werden (Selkoe 2001). Die A β -Generierung erfolgt dabei hauptsächlich in Endosomen nach Reinternalisierung von β APP (Golde et al. 1992, Haass et al. 1992 a, Koo und Squazzo 1994, Yamazaki et al. 1996, Small und Gandy 2006).

β APP ist eng verwandt mit den zur APP-Familie gehörenden homologen Proteinen APLP-1 (amyloid precursor like protein-1) und APLP-2 (Wasco et al. 1992, Sprecher et al. 1993). Trotz des hohen Konservierungsgrades ihrer Gene, welcher auf eine nicht unwesentliche Funktion ihrer Genprodukte schließen lässt, ist die Funktion der APP-Familie bisher nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden eine Rolle von β APP bei der Zelladhäsion und Migration sowie trophische Funktionen. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass β APP das Auswachsen von Neuriten stimuliert und die Synaptogenese fördert (Thinakaran und Koo 2008). Intrazerebroventrikulär injiziertes

β APP induzierte im Tiermodell nicht nur eine erhöhte Synapsendichte sondern verbesserte sogar die Gedächtnisleistung der behandelten Tiere (Roch et al. 1994, Meziane et al. 1998).

Weiteren Aufschluss über die physiologischen Funktionen der APP-Familie erhoffte man mit „Knockout“-Studien zu erzielen. Während Verlust jeweils eines Gens (β APP^{-/-}; APLP-1^{-/-}; APLP-2^{-/-}) nur geringfügige Veränderungen des Phänotyps hervorrief (Zheng et al. 1995, Von Koch et al. 1997, Heber et al. 2000), verstarben „Doppel-Knockout“-Mäuse bei denen sowohl beide β APP- als auch beide APLP-2-Allele (β APP^{-/-}/APLP-2^{-/-}) oder jeweils die beiden Allele von APLP-1 und APLP-2 (APLP-1^{-/-}/APLP-2^{-/-}) ausgeschaltet worden waren früh postnatal ohne dabei histopathologische Anomalitäten aufzuweisen. Die ebenfalls letalen „Triple-Knockout“-Mäuse zeigen dagegen eine gestörte Gehirnentwicklung. Sie offenbaren eine essentielle Rolle der APP-Gen-Familie in der Entwicklung des Nervensystems, beruhend auf ihrem Einfluss auf die Struktur und Funktion von Synapsen als auch auf die neuronale Migration (Herms et al. 2004). „Knock-in“ von APPs- α in die „Doppel-Knockout“-Mäuse β APP^{-/-}/APLP-2^{-/-} konnte die postnatale Letalität dieser Mäuse verhindern und somit Aufschluß über synergistische Funktionen von β APP und APLP-2 geben. Es konnte gezeigt werden, dass β APP und APLP-2 eine besondere Bedeutung während der Synaptogenese, für die postnatale Reifung der neuromuskulären Synapse aber auch für den Erhalt der adulten neuromuskulären Synapse und für eine korrekte Neurotransmission an dieser zukommt (Weyer et al. 2011). Im Gegensatz zur letalen Kombination von β APP^{-/-}/APLP-2^{-/-} waren β APP^{-/-}/APLP-1^{-/-} Mäuse vital, was auf eine bedeutende physiologische Funktion von APLP-2 als auch auf eine Redundanz zwischen APLP-2 und den beiden anderen Mitgliedern der APP-Familie hinweist (Heber et al. 2000).

1.2.2.2. β APP-Proteolyse

Die proteolytische Prozessierung der Ektodomäne von β APP (Shedding) erfolgt entweder durch die α -Sekretase (anti-amyloidogener Pathway) oder durch die β -Sekretase (amyloidogener Pathway) (Selkoe 2001). Sie resultiert in der Sekretion von löslichem β APP (APPs- α und APPs- β). Beide Pathways spielen eine entscheidende Rolle für die Generierung des A β -Peptids (Selkoe und Schenk 2003, Haass 2004).

Trotz der Diskussion ob α - und β -Sekretase in einigen Zelllinien nicht um das konstitutive Shedding von β APP konkurrieren (Jorissen et al. 2010, Kuhn et al. 2010) wird im Allgemeinen eine Konkurrenz der beiden Sekretasen um das gemeinsame Substrat β APP angenommen (Selkoe und Schenk 2003, Postina et al. 2004). So lässt sich

ein vermindertes Shedding von β APP durch die β -Sekretase nachweisen, wenn die α -Sekretase-Aktivität entweder durch Überexpression der α -Sekretase ADAM10 (Postina et al. 2004) oder nach pharmakologischer Aktivierung (Bandyopadhyay et al. 2007) (stimuliertes Shedding) über das konstitutive Level hinaus gesteigert ist. Umgekehrt ist eine vermindertes Shedding durch die α -Sekretase bei Überexpression der β -Sekretase BACE1 zu beobachten (Vassar et al. 1999, Kuhn et al. 2010). Für die Konkurrenz beider Sekretasen könnten Veränderungen in der zellulären Lokalisation des Sheddings von β APP im Rahmen einer gesteigerten enzymatischen Aktivität verantwortlich sein (Lichtenthaler 2011).

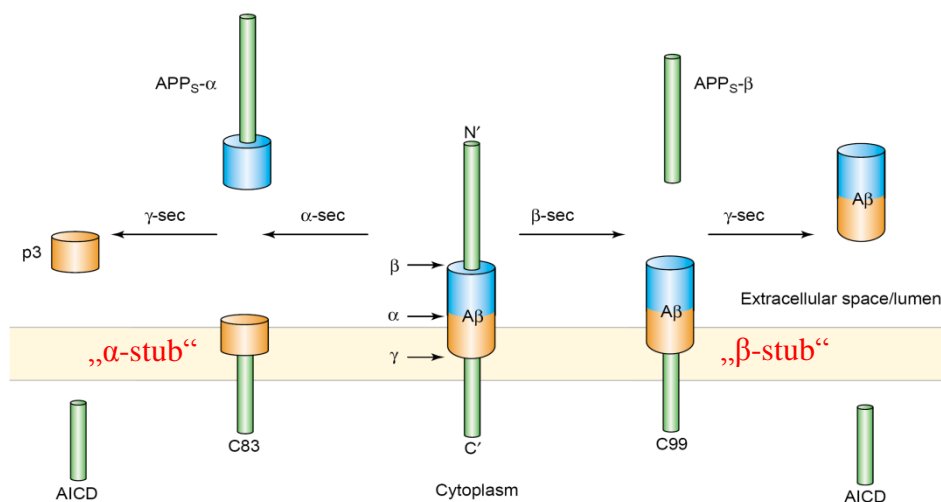


Abbildung modifiziert nach Haass & Steiner, Trends in Cell Biol 12 (2002) 556-562

Abb. 3: Proteolytische Prozessierung von β APP. Die A β -Domäne ist blau-orange markiert. Bei der Proteolyse durch die β - bzw. α -Sekretase werden die löslichen Formen APPs- β bzw. APPs- α sezerniert. Die dabei entstehenden 12 kDa („C99“/„C89“) bzw. 10 kDa („C83“) großen C-terminalen Fragmente verbleiben zunächst in der Membran. Die anschließende Prozessierung durch den γ -Sekretase-Komplex generiert A β bzw. P3 sowie jeweils ein ca. 7 kDa großes intrazelluläres Fragment (AICD).

Die endoproteolytische Prozessierung von β APP durch die β -Sekretase führt zur Bildung des A β -Peptids (amyloidogener Pathway). Der durch die β -Sekretase vermittelte Schnitt von β APP, welcher meist an Asp-1 (β -site), seltener an Glu-11 (β' -site) der Ektodomäne erfolgt (Vassar et al. 1999), generiert neben dem löslichen APPs- β ein membranständiges C-terminales Fragment (CTF β) mit einer Länge von 99 AS („C99“) bzw. 89 AS („C89“) (Vassar et al. 1999, Vassar und Citron 2000). CTF β beinhaltet die vollständige A β -Sequenz und ist damit der direkte Vorläufer für die A β -Synthese (Steiner und Haass 2000).

Die weitere Proteolyse des CTF β erfolgt durch den γ -Sekretase-Komplex innerhalb der Transmembrandomäne an der ϵ -Schnittstelle. Sie führt zur intrazellulären Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne (APP-intracellular-domain, AICD), welcher eine Bedeutung in der nukleären Signaltransduktion beigemessen wird (Cao und Südhof 2001, Sastre et al. 2001, Weidemann et al. 2002). Daraufhin wird A β durch katalytische Prozessierung des verbliebenen membrangebundenen Fragments freigesetzt. Der Schnitt erfolgt dabei innerhalb der TMD am C-Terminus der A β -Domäne jeweils etwa drei Aminosäuren nach dem ϵ -Schnitt via der ζ - zur γ -Schnittstelle. Es werden zwei unterschiedliche A β -Peptid-Linien unterschieden. Zum einen die A β -Peptide A $\beta_{49}(\epsilon)$, A $\beta_{46}(\zeta)$, A $\beta_{43}(\gamma)$, A $\beta_{40}(\gamma)$ und A $\beta_{37}(\gamma)$, zum anderen die A β -Peptide A $\beta_{48}(\epsilon)$, A $\beta_{45}(\zeta)$, A $\beta_{42}(\gamma)$ und A $\beta_{39}(\gamma)$. Nur die Entstehung von A β_{38} kann mit diesem Modell nicht erklärt werden (Steiner et al. 2008).

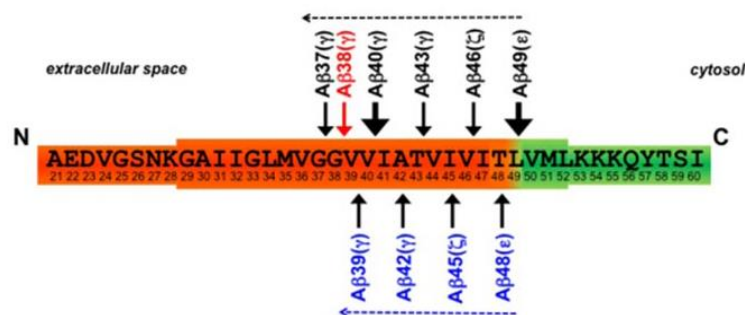


Abbildung entnommen aus Steiner, JBC 238 (2008) 29627-31

Abb. 4: Intramembranäre Prozessierung von β APP durch den γ -Sekretase-Komplex.

Darstellung der variablen γ -Sekretase-Schnittstellen innerhalb der TMD. Die A β -Domäne ist rot, die AICD grün dargestellt, die TMD ist vergrößert hervorgehoben. Die gestrichelten Pfeile geben die angenommene Schnittrichtung an.

Die Hydrolyseprodukte des amyloidogenen Pathways entstehen nicht nur unter pathologischen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen (Haass et al. 1992 a) und können im Liquor und Plasma von Alzheimer Patienten sowie von gesunden Probanden nachgewiesen werden (Seubert et al. 1992, Shoji et al. 1992).

In Neuronen wird β APP physiologischerweise hauptsächlich durch die α -Sekretase ADAM10 prozessiert (anti-amyloidogener Pathway) (Kuhn et al. 2010). Diese verhindert die Synthese des amyloidogenen A β durch einen Schnitt in der Mitte der A β -Domäne zwischen Aminosäure Lys¹⁶ und Leu¹⁷ (Esch et al. 1990, Sisodia 1992, Kuhn et al. 2010). Die α -Sekretase-Aktivität ist mit drei Mitgliedern der ADAM-Familie assoziiert (Buxbaum et al. 1998, Koike et al. 1999, Lammich et al. 1999), welche β APP vor allem

an der Zellmembran (Sisodia 1992, Haass et al. 1992 a) zum Teil jedoch bereits im sekretorischen Transportweg (De Strooper et al. 1993, Buxbaum et al. 1998, Lammich et al. 1999, Skovronsky et al. 2000) prozessieren und dabei das lösliche APPs- α generieren (Jorissen et al. 2010, Kuhn et al. 2010). Für APPs- α konnten neuroprotektive und Gedächtnis fördernde Eigenschaften nachgewiesen werden (Roch et al. 1994, Furukawa et al. 1996). Der verbleibende transmembranäre C-terminale Rest (CTF α , C83) wird analog dem CTF β weiter durch den γ -Sekretase-Komplex prozessiert, wobei das lösliche Peptid p3 (Haass et al. 1993) und die freigesetzte intrazelluläre Domäne (AICD) entstehen (Sastre et al. 2001, Weidemann et al. 2002).

1.3. γ -Sekretase-Aktivität

Der γ -Sekretase-Komplex besitzt aufgrund seiner fehlenden Sequenzspezifität viele verschiedene Substrate, wobei es sich ausnahmslos um Typ I Transmembranproteine handelt. Neben β APP prozessiert der γ -Sekretase-Komplex unter anderem APLP1 und -2, den Notch- und ErbB4-Rezeptor, die Notch-Liganden Delta und Jagged sowie N- und E-Cadherin, Nectin1- α , CD44 und Typ III NRG1 (Bao et al. 2003, Haass 2004). Derzeit sind neben dem γ -Sekretase-Komplex die weiteren Aspartylproteasen Signal Peptid Peptidase und deren homologe Typ 4 Prepilin Peptidase aus der Familie der Signalpeptidasen (SPP), sowie die Metalloprotease-ähnliche S2P-Familie und Serinproteasen der Rhomboid-Familie bekannt (Haass und Steiner 2002). Im Gegensatz zu diesen benötigt die katalytische Einheit der γ -Sekretase einen hochmolekularen Komplex zur Entfaltung ihrer katalytischen Aktivität (De Strooper 2003). Dieser setzt sich aus den vier Komponenten Presenilin (PS-1 oder PS-2), Nicastrin (Nct), APH-1a mit seinen zwei Spleiß-Varianten APH-1aS und APH-1aL bzw. dem homologen APH-1b (anterior pharynx-defective-1) und PEN-2 (presenilin enhancer-2) zusammen (Yu et al. 2000, Francis et al. 2002, Goutte et al. 2002, Lee et al. 2002, De Strooper 2003, Edbauer et al. 2003).

Alle vier Untereinheiten sind essentiell und zugleich ausreichend für die γ -Sekretase-Aktivität (Edbauer et al. 2003, Fraering et al. 2004). Im ER werden sie schrittweise zum hochmolekularen γ -Sekretase-Komplex, wahrscheinlich in einem Verhältnis 1:1:1:1, zusammengefügt (Kim et al. 2004, Capell et al. 2005, Sato et al. 2007). Nct und APH-1 bilden dabei zunächst einen dimeren Komplex, welcher der Anlagerung und Stabilisierung des PS-Holoproteins dient (Takasugi et al. 2003, Shirotani et al. 2004). Als letzte Komponente lagert sich an den nun trimeren Komplex PEN-2 an, was zur

Konformationsänderung von Nct führt und die Endoproteolyse von PS induziert (Kim et al. 2003, Takasugi et al. 2003, Prokop et al. 2004, Kaether et al. 2006).

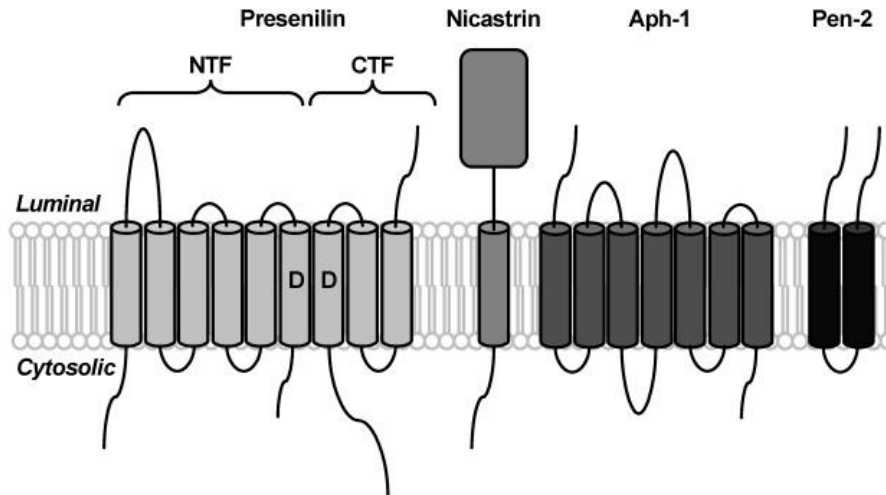


Abbildung modifiziert nach Wolfe, S.W; Biochemistry 45 (2006) 7931-7939

Abb. 5: Der γ -Sekretase-Komplex. Darstellung des γ -Sekretase-Komplexes mit den fünf Untereinheiten PS-1, PS-2, Nct, APh-1 und PEN-2.

Aufgrund der verschiedenen Isoformen von APh-1 und PS existieren mindestens sechs unterschiedliche γ -Sekretasekomplexe, welche jeweils γ -Sekretase-Aktivität besitzen und $A\beta_{42}$ produzieren können (Shirotani et al. 2007). Die γ -Sekretase-Aktivität ist vor allem an der Plasmamembran und in Endosomen lokalisiert (Chyung et al. 2005, Kaether et al. 2006), wobei die γ -Sekretasekomplexe mit aktiver Konformation an der Plasmamembran nur etwa 6 % bis 7 % aller γ -Sekretasekomplexe ausmachen (Dries und Yu 2008).

1.3.1. Presenilin

Der erste Hinweis auf die für die γ -Sekretase-Aktivität verantwortlichen Proteine kam von genetischen Studien, welche die FAD mit Mutationen der für Presenilin-1 und -2 (PS-1 und -2) kodierenden Gene auf Chromosom 1 und 14 assoziierten (Rogaev et al. 1995, Sherrington et al. 1995, Levy-Lahad et al. 1995 a, Levy-Lahad et al. 1995 b). PS-1 und PS-2 sind homologe, polytope Transmembranproteine (Levy-Lahad et al. 1995 b) mit je neun Transmembrandomänen (Laudon et al. 2005). Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Preseniline die katalytische Einheit des γ -Sekretase-Komplexes darstellen, wobei ihre zwei konservierten Aspartylreste in TMD 6 und in TMD 7 das aktive Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes bilden (Wolfe et al. 1999). Die verminderte $A\beta$ -Produktion infolge Deletion von PS-1 (De Strooper et al.

1998), sowie die vollständige Inhibition der A β -Synthese bei „Doppel-Knockout“ von PS-1 und -2 bestätigen die Annahme, dass PS-1 und PS-2 die katalytisch aktiven Untereinheiten des γ -Sekretase-Komplexes sind (Zhang et al. 2000).

Interessanterweise besitzen Preseniline nicht das klassische D(T/S)G(T/S)-Motiv der Aspartylproteasen, sondern als neue Familie der Aspartylproteasen ein hoch konserviertes GxGD-Motiv, welches den Aspartylrest der TMD 7 enthält (Steiner et al. 2000, Haass und Steiner 2002). Während der Maturierung des Sekretasekomplexes wird PS innerhalb des großen Loops zwischen TMD 6 und 7 endoproteolysiert. Hierbei entsteht das stabile PS-Heterodimer, bestehend aus einem N-terminalen (NTF) und einem C-terminalen (CTF) Fragment (Thinakaran et al. 1996, Capell et al. 1998). Die Endoproteolyse von PS erfolgt autokatalytisch und dient der Aktivierung des γ -Sekretase-Komplexes. Die Autoproteolyse von PS erfolgt dabei in einer schrittweisen Endoproteolyse analog der Proteolyse anderer γ -Sekretase-Substrate wie z.B. von β APP, vermutlich zunächst durch Schnitt an der ε -Schnittstelle, gefolgt durch weitere Schnitte via der ζ - zur γ -Schnittstelle (Fukumori et al. 2010).

1.3.2. Nicastrin

Nicastrin (Nct) ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären N-terminalen und einer kurzen intrazellulären C-terminalen Domäne (Yu et al. 2000). Es wird angenommen, dass Nct als Substratrezeptor des γ -Sekretasekomplexes dient, indem die luminal Domäne von Nct spezifisch an den N-terminalen Rest des Substrates bindet, dessen Ektodomäne zuvor proteolytisch entfernt wurde (Shah et al. 2005, Struhl und Adachi 2000). Dies verleiht dem γ -Sekretase-Komplex eine gewisse Substratspezifität trotz seiner fehlenden Sequenzspezifität. Die Annahme, dass Nct als Substrat-Rezeptor dient, welcher Substrate mit einer bestimmten Länge erkennt, wurde jedoch angezweifelt und bleibt somit kontrovers diskutiert (Chávez-Gutiérrez et al. 2008).

1.3.3. Aph-1

Aph-1 ist ein Protein mit sieben Transmembrandomänen, welches das PS-Holoprotein im γ -Sekretasekomplex stabilisiert und als Gerüst für den Rest des Komplexes dient (Kim et al. 2003, Takasugi et al. 2003). Weitere Funktionen sind bisher nicht für Aph-1 bekannt (Steiner et al. 2008).

1.3.4. PEN-2

PEN-2 ist zwar die kleinste der γ -Sekretase-Untereinheiten, ist jedoch von essentieller Bedeutung für die Aktivierung des γ -Sekretase-Komplexes (Bammens et al. 2011).

PEN-2 besitzt zwei hydrophobe Transmembrandomänen, wobei eine dieser Domänen in unmittelbarer Nachbarschaft zum PS-CTF lokalisiert ist (Prokop et al. 2004, Bammens et al. 2011). Die Bindung von PEN-2 an PS des Aph-1/Nct/PS-Komplexes triggert die Endoproteolyse von PS (Takasugi et al. 2003, Prokop et al. 2004). PEN-2 spielt zudem eine entscheidende Rolle bei der Maturierung von Nct und PS, was wiederum essentiell für die Stabilisierung des γ -Sekretasekomplexes ist, welcher ansonsten rasch vom Proteasom degradiert wird (Prokop et al. 2004, Bammens et al. 2011).

1.3.5. γ -Sekretase-Inhibition- und Modulation als Therapieansatz

Der weltweit größte Forschungsschwerpunkt liegt auf der Inhibition der γ -Sekretase-abhängigen $A\beta_{42}$ -Produktion. Obwohl der γ -Sekretase-Komplex in vielerlei Hinsicht einen viel versprechenden Therapieangriffspunkt darstellt, ist die generelle Inhibition des γ -Sekretase-Komplexes mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Denn neben der β APP-Prozessierung wird auch die Prozessierung der weiteren γ -Sekretase-Substrate, im Besonderen die von Notch, gehemmt. So führt die nicht-selektive γ -Sekretase-Inhibition zu schweren Veränderungen des Gastrointestinal-Trakts und des lymphatischen Systems infolge gehemmter Notch-Signaltransduktion (Roberson und Mucke 2006, Barten und Albright 2008).

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Langzeiteinnahme von NSAIDs (Non steroidal anti inflammatory drugs) die Prävalenz der AD reduziert. NSAIDs wie Ibuprofen und Sulindac Sulfide modulieren möglicherweise über allosterische Bindungsstellen des γ -Sekretase-Komplexes die $A\beta$ -Produktion. Hierbei wird die $A\beta_{42}$ -Generation vermindert und gleichzeitig die Produktion des benignen $A\beta_{38}$ erhöht. Dies erfolgt unabhängig von der Cyclooxygenaseaktivität und vor allem ohne den ε -Schnitt des γ -Sekretase-Komplexes innerhalb der TMD von Notch zu beeinflussen, sodass die Freisetzung der Notch-NICD nicht beeinträchtigt wird (Weggen et al. 2001). Einige PS-Mutationen der FAD scheinen jedoch nicht auf diese γ -Sekretase-Modulatoren anzusprechen (Page et al. 2008).

Substanzen, welche eine allosterische Modifikation der γ -Sekretase-Aktivität bewirken, stellen viel versprechende Therapieansätze dar, erfordern aber eine weitere intensive Erforschung.

1.4. α -Sekretase-Aktivität

Die α -Sekretase-Aktivität war die erste katalytische Aktivität, die im Rahmen der β -APP-Prozessierung identifiziert wurde (Sisodia et al. 1990). Ihre Substratspezifität ist dabei unabhängig von einer bestimmten AS-Konsensussequenz. Vielmehr scheinen sekundäre strukturelle Merkmale wie die Distanz von 12 bis 13 AS von der Transmembrandomäne und eine α -helikale Konformation des Substrats im Bereich der Schnittstelle für dessen Prozessierung ausschlaggebend zu sein (Sisodia 1992, De Strooper et al. 1993). An der Zellmembran ist die α -Sekretase meist konstitutiv aktiv, ihre Aktivität kann jedoch auch zusätzlich reguliert werden, wobei Protein Kinase C (PKC), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) oder G-Protein gekoppelte Signalwege beschrieben werden (Fahrenholz und Postina 2006, Herrlich et al. 2008).

Enzyme, welche die Eigenschaften der α -Sekretase aufweisen, gehören zur Familie der ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase). Seit der Entdeckung des ersten Mitglieds dieser Proteasefamilie, dem heterodimeren aus Spermien stammenden Protein Fertilin, ist die ADAM-Familie auf 34 Mitglieder angewachsen (<http://merops.sanger.ac.uk/33>). Diese sind Typ I Transmembranproteine, welche eine gemeinsame Multidomänenstruktur mit einer „Disintegrin- und Metalloproteaseaktivität“ besitzen (Black und White 1998, Schlöndorff und Blobel 1999). Ihre Ektodomäne besitzt N-terminal ein Signalpeptid und eine Prodomäne, gefolgt von der Metalloproteasedomäne, welche ein Zink-Bindungsmotiv enthält. Daran schließen sich die Disintegrindomäne und eine cysteinreiche Domäne an, die gewöhnlich eine EGF-ähnliche Domäne enthält. Auf die Ektodomäne folgen die Transmembran- sowie die zytoplasmatische Domäne (Wolfsberg und White 1996, Seals und Courtneidge 2003). Die Prodomäne fungiert bei katalytisch aktiven ADAMs als Chaperone (Roghani et al. 1999, Schlöndorff und Blobel 1999, Seals und Courtneidge 2003). Nach korrekter Faltung der Protease inhibiert die Prodomäne die katalytische Aktivität, bis sie durch Furin oder furinähnliche Proteasen im TGN entfernt wird (Roghani et al. 1999, Seals und Courtneidge 2003). Nur etwa die Hälfte aller bekannten ADAMs besitzen die konservierte katalytische Metzincin Konsensussequenz (HEXGHXXGXXHD) und sind damit katalytisch aktiv (Blobel 2005). Innerhalb der katalytischen Domäne befinden sich mehrere Loops, wobei jedoch neben ADAM10 nur für ADAM17 diese Loop-Struktur bekannt ist (Maskos et al. 1998). Die zytoplasmatische Domäne besitzt häufig Signalmotive wie Phosphorylierungsstellen oder prolinreiche Regionen und scheint für die Hochregulierung des Sheddings (proteolytische Prozessierung der Ektodomäne von Transmembranproteinen) verantwortlich zu sein

(Schlöndorff und Blobel 1999). Ferner kommt der zytoplasmatischen Domäne eine entscheidende Bedeutung bezüglich des intrazellulären Transports vom ER an die Plasmamembran zu (Marcello et al. 2010).

ADAMs sind an Entwicklungsprozessen wie der Befruchtung, der Angiogenese, Kardiogenese, Neurogenese und der Entwicklung verschiedener epithelialer Gewebe beteiligt (Blobel 2005). Zudem spielen sie neben der Alzheimer Demenz eine Rolle in der Pathogenese einiger weiterer Erkrankungen, unter anderem bei der Rheumatoiden Arthritis, dem Morbus Crohn, der kardialen Hypertrophie und der Entstehung von Karzinomen (White 2003). Ihre Funktion entfalten sie einerseits via Signaltransduktion infolge Shedding von Transmembranproteinen wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Rezeptoren (Schlöndorff und Blobel 1999, Seals und Courtneidge 2003, White 2003), wobei für diese Funktion die Metalloproteaseaktivität verantwortlich ist. Andererseits sind sie als Disintegrine für Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Interaktionen verantwortlich (Seals und Courtneidge 2003).

ADAM10 (Kuzbanian) wurde 1989 erstmals aus Myelinscheiden von Rinderhirnen als myelindegradierendes Enzym isoliert (Chantry et al. 1989), bevor seine essentielle Beteiligung an der neuronalen Entwicklung, unter anderem infolge der Proteolyse der Notch-Rezeptoren, erkannt wurde (Rooke et al. 1996). Die von ADAM10 katalysierte Prozessierung der Notch-Ektodomäne stellt die Voraussetzung für den darauf folgenden intramembranären Schnitt durch die γ -Sekretase dar (Schroeter et al. 1998, Schlöndorff und Blobel 1999). ADAM10- defiziente Mäuse sterben an Tag 9.5 ihrer Embryogenese infolge von Entwicklungsstörungen des kardiovaskulären Systems. Sie weisen zudem Störungen ihrer Somiten und des ZNS auf (Hartmann et al. 2002). Die neuronalen Entwicklungsstörungen beruhen dabei auf einer fehlenden lateralen Inhibition und einem gestörten axonalen Längenwachstum infolge eines mangelnden Shedding von Notch durch ADAM10 (Rooke et al. 1996, Pan und Rubin 1997, Hartmann et al. 2002).

ADAM10 ist als Metalloprotease für das Shedding der membrangebundenen EGF-Rezeptor-Liganden HB-EGF und Betacellulin verantwortlich, wobei die Signaltransduktion via EGF-Rezeptoren (epidermal growth factor receptors) eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, wie zum Beispiel in der Kardiogenese, als auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen spielt (Sahin et al. 2004).

Neben der Prozessierung von Notch und EGF-Rezeptor-Liganden ist ADAM10 die hauptverantwortliche Sekretase für die proteolytische Prozessierung von Cadherinen in

Fibroblasten und Neuronen. Das Cadherin-Shedding beeinflusst dabei Zell-Zell-Interaktionen und induziert über eine β -Catenin-Transaktivierung Gene, welche eine wichtige Rolle in der Proliferation und dem Überleben von Zellen spielen (Maretzky et al. 2005, Reiss et al. 2005).

Erst zehn Jahre nach Entdeckung von ADAM10 konnte die α -Sekretase-Aktivität dieser Sekretase nachgewiesen werden (Lammich et al. 1999). ADAM10 gilt als die hauptsächlich für die Aktivität der α -Sekretase in vitro als auch in vivo verantwortliche Protease (Lammich et al. 1999, Kuhn et al. 2010). Zwar weisen ADAM10-defiziente Mäuse weiterhin α -Sekretase-Aktivität auf, was für eine Kompensation des ADAM10-Verlustes durch andere Sekretasen spricht (Hartmann et al. 2002), wobei für ADAM17 (TACE) (Buxbaum et al. 1998) als auch für ADAM9 (Koike et al. 1999) Eigenschaften der α -Sekretase nachgewiesen wurden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Neuronen ADAM10 die einzige physiologisch relevante α -Sekretase ist, welche das konstitutive Shedding von β APP katalysiert (Jorissen et al. 2010, Kuhn et al. 2010).

1.4.1. Aktivierung der α -Sekretase als Therapieansatz

Stimulierung oder Überexpression der α -Sekretase-Aktivität bedingen einen Shift der β APP-Prozessierung in Richtung des anti-amyloidogenen Pathways und damit einer verminderten A β -Synthese. Überexpression der α -Sekretase ADAM10 reduziert im Tiermodell die Plaquebildung und verbessert kognitive Defizite, sodass die Aktivierung dieser α -Sekretase einen viel versprechenden Therapieansatz darstellt (Postina et al. 2004). Eine solche Stimulierung kann über Protein-Kinase C (PKC)-Aktivatoren wie PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) erfolgen. Da Phorbol ester jedoch eine Tumor fördernde Wirkung aufweisen, sind sie therapeutisch nicht geeignet. Bryostatin, ein neuer PKC-Aktivator, der in der Krebstherapie eingesetzt wird, wirkt nicht kanzerogen, vermindert die Mortalitätsrate und reduziert zerebrales A β_{40} und A β_{42} im Mausmodell (Etcheberrigaray et al. 2004). Auch die Stimulierung von G-Protein gekoppelten muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren stimuliert die α -Sekretase-Aktivität in vivo mit konsekutiver Reduktion von zerebralem sowie vaskulärem A β_{42} und resultiert in der Verminderung kognitiver Defizite in Tiermodellen (Fisher 2008). „Knockout“-Studien konnten bestätigen, dass der muskarinische Acetylcholin-Rezeptor M1 essentiell an der Stimulierung der α -Sekretase-Aktivität beteiligt ist (Davis et al. 2010). Ein weiterer Ansatz zur Aktivierung der ADAM10-Aktivität stellt die Reduktion von zellulärem Cholesterin dar. In vitro konnte eine Aktivierung der ADAM10-Aktivität nach Inhibition der Cholesterin-Synthese beobachtet werden (Kojro et al. 2010).

Die Stimulierung der α -Sekretase-Aktivität scheint jedoch nicht ganz unproblematisch zu sein, da Überexpression von ADAM10 nicht nur den anti-amyloidogenen Pathway stimuliert, sondern via gesteigertem Cadherin-Shedding die Zell-Migration fördert und in epithelialen Zellen über eine vermehrte Expression von β -Catenin gesteuerten Genen zu einer gesteigerten Zellproliferation führt (Maretzky et al. 2005). Somit könnte infolge einer Aktivierung von ADAM10 auch die Tumorzell-Migration und Proliferation gefördert werden.

1.5. β -Sekretase-Aktivität

Die β -Sekretase-Aktivität wird in allen Zell- und Gewebetypen gefunden (Haass et al. 1992 b). Ihre höchste Aktivität wird jedoch im peripheren und zentralen Nervensystem detektiert, vor allem in Neuronen der dorsalen Wurzelganglien, Motoneuronen, im Hippocampus, dem Kortex und im Cerebellum (Willem et al. 2009). Die β -Sekretase-Aktivität erreicht dabei ihr Maximum in Endosomen bei einem pH-Optimum von 4,5 (Koo und Squazzo 1994, Haass et al. 1995 a, Vassar et al. 1999). Interessanterweise prozessiert die β -Sekretase fast ausschließlich membrangebundene Substrate (Citron et al. 1995). Das membrangebundene Substrat β APP wird durch die β -Sekretase bevorzugt nach hydrophoben und vor sauren AS-Resten geschnitten (Citron et al. 1995, Turner et al. 2001, Li und Südhof 2004, Stockley und O'Neill 2008).

BACE1 (β -site-cleaving-enzyme 1), auch Memapsin-2 oder Asp-2 genannt, wurde 1999 von Vassar und Kollegen als die β APP prozessierende β -Sekretase identifiziert. Sie gehört zur Pepsinfamilie der Aspartylproteasen, stellt aber als Transmembranprotein eine eigene Untergruppe dieser Familie dar (Hussain et al. 1999, Sinha et al. 1999, Vassar et al. 1999, Yan et al. 1999, Lin et al. 2000). Eine weitere Sekretase, BACE2 (Asp1), welche eine sehr große Homologie zu BACE1 aufweist, konnte ebenfalls identifiziert werden (Farzan et al. 2000, Hussain et al. 2000, Bennett et al. 2000 a, Yan et al. 2001). BACE1 und BACE2 weisen zu 64 % dieselbe AS-Sequenz auf und besitzen jeweils zwei für Aspartylproteasen der Pepsinfamilie typische aktive Zentren mit den konservierten Motiven D(T/S)G(T/S) (Hussain et al. 1999, Bennett et al. 2000 b). Ferner besitzen BACE1 und BACE2 je sechs konservierte luminale Cystein-Reste, welche drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, sowie eine C-terminale Transmembrandomäne, N-Glykosylierungsstellen und weitere strukturelle Charakteristika der Aspartylproteasen (Vassar 2004).

1.5.1. BACE1

Die Aspartylprotease BACE1 wird hauptsächlich in Neuronen und kaum in Gliazellen exprimiert und ist intrazellulär vor allem im sekretorischen Pathway lokalisiert (Vassar et al. 1999). Der Hauptanteil der β -Sekretase-Aktivität ist in Endosomen nachweisbar, was gut mit dem sauren pH-Optimum (ca. 4,5) von BACE1 korreliert (Koo und Squazzo 1994, Haass et al. 1995 a, Vassar et al. 1999). Die Überexpression von BACE1 resultiert in einem vermehrten Shedding von β APP, welches an der β -Sekretase-Schnittstelle an AS-Position Asp1 oder Glu11 erfolgt (Vassar et al. 1999). Anhand von BACE1-„Knockout“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass BACE1 die einzige Sekretase ist, welche für die neuronale β -Sekretase-Aktivität und damit für die Generation von A β verantwortlich ist (Cai et al. 2001, Luo et al. 2001, Dominguez et al. 2005). Zudem wird die β -Sekretase-Aktivität sowohl durch Antisense-Inhibition endogener BACE1-mRNA mit Antisense-Oligonukleotiden (Vassar et al. 1999, Yan et al. 1999) als auch durch Applikation von BACE1-siRNA (small interfering RNA) (Kao et al. 2004) gehemmt, was jeweils zur Reduktion der A β -Synthese in vitro führt. Reduktion der BACE1-Aktivität mit Hilfe von gegen BACE1 gerichteter siRNAs reduziert nicht nur die A β -Produktion sondern bewirkt sogar eine Verbesserung der Gedächtnisdefizite β APP-transgener Mäuse (Singer et al. 2005).

BACE1 wird im ER als immatures Vorläuferprotein synthetisiert. Seine Maturierung beinhaltet die Ausbildung von Disulfidbrücken, N-Glykosylierung und die proteolytische Entfernung des Propeptids durch Furin oder furin-ähnliche Sekretasen (Capell et al. 2000, Haniu et al. 2000, Huse et al. 2000, Bennett et al. 2000 b, Creemers et al. 2001).

Nach Erreichen der Plasmamembran wird matures BACE1 zusammen mit β APP reinternalisiert und zirkuliert zwischen Plasmamembran, Endosomen und dem TGN (Huse et al. 2000, Walter et al. 2001). Der intrazelluläre Transport von BACE1 wird dabei durch dessen zytoplasmatische Domäne gesteuert (Huse et al. 2000). Diese besitzt C-terminal ein „Acid-cluster-dileucine“ (ACDL)-Motiv als eigenständiges endozytotisches Signal, welches den Transport von BACE1 in Endosomen steuert (Huse et al. 2000, He et al. 2005). Für das Recycling von BACE1 von frühen Endosomen via TGN zurück zur Zelloberfläche ist die Phosphorylierung eines Serinrestes innerhalb des ACDL-Motivs essentiell (Walter et al. 2001, He et al. 2005, Wahle et al. 2005), welche die Affinität von BACE1 zu GGA-Proteinen (γ -ear-containing ARF-binding proteins) im Golgi-Apparat um ein Vielfaches steigert (He et al. 2005, Wahle et al. 2005). Somit ist

die BACE1-Aktivität nicht nur vom Expressions-Level, sondern auch von der subzellulären Lokalisation von BACE1 abhängig.

Reifes BACE1 gelangt hauptsächlich an die apikale Zelloberfläche, wo jedoch nur relativ wenig β APP nachweisbar ist. Das wenige nach basolateral gelangende BACE1 konkurriert dort mit der sehr hohen α -Sekretase-Aktivität. Die γ -Sekretase-Aktivität ist sowohl apikal als auch basolateral gleichermaßen nachweisbar. Auf diese Weise wird die A β -Synthese durch die unterschiedliche Lokalisation von BACE1 und β APP innerhalb polarisierter Zellen limitiert (Capell 2002).

Die „schwedische“ Doppelmutation von β APP K595N/M596L führt zu einer vermehrten Produktion und Sekretion von A β (Citron et al. 1992, Cai et al. 1993). Sie wurde erstmals in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen (Mullan et al. 1992). Sie erhöht die Affinität der β -Sekretase für ihr Substrat, sodass der β -Sekretase-Schnitt bereits im Golgi-Apparat erfolgen kann, wo dann α - und β -Sekretase gleichermaßen um β APP konkurrieren (Haass et al. 1995 b).

1.5.1.1. Multifaktorielle Regulierung der BACE1-Expression

BACE1 ist in Gehirnen von Patienten mit der sporadischen Form der AD hochreguliert (Holsinger et al. 2002, Yang et al. 2003). Für die Hochregulierung von BACE1 könnten Faktoren wie oxidativer Stress und freie Radikale im Rahmen des Alterungsprozesses verantwortlich sein (Haass 2004). Trotz der erhöhten β -Sekretase-Aktivität weisen die BACE1-mRNA-Level keinen Unterschied zu gesunden Kontrollen auf (Holsinger et al. 2002), was auf eine posttranskriptionelle Regulation der BACE1-Level schließen lässt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die BACE1-5' untranslated Region (5'UTR) die BACE1-Translation kontrolliert (Rogers et al. 1999, Rogers et al. 2002, Lammich et al. 2004, Mihailovich et al. 2007). Es wird angenommen, dass durch vorgeschaltete konservierte AUG-Kodons (upstream AUGs, uAUGs) und die GC-reiche Region der 5'UTR die BACE1-Translation inhibiert wird (Lammich et al. 2004, Mihailovich et al. 2007). So wird bei Expression der 5'UTR eine Reduktion sowohl der BACE1-Protein-Level als auch der BACE1-Aktivität in vitro um bis zu 90 % im Vergleich zu Zellen, welche BACE1 ohne die 5'UTR exprimieren, beobachtet (Lammich et al. 2004). Auch die 3'UTR moduliert via Mikro-RNAs (miRNA) posttranskriptionell die Genexpression von BACE1. Reduzierte Mikro-RNA-Level, wie sie bei AD-Patienten beobachtet werden, resultieren in einer vermehrten Expression von BACE1 und folglich in einer gesteigerten A β -Generation (Hébert et al. 2008).

In geringerem Ausmaß wird die BACE1-Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert. So enthält der BACE1-Promotor Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der BACE1-Transkription (STAT1/3 und STAT6) (Sambamurti et al. 2004, Wen et al. 2008). Über eine STAT1/3 regulierte BACE1-Promotor-Aktivität können die A β -Level verdoppelt werden, wenn p25 [der Aktivator der CDK5 (cyclin dependent kinase 5)] überexprimiert wird, da eine CDK5-Aktivierung die Hyperphosphorylierung von STAT1/3 induziert (Wen et al. 2008).

1.5.1.2. Substrate von BACE1

Neben APP und APLPs werden der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) (Lichtenthaler et al. 2003), die Sialyl-Transferase ST6Gal I (Kitazume et al. 2005), β -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle (Wong et al. 2005, Kim et al. 2007), sowie das Protein Neuregulin-1 Typ III (Typ III NRG1) (Willem et al. 2006, Fleck et al. 2013) als Substrate der β -Sekretase beschrieben. Lichtenthaler et al. konnten erst kürzlich insgesamt 34, zumeist neue, neuronale BACE1-Substrate wie z.B. das Seizure Protein 6 (SEZ6) und das homologe Seizure Protein 6-like Protein 1 (SEZ6L1) identifizieren. BACE1 ist somit eine der wichtigsten Proteasen des Nervensystems (Kuhn et al. 2012).

1.5.2. β -Sekretase-Inhibition als Therapieansatz

Die Inhibition von BACE1 galt lange als ideale Alternative zur Inhibition des γ -Sekretase-Komplexes (Vassar 2001). Zum einen, da BACE1 im ZNS von AD-Patienten hochreguliert ist (Yang et al. 2003), zum anderen da BACE1 den limitierenden Faktor für die A β -Synthese darstellt (Citron 2004) und Deletion von BACE1 zur Reduktion des zerebralen Amyloids führt, die cholinerge Dysfunktion verbessert (Ohno et al. 2004) und dabei keinen veränderten Phänotyp hervorzurufen schien (Cai et al. 2001, Luo et al. 2001).

Die Inhibition der β -Sekretase gestaltet sich jedoch insofern problematisch, da die Synthese geeigneter Inhibitoren schwierig ist und die Liste physiologisch relevanter BACE1-Substrate wächst. Zudem werden entgegen vorheriger Erkenntnisse auffällige Phänotypen bei BACE1-/- Mäusen beobachtet. So weisen diese schizophrenie-ähnliche Symptome mit kognitiven Defiziten, Hyperaktivität und Ängstlichkeit auf. Ferner werden eine erhöhte Insulinsensitivität mit einem reduzierten Körpergewicht und eine erhöhte Mortalität beschrieben (Harrison et al. 2003, Dominguez et al. 2005, Laird et al. 2005, Hu et al. 2006, Savonenko et al. 2008, Meakin et al. 2012). Obwohl bisher keine allgemeine Substraterkennungs-Sequenz von BACE1 identifiziert wurde, konnten

peptidomimetische Inhibitoren hergestellt werden, welche gegen das aktive Zentrum der β -Sekretase gerichtet sind. Eine weitere Herausforderung stellt die zerebrale Verfügbarkeit eines solchen Inhibitors dar. Dieser muss die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und ausreichend hohe zerebrale Konzentrationen erreichen.

Ursache für die auffälligen Phänotypen der BACE1^{-/-} Mäuse ist unter anderem eine abnormale NRG1/ErbB-Rezeptor-Signaltransduktion infolge gestörter proteolytischer Prozessierung von NRG1 (Hu et al. 2006, Willem et al. 2006, Hu et al. 2008, Savonenko et al. 2008). Der Signaltransduktionsweg von NRG1 via ErbB-Rezeptoren spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Neurotransmission an GABAergen und glutamatergen Synapsen (Hahn et al. 2006, Li et al. 2007, Liu et al. 2007, Woo et al. 2007). Sowohl das glutamaterge als auch das GABA-System sind an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt (Hahn et al. 2006, Woo et al. 2007). Da NRG1 zudem eines der Gene ist, welche mit einem erhöhten Risiko für Schizophrenie assoziiert sind (Stefansson et al. 2002) und sowohl NRG (+/-) als auch BACE1^{-/-} Mäuse schizophrenie-ähnliche Eigenschaften aufweisen, lässt dies auf eine Beteiligung der BACE1 abhängigen NRG1/ErbB4-Signaltransduktion bei der Pathogenese der Schizophrenie schließen und verdeutlicht gleichzeitig wie heikel sich die vollständige Inhibition von BACE1 gestalten kann (Savonenko et al. 2008).

1.6. Neuregulin

Für die klinische Anwendung oben genannter Therapieansätze ist die Kenntnis weiterer Substrate der für die AD-Pathogenese verantwortlichen Sekretasen erforderlich. Unter Kenntnis dieser Substrate und ihrer physiologischen Eigenschaften können potentielle schwerwiegende Nebenwirkungen, die in Folge von Inhibition bzw. Aktivierung ihrer Sekretasen resultieren, bereits im Vorfeld erkannt und die Therapieansätze dementsprechend modifiziert werden. Für die Prozessierung von Neuregulin (NRG) scheint nicht nur eine dieser Sekretasen, sondern sowohl die α -, als auch die β -Sekretase und der γ -Sekretasekomplex verantwortlich zu sein.

Neureguline stellen eine Familie strukturell verwandter Wachstumsfaktoren dar, deren Mitglieder durch vier verschiedene Gene kodiert werden (NRG1 - 4) (Holmes et al. 1992, Wen et al. 1992, Falls et al. 1993, Marchionni et al. 1993, Carraway et al. 1997, Zhang et al. 1997). Während über die Funktionen von NRG2 - 4 nur wenig bekannt ist, hat NRG1 eine besondere Bedeutung für die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems sowie für die Kardiogenese. NRG1 weist zudem eine Assoziation mit einigen Erkrankungen auf, im Besonderen der Schizophrenie und dem Mammakarzinom

(Yuste et al. 2005, Mei und Xiong 2008). Die biologischen Effekte der NRGs werden über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der ErbB-Rezeptor-Familie vermittelt. Da die meisten NRGs jedoch als membrangebundene Vorläuferproteine (Pro-NRG) synthetisiert werden, erfordert die Freisetzung ihrer funktionell aktiven Domäne ihre proteolytische Prozessierung (Burgess et al. 1995, Loeb und Fischbach 1995, Montero et al. 2000, Wang et al. 2001, Falls 2003 a, Falls 2003 b, Willem et al. 2006, Mei und Xiong 2008).

NRG1 und NRG2 sind eng miteinander verwandte Proteine, wohingegen NRG3 und NRG4 nur geringe Homologie zu NRG1 aufweisen (Buonanno und Fischbach 2001). Nur für NRG1 und NRG2 sind verschiedene Isoformen bekannt (Garratt et al. 2000). Infolge unterschiedlicher Promotoren und alternativen Spleißens der mRNA existieren für NRG1 sechs verschiedene Typen und über 31 Isoformen mit gewebespezifischer Expression (Falls 2003 b, Steinhorsdottir et al. 2004, Mei und Xiong 2008). Ihrer unabhängigen Entdeckung durch verschiedene Arbeitsgruppen in den 90er Jahren verdanken sie die Vielfalt ihrer Namen wie ARIA (Acetylcholine receptor inducing activity) (Falls et al. 1993), GGF (glial growth factor) (Goodearl et al. 1993, Marchionni et al. 1993) oder Heregulin (Holmes et al. 1992), NDF (neu differentiation factor) (Peles et al. 1992, Wen et al. 1992) und SMDF (sensory and motor neuron derived factor) (Ho et al. 1995).

1.6.1. Funktionen von Neuregulin

Zum Verständnis der Funktionen von Neuregulin haben vor allem Deletionsstudien beigetragen mit gezielten Mutationen des NRG1-Gens. Sie weisen auf essentielle Funktionen von NRG1 während der embryonalen Entwicklung hin. So sterben Typ I NRG1-„Knockout“-Mäuse an Tag 10.5 ihrer Embryogenese aufgrund einer gestörten ventrikulären Trabekelbildung und einer mangelnden Kardiomyozytendifferenzierung. Zudem ist die Bildung ihrer kranialen Ganglien und des sympathischen Nervensystems gestört (Meyer und Birchmeier 1995, Kramer et al. 1996, Erickson et al. 1997, Meyer et al. 1997, Britsch et al. 1998, Liu et al. 1998). Typ I NRG1 reguliert ferner die Expression der GABA-Rezeptoren im ZNS und ist für die Induktion der Acetylcholin-Rezeptoren an neuromuskulären Synapsen verantwortlich (Falls et al. 1993, Fischbach und Rosen 1997, Rieff et al. 1999).

Typ III NRG1 kommt eine große Bedeutung bei der Myelinisierung des peripheren Nervensystems (PNS) zu. So ist das Shedding von Typ III NRG1 essentiell für die Entwicklung von Schwannzellen und ist zudem verantwortlich für die Dicke der Myelinscheide peripherer Nerven (Garratt et al. 2000, Michailov et al. 2004, Taveggia et al. 2005, Willem et al. 2006, Brinkmann et al. 2008).

1.6.1.1. Ausgewählte Funktionen von NRG1

Organ	Funktion	Effekt	Referenzen
ZNS & PNS	Neuronale Migration	Migration von: zerebralen kortikalen Neuronen, sympathischen Neuronen, Kleinhirn-Körnerzellen, GABA-ergen Interneuronen	a)
	Neuronales Überleben	Überleben von sensorischen und motorischen Neuronen während der Synaptogenese	b)
	Myelinisierung	Überleben und Differenzierung von Neuralleistenzellen zu Gliazellen Proliferation, Differenzierung und Überleben von Schwannzellen Regulierung der Myelinisierung des PNS	c)
		in vitro: Differenzierung, Proliferierung, Überleben von Oligodendrozyten und Myelinisierung durch Oligodendrozyten in vivo: Myelinisierung des ZNS durch Oligodendrozyten kontrovers diskutiert	d)
	synaptische Plastizität	ZNS: Verhindert Induktion und Expression von LTP an CA1-Synapsen im Hippocampus Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren (NMDA, GABA, neuronale nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren) Stimulierung der GABA-Freisetzung Stabilisierung von AMPA-Rezeptoren	e)
		Neuromuskuläre Synapse: Induktion der Acetylcholin- Rezeptor-Synthese (ARIA) Synapsenbildung und -erhaltung	f)
Herz	Kardiogenese	Entwicklung von ventrikulären Trabekeln, des AV-Septums und der Herzklappen sowie des Erregungs-Leitungssystems	g)
	Funktion beim adulten Herzen	Wachstum, Reparatur und Fortbestehen von adulten Kardiomyozyten	h)
Mamma	Reifung	Reguliert die epitheliale Proliferation und lobuloalveoläre Entwicklung während Schwangerschaft und Laktation	i)
Lunge	Genese	Entwicklung des Pulmonalepithels	k)
a) (Anton et al. 1997, Rio et al. 1997, Britsch et al. 1998, Flames et al. 2004)			
b) (Wolpowitz et al. 2000)			
c) (Shah et al. 1994, Trachtenberg und Thompson 1996, Meyer et al. 1997, Jessen und Mirsky 1998, Garratt et al. 2000, Wolpowitz et al. 2000, Michailov et al. 2004, Jessen und Mirsky 2005, Hu et al. 2006, Willem et al. 2006)			
d) (Canoll et al. 1996, Fernandez et al. 2000, Calaora et al. 2001, Park et al. 2001, Hu et al. 2006, Brinkmann et al.			
e) (Ozaki et al. 1997, Yang et al. 1998, Rieff et al. 1999, Huang et al. 2000, Liu et al. 2001, Kwon et al. 2005, Chang und Fischbach 2006, Li et al. 2007, Woo et al. 2007, Hancock et al. 2008, Pitcher et al. 2008)			
f) (Falls et al. 1993, Fischbach und Rosen 1997, Wolpowitz et al. 2000, Falls 2003 b)			
g) (Meyer und Birchmeier 1995, Kramer et al. 1996, Erickson et al. 1997, Rentschler et al. 2002)			
h) (Zhao et al. 1998)			
i) (Li et al. 2002)			
k) (Patel et al. 2000)			

1.6.2. Struktur und Nomenklatur der NRG1-Isoformen

Die meisten der NRG1-Isoformen sind membrangebundene Wachstumsfaktoren, die aus einer variablen N-terminalen Sequenz, der EGF-ähnlichen Domäne, einer konservierten Transmembrandomäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne bestehen. Basierend auf der Struktur ihrer N-terminalen Sequenz können die NRG1-Isoformen in die Typen I - VI eingeteilt werden.

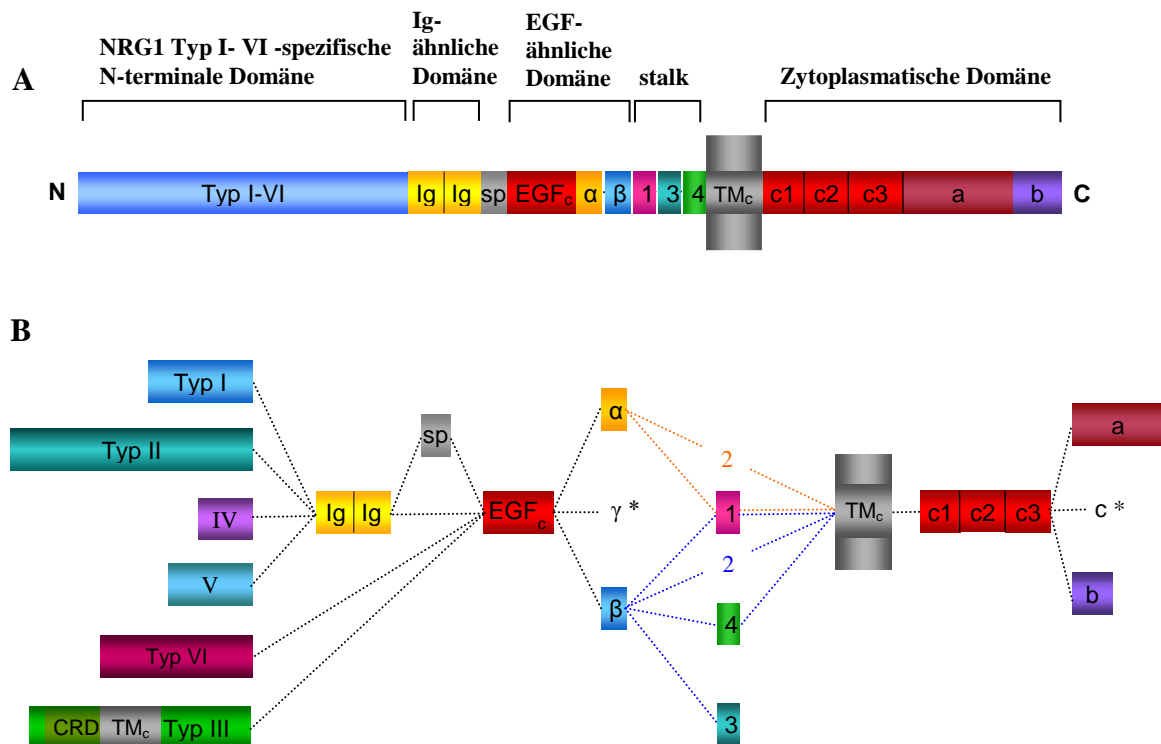


Abbildung modifiziert nach Mei und Xiong Nat. Rev. Neuroscience 9 (2008) 437-52

Abb. 6: NRG1-Isoformen. **A)** Darstellung der Exons von Typ I - VI NRG1. Diese kodieren für die spezifische N-terminale Sequenz von Typ I - VI NRG1, die Ig-ähnliche Domäne, die „spacer“-Region (sp), die EGF-ähnliche Domäne, die juxtamembranäre Region („Stalk“), die Transmembrandomäne (TM_c), sowie für die zytoplasmatische Domäne. **B)** Darstellung der Exons und deren Kombinationsmöglichkeiten durch Alternatives Spleißen. Die NRG1-Isoformen unterscheiden sich aufgrund Transkription unterschiedlicher Promotoren des NRG1-Gens sowie aufgrund Alternativen Spleißens. Die NRG1-Typen I - VI unterscheiden sich in der Struktur ihrer N-terminalen Sequenz, welche bei Typ III NRG1 zudem eine cysteinreiche Domäne (CRD) enthält. Typ I, II, IV und V NRG1 besitzen zwischen der N-terminalen Sequenz und der EGF-ähnlichen Domäne eine Ig-ähnliche Domäne und können zudem die darauf folgende „spacer“-Region besitzen. Die N-terminale Sequenz von Typ III und VI NRG1 ist dagegen direkt mit der EGF-ähnlichen Domäne verbunden. Alle biologisch aktiven NRGs besitzen eine EGF-ähnliche Domäne (α oder β), an welche sich die heterogene juxtamembranäre Region („Linker“ oder „Stalk“-Region) anschließt. Bei dieser werden die Sequenzen 1, 3 und 4 unterschieden. Fehlt diese Sequenz (Isoform 2), so schließt die EGF-ähnliche Domäne direkt an die Transmembrandomäne (TM_c oder TMD) an. Die TMD ist bei allen NRG1-Isoformen konserviert. Bei der variablen zytoplasmatischen Domäne werden drei unterschiedlich lange Typen (a, b, c) unterschieden, wobei „a“ für die längste, „b“ für die mittlere und „c“ für die kürzeste zytoplasmatische Domäne stehen. Die häufigste im ZNS exprimierte Isoform besitzt eine β-EGF-ähnliche Domäne und eine zytoplasmatische Domäne vom Typ „a“.

Als besonderes Charakteristikum besitzt die N-terminale Sequenz von Typ III NRG1 eine cysteinreiche Domäne (CRD), welche aufgrund ihrer hydrophoben Sequenzen vermutlich als zweite TMD dient. Die EGF-ähnliche Domäne von Typ III NRG1 ist innerhalb des extrazellulären Loops zwischen den beiden TMD lokalisiert (Vgl. Abb. 11). Die NRG1-Typen I, II, IV und V besitzen im Anschluß an ihre N-terminale Sequenz eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne, sowie eine juxtamembranäre Region mit O-Glykosylierungen. Dagegen ist die N-terminale Sequenz von Typ III und Typ VI NRG1 direkt mit der EGF-ähnlichen Domäne verbunden (Wen et al. 1994, Falls 2003 a, Falls 2003 b, Mei und Xiong 2008).

Die EGF-ähnliche Domäne ist alleine ausreichend für die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren (Yarden und Slivkowski 2001) und weist sechs hoch konservierte Cysteinreste auf, welche drei Disulfidbrücken ausbilden (Massagué 1990). Aufgrund von Unterschieden zwischen ihrem fünften und sechsten Cysteinrest existieren eine α - und β -EGF-Isoform (Holmes et al. 1992). Zwischen dem sechsten Cysteinrest der EGF-ähnlichen Domäne und der TMD befindet sich die juxtamembranäre Region („Linker“ oder „Stalk“), welche aufgrund der Insertion einer von drei verschiedenen Sequenzen (Isoform 1, 3, 4) ebenfalls variieren kann. Bei der Isoform 2 fehlt eine solche Sequenz, sodass hier die EGF-ähnliche Domäne direkt an die TMD anschließt. Für α -NRG1 existieren nur die Isoformen 1 oder 2, für β -NRG1 dagegen alle vier Isoformen (NRG1- β 1- β 4). NRG1- β 3 endet kurz nach der EGF-ähnlichen Domäne, sodass diese Form als einzige keine TMD besitzt und als lösliches Pro-Protein generiert wird (Holmes et al. 1992, Wen et al. 1994, Burgess et al. 1995, Falls 2003 b). Auf die hochkonservierte TMD folgt die zytoplasmatische Domäne, welche sich hinsichtlich ihrer Länge unterscheidet und die Typen a, b und c bildet, wobei „a“ für die längste, „b“ für die mittlere und „c“ für die kürzeste zytoplasmatische Domäne stehen (Wen et al. 1994, Burgess et al. 1995, Falls 2003 b).

1.7. Typ I NRG1- β -Isoformen in der vorliegenden Arbeit

Die Analyse der proteolytischen Prozessierung von Typ I NRG1 konzentriert sich in dieser Arbeit auf die am stärksten neuronal exprimierten Typ I NRG1-Isoformen. Diese besitzen eine β -EGF-ähnliche Domäne und eine zytoplasmatische Domäne vom Typ „a“ (Wang et al. 2001, Falls 2003 b). Typ I NRG1- β 1 ist dabei die Isoform mit der höchsten neuronalen Expression (Wen et al. 1994, Wang et al. 2001, Falls 2003 b). Die Typ I NRG1-Isoformen β 1, - β 2 und - β 4 werden als Typ I Transmembranproteine synthetisiert und unterscheiden sich lediglich in der Sequenz ihrer juxtamembranären Region (Abb. 7;

Vgl. 1.6.2.). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Typ I NRG1- β -Isoformen mit einer zytoplasmatischen Domäne vom Typ „a“ verwendet.

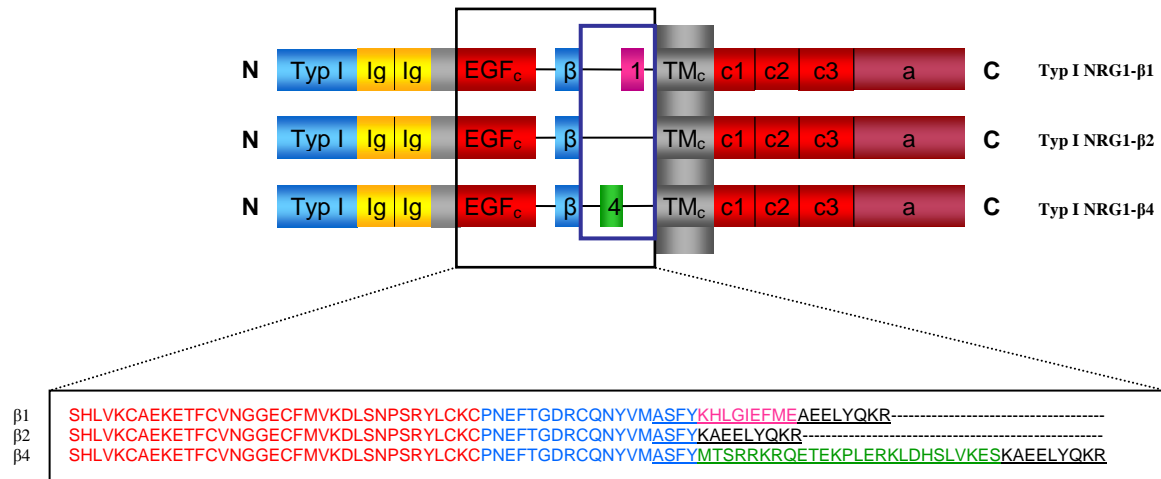


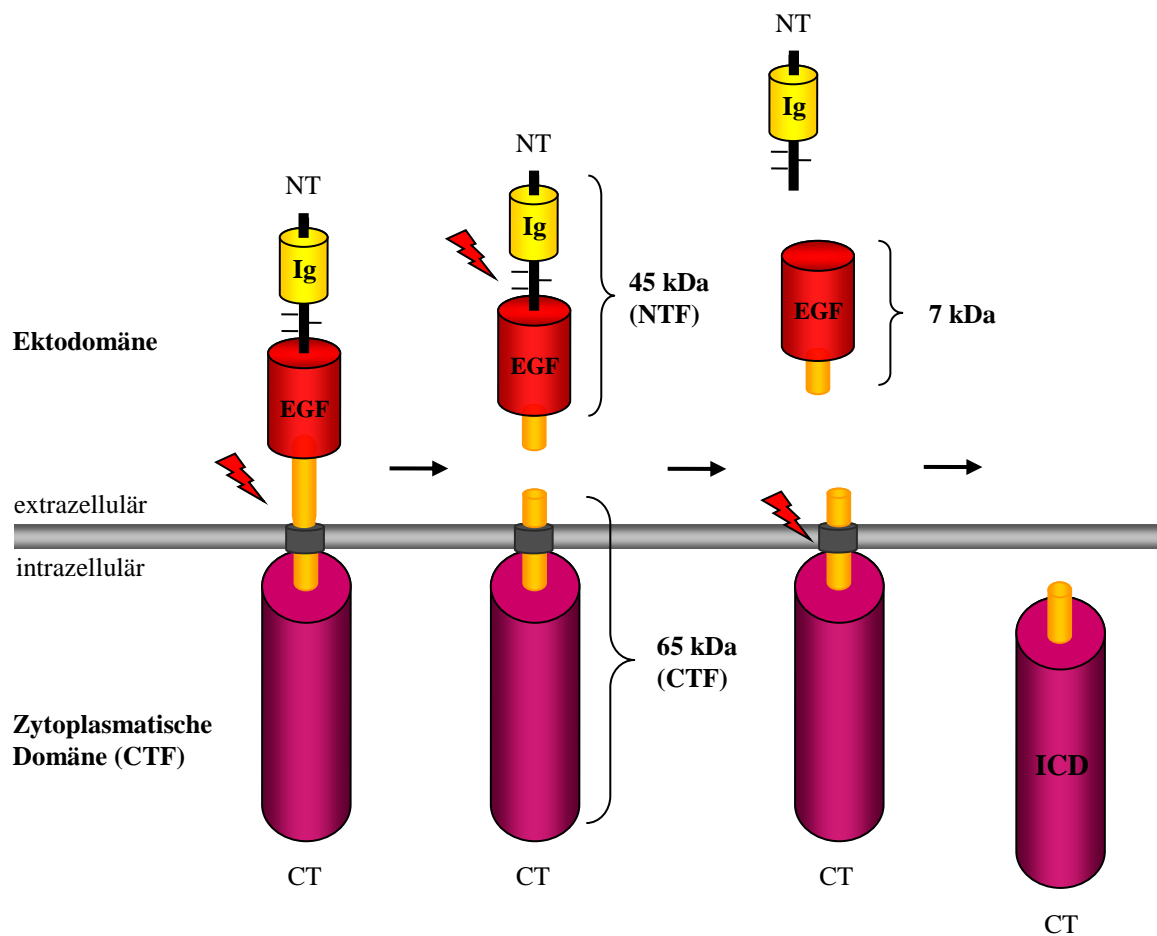
Abb. 7: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Typ I NRG1- β -Isoformen.

Verwendet wurden Typ I NRG1-Isoformen (Ratte) mit einer β -EGF-ähnlichen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne vom Typ „a“. Typ I NRG1- β 1, Typ I NRG1- β 2 und Typ I NRG1- β 4 werden als Typ I Transmembranproteine synthetisiert. Sie unterscheiden sich in der Sequenz ihrer juxtamembranen Region („Linker“). Die juxtamembrane Region ist in der Schemazeichnung blau umrahmt.

Darunter dargestellt sind die verschiedenen Sequenzen der β -EGF-ähnlichen Domäne. Die jeweilige juxtamembrane Region ist unterstrichen. Die spezifische Sequenz der β 1-Isoform ist analog der Schemazeichnung rosa und die der β 4-Isoform grün hervorgehoben. Die β 2-Isoform besitzt keine spezifische β 2-Insertion.

1.8. Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1

Die EGF-ähnliche Domäne ist die biologisch aktive Domäne aller NRG1-Moleküle und alleine ausreichend für die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren (Vgl. 1.9.). Die Signaltransduktion von Typ I NRG1 erfolgt dabei parakrin (Falls 2003 a) (Vgl. 1.9.2.4). Um eine parakrine Signaltransduktion zu ermöglichen, ist die Freisetzung der biologisch aktiven Domäne notwendig. Dies erfolgt durch proteolytische Prozessierung innerhalb der juxtamembranen Region mit konsekutiver Freisetzung der nun löslichen Ektodomäne (Shedding) (Burgess et al. 1995, Loeb und Fischbach 1995, Montero et al. 2000, Wang et al. 2001, Falls 2003 a, Falls 2003 b, Mei und Xiong 2008).



modifiziert nach Falls, J. of Neurocytology 32 (2003) 619-647

Abb. 8: Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1-β. Die Prozessierung des maturierten Typ I NRG1-β (110 kDa) innerhalb der juxtamembranen Region (Shedding) generiert ein lösliches Fragment (NTF) mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, sowie ein membrangebundenes zytoplasmatisches Fragment (CTF) mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. Die weitere Prozessierung des NTF zwischen EGF-ähnlicher Domäne und Ig-ähnlicher Domäne führt zur Freisetzung der biologisch aktiven EGF-ähnlichen Domäne. Die Freisetzung der ICD (intrazelluläre Domäne) erfolgt durch Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne des zytoplasmatischen Fragments.

Die proteolytische Prozessierung von NRG1 erfolgt analog der Prozessierung von βAPP (Abb. 3; Vgl. 1.2.2.2.) zunächst innerhalb der juxtamembranen Region (Abb. 8). Die Schnittprodukte des maturierten Typ I NRG1-β mit einem Molekulargewicht von 110 kDa sind dabei das membrangebundene zytoplasmatische Fragment (C-terminales Fragment, CTF) mit einem Molekulargewicht von 65 kDa und das lösliche N-terminale Fragment (NTF) mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, welches die β-EGF-ähnliche Domäne enthält (Abb. 8, Abb. 13, Abb. 17) (Loeb et al. 1998, Wang et al. 2001, Falls 2003 b). Ein weiterer Prozessierungsschritt mit Schnitt N-terminal der EGF-ähnlichen Domäne würde zur Freisetzung der EGF-ähnlichen Domäne (7 kDa) führen. Ein solcher

Schnitt wurde bisher erst durch eine Arbeitsgruppe beschrieben (Loeb und Fischbach 1995).

Im Anschluss an das Shedding erfolgt in Analogie zur β APP-Proteolyse (Vgl. 1.2.2.2.) die weitere Prozessierung des membranständigen NRG1-CTF innerhalb von dessen Transmembrandomäne durch den γ -Sekretase-Komplex mit konsekutiver Freisetzung der intrazellulären Domäne (NRG1-ICD) ins Zytosol. Die NRG1-ICD gelangt daraufhin in den Nukleus, wo diese vermutlich als Transkriptionsfaktor wirkt (Bao et al. 2003) (Vgl. 1.9.2.3.).

1.9. NRG/ErbB-Rezeptor-Signaltransduktion

1.9.1. ErbB-Rezeptoren

Die Signaltransduktion aller Mitglieder der NRG-Familie erfolgt über die ErbB-Rezeptoren. Vier Mitglieder gehören zur dieser Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen: der EGF-Rezeptor (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (Schlessinger 2002). Der ErbB2-Rezeptor besitzt keinen Liganden, hat jedoch eine aktive Tyrosin-Kinase, im Gegensatz zu ErbB3. ErbB3 bindet zwar NRG, weist aber keine Tyrosin-Kinase-Aktivität auf, sodass die Ausbildung von Heterodimeren mit den anderen ErbB-Rezeptoren für ihre Aktivität erforderlich ist. ErbB2 potenziert als Korezeptor die Signale der Dimerisierungspartner (Burden und Yarden 1997, Olayioye et al. 2000, Mei und Xiong 2008).

NRG1 und NRG2 sind Liganden der ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren, wobei NRG1 hauptsächlich an ErbB4 bindet, der als einziger Rezeptor physiologischerweise Homodimere bilden kann. NRG3 und NRG4 stimulieren nur den ErbB4-Rezeptor und nicht ErbB3 (Carraway et al. 1997, Zhang et al. 1997, Harari et al. 1999, Hobbs et al. 2002). ErbB1 ist zwar ein Rezeptor vieler Wachstumsfaktoren, jedoch nicht für NRG, kann aber als Dimerisierungspartner im NRG-ErbB-Signaltransduktionsweg dienen (Mei und Xiong 2008).

1.9.2. Signaltransduktion

1.9.2.1. Klassischer vorwärtsgerichteter Pathway

Die Bindung von NRG1 an die extrazelluläre Domäne der monomeren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ErbB3 oder ErbB4 induziert deren Dimerisierung zu Homo- oder Heterodimeren. Die Dimerisierung wiederum aktiviert die Autophosphorylierung von Tyrosinresten ihrer zytoplasmatischen Domäne, wobei die phosphorylierten Reste als Bindungsstelle von Signalmolekülen dienen. Die auf diese Weise aktivierten

intrazellulären Signalkaskaden gipfeln via Aktivierung von transkriptionellen Programmen in den zellulären Antworten wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion oder Apoptose-Inhibition (Burden und Yarden 1997, Olayioye et al. 2000, Yarden und Slivkowski 2001, Schlessinger 2002, Falls 2003 a, Mei und Xiong 2008).

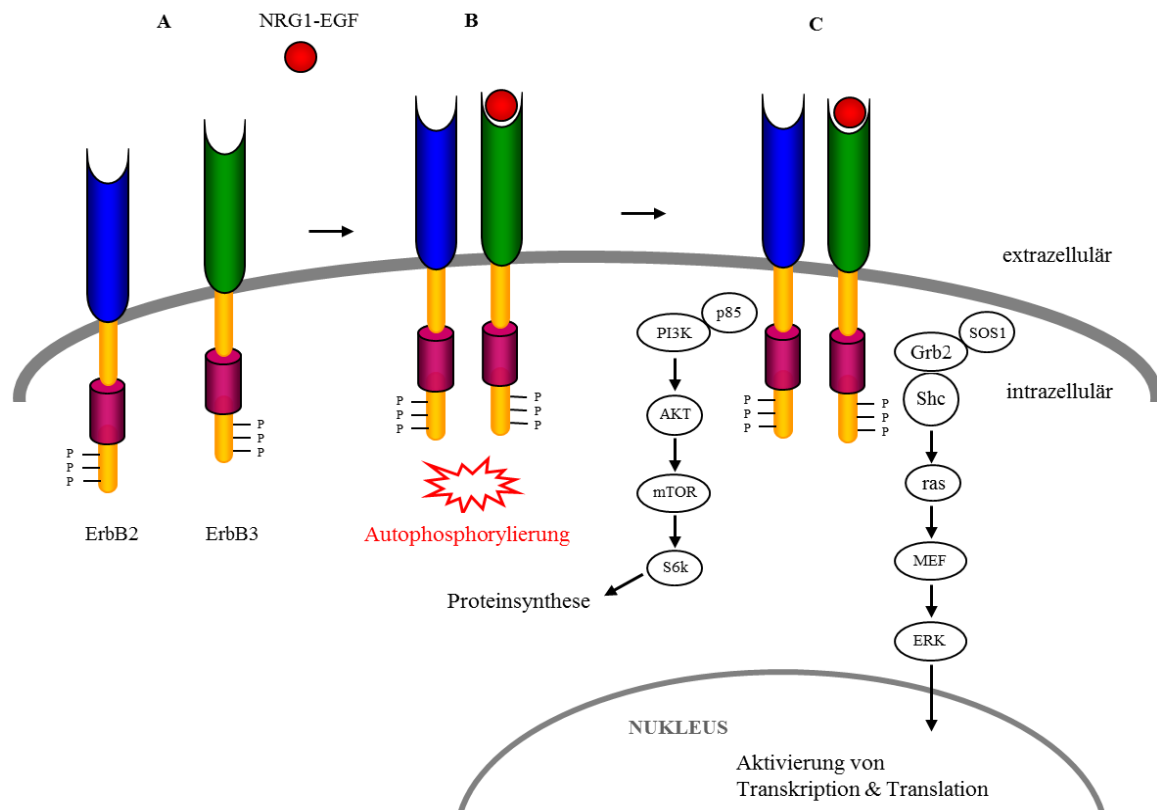


Abb. 9: Klassischer vorwärtsgerichteter Pathway. ErbB-Rezeptoren sind Typ I Transmembranproteine mit einer extrazellulären Domäne, einer TMD, einer kurzen intrazellulären juxtamembranären Region, einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne (violett dargestellt) sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Bindung von NRG1-EGF resultiert in der Dimerisierung von ErbB-Rezeptoren zu Homo- bzw. Heterodimeren. (A) **ErbB2 & ErbB3-Monomere.** ErbB2 stellt keinen Rezeptor für NRG1-EGF dar, besitzt aber eine aktive Tyrosin-Kinase-Domäne. ErbB3 bindet NRG1-EGF, besitzt aber eine beeinträchtigte Tyrosin-Kinase-Domäne. Somit müssen beide Heteromere ausbilden, um ihre Aktivität entfalten zu können. (B) **Dimerisierung & Autophosphorylierung.** Dimerisierung der ErbB-Rezeptoren resultiert in der Phosphorylierung C-terminaler Tyrosinreste durch die Tyrosin-Kinase. (C) **Aktivierung von Translation und Transkription.** Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für die Adaptorproteine Grb2 und Shc, welche den Ras-MEK-ERK-Pathway aktivieren, sowie für die PI3K-Untereinheit p85, welche den PI3K-Pathway aktiviert. Letztendlich resultieren diese Pathways in der Aktivierung von Transkription und Translation.

1.9.2.2. Nicht-klassischer vorwärtsgerichteter Pathway

Kontrovers wird die Signaltransduktion infolge proteolytischer Prozessierung des ErbB4-Rezeptors nach Ligandenbindung diskutiert. Während Mei et al. annehmen, dass die dem TACE-Schnitt nachfolgende Prozessierung durch die γ -Sekretase der Generierung der ErbB4-ICD als Transkriptionsfaktor in der NRG-bindenden Zelle dient, sehen Longart et

al. im Shedding durch TACE lediglich eine Regulierung der ErbB4-Expression auf der Zelloberfläche (Longart et al. 2007, Mei und Xiong 2008).

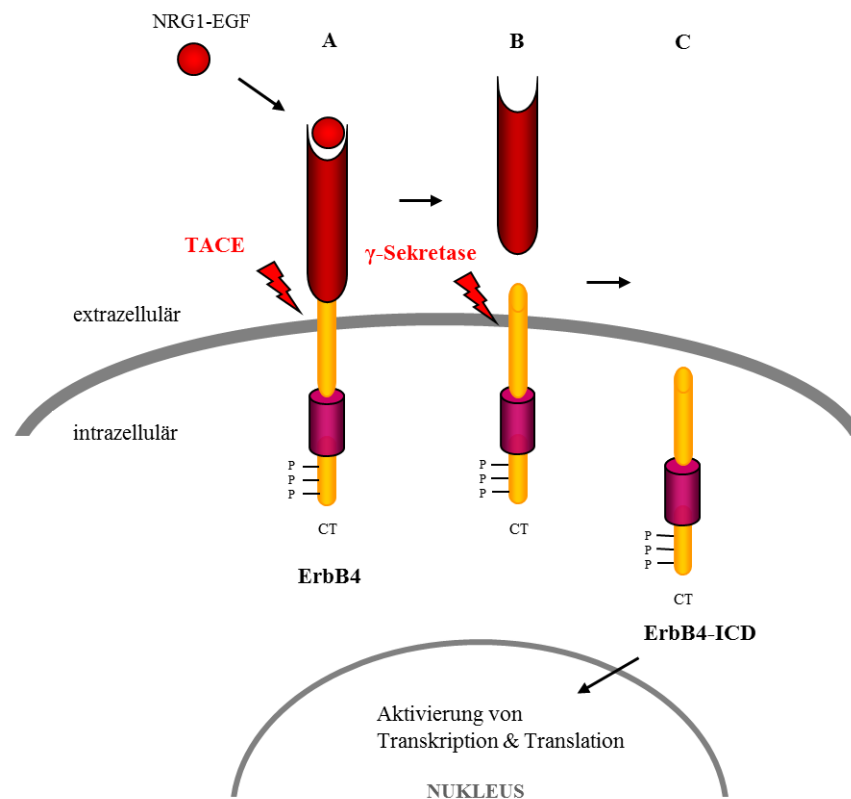


Abb. 10: Nicht klassischer vorwärtsgerichteter Pathway. Nach Bindung von NRG1 an den ErbB4-Rezeptor erfolgt das Shedding des Rezeptors durch TACE (A). Die dem TACE-Schnitt nachfolgende intramembranäre Proteolyse des C-terminalen Fragments durch den γ -Sekretase-Komplex (B) generiert die ErbB4-ICD, welche als Transkriptionsfaktor in der NRG1 bindenden Zelle dient (C).

1.9.2.3. Retrograder und bidirektionaler Pathway

NRG1 scheint nicht nur die Funktion eines Liganden sondern auch die eines Rezeptors auszuüben und über diesen retrograden Signalweg sowohl die Genexpression im präsynaptischen Neuron als auch via Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden u.a. den Einbau präsynaptischer nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) zu kontrollieren. Der NRG1-ErbB-Komplex überträgt somit sowohl vorwärts als auch retrograd Signale, sodass NRGs Moleküle mit bidirektionaler Signaltransduktion sind (Bao et al. 2003, Hancock et al. 2008). Die retrograde Signaltransduktion erfolgt dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zum einen führt die proteolytische Prozessierung von Typ III NRG1 durch den γ -Sekretase-Komplex zur Freisetzung der intrazellulären Domäne (ICD) mit konsekutiver Translokation der ICD in den Nukleus, wo diese vermutlich als Transkriptionsfaktor wirkt (Bao et al. 2003). Zum anderen kann ErbB4 bzw. die lösliche

Ektodomäne von ErbB4 als Ligand von Typ III NRG1 bzw. Typ I NRG1 dienen, wobei diese Interaktion zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden der NRG1 exprimierenden Zelle führt (Mei und Xiong 2008).

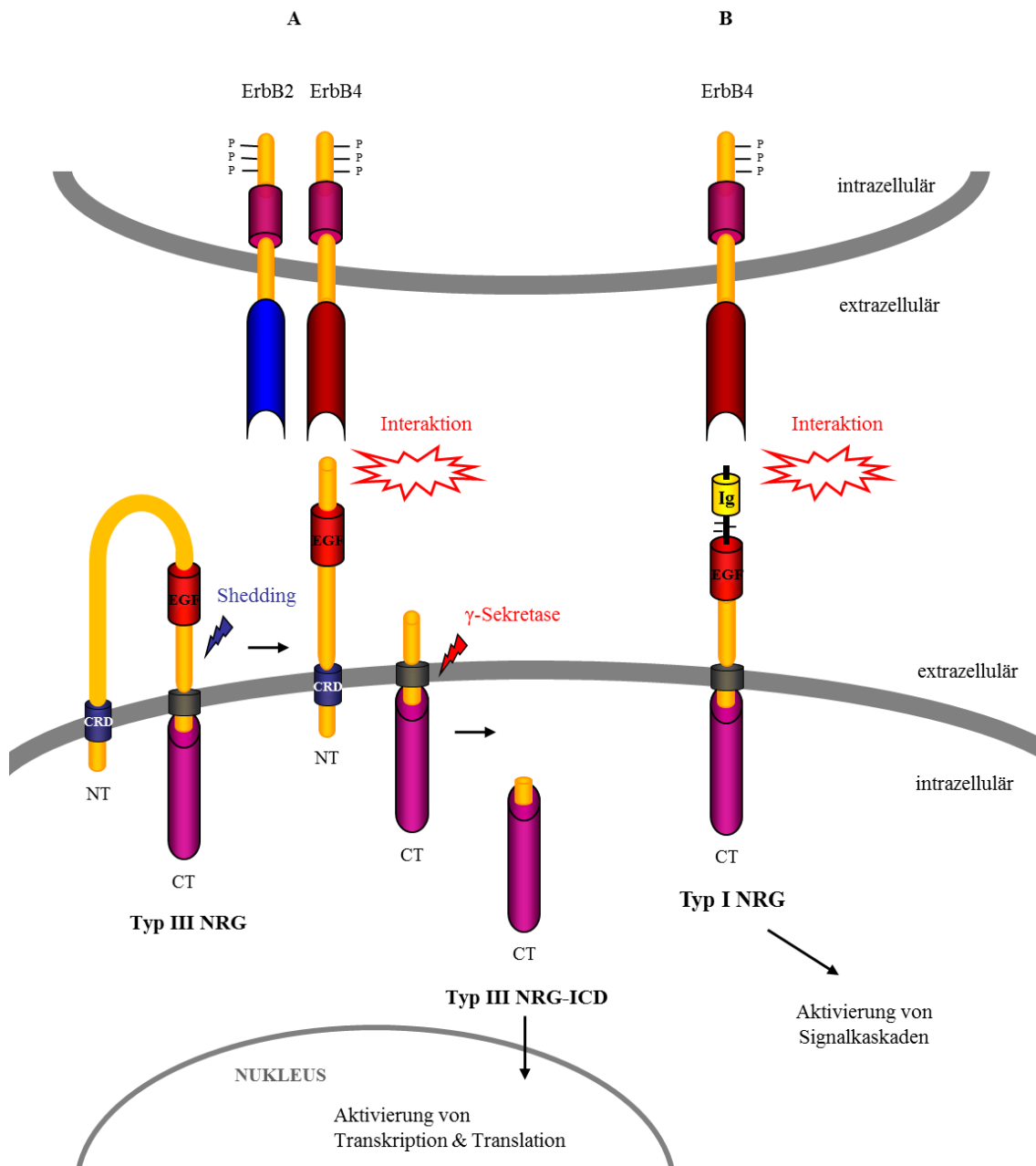


Abb. 11: Retrograde Signaltransduktion. (A) Die Interaktion des ErbB2/ErbB4-Rezeptor-Dimers mit Typ III NRG1 resultiert in der Freisetzung der Typ III NRG1-ICD mit konsekutiver Translokation in den Nukleus, wo diese als Transkriptionsfaktor dient. (B) ErbB4 dient als Ligand von NRG1, in der vorliegenden Abbildung von Typ I NRG1, mit konsekutiver Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden der NRG1 exprimierenden Zelle.

1.9.2.4. Parakrine und juxtakrine Signaltransduktion

Die NRG1-Isoformen unterscheiden sich in ihren Signaltransduktionseigenschaften. Einige scheinen dabei eher an der parakrinen, andere an der juxtakrinen Signalübertragung beteiligt zu sein. Typ I NRG1 und wahrscheinlich auch Typ II NRG1 übertragen ihre Signale parakrin, indem ihre biologisch aktive Domäne durch proteolytische Prozessierung ihrer Ektodomäne (Shedding) freigesetzt wird, um an die ErbB-Rezeptoren der Zielzelle binden zu können (Burgess et al. 1995, Loeb und Fischbach 1995, Montero et al. 2000, Wang et al. 2001, Falls 2003 a, Falls 2003 b, Mei und Xiong 2008).

Typ III NRG1 werden sowohl juxtakrine als auch parakrine Signaltransduktionseigenschaften zugeschrieben (Wang et al. 2001, Leimeroth et al. 2002, Falls 2003 a, Liu et al. 2007, Fleck et al. 2013). Die proteolytische Aktivierung von Typ III NRG1 durch Schnitt innerhalb der juxtamembranären Region generiert ein membrangebundenes Fragment, welches die EGF-ähnliche Domäne enthält. Es wird angenommen, dass prozessiertes membrangebundenes Typ III NRG1 juxtakrin die ErbB-Rezeptoren auf benachbarten Zellen aktiviert (Falls 2003 a, Willem et al. 2009). Aktuell konnte gezeigt werden, dass durch einen zweiten Schnitt die EGF-ähnliche Domäne freigesetzt wird und dass diese via parakriner Signaltransduktion ErbB3-Rezeptoren aktiviert (Fleck et al. 2013).

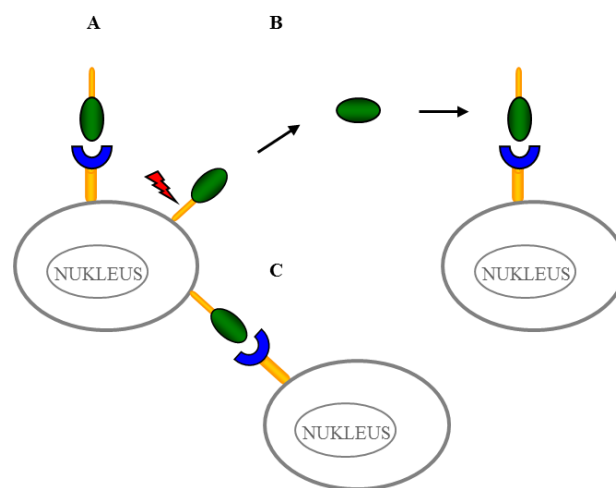


Abb. 12: Parakrine und juxtakrine Signaltransduktion. (A) Rezeptor-Liganden-Paar. (B) Parakrine Signaltransduktion. Nach proteolytischer Freisetzung eines membrangebundenen Liganden bindet dieser an einen Rezeptor der Zielzelle. (C) Juxtakrine Signaltransduktion. Membrangebundener Ligand bindet einen Rezeptor der Zielzelle.

1.10. Zielsetzung

Vielversprechende Therapieansätze für die Alzheimer Erkrankung stammen unter anderem aus der Molekularen Medizin. Sie basieren hauptsächlich auf der Amyloid-Hypothese und beinhalten die Inhibition der β - und γ -Sekretase-Aktivität sowie die Aktivierung der α -Sekretase ADAM10. Die Inhibition des γ -Sekretase-Komplexes erweist sich jedoch als problematisch, da neben der β APP-Prozessierung auch die Prozessierung der weiteren γ -Sekretase-Substrate beeinflusst wird. Lange Zeit galt die Inhibition der β -Sekretase BACE1 als optimale Alternative. Doch auch für BACE1 wächst die Liste physiologisch relevanter Substrate und es konnte inzwischen gezeigt werden, dass BACE1-„Knockout“-Mäuse einen veränderten Phänotyp aufweisen.

Nach dem bisherigen Stand der Erkenntnis ist die Stimulierung der α -Sekretase-Aktivität ein viel versprechender Therapieansatz, da diese in einer verminderten A β -Synthese resultiert und Überexpression der α -Sekretase ADAM10 im Tiermodell sogar kognitive Defizite verbessert. Es ist jedoch zu bedenken, dass aufgrund der Bedeutung von ADAM10 in der Prozessierung membrangebundener Wachstumsfaktoren die Tumorzell-Migration und Proliferation gefördert werden könnte. Für die Einschätzung und Minimierung von Nebenwirkungsprofilen im Rahmen oben genannter Therapieansätze ist die Kenntnis weiterer Substrate dieser Sekretasen essentiell. Ein solches Substrat scheint Neuregulin (NRG), ein Mitglied der EGF-Familie von Wachstumsfaktoren, zu sein. Sowohl für BACE1 als auch für den γ -Sekretase-Komplex konnte gezeigt werden, dass diese Typ III NRG1 prozessieren. Neben Typ III NRG1 existiert jedoch noch eine Vielzahl weiterer NRG1-Typen, unter anderem das ebenfalls vor allem neuronal exprimierte Typ I NRG1- β . Für dieses konnte bereits die Prozessierung durch mindestens eine α -Sekretase nachgewiesen werden. Es stellt sich daher die Frage, ob BACE1 und der γ -Sekretase-Komplex sowie weitere α -Sekretasen, wie zum Beispiel ADAM10, Typ I NRG1- β prozessieren.

Ziel meiner Arbeit war es daher erstens, zu klären, ob der γ -Sekretase-Komplex die intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1- β katalysiert.

Zweitens sollte diese Arbeit untersuchen, ob BACE1 für das Shedding von Typ I NRG1- β verantwortlich ist. Mein besonderes Interesse galt dabei der Charakterisierung der BACE1-Schnittstelle innerhalb der juxtamembranären Region von Typ I NRG1- β 1.

Drittens sollte diese Arbeit analysieren, ob ADAM10 das Shedding von Typ I NRG1- β katalysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1. Allgemein

Material	Hersteller
Analysenwaage (Analytical + 200 g - 0,0001 g)	Ohaus
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec
Einwegauslaufpipette (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt
Feinwaage (Standard 2000 g - 0,01 g)	Ohaus
Fotometer (Smart Spec TM 3000)	Bio Rad
Fotoverarbeitungsprogramm (Photoshop 5.5)	Universal Imag. Corp. Adobe
-20 °C-Gefrierschrank	AEG
-80 °C-Gefrierschrank	Heraeus
Heizblöcke	Stuart Scientific, NeoLab
Kolbenhubpipetten (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Gilson
Kühlschrank (Santo)	AEG
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Magnetrührer (IKAMAG RCT basic)	IKA Labortechnik
Mikrowelle	Bosch
pH-Elektrode	Schott
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Sarstedt
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Scanner Snap Scan 1236	Agfa
Schüttler KM2	Edmund Buhler
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Heraeus
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
Mikroskop Axioskop 2 plus	Zeiss
Wärmeschrank 37 °C (Function line)	Heraeus
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann

2.1.2. Molekularbiologische Methoden

Material	Hersteller
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Gel-Elektrophoresekammern	Peqlab
Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
PCR-Maschine (PTC-200)	MJ Research
Spannungsquelle	Bio-Rad
UV-Schirm	Intas

2.1.3. Zellkultur

Material	Hersteller
Deckgläschen	Marienfeld
Einfrierboxen	Sarstedt
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-PP-Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Mikroskop (Wiloverts 10 x 4/10/20)	Hund
N ₂ -Tank (Chronos)	Messer Griesheim
Poly-L-Lysin-beschichtete Zellkulturgefäße (24-well)	BD Biosciences
Sterilwerkbank (Hera Safe HS12)	Heraeus Instruments
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 24-well, 12-well, 6-well)	Nunc
Zell-Inkubator (Hera Cell)	Heraeus, Kendro
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Kendro

2.1.4. Proteinbiochemische Methoden

Material	Hersteller
Einwegküvetten (10 x 11 x 45 mm)	Sarstedt
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Fluorchem 8900 Biozym	Alfa InnoTech
Fotometer (Smart Spec TM 3000)	Bio-Rad
Gel-Elektrophoresekammern	Bio-Rad
Gel Transfer Filterpapier	Schleicher & Schuell
Messplatten Standard MA2400 (96 well)	Meso Scale Discovery (MSD)
PVDF Membran (Immobilon-P)	Millipore
Röntgenfilme (SuperRX)	Fujifilm

Spannungsquelle (Powerpac 300)	Bio-Rad
Streptavidin beschichtet	Mess Scale Discovery (MSD)
Transferkammer (Mini-Trans-Blot-Kammer)	Bio-Rad
Ultrazentrifuge Optima™ (TLA-55-Rotor)	Beckmann
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (1083)	GFL

2.1.5. Fluoreszenzmikroskopie

Objektträger Super Frost plus	Thermo
Deckplättchen	Marienfeld

2.1.6. Massenspektrometrie

Massenspektrometer Voyager Destr 4700	Applied Biosystems
---------------------------------------	--------------------

2.2. Enzyme, Versuchssysteme (Kits), Chemikalien

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Material	Hersteller
Agarose NA	Amersham Biosciences
dNTP (10 mM)	Roche
Ethidiumbromid (50.000 x)	Sigma
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
1 kb-DNA-Marker	Gibco Invitrogen Corporation
Pwo-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab
10 x Pwo Polymerase Reaktionspuffer	Peqlab
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas / New England Biolabs
SAP (1 U/μl; Shrimp Alkalische Phosphatase)	Roche
T4 DNA-Ligase (5 U/μl)	Fermentas
T4 DNA-Ligase-Puffer	Fermentas

2.2.2. Zellkultur

Material	Hersteller
Ampicillin	Roth
DMEM	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
G418 (Geneticin)	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Hygromycin	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (Penstrep)	Gibco
Poly-L-Lysin	Sigma
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco
Zeocin	Invitrogen

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

Material	Hersteller
Acrylamid-Bis-Lösung (Tris-Glycine-Gele)	
(37,5:1 / 40 % (w/v))	Serva
Ammonium-Persulfat (APS)	Roche
Anti-HA-Agarose (0,5 mg/ml)	Invitrogen
APS (Ammonium Persulfat) 10 %	Sigma
BCA-Assay Kit	Uptima, Interchim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Uptima, Interchim
Brij 35 10 %	Pierce
Bromphenolblau	Sigma
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
Glycerol 40 %	Roth
Glycin	Roth
I-Block	Tropix
Lubrol 10 %	Pierce
β -Mercaptoethanol	Roth
NP-40	Sigma
Protease-Inhibitor-Mix (PI-Mix)	Sigma
Protein-Molekulargewichtsstandard Marker (See Blue Plus 2)	Invitrogen
SDS („sodium-dodecyl-sulfate“; Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Calbiochem
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck

Tris	Biomol
Triton X-100	Merck
Tween-20	Merck

2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie

BSA	Sigma
DABCO	Sigma
Imersionsöl N518	Zeiss
Moviol	Hoechst
NGS (normal goat serum; Ziegen serum)	Sigma
Paraformaldehyd	J.T. Baker
Saccharose	Merck

2.3. Puffer, Medien und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem H₂O angesetzt, das mit einer Milli-Q Anlage zur bidest. Qualität aufgereinigt wurde und einen elektrischen Widerstand >18.2 MΩ/cm bei 25 °C hat. Bei Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent, soweit keine anderen Angaben gemacht wurden.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sowie deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
BACE1-NT-Puffer	50 mM NaAcetat; pH 4,4
Blockierlösung für Immunfluoreszenz	10 % NGS (normal goat serum; Ziegen serum) PBST-Puffer
Calcium-Chlorid-Puffer	50 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris; pH 8,0; in dH ₂ O
Citrat- Puffer	15 mM Citrat; pH 6,4
Citrat-EDTA-Puffer	15 mM Citrat; pH 6,4 1 mM EDTA
I-Block (Blockierlösung für Western-Blot)	1 g I-Block 0,1 % Tween-20 1 % PBS-Puffer dH ₂ O
DNA-Ladepuffer (4 x)	30 % Glycerin 10 mM EDTA 0,05 % Orange G
ECL-Blockierpuffer	PBS 0,5 % BSA 0,05 % Tween-20

Elektrophorese-Puffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1 % SDS
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd 4 % Saccharose PBS-Puffer
Grundmedium (Optimem; F10-Medium)	DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium mit High Glucose (PAA) und L-Glutamin) 10 % fetales Kälberserum (FCS, PAA) 1 % PEN/Strep (Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml/5 mg/ml)
Hitzeinaktiviertes Grundmedium (F10 HI-Medium)	Grundmedium, 1 Stunde bei 60 °C inkubiert, um darin enthaltene Phosphatasen zu inaktivieren.
Lämmli-Puffer (4 x SDS-Probenpuffer)	0,25 M Tris; pH 6,8 8 % SDS 40 % Glycerol 10 % β -Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau
LB-Ampicillin-Medium (Low Salt Luria-Bertani Medium)	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl; pH 7,0 (autoklaviert) 100 μ g/ml; Ampicillin (Selektionsantibiotikum)
Moviol-Lösung	15 % Moviol 50 mg/ml DABCO in dH ₂ O
Natrium-Acetat-Puffer	50 mM Natrium-Acetat; pH 4,5
Optimem-Medium	Siehe Grundmedium
PBS (steril)	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,75 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 (autoklaviert)
PBST	PBS 0,05 % Tween-20
Primärantikörper	Antikörper in entsprechender Konzentration (Vgl. 2.4., Tabelle 2) 0,25 % (w/v) BSA 0,05 % (w/v) Natriumazid in PBST
Poly-L-Lysin-Lösung	100 μ g/ml Poly-L-Lysin in sterilem PBS-Puffer
RF1	100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ -4H ₂ O 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ -2 H ₂ O 15 % Glycerin pH 5,8 (Essigsäure)

RF2	10 mM MOPS; pH 6,8 10 mM KCl 75 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O 15 % Glycerin pH 6,8 (NaOH)
RIPA-Lyse-Puffer	20 mM Tris; pH 7,4 150 mM NaCl, 1 % NP40 0,05 % Triton X-100 0,5 % Na-Desoxycholat 0,5 M EDTA
Sammelgel-Puffer (4 x „Upper Tris“)	0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SEAP-Puffer	0,1 M Glycin 1 mM MgCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ pH 10,4 (mit NaOH eingestellt)
Selektionsmedium	Grundmedium Selektionsantibiotika <ul style="list-style-type: none"> • Geneticin (G418): 200 µg/ml • Zeocin: 200 µg/ml • Hygromycin: 150 µg/ml
STET-Puffer	1 M Tris; pH 7,0 1 M NaCl 0,5 M EDTA 10 % SDS 1 % Triton X-100
STEN-Puffer	0,05 M Tris-HCl; pH 7,6 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 0,2 % NP-40
STEN-NaCl-Puffer	0,05 M Tris-HCl; pH 7,6 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 0,2 % NP-40 175 mM NaCl
STEN-SDS	STEN-Puffer mit 0,1 % SDS
TAE-Puffer	0,04 M Tris-Acetat 1 mM EDTA
TB-Puffer	10 mM HEPES 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl 55 mM MnCl ₂ pH 6,7 (mit KOH eingestellt) steril filtriert
TBST-Puffer	0,3 M NaCl 10 mM Tris-HCl; pH 7,6 0,3 % Triton X-100
Tris-Glycin-Puffer (Transferpuffer)	25 mM Tris 0,2 M Glycin

Tris-Glycin-SDS-Puffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1 % SDS
Trenngel-Puffer (4 x „Lower Tris“)	1,5 M Tris-HCl; pH 6,8 0,4 % SDS

2.4. Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die in Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenz-Analysen verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Wirtsspezies	Quelle	Applikation
Anti-HA-Agarose	HA-tag	1:100	Ziege, polyklonal, konjugiert an Agarose	Invitrogen	IP ¹
β-Aktin	β-Aktin	1:1000	Maus, monoklonal	Sigma	WB ²
6687	β-APP-C-Terminus (AS 676-695)	1:1000	Kaninchen, polyklonal	C. Haass	WB ²
1736	βAPP695 (AS 595-611)	1:600	Kaninchen	D.J.Selkoe (Haass 1992b)	WB ²
Sc-348	NRG1a-CT-Terminus (AS NQDPIAV)	1:500 ³ in IF	Kaninchen	Santa Cruz	WB ² IF ³
7520	BACE1-C-Terminus (AS 482-501)	1:1000	Kaninchen	A. Capell	WB ²
3F10 (HRP-gekoppelt)	HA-Peptid ⁴	1:1000 ²	Ratte, monoklonal	Roche	WB ²
3F10	HA-Peptid ⁴	1:500 ³	Ratte, monoklonal	Roche	IF ³

¹ Immunchemischer Nachweis in Immunpräzipitationen

² Immunchemischer Nachweis von Proteinen in Western-Blot-Analysen

³ Immunzytologischer Nachweis von Proteinen in der Immunfluoreszenz

⁴ 3F10 ist gegen das HA-Peptid mit der Sequenz YPYDVEDYA des Hämagglutinin-Proteins des humanen Influenza-Virus gerichtet. Da dieser Ak bereits HRP-gekoppelt ist, wird kein Sekundärantikörper benötigt

Tabelle 3 : Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Wirtsspezies	Quelle	Applikation
Anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	1:10.000	Ziege	Promega	WB ¹
Anti-Maus-HRP	Maus IgG	1:10.000	Ziege	Promega	WB ¹
Anti-Ziege-HRP	Ziege IgG	1:10.000	Ziege	Promega	WB ¹
Alexa Fluor 488	Ratte IgG	1:250	Ziege	Molecular Probes	IF ²
Alexa Fluor 555	Kaninchen IgG	1:250	Ziege	Molecular Probes	IF ²

HRP: Meerrettich-Peroxidase

¹Immunchemischer Nachweis von Proteinen in Western-Blot-Analysen

²Immunzytologischer Nachweis von Proteinen in der Immunfluoreszenz

2.5. Chemische Substanzen

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten chemischen Substanzen

Dargestellt sind die verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren mit Name, Wirkmechanismus, Lösungsmittel und ihrer Bezugsquelle.

Name	Wirkmechanismus	Lösungsmittel	Bezugsquelle
β-Sekretase-Inhibitor IV (C3)	β-Sekretase-Inhibition (Stachel et al. 2004).	DMSO	Calbiochem
TAPI-1	Inhibition von ADAM17 sowie von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP). Inhibition des Sheddings von βAPP und CADM1 durch ADAM10 (Slack et al. 2001, Kuhn et al. 2010, Nagara et al. 2012).	DMSO	Peptides International
GW280264X (GW)	Inhibition von ADAM10 und ADAM17 mit gleicher Potenz: → Inhibition des stimulierten Sheddings (via PMA) durch ADAM17. → Inhibition des konstitutiven Sheddings durch ADAM10 (Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005).	DMSO	Glaxo-SmithKline
GI254023X (GI)	Inhibition des konstitutiven Sheddings durch ADAM10 (Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005).	DMSO	Glaxo-SmithKline
DAPT	γ-Sekretase-Inhibitor (N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine t-ButylEster)	DMSO	Calbiochem

Phorbol 12-Myristate-13-Acetate (PMA)	α -Sekretase-Aktivator via PKC-Induktion (Burgess et al. 1995, Loeb et al. 1998, Montero et al. 2000).	DMSO	Calbiochem
---------------------------------------	---	------	------------

Tabelle 5: Übersicht über die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	ADAM10	ADAM17	BACE1
β -Sekretase-Inhibitor IV (C3)	/	/	15 nM [#]
TAPI-1	*(1)	1,2 μ M ^{*(2)}	/
GW280264X (GW)	11,5 nM bzw. 12 nM ^{** (1)} 1,0 μ M bzw. 0,9 μ M ^{** (2)}	8,0 nM ^{** (1)} 1,0 μ M ^{** (2)}	/
GI254023X (GI)	5,3 nM ^{** (1)} 1,0 μ M bzw. 1,5 μ M ^{** (2)}	541,0 nM ^{** (1)} >30 μ M ^{** (2)}	/

[#] IC₅₀ für das Shedding von artifiziellm APP im nicht zellbasierten Assay; Angabe in nM (Stachel et al. 2004).

*(1) TAPI-1 inhibiert die konstitutive Freisetzung von APPs- α sowie das Shedding von CADM1 in HEK 293-Zellen (Lammich et al. 1999, Kuhn et al. 2010, Nagara et al. 2012). Die für das konstitutive Shedding von β APP verantwortliche α -Sekretase in HEK 293-Zellen ist ADAM10 (Lammich et al. 1999, Kuhn et al. 2010). ADAM10 ist auch die für das Shedding von CADM1 hauptverantwortliche Sekretase (Nagara et al. 2012).

*(2) IC₅₀ für das konstitutive Shedding von β APP bei ADAM17-Überexpression in HEK 293-Zellen; Angabe in μ M (Slack et al. 2001).

** (1) IC₅₀ für das Shedding synthetischer Peptide in nicht zellbasierten Assays; Angabe in nM (Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005).

** (2) IC₅₀ für das Shedding des Membranproteins CX3CL1 in COS-7-Zellen; Angabe in μ M (Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005).

2.6. Vektoren und Oligonukleotide

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Bezeichnung	Bezugsquelle
pcDNA 3.1. Zeo (+)	Invitrogen
pSec Tag A Zeo (+)	Invitrogen
APtag-5	C. Blobel

Tabelle 7: Übersicht über die für diese Arbeit generierten und verwendeten Oligonukleotide

Konstrukt	Oligonukleotide	Template/ pcDNA
HA-Typ I NRG1-β1	<p>PCR 1 <u>Ansatz 1:</u> <u>vw: I HA NRG BamHI.F</u> 5'-AGGATCCATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGCCGAGGGCGACCCG AGCCAGCACTGC-3'</p> <p><u>rw: I NRGβ1.R</u> 5'-TAAATTCAATCCCAAGATGCTTGTAGAAGCTGGCCAT-3'</p> <p><u>Ansatz 2:</u> <u>vw: I NRGβ1.F</u> 5'-TTGGGATTGAATTTATGGAGGCGGAGGAGCTGTACC-3'</p> <p><u>rw: NRG1 mH XhoI.R</u> 5'-AACTCGACTACAGCAATAGGGTCTTGGTTAGC-3'</p> <p>PCR 2 <u>vw: I HA NRG BamHI.F</u> <u>rw: NRG1 mH XhoI.R</u></p>	<p>pcDNA 3.1 I NRG</p> <p>Produkte aus PCR 1</p>
HA-Typ I NRG1-β2	<p>PCR 1 <u>Ansatz 1:</u> <u>vw: I HA NRG BamHI.F</u></p> <p><u>rw: I NRGβ2.R</u> 5'-CGCCTTG TAGAAGCTGGCCATTACGTAGTTTTGG-3'</p> <p><u>Ansatz 2:</u> <u>vw: I NRGβ2.F</u> 5'-TAATGGCCAGCTTCTACAAGGCGGAGGAGCTGTA-3'</p> <p><u>rw: NRG1 mH XhoI.R</u></p> <p>PCR 2 <u>vw: I HA NRG BamHI.F</u> <u>rw: NRG1 mH XhoI.R</u></p>	<p>pcDNA 3.1 I NRG</p> <p>Produkte aus PCR 1</p>

HA-Typ I NRG1-β4	<p>PCR 1 <u>Ansatz 1:</u> <u>vw: I HA NRG BamHI.F</u></p> <p><u>rw: I NRGβ4.R</u> 5'-GGCTTCTCTGTTTCTTGCCTTTTCCTCCTAGAAATCAT-3'</p> <p><u>Ansatz 2:</u> <u>vw: I NRGβ4.F</u> 5'-GAGGAAAAGGCAAGAAACAGAGAAGCCTCTAGAAA-3'</p> <p><u>rw: NRG1 mH XhoI.R</u></p> <p>PCR 2 <u>vw: I HA NRG BamHI.F</u> <u>rw: NRG1 mH XhoI.R</u></p>	pcDNA 3.1 I NRG Produkte aus PCR 1
Typ I NRG1-β1- SEAP	<p>PCR 1 <u>Ansatz 1:</u> <u>vw: AP I NRG XhoI.F</u> 5'-ACTCGAGTCAACATCCACGACTGGGACCAGCCATCTC-3'</p> <p><u>rw: I NRGβ1.R</u> 5'-TAAATTC AATCCCAAGATGCTTGTAAGCTGGCCAT-3'</p> <p><u>Ansatz 2:</u> <u>vw: I NRGβ1.F</u> 5'-TTGGGATTGAATTTATGGAGGCGGAGGAGCTGTACC-3'</p> <p><u>rw: AP I NRG Nhe I.R</u> 5'-AGCTAGCACAGCAATAGGGTCTTGTTAGC-3'</p> <p>PCR 2 <u>vw: AP I NRG Xho.F</u> <u>rw: AP I NRG Nhe I.R</u></p>	pcDNA 3.1 I NRG Produkte aus PCR 1
Typ I NRG1-β2- SEAP	<p>PCR 1 <u>Ansatz 1:</u> <u>vw: AP I NRG XhoI.F</u></p> <p><u>rw: I NRGβ2.R</u> 5'-CGCCTTGTAAGCTGGCCATTACGTAGTTTGG-3'</p> <p><u>Ansatz 2:</u> <u>vw: I NRGβ2.F</u> 5'-TAATGGCCAGCTTCTACAAGGCGGAGGAGCTGTA-3'</p> <p><u>rw: AP I NRG Nhe I.R</u></p> <p>PCR 2 <u>vw: AP I NRG Xho.F</u> <u>rw: AP I NRG Nhe I.R</u></p>	pcDNA 3.1 I NRG Produkte aus PCR 1
Typ I NRG1-β4- SEAP	<p>PCR 1 <u>Ansatz 1:</u> <u>vw: AP I NRG XhoI.F</u></p> <p><u>rw: I NRGβ4.R</u> 5'-GGCTTCTCTGTTTCTTGCCTTTTCCTCCTAGAAATCAT-3'</p>	pcDNA 3.1 I NRG

vw: Vorwärtsprimer; rw: Rückwärtsprimer

Tabelle 8: Übersicht über die generierten und verwendeten cDNA-Konstrukte

Bezeichnung	Vektor	Klonierenzyme
HA-Typ I NRG1- β 1	pSec Tag A Zeo (+)	BamH1; Xho1
HA-Typ I NRG1- β 2	pSec Tag A Zeo (+)	BamH1; Xho1
HA-Typ I NRG1- β 2	pSec Tag A Zeo (+)	BamH1; Xho1
Typ I NRG1- β 1-SEAP	APtag-5	Xho1; Nhe1 (DNA-Konstrukt), Xba1 (Vektor) („sticky ends“ von Nhe1 und Xba1)
Typ I NRG1- β 2-SEAP	APtag-5	Xho1; Nhe1/Xba1
Typ I NRG1- β 4-SEAP	APtag-5	Xho1; Nhe1/Xba1
Typ I NRG1- β 1-AA-SEAP	APtag-5	Xho1; Nhe1/Xba1
Typ I NRG1- β 1- Δ 7-SEAP	APtag-5	Xho1; Nhe1/Xba1

2.7. Methoden

2.7.1. Molekularbiologische Methoden

2.7.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“, PCR)

Für die Amplifikation der oben genannten Konstrukte wurden zwei PCR-Schritte benötigt. Als Matrize für die verschiedenen Neuregulin-Konstrukte diente pcDNA 3.1 I NRG1- β 4 (freundlicher Weise von A. Garratt zur Verfügung gestellt).

Folgende PCR-Reaktionsansätze wurden hergestellt:

1. PCR-Reaktion:

- 3 μ l der pcDNA 3.1 I NRG1- β 4 (11 ng/ μ l)
- 1 μ l des entsprechenden vorwärts Oligonukleotids (vw)
- 1 μ l des entsprechenden rückwärts Oligonukleotids (rw)
- 1 μ l dNTP-Mix (10 mM)
- 2 μ l Pwo DNA-Polymerase (1U/ μ l)
- 10 μ l Pwo-Reaktionspuffer 10 x
- 82 μ l dH₂O
- Gesamtvolumen: 100 μ l

Die in der 1. PCR-Reaktion generierten DNA-Fragmente dienten als Templates für die 2. PCR-Reaktion. In dieser wurde das gewünschte DNA-Konstrukt für die spätere Insertion in den Transfektionsvektor generiert.

2. PCR-Reaktion:

10 µl DNA-Template 1
10 µl DNA-Template 2
1 µl des entsprechenden vorwärts Oligonukleotids (vw)
1 µl des entsprechenden rückwärts Oligonukleotids (rw)
1 µl dNTP-Mix (10 mM)
2 µl Pwo DNA-Polymerase (1U/µl)
10 µl Pwo-Reaktionspuffer 10 x
65 µl dH₂O
Gesamtvolumen: 100 µl

Die Reaktionsansätze wurden gemischt und die Amplifikation mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Schritt 1: 95 °C 5 min
Schritt 2: 95 °C 1 min
Schritt 3: 50 °C 1 min
Schritt 4: 72 °C 1,5 min
Schritt 5: 72 °C 10 min
Schritt 6: Kühlung bei 4 °C

} 25 Zyklen

2.7.2. Reinigung und Analyse von DNA**2.7.2.1. Agarosegelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung suprahelikaler DNA-Plasmide und DNA-Fragmente wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde zunächst durch Erwärmung in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Die Agarosegellösung wurde in die Gelkammer gegossen und mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml in dH₂O) versetzt. Anschließend wurde der Probentaschenkamm zum Laden der DNA eingesetzt. Als Molekulargewichtsmarker diente die 1 kb „DNA ladder“ von Gibco. Die Gel-Elektrophorese wurde bei 120 V mit TAE-Puffer in Agarosegelkammern durchgeführt.

2.7.2.2. Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurden die gewünschten DNA-Banden detektiert und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.7.3. Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.3.1. Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien

E.coli-Stamm: DH5 α

5 ml LB-Medium wurden mit einer E.coli DH5 α -Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (200 upm) inkubiert. Die E.coli-Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:200 in 200 ml LB-Medium bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert, dann auf vier 50 ml Falcon-Gefäße aufgeteilt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten (Megafuge 1,0 R; 1.500 x g, 4 °C). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Bakteriensediment in 30 ml RF1 (gekühlt) gelöst (10 s, Vortex) und dann erneut 15 Minuten zentrifugiert (Megafuge 1,0 R; 1.500 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 6 ml RF2 (gekühlt) gelöst (10 s, Vortex) und die Bakteriensuspension in 200 μ l Aliquots bei -60 °C überführt. Die Bakterienaliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren, bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert oder direkt für die Transformation verwendet.

2.7.3.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

Für den Verdau von Vektoren wurden 3 μ g Vektor (Plasmid-DNA) mit je 1 μ l der entsprechenden Restriktionsendonukleasen (10 U) und 4 μ l 10 x Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 40 μ l über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für den Verdau von cDNA-Fragmenten wurden je 80 μ l des PCR-Produkts, 10 μ l vom Hersteller empfohlener 10 x Reaktionspuffer und je 2,5 μ l Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 100 μ l (mit dH₂O auf 100 μ l aufgefüllt) verwendet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Analyse und Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Vgl. 2.7.2.1.) und anschließender Isolierung der DNA aus dem Gel (Vgl. 2.7.2.2.).

2.7.3.3. Dephosphorylierung von DNA

Um vor einer Ligation eine intramolekulare Selbstligation der linearisierten Plasmide zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit einer Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP; Roche) entfernt. Hierzu wurden 40 μ l der linearisierten Plasmid-DNA mit 1 μ l SAP und 6 μ l Reaktionspuffer (dem beim Verdau verwendeten Puffer entsprechend) mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Vgl. 2.7.2.1.), isoliert und aufgereinigt (Vgl. 2.7.2.2.).

2.7.3.4. Ligation von DNA

Die Insertion des DNA-Fragments, welches zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut worden war (Vgl. 2.7.3.2.), erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase) in das zuvor linearisierte und dephosphorylierte Plasmid (Vgl. 2.7.3.3). 2 µl Plasmidvektor, 8 µl DNA-Fragment (Insert), 2 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase wurden in einem Endvolumen von 20 µl für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. 10 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente E.coli DH5α-Bakterien verwendet (Vgl. 2.7.3.5.).

2.7.3.5. Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E.coli-Bakterien

Für die Transformation der hergestellten DNA-Konstrukte in kompetente E.coli-Bakterien wurden 10 µl Ligationsansatz mit 100 µl der zuvor auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme der DNA in die Bakterien zu ermöglichen erfolgte ein Hitzeschock durch Inkubation der Ansätze für 90 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurden die Ansätze für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, 800 µl LB-Medium zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min/2500 upm, RT) wurde der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf zuvor bei 37 °C vorgewärmte LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Die über Nacht bei 37 °C auf der Platte gewachsenen Einzelkolonien wurden zum Animpfen von Übernachtskulturen für die Plasmidpräparation nach der Mini-Präp-Methode bzw. der Maxi-Präp-Methode (Vgl. 2.7.3.6. und 2.7.3.7.) verwendet.

2.7.3.6. Präparation von Plasmidvektoren im kleinen Maßstab (Mini-Präp)

Mit einer Pipettenspitze wurden die Klone von der mit transformierten E.coli DH5α beimpften LB-Ampicillin-Agar-Platte aufgenommen und in je ein autoklaviertes Reaktionsgefäß (15 ml) mit 3 ml LB-Medium gegeben. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler (200 upm) wurde der Reaktionsansatz in 1,5 ml Aliquots überführt, zentrifugiert (1200 upm; 4 °C) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die DNA-Eluierung erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits von Machery-Nagel. Hierbei wurde das Pellet in 150 µl P1-Puffer gelöst (10 s, Vortex), dann 150 µl P2-Puffer hinzugeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Durch Zugabe des P3-Puffers (3 s, Vortex) wurden die Proteine ausgefällt, welche in der anschließenden Zentrifugation (1 min, 1200 upm, 4 °C) sedimentiert wurden. Der die DNA enthaltende Überstand wurde in 1 ml 100 %-iges Ethanol überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1 min, 1200 upm, 4 °C), der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 500 µl

70 %-igem Ethanol gewaschen. Der Ethanolüberstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Es erfolgte die Resuspension des getrockneten DNA-Pellets in 80 µl dH₂O.

2.7.3.7. Präparation von Plasmidvektoren im großen Maßstab (Maxi-Präp)

Von der Mini-Präp-Kultur, die ein positives Ergebnis im Mini-Präp erbracht hatte, wurden für den Maxi-Präp Übernachtskulturen in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben angeimpft. Der Reaktionsansatz mit je 100 ml LB-Medium wurde bei 37 °C im Schüttler über Nacht inkubiert und dann in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (15 min, 4500 upm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Zur Eluierung der DNA aus dem Sediment wurde das QIAfilter Plasmid Maxi Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Das auf diese Weise erhaltene DNA-Pellet wurde getrocknet und anschließend in 200 µl dH₂O resuspendiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) gemessen.

2.7.3.8. Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von der Firma GATC Biotech AG mit Sitz in Konstanz durchgeführt.

2.7.4. Zellkultur

2.7.4.1. Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene HEK 293-Zelllinien und ferner SH-SY5Y-Zellen verwendet. HEK 293-Zellen dienten bereits in vorangegangenen Arbeiten als geeignetes Zellmodell für die Analyse des Sheddings von NRG1 (Montero et al. 2000, Willem et al. 2006), sowie für die Charaktisierung von BACE1, der α -Sekretase ADAM10 und des γ -Sekretase-Komplexes (Citron et al. 1992, Shoji et al. 1992, Haass et al. 1992 b, Seubert et al. 1993, Vassar et al. 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten HEK 293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells), die als stabil exprimierende Zellen hergestellt wurden. Sie exprimieren stabil humanes β APP₆₉₅. HEK 293-BACE1-Zellen exprimieren zudem stabil die β -Sekretase BACE1 (HEK 293-B1-Zellen). HEK 293-Zellen mit stabiler Expression der α -Sekretase ADAM10 werden in der vorliegenden Arbeit als HEK 293-AD10-Zellen bezeichnet. HEK 293 swe-NRG-Zellen exprimieren humanes β APP₆₉₅, welches die „schwedische“ Doppel-Mutation K595N/M596L an der BACE1-Schnittstelle von β APP aufweist (Citron et al. 1992, Vassar et al. 1999). Ferner exprimieren sie stabil Typ I NRG1- β 4.

SH-SY5Y-Zellen stammen von humanen Neuroblastomzellen ab (Biedler et al. 1978). Sie wurden bereits für die Analyse des Sheddings von β APP durch BACE1 und durch ADAM10 (Kuhn et al. 2010) sowie in dieser Arbeit erstmals für die Analyse des Sheddings von Typ NRG1- β verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien und ihre Antibiotikaresistenzen

Aufgeführt sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, genetisch veränderten Zelllinien. Angegeben sind der Name der jeweiligen Ursprungszelllinie, alle exogen exprimierten Proteine und die entsprechenden Resistenzen zur Selektion der Einzelzellklone.

Name	Mutterzelllinie	Exogen exprimierte Proteine	Resistenz
HEK 293	HEK 293	β APP _{695wt}	G418
HEK 293 B1	HEK 293	β APP _{695wt} BACE1	G418 Zeocin
HEK 293 AD10	HEK 293	β APP _{695wt} ADAM10	G418 Hygromycin
HEK 293 swe-NRG	HEK 293	β APP _{695swe} Typ I NRG1- β 4	G418 Zeocin
SH-SY5Y	SH-SY5Y (humane Neuroblastomzelllinie)	keine	Keine Resistenz

2.7.4.2. Medien und Lösungen

Dem Medium der HEK 293-Zellen wurde zur Aufrechterhaltung der β APP-Expression Geneticin zugefügt. Dem Medium der HEK 293-B1-Zellen wurde zudem zur Aufrechterhaltung der BACE1-Expression Zeocin, dem Medium der HEK 293-AD10-Zellen zur Aufrechterhaltung ihrer ADAM10-Expression Hygromycin und dem Medium der HEK 293 swe-NRG-Zellen zur Aufrechterhaltung der NRG-Expression Zeocin supplementiert.

2.7.4.3. Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Kultivierung wurden 10 cm Zellkulturschalen mit je 10 ml der oben genannten Kulturmedien verwendet. Wachstum und Konfluenz der Zellen wurden lichtmikroskopisch kontrolliert. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Zur Ablösung der an den

Zellkulturschalen adhären Zellen erfolgte die Zugabe von je 1 ml Trypsin-EDTA. Nach 5 Minuten wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 1 ml Kulturmedium geblockt, die Zellen mit einer sterilen 2 ml Pipette trituiert und in ein 15 ml Einweg-PP-Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugation (1000 x g, 5 min, RT, Megafuge) wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen auf die Zellkulturschalen mit je 10 ml Kulturmedium gegeben. Dabei wurde durch leichtes Schwenken der Schalen auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Schale geachtet.

Zum Auslegen von Zellen für Versuchsreihen wurden die Zellen wie oben beschrieben von der Zellkulturschale abgelöst. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen ausgezählt, dann auf die gewünschte Zelldichte verdünnt, auf die jeweiligen Zellkulturschalen verteilt und dann bis zu Versuchsbeginn bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zum Anlegen einer Dauerkultur (Kryokonservierung) wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und auf drei Einfriergefäße verteilt. Diese wurden mit Hilfe von Einfrierboxen bei -80 °C langsam herunter gekühlt. Die Zellen wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C oder langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung der Zellen in Zelllysaten oder Membranpräparationen wurden Zellpellets hergestellt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 5 ml kaltem (4 °C) PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde abgesaugt und durch 1 ml kalten (4 °C) PBS-Puffer ersetzt. Mit einem Spatel löste man die Zellen von der Zellkulturschale ab. Die so gewonnen Zellen wurden in einer Tischzentrifuge (1000 x g, 5 Minuten, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

2.7.4.4. Beschichtung von Kulturschalen und Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den für Immunfluoreszenzanalysen benötigten runden Deckgläschen (Durchmesser 1cm) zu erlangen, erfolgte die Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin. Hierzu wurden 6 cm Zellkulturschalen mit sterilisierten Deckgläschen nicht überlappend ausgelegt, vollständig mit 5 ml Poly-L-Lysin bedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Sterilbank inkubiert. Nach Absaugen der Poly-

L-Lysin-Lösung wurden die Schalen zweimal mit je 5 ml sterilem dH₂O gewaschen und anschließend getrocknet. Sie standen nun zum Auslegen der Zellen bereit.

2.7.4.5. Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA

Für 24-well Platten (Poly-L-Lysin beschichtet) wurden die zur Transfektion vorgesehen Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/well in 1 ml Kulturmedium ausgelegt. Am folgenden Tag erfolgte die Transfektion mit 0,5 µg rekombinanter DNA/well, 1,0 µl Lipofectamine2000/well und 0,5 ml Optimem-Medium/well. Hierzu wurde zunächst Optimem-Medium mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren sterilen Reaktionsgefäß wurde Optimem-Medium mit der gewünschten rekombinanten DNA versetzt. Beide Ansätze wurden gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde der Transfektionsansatz mit der oben beschriebenen Konzentration auf die Zellen geträufelt und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Transfektion in 10 cm bzw. 6 cm Kulturschalen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 70 %. Der Transfektionsansatz pro 10 cm Schale bzw. pro drei 6 cm Schalen enthielt 1 ml Optimem-Medium, 10 µl Lipofectamine2000 und 5 µg rekombinante DNA. Der Transfektionsansatz wurde wie oben beschrieben angesetzt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde dieser mit der genannten Konzentration auf die Zellen geträufelt und diese für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.7.5. Fluoreszenzmikroskopie

Herstellung eines Fluoreszenzpräparates

Einen Tag nach Transfektion wurden die auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultivierten Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und dann für 10 Minuten mit Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen.

Der Nachweis intrazellulärer Proteine erforderte die Permeabilisierung der Zellen. Hierzu wurden die Zellen 10 Minuten mit Triton-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Für die Absättigung unspezifischer Proteinbindungen erfolgte anschließend sowohl für die zur Oberflächenfärbung bestimmten, unbehandelten Zellen als auch für die permeabilisierten Zellen eine einstündige Inkubation mit Blockierlösung. Monoklonale Primärantikörper wurden in einer 1:500 Verdünnung für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBST-Puffer gewaschen und dann 1 Stunde

bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBST-Puffer, dann einmal mit PBS-Puffer gewaschen und die Deckgläschen zur Entfernung eventueller Salzkrusten einmal kurz in dH₂O eingetaucht. Die Deckgläschen wurden mit je 1 Tropfen Moviol-Lösung auf einem Objektträger fixiert. Nach dem Aushärten konnten die so erhaltenen Präparate unter Verwendung von Immersionsöl im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.7.6. Proteinbiochemische Methoden

2.7.6.1. Membranpräparation

Für Membranpräparationen wurden die in Kapitel 2.7.4.3. beschriebenen PBS-Zellpellets verwendet. Während der gesamten Durchführung der folgenden Arbeitsschritte wurden die Proben auf Eis gelagert, sofern nicht anders angegeben. Die PBS-Zellpellets wurden jeweils in 1 ml mit PI-Mix (1:500) versetzten hypotonen Citrat-EDTA-Puffer resuspendiert (10 s, Vortex) und anschließend auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Zur Rupturierung der Zellmembranen erfolgte die Schockgefrierung der Proben für 2 Minuten in flüssigem Stickstoff. Nach langsamem Auftauen der Proben bei 37 °C wurden diesen jeweils 100 µl Brij 35 10 % und 100 µl Lubrol 10 % zugefügt, um die Aggregation der Proteine zu verhindern. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und dann zentrifugiert (7000 x g, 10 min, 4 °C). Je 950 µl des sog. „post-nuklearen“ Überstandes, welcher Membranen sowie das Zytosol enthält, wurden vorsichtig abpipettiert und jeweils in ein mit 140 µl Glycerol 40 % befülltes 1,5 ml Ultrazentrifugenreaktionsgefäß transferiert und vorsichtig gemischt. In dem folgenden Zentrifugationsschritt (55.000 upm, 60 min, 4 °C) wurde die Gesamtmembranfraktion pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets jeweils in 190 µl Citrat-EDTA-Puffer resuspendiert. Die anschließende Zugabe von je 5 µl Triton X-100 20 % diente der Extraktion der Proteine aus den Membranen. Nach 10 minütiger Inkubation wurden die Proben erneut zentrifugiert (55.000 upm, 30 min, 4 °C). Die Triton unlöslichen Proteine und Membranreste befanden sich nun im Pellet. Der Überstand mit den aus den Membranen gelösten Proteinen wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.6.2. Herstellung von Zelllysaten

RIPA-Lysat

PBS-Zellpellets (Vgl. 2.7.4.3.) wurden zunächst in 1 ml eiskaltem RIPA-Lyse-Puffer, welcher zuvor mit PI-Mix versetzt worden war, resuspendiert und dann für 60 Minuten auf Eis im Schüttelinkubator (200 upm; 4 °C) inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate zentrifugiert (13.000 upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand mit den darin gelösten Proteinen wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Gesamtproteinkonzentration der Proben mittels BCA-Assays (Vgl. 2.7.6.3.) bestimmt. Die Zelllysate wurden dann unmittelbar mittels SDS-Page und Western-Blot (Vgl. 2.7.6.6.) analysiert oder bei -80 °C gelagert.

STET-Lysat

PBS-Zellpellets (Vgl. 2.7.4.3.) wurden zunächst in 1 ml eiskaltem STET-Puffer, welcher zuvor mit PI-Mix versetzt worden war, resuspendiert und dann für 60 Minuten auf Eis im Schüttelinkubator (200 upm; 4°C) inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate zentrifugiert (13.000 upm, 5 min, 4°C). Der Überstand mit den darin gelösten Proteinen wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Gesamtproteinkonzentration der Proben mittels BCA-Assays (Vgl. 2.7.6.3.) bestimmt. Die Zelllysate wurden dann unmittelbar mittels SDS-Page und Western-Blot (Vgl. 2.7.6.6.) analysiert oder bei -80°C gelagert.

2.7.6.3. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA-Assay)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden je 10 µl der zu messenden Probe mit je 1 ml BCA-Lösung (Reagenz A und B in 1:50 Verdünnung des Bicinchoninic Acid Assays, BCA) versetzt, gemischt und je 200 µl hiervon in ein well einer 96-well-Platte pipettiert und dann 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als Kalibrierstandard wurde parallel hierzu eine Verdünnungsreihe einer BSA-Standard-Lösung (2 mg/ml Bovine Serum Albumin) mit jeweils bekannten Konzentrationen angesetzt und ebenfalls mit je 1 ml der BCA-Lösung versetzt. Hiervon wurden dann jeweils 200 µl in ein well einer 96-well-Platte pipettiert und anschließend 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Extinktion der Proben und Kalibrierstandards wurde bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der linearen Standardkurve berechnet.

2.7.6.4. Immunpräzipitation von Proteinen

Zum Nachweis der löslichen HA-INRG1- β -Ektodomäne wurden Immunpräzipitationen aus konditioniertem Medium durchgeführt. Hierzu wurde je 1 ml konditioniertes Medium von konfluenten 10 cm Schalen mit je 15 μ l Anti-HA-Agarose (jeweils in 200 μ l PBS-Puffer suspendiert) versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler (200 upm) inkubiert. Anschließend wurden die Immunpräzipitate durch Zentrifugation (6000 upm, 5 min, 4 °C) pelletiert und diese mit je 1 ml STEN-NaCl-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (6000 upm, 5 min, 4 °C) wurden die Pellets erneut mit je 1 ml STEN-NaCl-Puffer gewaschen. Im Anschluß an den letzten Waschschrift mit je 1 ml STEN-Puffer wurden die Pellets mit je 15 μ l 4 x Lämmli-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 100 °C inkubiert. Durch die Zentrifugation (13.000 upm, 1 min, RT) sedimentierte die immobile Phase. Der Überstand mit den nun darin gelösten und denaturierten Proteinen wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und im Western-Blot (Vgl. 2.7.6.6.) analysiert.

2.7.6.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

	8 % Trenngel	10 % Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	8,8 ml	8 ml	6,5 ml
Acrylamid 40 %	3,2 ml	4 ml	1 ml
4x Lower Tris	4 ml	4 ml	
4x Upper Tris			2,5 ml
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l
APS 10 %	30 μ l	30 μ l	30 μ l

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Hierzu wurden SDS-Polyacrylamid-Gele mit je 10 Probetaschen und einer Dicke von 0,75 mm oder Gele mit 15 Probetaschen und einer Dicke von 1,5 mm verwendet.

Die Trennfähigkeit der Gele ist abhängig vom Anteil des Polyacrylamids. Je höher der Polyacrylamid-Anteil ist, desto besser ist die Auftrennung kleiner Proteine. 8 %-Gele wurden zur Proteinauftrennung von Zelllysaten und Membranpräparationen verwendet, 10 %-Gele dienten der Proteinauftrennung von Immunpräzipitationen aus Zellkulturüberständen.

Nach Entfernung von Rückständen von den Glasplatten mittels Seifenlösung und Ethanol wurden die Glasplatten in die Gießkammern eingesetzt und das Trenngel bis zu einer Höhe von 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen

und dessen Rückstände entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das ausgehärtete Trenngel gegossen und der entsprechende Probentaschenkamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurde der Probentaschenkamm vorsichtig entfernt und das Gel in die mit dem Elektrophoresepuffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer) gefüllte Trennkammer eingesetzt. Die Geltaschen wurden dann mehrmals mit dem Elektrophoresepuffer gespült. Das Gel stand nun zur Ladung von Proben bereit.

Hierzu wurden 25 µg Protein bzw. bei Immunpräzipitationen der komplette Überstand nach Sedimentation der immobilen Phase mit SDS-Probenpuffer (4 x Lämmli-Puffer bei Zelllysaten und Membranpräparationen; 2 x Lämmli-Puffer bei Immunpräzipitationen; jeweils Mercaptoethanol zugefügt) versetzt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Durch Zentrifugation wurden nicht gelöste Bestandteile sedimentiert. Der Überstand wurde in die Probetaschen geladen. Als Molekulargewichtsstandard diente der Marker See blue von Invitrogen.

Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 70 V und dann ab Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 120 V.

2.7.6.6. Western-Blot-Analyse

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Transfermembran, welche zuvor für 10 Minuten mit Isopropanol benetzt und anschließend 30 Minuten in dH₂O gewaschen worden war.

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- Poröser Schwamm in Tris-Glycin-Puffer äquilibriert
- Zwei Lagen Geltransferfilterpapier in Tris-Glycin-Puffer äquilibriert
- PVDF-Transfermembran
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- Zwei Lagen Geltransferfilterpapier in Tris-Glycin-Puffer äquilibriert
- Poröser Schwamm in Tris-Glycin-Puffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Der Protein-Transfer erfolgte in einer Mini-Trans-Blot-Kammer, welche mit Tris-Glycin-Puffer als Transferpuffer aufgefüllt war, bei 400 mA für 1 Stunde. Um unspezifische Proteinbindungsstellen nach erfolgtem Transfer abzusättigen, wurde die PVDF-Transfermembran anschließend über Nacht in I-Block inkubiert (200 upm, 4 °C). Darauf

erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Vgl. Tabelle 2) für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler (200 upm). Nach 5 Waschschritten à 10 Minuten mit TBST-Puffer (200 upm, RT) wurde die PVDF-Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut für 50 Minuten mit TBST-Puffer (200 upm, RT) gewaschen. Danach wurden die Membranen mit je 5 ml ECL-Lösung (2,5 ml ECL-1, 2,5 ml ECL-2) für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die Chemilumineszenz-Signale mit Fuji-Röntgen-Filmen detektiert. Diese wurden im Filmentwicklungsgerät nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die entwickelten Filme wurden mit dem Scanner gescannt und mit einem Fotoverarbeitungsprogramm der entsprechende Ausschnitt zurechtgeschnitten.

2.7.6.7. SEAP-Enzym-Assay (Bestimmung der Alkaline-Phosphatase-Aktivität)

Für den SEAP-Enzym-Assay wurden die Zellen wie oben beschrieben in 24-well Platten ausgelegt und transfiziert (Vgl. 2.7.4.3. und 2.7.4.5.). Etwa 10 bis 12 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen mit den gewünschten Inhibitoren (Vgl. Tabelle 4) über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Jeweils 80 µl Zellkulturüberstand wurden auf vier wells einer 96-well Platte pipettiert und pro well mit 200 µl Reaktionslösung versetzt. Die Platte wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Als Referenz wurde Hitze-inaktiviertes Medium von unbehandelten Zellen verwendet. Die Absorption stellt ein Maß für die Menge des umgesetzten Substrats dar.

2.7.7. Massenspektrometrische Analyse

Zur Identifizierung der Schnittstelle von Typ I NRG1-β durch die β-Sekretase BACE1 wurde von Peptide Speciality Laboratories GmbH ein Peptid mit der AS-Sequenz der juxtamembranären Region von Typ I NRG1-β1 generiert. 10 µg Peptid wurden mit 1 µg BACE1-NT (Westmeyer et al. 2004) zu einem Endvolumen von 100 µl mit Na-Acetat-Puffer gemischt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Ein weiterer Reaktionsansatz mit 10 µg Peptid, 1 µg BACE1-NT und 1 µM Inhibitor C3 wurde auf ein Endvolumen von 100 µl mit Citrat-Puffer gemischt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Die Proben wurden freundlicherweise durch Herrn Tilman Schlunk vom Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU in einem MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) Massenspektrometer analysiert.

2.7.8. Statistische Analyse

Da sich die absoluten Werte der AP-Aktivität in den verschiedenen Versuchen eines Versuchsaufbaus im SEAP-Enzym-Assay unterschieden, wurden die absoluten Werte der AP-Aktivität jeweils ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Dadurch entstanden relative Werte der AP-Aktivität, die mit der auf "1" genormten Kontrolle verglichen wurden. Relative Werte kleiner eins deuten auf eine verminderte AP-Aktivität hin, relative Werte größer eins auf eine erhöhte Aktivität. Die Mittelwerte der relativen AP-Aktivität, deren 95 %-Konfidenzintervalle, sowie die P-Werte für die Gruppenvergleiche wurden mit Hilfe eines log-linearen Regressionsmodells ermittelt. Die statistische Auswertung einschließlich der Erstellung entsprechender Graphiken erfolgte im Statistikprogramm R. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet (*P $< 0,05$, **P $< 0,01$, ***P $< 0,001$).

3. Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der proteolytischen Prozessierung von Typ I NRG1- β durch die für die Pathophysiologie der Alzheimer Demenz hauptverantwortlichen Sekretasen.

3.1. Intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1 durch den γ -Sekretase-Komplex

Um zu verifizieren, dass der γ -Sekretase-Komplex die proteolytische Prozessierung von Typ I NRG1 innerhalb der Transmembrandomäne katalysiert, wurde die Prozessierung von Typ I NRG1- β 4 mit und ohne Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität in dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurden HEK 293 swe-Zellen mit stabiler Typ I NRG1- β 4-Expression mit dem γ -Sekretase-Inhibitor N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine t-Butyl-Ester (DAPT; 2 μ M) über Nacht inkubiert. Zur Anreicherung von membrangebundenem Protein aus diesen Zellen erfolgte die Herstellung von Membranpräparationen. Die Detektion von membrangebundenem Typ I NRG1- β 4 aus Membranpräparationen erfolgte in Western-Blot-Analysen mit dem gegen den C-Terminus von NRG1 gerichteten Antikörper Sc-348. Als Kontrolle diente β APPswe, welches mit dem Antikörper 6687 in Western-Blot-Analysen nachgewiesen wurde. Bei Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität zeigt sich eine Akkumulation des zytoplasmatischen Fragments von Typ I NRG1- β 4. Analog zu Neuregulin lässt sich eine Akkumulation der membrangebundenen β APP-Prozessierungsprodukte C99 und C83 bei Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität beobachten (Abb. 13). Die vorliegenden Resultate zeigen, dass die Proteolyse innerhalb der Transmembrandomäne durch Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität gehemmt wird. Dies bestätigt, dass der γ -Sekretase-Komplex für die Proteolyse innerhalb der Transmembrandomäne von Typ I NRG1- β verantwortlich ist.

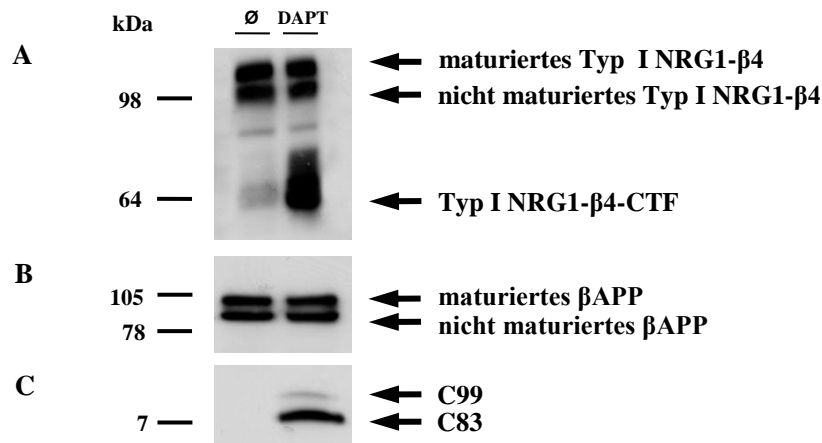


Abb. 13: Intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1-β durch den γ -Sekretase-Komplex.

HEK 293 swe-NRG-Zellen mit stabiler Typ I NRG1-β4-Expression wurden mit dem γ -Sekretase spezifischen Inhibitor DAPT (2 μ M) über Nacht inkubiert.

(A) Detektion von Typ I NRG1-β in Western-Blot-Analysen von Membranpräparationen mit dem Ak Sc-348. Die Pfeile kennzeichnen die Banden für matriertes und nicht matriertes Typ I NRG1-β4 sowie für membrangebundenes Typ I NRG1-β4-CTF. (B&C) Die Detektion von βAPP und dessen Prozessierungsprodukten C99 und C83 mit dem Ak 6687 in Western-Blot-Analysen von Membranpräparationen erfolgte als Kontrolle für die inhibitorische Wirkung von DAPT. Die Pfeile kennzeichnen die Banden sowohl für matriertes und nicht matriertes βAPP (B) als auch für C99 und C83 (C).

3.2. Typ I NRG1-β-Konstrukte in der vorliegenden Arbeit

Nachdem in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, dass der γ -Sekretase-Komplex die proteolytische Prozessierung von Typ I NRG1-β innerhalb der Transmembrandomäne katalysiert, stellt sich die Frage nach den für das Shedding von Typ I NRG1-β verantwortlichen Sekretasen. Dessen Analyse erfordert die Detektion sowohl des ungeschnittenen Proteins als auch den Nachweis der Prozessierungsprodukte, d.h. des löslichen N-terminalen Fragments (NTF) sowie des membrangebundenen C-terminalen Fragments (CTF). In der vorliegenden Arbeit dienten Immunfluoreszenz-Analysen sowie Western-Blot-Analysen von Zelllysaten der Detektion von membrangebundenem Typ I NRG1-β. Western-Blot-Analysen von Immunpräzipitationen sowie Enzym-Assay-Analysen ermöglichten hingegen den Nachweis sezernierter Prozessierungsprodukte im Zellkulturüberstand. Um eine spezifische Ektodomänen-Detektion in Immunoassays zu ermöglichen, wurden für die verschiedenen Typ I NRG1-β-Isoformen cDNA-Konstrukte generiert, welche mit einem für das Hämagglutinin-Peptid (HA-Peptid) kodierenden Tag (HA-Tag) an ihrem N-Terminus konjugiert sind. Mit Hilfe eines spezifisch gegen das HA-Peptid gerichteten Antikörpers konnte somit die Ektodomäne spezifisch nachgewiesen werden. Die Verwendung eines solchen Tags erlaubt in Immunoassays den Rückschluss von Signalintensitäten auf die relative Menge an geschnittenem Typ I

NRG1- β . Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Prozessierung von Typ I NRG1 durch Konjugation an HA-Tags nicht von der Prozessierung nativer Typ I NRG1-Proteine unterscheidet (Wang et al. 2001) (Abb. 13 & 17). Entscheidend ist auch die Tatsache, dass die Proteinfaltung sowie die biologische Aktivität von HA-Typ I NRG1-Konstrukten nicht beeinträchtigt werden (Montero et al. 2000). Die gewählte Position des HA-Tags am N-Terminus von Typ I NRG1- β entspricht derjenigen, die schon in vorherigen Studien anderer Arbeitsgruppen zur Untersuchung des Sheddings von Typ I NRG- β verwendet wurde (Shirakabe et al. 2001, Yokozeki et al. 2007).

Für die spezifische Ektodomänen-Detektion in Enzym-Assay-Analysen wurden cDNA-Konstrukte generiert, welche für Typ I NRG1- β -Isoformen mit einer Alkaline Phosphatase (AP)-Sequenz an ihrem N-Terminus kodieren (Abb. 14 C). Die Verwendung einer für Alkaline Phosphatase kodierenden Sequenz erlaubt in SEAP-Enzym-Assays (secreted alkaline phosphatase-Enzym-Assays) den Rückschluss von Signalintensitäten auf die relative Menge an löslichem Typ I NRG1- β und damit auf das Ausmaß des Sheddings (Burgess et al. 1995, Loeb und Fischbach 1995, Montero et al. 2000, Wang et al. 2001, Falls 2003 a, Falls 2003 b, Willem et al. 2006, Mei und Xiong 2008). Als Matrize für diese cDNA-Konstrukte diente der, freundlicher Weise von C. Blobel zur Verfügung gestellte, Vektor APTag-5. In diesen ist die Sequenz der juxtamembranären Region, die TMD, sowie Anteile des zytoplasmatischen Fragments von Typ I NRG1- β 2 kloniert (Nukleotide 977-2374, GenBank accession number NM_013957), wobei ein Protein generiert wird, an dessen N-Terminus die AP konjugiert ist (Zhou et al. 2004). Die Lokalisation der AP direkt N-terminal der EGF-ähnlichen Domäne entspricht der Lokalisation in voraus gegangenen Arbeiten mit EGF-Rezeptorliganden (Sahin et al. 2004, Zhou et al. 2004, Horiuchi et al. 2005). Sowohl für das Shedding der EGF-Rezeptorliganden TGF- α , Epiregulin, HB-EGF als auch für Typ I NRG1- β scheint die Fusion mit AP proximal der EGF-ähnlichen Domäne das Shedding nicht zu beeinflussen (Sahin et al. 2004, Zhou et al. 2004, Horiuchi et al. 2005). Die Verwendung von AP-Tags ist somit eine geeignete Methode, um das Shedding dieser Substrate zu analysieren.

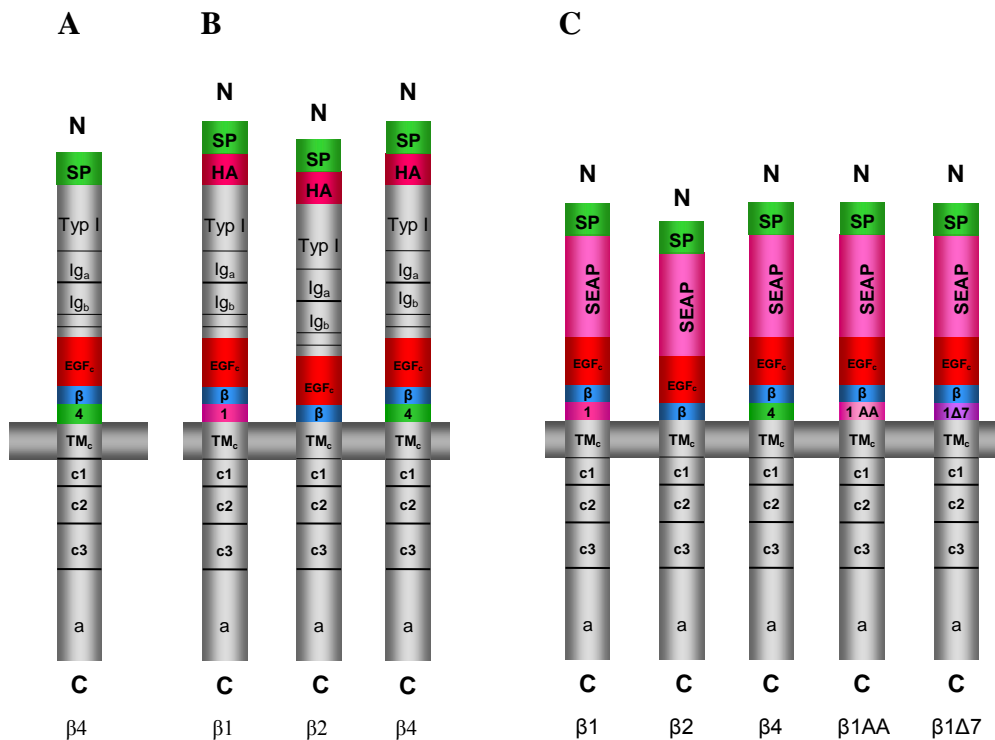


Abb. 14: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Typ I NRG1-β-Konstrukte. Die Typ I NRG1-Exons und ihre korrespondierenden Protein-Sequenzen sind verschiedenfarbig dargestellt und entsprechend ihrer jeweiligen Domänen beschriftet (Falls 2003 b). Die Sequenzen aller hier verwendeten Typ I NRG1-Isoformen entsprechen den Sequenzen der Typ I NRG1-Isoformen bei der Ratte. (A) Ungeschnittenes Typ I NRG1-β4, welches als Matriz zur Klonierung der unter (B) dargestellten Konstrukte diente. (B) HA-Typ I NRG1-β-Konstrukte. Das HA-Epitop (rote Box) und das Signalpeptid (SP, grüne Box) am N-Terminus ihrer Ektodomäne sind gekennzeichnet. Dargestellt sind die hier verwendeten Isoformen Typ I NRG1-β1,- β2 und -β4. (C) Typ I NRG1-β-SEAP-Konstrukte für SEAP-Enzym-Assay-Analysen. Die für Alkaline Phosphatase (AP) kodierende Sequenz unmittelbar N-terminal der β-EGF-ähnlichen Domäne ist gekennzeichnet (rosa Box). Dargestellt ist das Konstrukt Typ I NRG1-β2-SEAP, welches als Matriz für die anderen Konstrukte diente: Typ I NRG1-β1-SEAP, Typ I NRG1-β4-SEAP, Typ I NRG1-β1AA-SEAP (Austausch der AS Glu-Phe→Ala-Ala (AA) im Bereich der juxtamembranären Region) und Typ I NRG1-β1Δ7-SEAP (Deletion von 7 AS in der juxtamembranären Region).

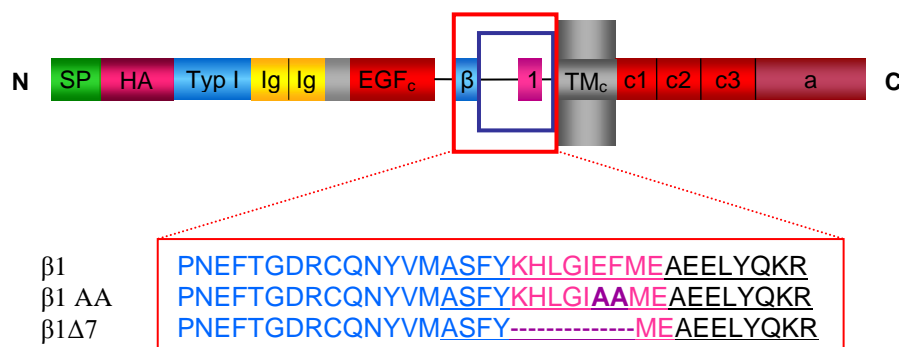


Abb. 15: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Typ I HA-NRG1-β1-Mutationskonstrukte. Die juxtamembranäre Region ist in der Schemazeichnung blau umrahmt. Darunter dargestellt sind die verschiedenen AS-Sequenzen der juxtamembranären Region und der β-EGF-ähnlichen Region von Typ I NRG1-β1 sowie von den Mutationskonstrukten Typ I NRG1-β1AA und Typ I NRG1-β1Δ7. Diese entsprechen der rot umrahmten Region der Schemazeichnung. Die jeweilige juxtamembranäre Region ist unterstrichen. Die spezifische Sequenz der β1-Isoform ist analog der Schemazeichnung rosa und die Mutationen violett hervorgehoben.

3.3. Shedding von Typ I NRG1- β durch BACE1

Im Rahmen der Erforschung von Therapieoptionen der Alzheimer Demenz spielt die Inhibition der β -Sekretase BACE1 zunehmend eine Rolle. Hierbei ist jedoch die Beeinflussung der biologischen Funktionen der BACE1-Substrate zu berücksichtigen. Zu Beginn dieser Arbeit gab es bereits Hinweise darauf, dass Typ III NRG1- β 1 als BACE1-Substrat eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems spielt (Willem et al. 2006). Da neben Typ III NRG1 auch Typ I NRG1 stark neuronal exprimiert wird (Wang et al. 2001, Falls 2003 b), hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, die Beteiligung von BACE1 am Shedding von Typ I NRG1 zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich dabei auf das Shedding der hauptsächlich neuronal exprimierten Isoformen β 1, β 2 und β 4 von Typ I NRG1- β (Wen et al. 1994, Oberto et al. 2001, Wang et al. 2001, Falls 2003 b).

3.3.1. Immunoassay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β durch BACE1

Typ I NRG1- β wird als maturiertes Pro-Protein unter anderem an der Zellmembran exprimiert und prozessiert (Burgess et al. 1995, Loeb et al. 1998, Wang et al. 2001). Durch Vergleich der Oberflächenexpression von transfizierten Typ I NRG1- β -Konstrukten in Zelllinien mit und ohne stabiler BACE1-Überexpression sollte in Immunfluoreszenzanalysen das Shedding von Typ I NRG1- β durch BACE1 nachgewiesen werden. Hierzu wurden HEK 293-Zellen (Kontrollzelllinie) und HEK 293-Zellen mit stabiler BACE1-Überexpression (HEK 293-B1-Zellen) transient mit dem rekombinanten Konstrukt HA-Typ I NRG1- β 4 transfiziert. Der Nachweis von maturiertem HA-Typ I NRG1- β 4 erfolgte in der Oberflächenfärbung durch Detektion von dessen Ektodomäne (HA-Epitop) (Abb. 16 A). In der Oberflächenfärbung wird bei Überexpression von BACE1 (293 B1) eine deutlich reduzierte Oberflächenexpression von maturiertem Typ I NRG1- β 4 im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet (Abb. 16 A). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass Typ I NRG1- β 4 durch BACE1 prozessiert wird.

Um jedoch eine unterschiedliche Transfektionsrate von HEK 293-Zellen im Vergleich zu HEK 293-B1-Zellen als Ursache der reduzierten Oberflächenexpression auszuschließen, wurden im selben Experiment Färbungen von permeabilisierten Zellen durchgeführt (Abb. 16 B). In permeabilisierten Zellen kann im Gegensatz zur Oberflächenfärbung nicht nur ungeschnittenes sondern auch bereits prozessiertes membrangebundenes Protein detektiert werden. Der Nachweis von membrangebundenem Neuregulin erfolgte in der

Färbung permeabilisierter Zellen durch Detektion des NRG1-CT. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von HA-Typ I NRG1- β 4 (NRG1-CT) in HEK 293-B1-Zellen nicht von der Expression in der Kontrollzelllinie unterscheidet. Entsprechend den Ergebnissen aus der Oberflächenfärbung wird auch in permeabilisierten Zellen bei Überexpression von BACE1 (293 B1) ein deutlich reduzierter Nachweis von maturiertem Typ I NRG1- β 4 (HA-Epitop) im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet (Abb. 16 B). Es ist somit anzunehmen, dass die Detektionsunterschiede bezüglich maturiertem Typ I NRG1- β 4 in HEK 293-Zellen mit und ohne BACE1-Überexpression auf der Freisetzung der NRG1-Ektodomäne infolge Shedding durch BACE1 beruhen. Zusammengefasst konnte in den Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, dass BACE1 das Shedding von Typ I NRG1- β 4 katalysiert.

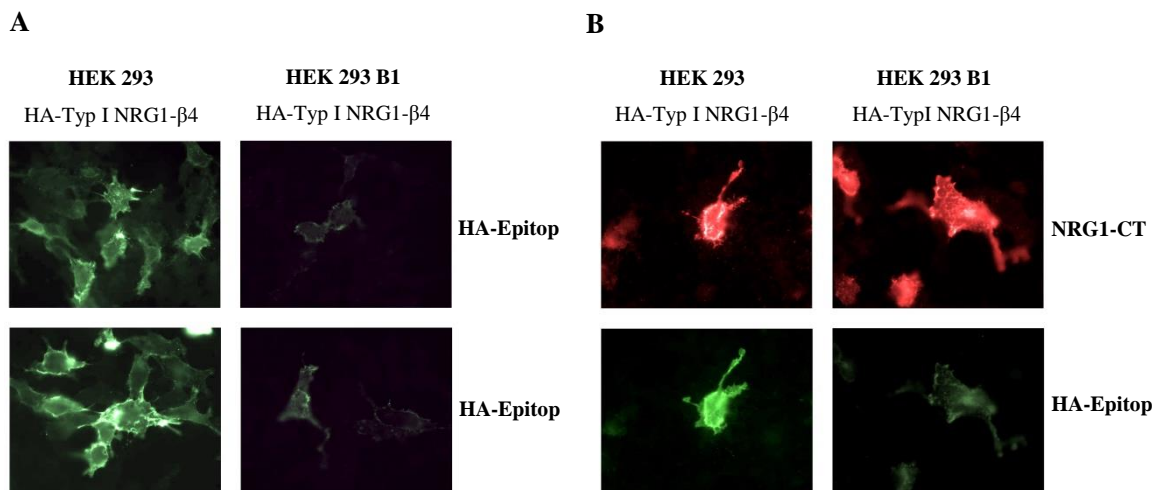


Abb. 16: Prozessierung von Typ I NRG1- β 4 durch BACE1 in der Immunfluoreszenz.

(A) Oberflächenfärbung. HEK 293-Zellen (293) und HEK 293-Zellen mit stabiler BACE1-Überexpression (293 B1) wurden transient mit dem cDNA-Konstrukt HA-Typ I NRG1- β 4 transfiziert und die NRG1-Ektodomäne durch Detektion des HA-Epitops nachgewiesen. (B) Färbung permeabilisierter Zellen. HEK 293-Zellen und HEK 293-B1-Zellen wurden transient mit dem cDNA-Konstrukt HA-Typ I NRG1- β 4 transfiziert. Der simultane Nachweis von Ektodomäne (HA-Epitop) und C-Terminus (CT) erfolgte mit unterschiedlich fluoreszierenden Sekundär-Antikörpern.

Zur weiteren Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β durch BACE1 wurden in der vorliegenden Arbeit Western-Blot-Analysen aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen von Zellen mit und ohne BACE1-Überexpression sowie nach Inhibition der BACE1-Aktivität durchgeführt. Die Analyse des Sheddings konzentriert sich hierbei auf die am stärksten neuronal exprimierten Typ I NRG1- β -Isoformen Typ I NRG1- β 1, - β 2 und - β 4 (Wang et al. 2001, Falls 2003 b). Zu diesem Zweck wurden HEK 293-Zellen mit und ohne stabiler BACE1-Überexpression nach transients Transfektion mit den cDNA-

Konstrukten HA-Typ I NRG1- β 1, - β 2 und - β 4 mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 (2 μ M) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Prozessierungsprodukte der jeweiligen Typ I NRG1- β -Isoformen analysiert. Der Nachweis von membrangebundenem Typ I NRG1- β erfolgte durch Detektion des C-Terminus in Western-Blot-Analysen von Zelllysaten. Sezerniertes Typ I NRG1- β wurde durch Detektion des HA-Epitops in Western-Blot-Analysen von Immunpräzipitationen aus den korrespondierenden Zellkulturüberständen nachgewiesen (Abb. 17).

In HEK 293-Zellen mit endogener BACE1-Expression ist für das Shedding der in dieser Arbeit verwendeten Typ I NRG1- β -Isoformen kein signifikanter Unterschied zwischen Inhibition der BACE1-Aktivität (C3) und unbehandelter Kontrolle zu beobachten (Abb. 17 A & B). Dagegen zeigt sich in Zelllysaten von BACE1 überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Inhibition der BACE1-Aktivität eine Akkumulation der maturierten Typ I NRG1-Isoformen β 1 und β 4, sowie eine entsprechende Reduktion des prozessierten membrangebundenen CTF (Abb. 17 C). In Übereinstimmung hierzu findet sich im entsprechenden Zellkulturüberstand eine deutliche Reduktion der jeweils korrespondierenden Ektodomäne im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 17 D). Im Gegensatz zu den Isoformen β 1 und β 4 resultiert die Inhibition der BACE1-Aktivität in BACE1 überexprimierenden HEK 293-Zellen nicht in einer vermehrten Akkumulation der maturierten Typ I NRG1-Isoform β 2 (Abb. 17 C). Im Vergleich zu den Typ I NRG1-Isoformen β 1 und β 4 ist jedoch insgesamt eine stärkere Akkumulation von maturiertem Typ I NRG1- β 2 sowohl bei Inhibition als auch ohne Inhibition der BACE1-Aktivität in Zelllysaten von HEK 293-Zellen als auch von HEK 293-B1-Zellen nachzuweisen (Abb. 17 A & C). In Übereinstimmung mit der Akkumulation der maturierten β 2-Isoform im Zelllysat findet sich im entsprechenden konditionierten Medium eine deutlich reduzierte Signalintensität der β 2-Ektodomäne verglichen mit den Signalintensitäten der Typ I NRG1-Isoformen β 1 und β 4 (Abb. 17 B & D). Erstaunlicherweise zeigt sich nach Inhibition der BACE1-Aktivität in HEK 293-B1-Zellen eine reduzierte Signalintensität der β 2-Ektodomäne im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 17 D).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest bei BACE1-Überexpression in HEK 293-Zellen die Isoformen Typ I NRG1- β 1 und - β 4 BACE1-Substrate darstellen, wohingegen Typ I NRG1- β 2 nicht oder nur wenig durch BACE1 prozessiert wird.

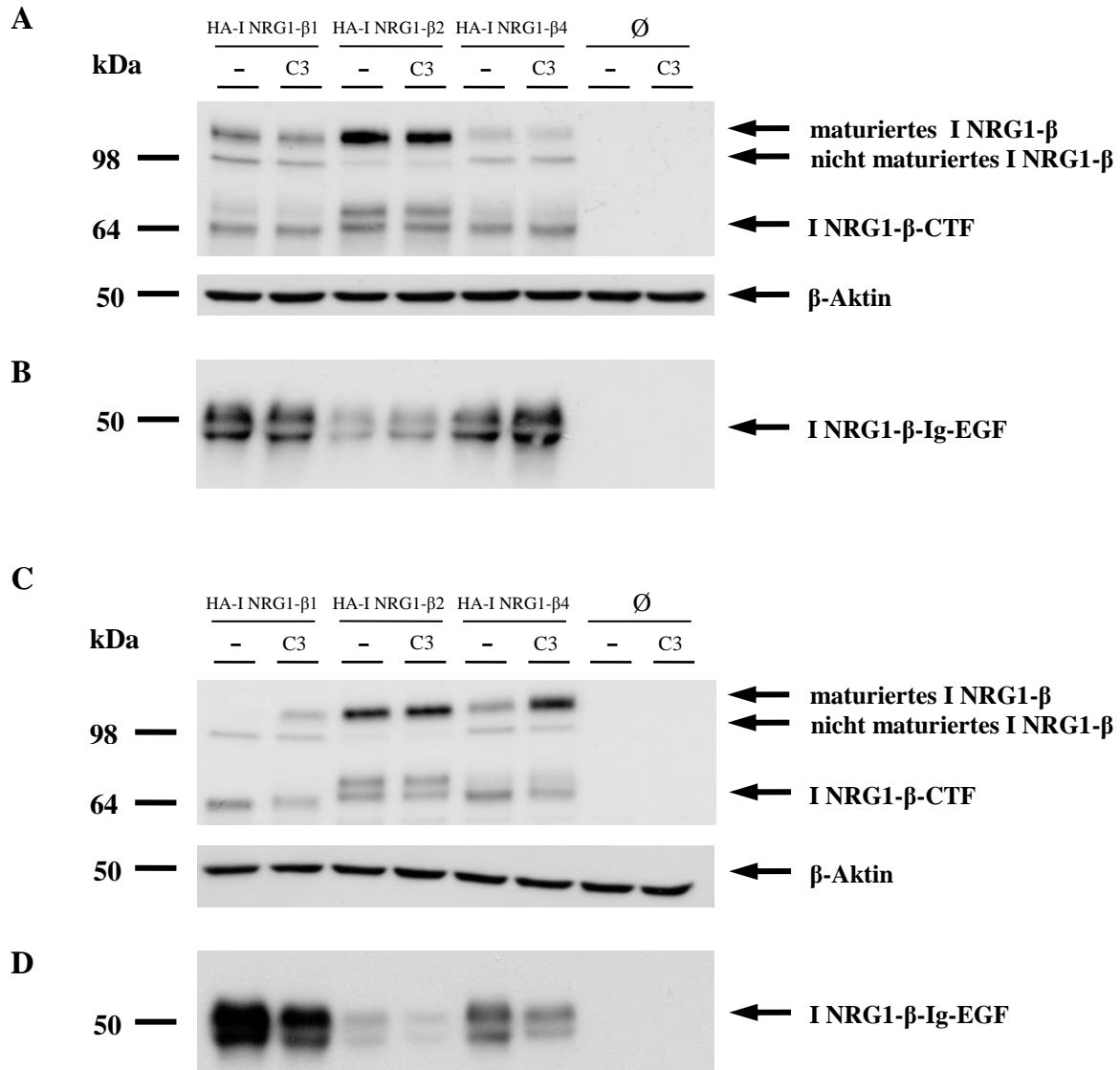


Abb. 17: Prozessierung von Typ I NRG1- β 1, Typ I NRG1- β 2 und Typ I NRG1- β 4 durch BACE1 in HEK 293-Zellen (A, B) und HEK 293-B1-Zellen (C, D). HEK 293-Zellen sowie HEK 293-B1-Zellen wurden transient mit den cDNA-Konstrukten HA-Typ I NRG1- β 1, HA-Typ I NRG1- β 2 und HA-Typ I NRG1- β 4 transfiziert und mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 (2 μ M) über Nacht inkubiert. In Western-Blot-Analysen von STET-Lysaten wurde matures Typ I NRG1- β durch Nachweis des C-Terminus detektiert (Ak Sc-348). Als Ladekontrolle diente der gleichmäßige Nachweis von β -Aktin. Die Pfeile kennzeichnen matures und nicht matures Typ I NRG1- β sowie membrangebundenes Typ I NRG1- β -CTF. In Western-Blot-Analysen von Immunpräzipitationen (IP) aus den entsprechenden Zellkulturüberständen wurde die lösliche Ektodomäne von Typ I NRG1- β durch Nachweis des HA-Epitops detektiert. (A) Lysate von HEK 293-Zellen. (B) IP aus Zellkulturüberständen von HEK 293-Zellen mit Nachweis der löslichen Ektodomäne. (C) Lysate von HEK 293-B1-Zellen. (D) IP aus Zellkulturüberständen von HEK 293-B1-Zellen mit Nachweis der löslichen Ektodomäne.

3.3.2. SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β

Zur besseren Quantifizierung der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Typ I NRG1- β -Ektodomäne wurden SEAP-Enzym-Assay-Analysen durchgeführt. Die Zellkulturüberstände für den SEAP-Enzym-Assay stammten von HEK 293-Zellen, welche zuvor

mit den für diesen Enzym-Assay generierten cDNA-Konstrukten (Abb. 14) transfiziert wurden. Da die Alkaline Phosphatase (AP) in den genannten Konstrukten N-terminal der β -EGF-ähnlichen Domäne und damit auch N-terminal der vermuteten Schnittstelle lokalisiert ist, setzt die Prozessierung der Ektodomäne die EGF-ähnliche Domäne zusammen mit der AP in den Zellkulturüberstand frei. Somit entspricht die im Zellkulturüberstand gemessene AP-Aktivität der relativen Menge an sezerniertem Typ I NRG1- β -SEAP. Sie ist folglich ein indirektes Maß für das Shedding von Typ I NRG1- β -SEAP bzw. der enzymatischen Aktivität der für das Shedding verantwortlichen Sekretase.

Durch Vergleich der Signalintensitäten im Zellkulturüberstand von Zellen mit bzw. ohne BACE1-Überexpression sowie nach Inhibition der BACE1-Aktivität sollte das Shedding der verschiedenen Typ I NRG1- β -Isoformen durch BACE1 bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden HEK 293-Zellen mit und ohne BACE1-Überexpression sowie SH-SY5Y-Zellen transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1- β 1-SEAP, Typ I NRG1- β 2-SEAP und Typ I NRG1- β 4-SEAP transfiziert und teilweise anschließend mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 (2 μ M) über Nacht inkubiert.

In HEK 293-Zellen mit endogener BACE1-Expression ist für das Shedding der in dieser Arbeit verwendeten Typ I NRG1- β -Isoformen kein signifikanter Unterschied zwischen Inhibition der BACE1-Aktivität (C3; 2 μ M) und unbehandelter Kontrolle zu beobachten (Typ I NRG1- β 1 $p=0,49$; $n=6$; Typ I NRG1- β 2 $p=0,22$; $n=6$; Typ I NRG1- β 4 $p=0,95$; $n=6$; Abb. 18).

Verglichen mit der Kontrollzelllinie ist in BACE1 überexprimierenden HEK 293-Zellen ein 2,5-facher signifikanter Anstieg des Sheddings von Typ I NRG1- β 1 festzustellen ($p<0,001$; $n=6$; Abb. 18). Nach Inhibition der BACE1-Aktivität (C3; 2 μ M) in derselben Zelllinie zeigt sich eine signifikante Reduktion des Sheddings um ca. 70 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p<0,001$; $n=6$; Abb. 18) und erstaunlicherweise eine signifikante Reduktion des Sheddings um ca. 35 % im Vergleich zur Kontrollzelllinie ($p<0,001$; $n=6$; Abb. 18). In SH-SY5Y-Zellen kann das Shedding nach Inhibition der endogenen BACE1-Aktivität (C3; 2 μ M) signifikant um ca. 30 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert werden ($p<0,001$; $n=3$; Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen, dass Typ I NRG1- β 1 durch BACE1 prozessiert wird, sowohl bei BACE1-Überexpression in HEK 293-Zellen als auch unter endogenen Bedingungen in SH-SY5Y-Zellen.

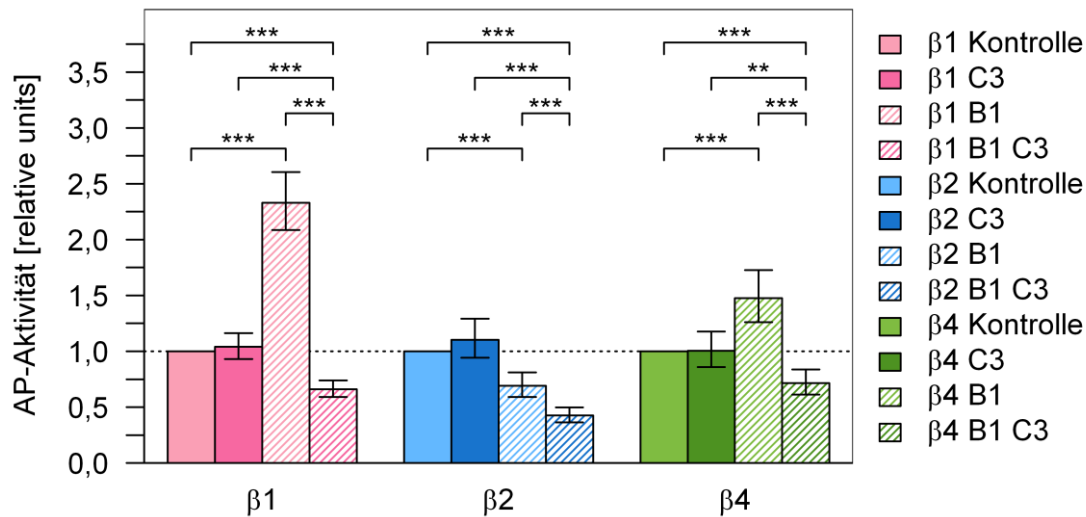


Abb. 18: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β in HEK 293- und HEK 293-B1-Zellen. Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand der transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1- β 1-SEAP (rosa), Typ I NRG1- β 2-SEAP (blau) und Typ I NRG1- β 4-SEAP (grün) transfizierten HEK 293- und HEK 293-B1-Zellen. Schraffierte Balken repräsentieren die relative Menge an löslichem Typ I NRG1- β -SEAP im Zellkulturüberstand von HEK 293-B1-Zellen. Nicht schraffierte Balken repräsentieren das Shedding von Typ I NRG1- β -SEAP in HEK 293-Zellen (Kontrollzelllinie). Inhibitorbehandlung mit C3 (2 μ M) ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die jeweiligen im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzelllinie gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus sechs unabhängigen Experimenten (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Für Typ I NRG1- β 4 ist in BACE1 überexprimierenden HEK 293-Zellen ein signifikanter Anstieg des Sheddings um das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrollzelllinie zu beobachten ($p < 0,001$; $n = 6$; Abb. 18). Nach Inhibition der BACE1-Aktivität (C3; 2 μ M) in derselben Zelllinie wird das Shedding der β 4-Isoform signifikant um ca. 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,001$; $n = 6$; Abb. 18) und erstaunlicherweise signifikant um ca. 30 % im Vergleich zur Kontrollzelllinie ($p < 0,01$; $n = 6$; Abb. 18) reduziert. In SH-SY5Y-Zellen lässt sich kein signifikanter Unterschied für das Shedding der β 4-Isoform nach BACE1-Inhibition verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nachweisen ($p = 0,87$; $n = 3$; Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen, dass Typ I NRG1- β 4 zwar nicht bei endogener BACE1-Expression in den hier verwendeten Zelllinien, jedoch bei Überexpression von BACE1 in HEK 293-Zellen ein Substrat für diese Sekretase darstellt. Bezüglich der Typ I NRG1- β 2-Isoform wird bei BACE1-Überexpression in HEK 293-Zellen eine signifikante Reduktion des Sheddings um ca. 30 % im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet ($p < 0,001$; $n = 6$; Abb. 18), sowie nach Inhibition der BACE1-

Aktivität erstaunlicherweise eine weitere signifikante Abnahme des Sheddings um ca. 40 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,001$; $n=6$; Abb. 18).

In SH-SY5Y-Zellen lässt sich kein signifikanter Unterschied für das Shedding der $\beta 2$ -Isoform nach BACE1-Inhibition verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nachweisen ($p=0,73$; $n=3$; Abb. 19). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass BACE1 in HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen nicht oder zumindest nur in sehr geringem Ausmaß für das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 2$ verantwortlich ist.

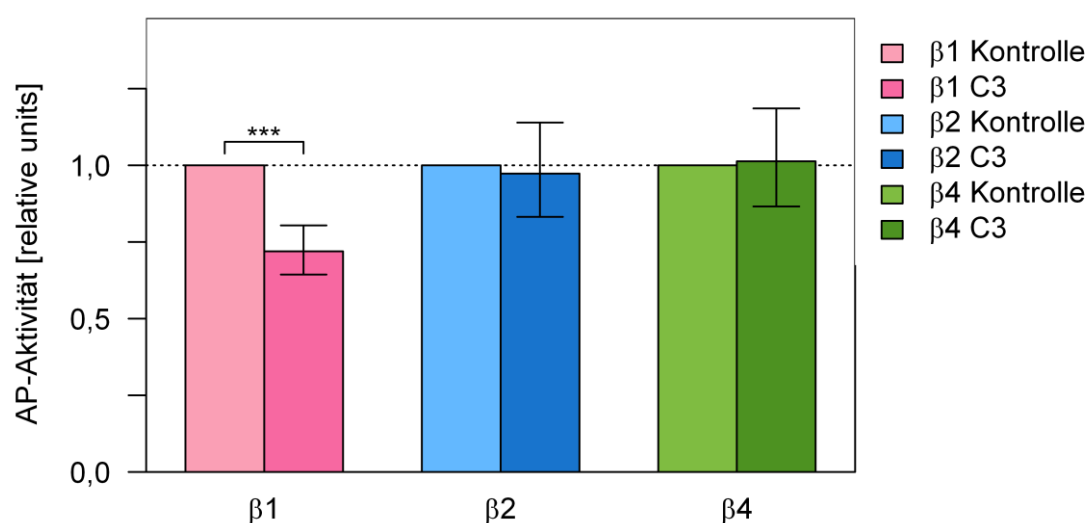


Abb. 19: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β in SH-SY5Y-Zellen.

Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand von transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1- $\beta 1$ -SEAP (rosa), Typ I NRG1- $\beta 2$ -SEAP (blau) und Typ I NRG1- $\beta 4$ -SEAP (grün) transfizierter SH-SY5Y-Zellen. Inhibitorbehandlung mit C3 (2 μ M) ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die jeweiligen im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Die vorliegenden Resultate zeigen, dass das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ und Typ I NRG1- $\beta 4$ durch BACE1 katalysiert wird. Typ I NRG1- $\beta 1$ stellt dabei sowohl bei BACE1-Überexpression in HEK 293-Zellen als auch bei endogener BACE1-Expression in SH-SY5Y-Zellen ein Substrat für BACE1 dar, wohingegen Typ I NRG1- $\beta 4$ nur bei BACE1-Überexpression in HEK 293-Zellen durch BACE1 prozessiert wird.

Für Typ I NRG1- $\beta 2$ konnte in beiden Zelllinien kein Shedding durch BACE1 nachgewiesen werden.

3.3.3. Bestimmung der BACE1-Schnittstelle von Typ I NRG1-β1

3.3.3.1. Bestimmung der BACE1-Schnittstelle von Typ I NRG1-β1 in der MALDI-TOF-MS-Analyse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass BACE1 bevorzugt das Shedding der Typ I NRG1-β1-Isoform katalysiert, wurde im Folgenden die Schnittstelle für BACE1 innerhalb der juxtamembranären Region dieser Isoform in der MALDI-TOF-MS-Analyse charakterisiert (Abb. 20). Hierfür wurde ein Peptid generiert, dessen AS-Sequenz der juxtamembranären Region von Typ I NRG1-β1 entspricht. Die infolge in vitro-Verdau produzierten Schnittprodukte dieses Peptids wurden in der MALDI-TOF-MS-Analyse untersucht, wobei der Peptid-Verdau durch BACE1 zwei Schnittprodukte mit einem Molekulargewicht von 1538 bzw. 1947 Dalton generierte (Abb. 20 B). In Kontrollanalysen mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 konnten diese Schnittprodukte in der MALDI-TOF-MS-Analyse nicht nachgewiesen werden, sondern lediglich das unprozessierte Peptid (Abb. 20 C). Die Inhibitor-Kontrolle bestätigt die Annahme, dass die Generierung der beiden Schnittprodukte infolge BACE1-Enzymverdau erfolgte und zeigt, dass diese Reaktion spezifisch ist.

Die Summe beider Schnittprodukte entspricht in etwa dem Molekulargewicht des unverdauten Peptids mit 3469 Dalton (Abb. 20 A). Aus den Massenwerten der zwei Schnittprodukte konnte unter Kenntnis der Peptidsequenz auf die exakte Schnittstelle innerhalb dieses Peptids und damit innerhalb der juxtamembranären Region von Typ I NRG1-β1 geschlossen werden. Die BACE1-Schnittstelle entspricht dabei einem Schnitt zwischen Aminosäure-Position Glu²³⁶-Phe²³⁷ und Met²³⁸-Glu²³⁹ von humanem Typ I NRG1-β1.

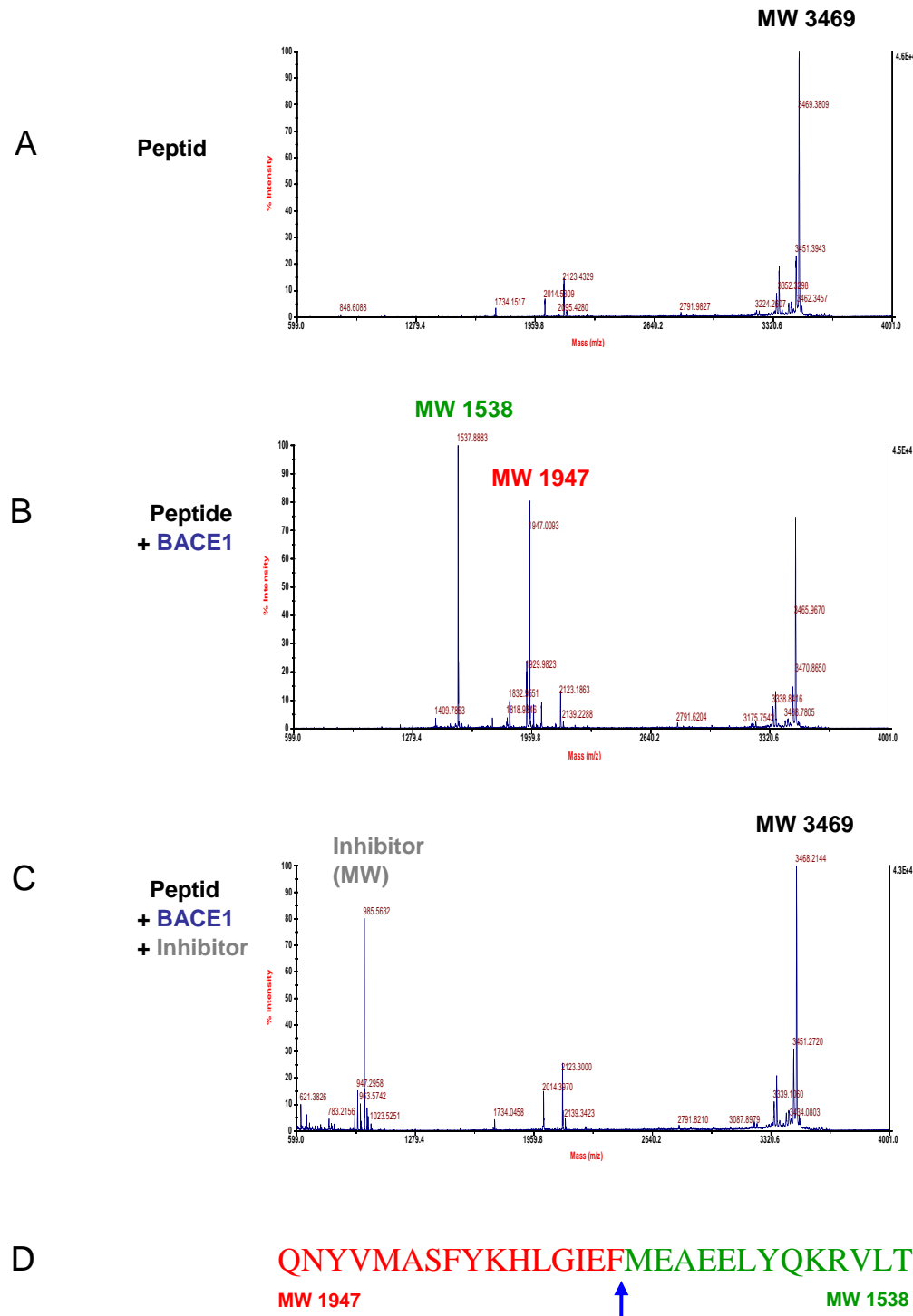


Abb. 20: Bestimmung der BACE1-Schnittstelle von Typ I NRG1- β 1 in der MALDI-TOF-MS-Analyse. Die Skalierung gibt die relative Intensität der Peaks an. Die für die Peaks gemessenen Massenwerte sind jeweils angegeben. **(A)** Abgebildet ist das Massenspektrum eines Peptids, dessen AS-Sequenz der juxtamembranären Region von Typ I NRG1- β 1 entspricht. Das Molekulargewicht des Peptids ist angegeben. **(B)** Abgebildet sind die Massenspektren der Peptidschnittprodukte nach BACE1-Enzym-Verdau sowie unprozessiertes Peptid. Das Molekulargewicht des Peptids sowie das Molekulargewicht von dessen Schnittprodukten ist angegeben. **(C)** Abgebildet sind die Massenspektren des unprozessierten Peptids und des Inhibitors nach Inhibition der BACE1-Aktivität. Es werden keine Schnittprodukte nachgewiesen. Das Molekulargewicht des unprozessierten Peptids ist angegeben. **(D)** Dargestellt ist die Peptidsequenz, wobei die Schnittprodukte farbig hervorgehoben sind (rot; grün) und das jeweilige Molekulargewicht angegeben ist. Die BACE1-Schnittstelle ist markiert (blauer Pfeil).

3.3.3.2. SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β -Schnittstellen-Mutanten

In der MALDI-TOF-MS-Analyse konnte, wie oben gezeigt, die BACE1-Schnittstelle innerhalb der Typ I NRG1- β 1-Ektodomäne ermittelt werden. Um die Sequenzspezifität von BACE1 für die ermittelte Schnittstellen-Sequenz zu untersuchen und die Existenz weiterer BACE1-Schnittstellen innerhalb der juxtamembranären Region von Typ I NRG1- β 1 auszuschließen, wurden Mutationen im Bereich der in dieser Arbeit charakterisierten Schnittstelle eingeführt. Durch den Austausch von zwei AS (Glu-Phe \rightarrow Ala-Ala) bzw. durch Deletion von sieben AS im Bereich der BACE1-Schnittstelle wäre im Falle einer Schnittstellen-Sequenzspezifität für BACE1 bzw. bei Existenz von nur einer einzigen BACE1-Schnittstelle kein weiteres Shedding von Typ I NRG1- β 1 zu erwarten.

Die Prozessierung der Typ I NRG1- β 1-SEAP-Mutationsderivate durch BACE1 wurde im Folgenden in SEAP-Enzym-Assays von Zellkulturüberständen analysiert. Die Zellkulturüberstände stammten dabei von SH-SY5Y-Zellen, sowie von HEK 293-Zellen und HEK 293-B1-Zellen mit und ohne Inhibition der BACE1-Aktivität. Die Zellen wurden hierfür transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1- β 1-SEAP, Typ I NRG1- β 1AA-SEAP und Typ I NRG1- β 1 Δ 7-SEAP (Abb. 14 & 15) transfiziert und anschließend teilweise mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 (2 μ M) über Nacht inkubiert. Die jeweiligen Zellkulturüberstände standen nun für die Analyse im SEAP-Enzym-Assay zur Verfügung (Abb. 21).

Im Gegensatz zur β 1-Isoform zeigt die Inhibition der endogenen BACE1-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen keinen signifikanten Effekt auf das Shedding der AS-Austauschmutante Typ I NRG1- β 1AA-SEAP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p=0,52$; $n=3$; Abb. 21). Auch für die Δ 7-Deletionsmutante lässt sich nach Inhibition der endogenen BACE1-Aktivität kein signifikanter Effekt auf das Shedding nachweisen ($p=0,062$; $n=3$; Abb. 21). Bei Überexpression von BACE1 in HEK 293-Zellen wird im Vergleich zur Kontrollzelllinie kein signifikanter Effekt auf das Shedding der AS-Austauschmutante ($p=0,29$; $n=3$; Abb. 22) im Gegensatz zu Typ I NRG1- β 1 beobachtet. Nach Inhibition der BACE-Aktivität (C3; 2 μ M) in BACE1 überexprimierenden HEK 293-Zellen lässt sich das Shedding der AS-Austauschmutante jedoch erstaunlicherweise um ca. 75 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduzieren ($p<0,001$; $n=3$; Abb. 22).

Zusammengefasst hat die Inhibition der endogenen BACE1-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen keinen signifikanten Effekt auf das Shedding der Typ I NRG1- β 1-Mutanten AA und Δ 7 im Gegensatz zur β 1-Isoform. Ferner resultiert die Überexpression von BACE1

in HEK 293-Zellen in keinem vermehrten Shedding der Typ I NRG1- β 1-AS-Austauschmutante AA im Gegensatz zur β 1-Isoform. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass infolge Mutation der in der MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten BACE1-Schnittstelle, sowohl durch AS-Austausch von Glu-Phe (EF) nach Ala-Ala (AA) als auch durch Deletion von sieben AS (Δ 7), das Shedding von Typ I NRG1- β 1 durch BACE1 verhindert wird. Somit ist anzunehmen, dass BACE1 eine Sequenzspezifität für die in dieser Arbeit ermittelte Schnittstelle innerhalb der juxtamembranären Region besitzt und dass keine weiteren Schnittstellen für BACE1 innerhalb der juxtamembranären Region existieren.

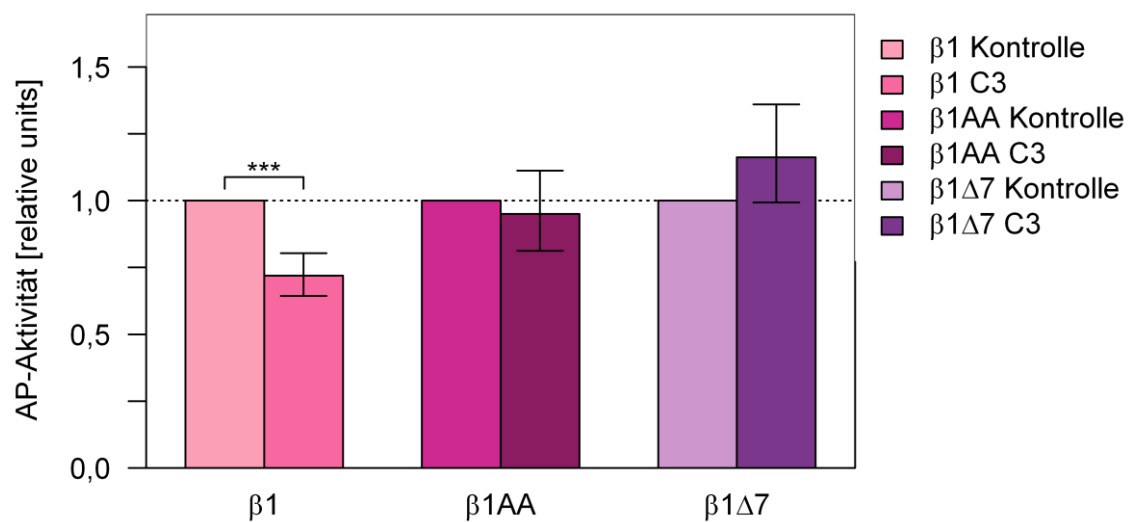


Abb. 21: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings der SEAP-Typ I NRG1- β 1-Mutanten in SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand von transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1- β 1-SEAP (rosa), Typ I NRG1- β 1AA-SEAP (violett) und Typ I NRG1- β 1 Δ 7-SEAP (lila) transfizierten SH-SY5Y-Zellen. Inhibitorbehandlung mit C3 (2 μ M) ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die jeweiligen im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten. (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

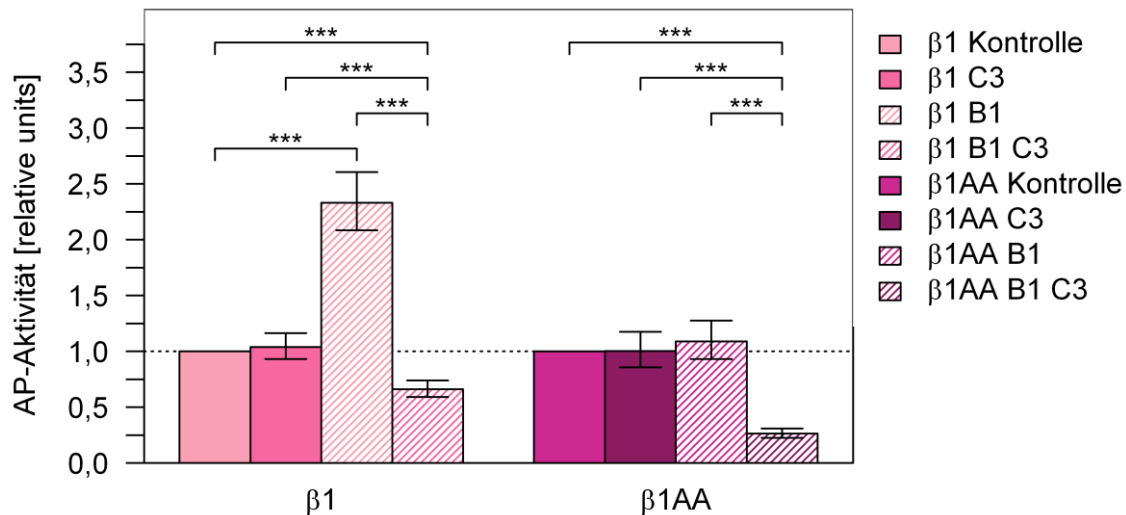


Abb. 22: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings der SEAP-Typ I NRG1-β1-Mutante β1-AA in HEK 293- und HEK 293-B1-Zellen. Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand von transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1-β1-SEAP (rosa) und Typ I NRG1-β1AA-SEAP (violett) transfizierten HEK 293- und HEK 293-B1-Zellen. Schraffierte Balken repräsentieren die relative Menge an löslichem Typ I NRG1-β-SEAP im Zellkulturüberstand von HEK 293-B1-Zellen. Nicht schraffierte Balken repräsentieren das Shedding von Typ I NRG1-β-SEAP in HEK 293-Zellen (Kontrollzelllinie). Inhibitorbehandlung mit C3 (2 μ M) ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die jeweiligen im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzelllinie gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

3.4. Shedding von Typ I NRG1-β durch ADAMs

Da Typ I NRG1 ein Substrat von mindestens einer Disintegrin- und Metalloprotease ist (Montero et al. 2000, Shirakabe et al. 2001, Horiuchi et al. 2005), stellt sich die Frage, ob noch weitere Mitglieder der ADAM-Familie dessen Shedding katalysieren. Ziel dieser Arbeit war es daher unter anderem, das Shedding durch ADAMs und im Besonderen durch ADAM10, zu analysieren.

3.4.1. Stimuliertes Shedding von Typ I NRG1-β

Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass durch Induktion der α -Sekretase-Aktivität das Shedding von Typ I NRG1-β gesteigert werden kann (stimuliertes Shedding). Stimulierung der α -Sekretase-Aktivität mit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 1 μ M; 30 min.) (Burgess et al. 1995) in Typ I NRG1-β4 exprimierenden HEK 293 swe-NRG-Zellen führt zu einer deutlichen Reduktion der Menge an maturiertem Neuregulin, während die Menge des korrespondierenden CTF zunimmt (Abb. 23). Als Kontrolle diente der Nachweis von β APPswe und dessen Schnittprodukten. Die Menge an maturiertem β APPswe ist nach Induktion der α -Sekretase-Aktivität reduziert, während

die Menge an löslichem endogenen APPs- α 770/751 sowie APPs- α swe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht ist.

Diese Beobachtungen zeigen, dass sich das Shedding von Typ I NRG1- β 4 durch Aktivierung der α -Sekretase-Aktivität induzieren lässt.

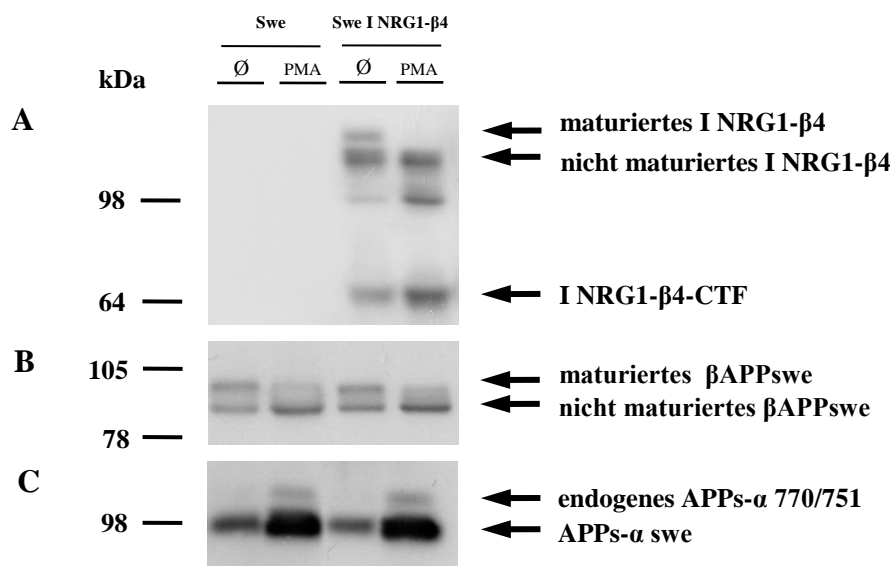


Abb. 23: PMA induziertes Shedding von Typ I NRG1- β 4 und β APPswe (stimuliertes Shedding).

(A) Western-Blot-Analyse aus RIPA-Lysaten von HEK 293 swe-NRG-Zellen mit und ohne stabiler Expression von Typ I NRG1- β 4. Induktion der α -Sekretase-Aktivität erfolgte durch Inkubation mit PMA (1 μ M) über Nacht. Membrangebundenes Typ I NRG1- β 4 wurde mit dem Ak Sc-348 detektiert.

(B&C) Als Kontrolle diente der Nachweis von β APPswe und dessen Schnittprodukten. Membrangebundenes β APPswe wurde in Western-Blot-Analysen mit dem Antikörper 6687 (B), lösliches APPs- α und endogenes APPs- α 770/751 mit dem Antikörper 1736 (C) detektiert.

3.4.2. Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAM10

Das durch α -Sekretasen katalysierte Shedding von Typ I NRG1- β wurde in dieser Arbeit in SEAP-Enzym-Assay-Analysen näher untersucht. Ziel war es, herauszufinden, ob ADAM10 das Shedding von Typ I NRG1- β katalysiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst Inhibitoranalysen mit spezifischen Metalloprotease-Inhibitoren durchgeführt. Hierfür wurden HEK 293-Zellen mit dem cDNA-Konstrukt Typ I NRG1- β 1-SEAP (Abb. 14 & 15) transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit dem BACE1-Inhibitor C3 (10 μ M) (Stachel et al. 2004) oder mit den ADAM- und Matrix-Metallo-Protease-Inhibitoren TAPI-1 (25 μ M; tumor necrosis factor- α protease inhibitor) (Slack et al. 2001), GW (5 μ M; hydroxamate based inhibitor GW280264X) bzw. GI (5 μ M; hydroxamate based inhibitor GI254023X) (Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005) über Nacht inkubiert. TAPI-1 ist ein Inhibitor für Matrix-Metalloproteasen (MMP) und im Besonderen ein Inhibitor für ADAM17 (Slack et al. 2001). Ferner wird für TAPI-

1 eine inhibitorische Wirkung auf die konstitutive Freisetzung von APPs- α in HEK 293-Zellen durch ADAM10 beschrieben (Kuhn et al. 2010). TAPI-1 inhibiert zudem das Shedding des Transmembranproteins CADM1, wobei gezeigt werden konnte, dass ADAM10 die für das Shedding von CADM1 verantwortliche Sekretase ist (Nagara et al. 2012). Somit ist anzunehmen, dass TAPI-1 das ADAM10 abhängige Shedding von CADM1 inhibiert. Der Inhibitor GW inhibiert gleichermaßen ADAM10 und ADAM17 (Ludwig et al. 2005). GI ist ein Inhibitor für ADAM10 als auch für ADAM17, inhibiert jedoch ADAM10 mit einer 100-fach höheren Potenz als ADAM17 (Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005). Zur Vermeidung von Fehlern, die aus zu niedrigen bzw. zu hohen und damit toxischen Inhibitor-Konzentrationen resultieren, wurden in dieser Arbeit Inhibitorkonzentrationen verwendet, die bereits von anderen Arbeitsgruppen in HEK-Zellen erprobt wurden (Slack et al. 2001, Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005, Willem et al. 2006, Kuhn et al. 2010, Luo et al. 2011). In Kenntnis dieser Erfahrungen wurde in der vorliegenden Arbeit auf einen Toxizitäts-Assay verzichtet. Aufgrund begrenzter Verfügbarkeit der Inhibitoren GI und GW wurde die in Abb. 24 dargestellte SEAP-Enzym-Assay-Analyse nur für die Isoform Typ I NRG1- β 1 durchgeführt. Alle folgenden Analysen bezüglich des Sheddings der Typ I NRG1- β -Isoformen durch ADAMs erfolgten dagegen nur mit TAPI-1.

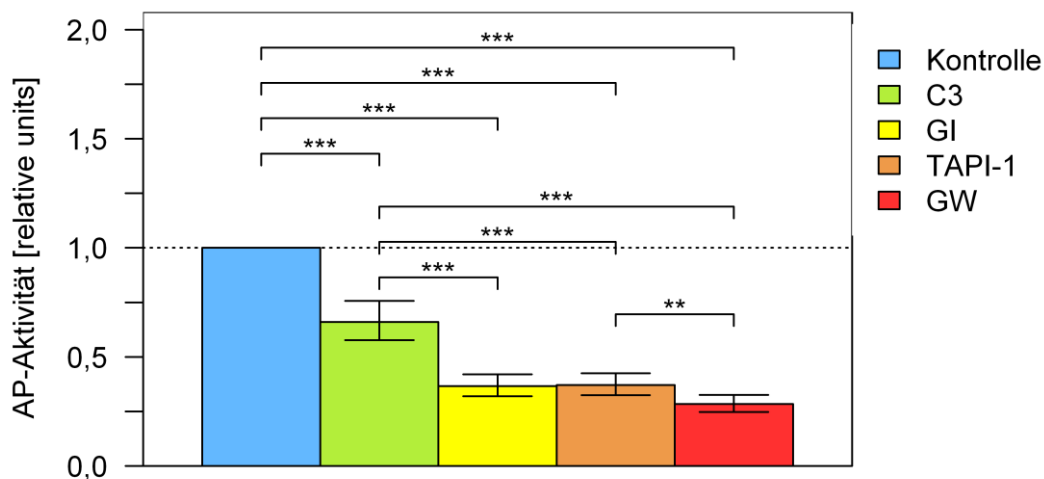


Abb. 24: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1- β 1 in HEK 293-Zellen durch ADAMs und BACE1. Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand von transient mit dem cDNA-Konstrukt Typ I NRG1- β 1-SEAP transfizierter HEK 293-Zellen nach Inkubation mit dem BACE1 spezifischen Inhibitor C3 (10 μ M; grüner Balken), sowie den ADAM-Inhibitoren GI (5 μ M; gelber Balken) bzw. TAPI-1 (50 μ M; orangener Balken) und GW (5 μ M; roter Balken). Die Balken repräsentieren die relative Menge an löslichem Typ I NRG1- β 1-SEAP im Zellkulturüberstand. Die im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Inhibition der BACE1-Aktivität mit dem Inhibitor C3 (10 μ M) führt zu einer signifikanten Reduktion des Sheddings der β 1-Isoform um ca. 34 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 24). Im Vergleich zu den hier verwendeten ADAM-Inhibitoren lässt sich das Shedding von Typ I NRG1- β 1 durch den BACE1-Inhibitor C3 zwar signifikant, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß reduzieren. Dies könnte darauf hinweisen, dass in HEK 293-Zellen, welche eine niedrige endogene BACE1-Expression aufweisen (Luo et al. 2011), das Shedding von Typ I NRG1- β 1 überwiegend durch ADAMs und in geringerem Maße durch BACE1 katalysiert wird. In Übereinstimmung hiermit steht auch, dass bei Verwendung einer geringeren Konzentration des BACE-Inhibitors C3 (2 μ M) kein Effekt auf das Shedding von Typ I NRG1- β 1 in HEK 293 Zellen beobachtet wird (Abb. 17 & 18).

Durch Inhibitorbehandlung mit GI und TAPI-1 zeigt sich eine signifikante Reduktion des Sheddings von Typ I NRG1- β 1 jeweils um ca. 63 % (GI: $p < 0,001$; $n=3$; TAPI-1: $p < 0,001$; $n=3$; Abb. 24), bei Verwendung des Inhibitors GW sogar eine signifikante Reduktion des Sheddings um ca. 72 % ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 24) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da die ADAM10 spezifischen Inhibitoren GI und GW das Shedding von Typ I NRG1- β 1 reduzieren, ist anzunehmen, dass ADAM10 das Shedding dieser Isoform katalysiert. TAPI-1 und GI inhibieren das Shedding von Typ I NRG1- β 1 im selben Ausmaß (Abb. 24). Somit kann angenommen werden, dass bei den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitorkonzentrationen TAPI-1 ebenfalls das ADAM10 katalysierte Shedding der β 1-Isoform inhibiert.

Um die Annahme zu bestätigen, dass ADAM10 das Shedding der β 1-Isoform katalysiert, wurde das Shedding dieser Isoform in Überexpressionsmodellen untersucht. Ergänzend hierzu wurde die Bedeutung von ADAM10 für die Proteolyse der Typ I NRG1- β -Isoformen β 2 und β 4 ebenfalls mit Hilfe von Überexpressionsmodellen analysiert. Hierfür wurden HEK 293-Zellen mit und ohne ADAM10-Überexpression (freundlicher Weise von Dr. Anja Capell zur Verfügung gestellt) mit den für den SEAP-Enzym-Assay generierten cDNA-Konstrukten transient transfiziert (Abb. 14 & 15) und anschließend mit TAPI-1 (25 μ M) über Nacht inkubiert.

Vergleicht man im SEAP-Enzym-Assay die Signalintensitäten zwischen HEK 293-Zellen mit und ohne ADAM10-Überexpression (Abb. 25), so zeigt sich eine signifikante Zunahme des Sheddings der β 1-Isoform bei ADAM10-Überexpression um das 1,2-fache ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 25). Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 resultiert sowohl in HEK 293-Zellen mit ADAM10-Überexpression ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 25) als auch ohne ADAM10-

Überexpression ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 25) in einer signifikanten Reduktion des Sheddings von Typ I NRG1- $\beta 1$ um jeweils ca. 30 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Beobachtungen bestätigen, dass Typ I NRG1- $\beta 1$ ein Substrat von ADAM10 darstellt.

Im Gegensatz zu Typ I NRG1- $\beta 1$ lässt sich für die $\beta 2$ -Isoform kein signifikanter Effekt auf das Shedding infolge Überexpression von ADAM10 nachweisen ($p=0,59$, $n=3$; Abb. 25). Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 resultiert jedoch in HEK 293-Zellen mit ADAM10-Überexpression in einer signifikanten Reduktion des Sheddings um ca. 60 % ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 25) und in HEK 293-Zellen ohne ADAM10-Überexpression ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 25) in einer signifikanten Reduktion des Sheddings von Typ I NRG1- $\beta 2$ um ca. 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch in SH-SY5Y-Zellen, welche analog der HEK 293-Zellen mit den für den SEAP-Enzym-Assay generierten cDNA-Konstrukten transient transfiziert (Abb. 14 & 15) und anschließend mit TAPI-1 (25 μM) über Nacht inkubiert wurden, lässt sich das Shedding der $\beta 2$ -Isoform signifikant um ca. 55 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduzieren ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 26). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Typ I NRG1- $\beta 2$ von Sekretasen prozessiert wird, welche durch TAPI-1 inhibiert werden. Sie ermöglichen jedoch keine Aussage dazu, um welche spezifische Sekretase es sich handelt. Da kein signifikanter Effekt infolge ADAM10-Überexpression auf das Shedding der $\beta 2$ -Isoform beobachtet wird, ist jedoch anzunehmen, dass ADAM10 keine oder nur eine geringe Bedeutung für das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 2$ zukommt.

Für Typ I NRG1- $\beta 4$ kann weder ein signifikanter Effekt auf das Shedding infolge Überexpression von ADAM10 in HEK 293-Zellen ($p=0,31$; $n=3$; Abb. 25), noch infolge Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 in HEK 293-Zellen ($p=0,095$; $n=3$; Abb. 25) bzw. in SH-SY5Y-Zellen ($p=0,92$; $n=3$; Abb. 26) beobachtet werden. In diesem Enzym-Assay lässt sich somit keine Bedeutung von ADAM10 oder ADAM17 für das Shedding der $\beta 4$ -Isoform nachweisen.

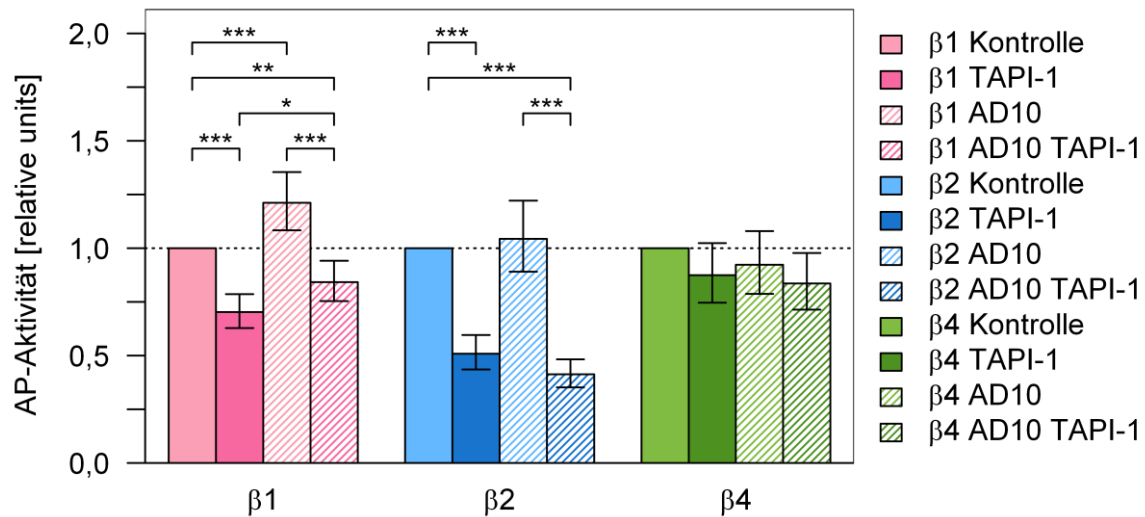


Abb. 25: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1-β bei ADAM10-Überexpression. Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand von transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1-β1-SEAP (rosa), Typ I NRG1-β2-SEAP (blau) und Typ I NRG1-β4-SEAP (grün) transfizierter HEK 293-Zellen bzw. HEK 293-AD10-Zellen. Schraffierte Balken repräsentieren die relative Menge an löslichem Typ I NRG1-β-SEAP im Zellkulturüberstand von HEK 293-AD10-Zellen, nicht schraffierte Balken repräsentieren das Shedding von Typ I NRG1-β-SEAP in HEK 293-Zellen (Kontrollzelllinie). Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 (25 μM) ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

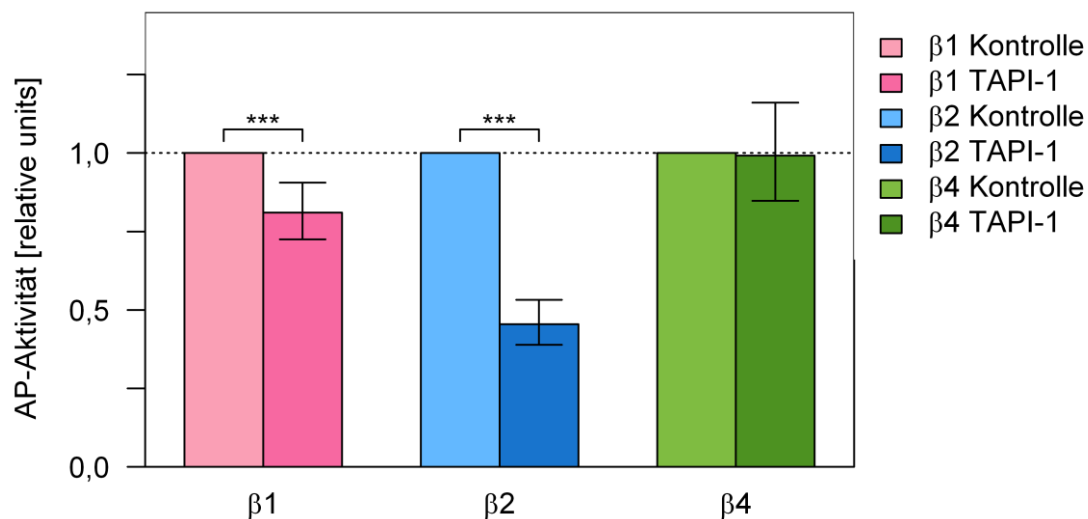


Abb. 26: SEAP-Enzym-Assay-Analyse des Sheddings von Typ I NRG1-β in SH-SY5Y-Zellen durch ADAMs. Dargestellt ist die Alkaline Phosphatase (AP)-Aktivität im Zellkulturüberstand von transient mit den cDNA-Konstrukten Typ I NRG1-β1-SEAP (rosa), Typ I NRG1-β2-SEAP (blau) und Typ I NRG1-β4-SEAP (grün) transfizierter SH-SY5Y-Zellen. Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 (25 μM) ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die jeweils hellere Farbtönung repräsentiert das Shedding von I NRG1-β-SEAP in unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Kontrolle). Die im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

Zusammengefasst stellt Typ I NRG1- β 1 ein Substrat für die α -Sekretase ADAM10 in HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen dar. Denn sowohl die Überexpression von ADAM10, als auch die Behandlung mit ADAM10 spezifischen Inhibitoren zeigen einen signifikanten Effekt auf das Shedding dieser Isoform. Für die β 2-Isoform wird zwar eine signifikante Reduktion des Sheddings infolge Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 in HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen, jedoch kein signifikanter Effekt infolge ADAM10-Überexpression beobachtet. Somit ist anzunehmen, dass Typ I NRG1- β 2 nicht oder nur in geringem Ausmaß durch ADAM10, sondern durch andere TAPI-1 sensitive ADAMs oder MMPs prozessiert wird. Typ I NRG1- β 4 stellt kein Substrat für ADAM10 dar. Denn sowohl Überexpression von ADAM10 als auch die Behandlung mit TAPI-1 zeigen keinen signifikanten Effekt auf das Shedding dieser Isoform.

3.4.3. Kompensation des BACE1-abhängigen Sheddings von Typ I NRG1- β 1 durch ADAMs

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl BACE1 als auch ADAM10 das Shedding von Typ I NRG1- β 1 in HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen katalysieren. Für BACE1 konnte dabei die spezifische Schnittstelle von Typ I NRG1- β 1 identifiziert werden.

In SH-SY5Y-Zellen, welche transient mit den für den SEAP-Enzym-Assay generierten cDNA-Konstrukten (Abb. 14 & 15) transfiziert und über Nacht mit TAPI-1 (25 μ M) inkubiert wurden, wird das Shedding der Typ I NRG1- β 1-Deletionsmutante (Δ 7) signifikant stärker im Vergleich zu Typ I NRG1- β 1 inhibiert ($p < 0,001$; $n=3$; Abb. 27). Es ist somit anzunehmen, dass die Deletionsmutante (Δ 7) im Vergleich zur β 1-Isoform das bevorzugte Substrat für ADAMs darstellt. Vermutlich wird das BACE1-abhängige Shedding, welches infolge Deletion der BACE1-Schnittstelle (Δ 7) vermindert ist, durch ADAMs kompensiert und kann folglich stärker durch TAPI-1 inhibiert werden. Da das Shedding der Deletionsmutante (Δ 7) im Vergleich zur Typ I NRG1- β 1-AS-Austauschmutante (AA) signifikant stärker durch TAPI-1 inhibiert wird ($p < 0,01$; $n=3$; Abb. 27), kann angenommen werden, dass die Deletionsmutante (Δ 7) im Vergleich zur AS-Austauschmutante (AA) das bevorzugte Substrat für ADAMs darstellt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass infolge Deletion von sieben Aminosäuren im Bereich der BACE1-Schnittstelle (Δ 7) das Shedding durch BACE1 stärker als durch AS-Austausch (AA) blockiert wird und somit das Shedding der Deletionsmutante vermutlich stärker als das Shedding der AS-Austauschmutante durch ADAMs kompensiert werden kann.

3.4.4. Die Länge der juxtamembranären Region beeinflusst das Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAMs

Vergleicht man die Typ I NRG1- β -Isoformen bzw. -Schnittstellen-Mutanten bezüglich ihres Sheddings durch ADAMs, so fällt auf, dass die Länge der juxtamembranären Region einen entscheidenden Einfluss auf das Shedding der jeweiligen Isoform bzw. Typ I NRG1- β -Mutante hat. Je kürzer die juxtamembranäre Region der jeweiligen Typ I NRG1- β -Isoform bzw. der β 1-Schnittstellen-Mutante ist, desto stärker wird das Shedding durch TAPI-1 in SH-SY5Y-Zellen inhibiert (Abb. 27). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Typ I NRG1- β -Isoformen mit einer kürzeren juxtamembranären Region, wie es für Typ I NRG1- β 2 und die Typ I NRG1- β 1-Deletetions-Mutante (Δ 7) der Fall ist, bevorzugte ADAM-Substrate darstellen im Vergleich zu solchen mit einer längeren juxtamembranären Region.

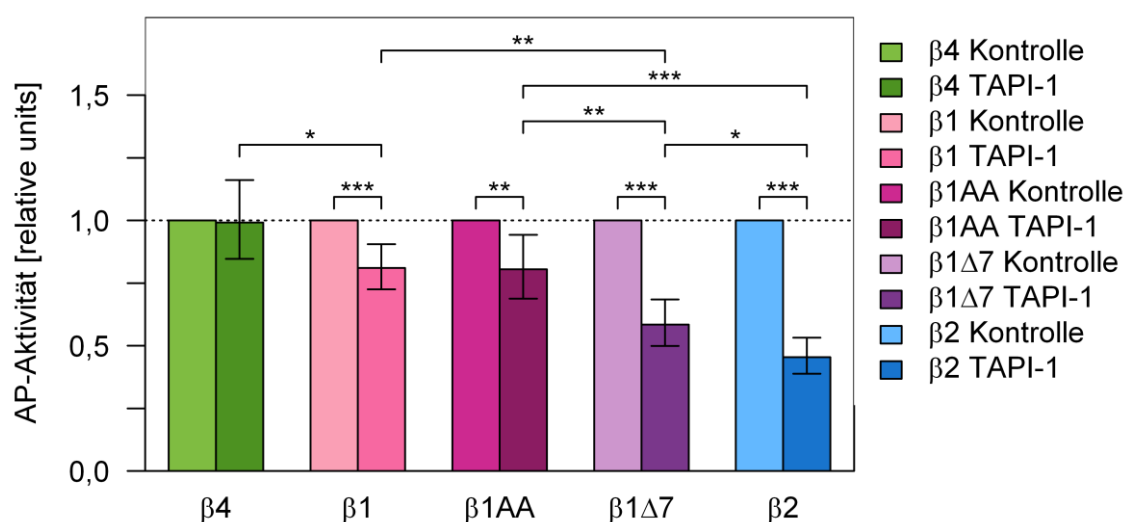


Abb. 27: Die Länge der juxtamembranären Region ist ausschlaggebend für das Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAMs. In Analogie zu der in Abb. 26 dargestellten SEAP-Enzym-Assay-Analyse wurde neben dem Shedding von Typ I NRG1- β 4-SEAP (grün), Typ I NRG1- β 1-SEAP (rosa) und Typ I NRG1- β 2-SEAP (blau) zudem das Shedding der Typ I NRG1- β 1-Mutanten Typ I NRG1- β 1AA-SEAP (violett) und Typ I NRG1- β 1 Δ 7-SEAP (lila) durch ADAMs in SH-SY5Y-Zellen analysiert. Inhibitorbehandlung mit TAPI-1 ist durch die jeweils dunklere Farbtönung gekennzeichnet. Die im Zellkulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Werte für die AP-Aktivität wurden gleich „1“ und die übrigen Messwerte hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle aus drei unabhängigen Experimenten (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001).

4. Diskussion

Die Alzheimer Erkrankung ist die häufigste Form der Demenz. Sie manifestiert sich klinisch zunächst als Störung des Gedächtnisses und des Sprachvermögens. Später führt sie zu Veränderungen der Persönlichkeit und letztendlich zur Bettlägerigkeit und zum Tod des Patienten. Die ausgeprägte Hirnatrophie, welche diesem Krankheitsbild zugrunde liegt, resultiert aus einer progredienten neuronalen Degeneration. Für diese wird vor allem eine gesteigerte Sezernierung des β -Amyloid-Peptids ($A\beta$) verantwortlich gemacht, welches aus der Prozessierung des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins (β APP) entsteht. Für die Prozessierung von β APP sind die Sekretasen ADAM10 (α -Sekretase), BACE1 (β -Sekretase) und der γ -Sekretase-Komplex verantwortlich. Vielversprechende Therapieansätze stellen daher spezifische Inhibitoren für BACE1 und den γ -Sekretase-Komplex, sowie Aktivatoren für ADAM10 dar. Um gezielt solche spezifischen Inhibitoren bzw. Aktivatoren entwickeln zu können, ist es notwendig, die Eigenschaften und weiteren Substrate dieser Sekretasen zu kennen. Neuregulin (NRG), ein Mitglied der EGF-Familie von Wachstumsfaktoren, scheint sowohl für α -Sekretasen, für die β -Sekretase BACE1 als auch für den γ -Sekretase-Komplex ein Substrat darzustellen. Dabei dient die proteolytische Freisetzung der Ektodomäne (Shedding) von Neuregulin der parakrinen Signaltransduktion.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BACE1 das Shedding von Typ I NRG1- β 1 und Typ I NRG1- β 4 katalysiert, wogegen Typ I NRG1- β 2 nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß durch BACE1 prozessiert wird. Für Typ I NRG1- β 1 konnte die exakte Schnittstelle von BACE1 innerhalb der juxtamembranären Region zwischen Aminosäure-Position Glu²³⁶-Phe²³⁷ und Met²³⁸-Glu²³⁹ (EF-ME) von humanem Typ I NRG1- β 1 charakterisiert werden.

Für die α -Sekretase ADAM10 wurde gezeigt, dass diese das Shedding von Typ I NRG1- β 1 katalysiert. Typ I NRG1- β 2 wird jedoch nicht oder nur in geringem Ausmaß durch ADAM10 prozessiert. Das Shedding der β 2-Isoform erfolgt durch TAPI-1 sensible Sekretasen, wobei die vorliegenden Ergebnisse keine Aussage dazu ermöglichen, um welche spezifische Sekretase es sich handelt. Dagegen konnte für Typ I NRG1- β 4 gezeigt werden, dass diese Isoform weder durch ADAM10 noch durch ADAM17 prozessiert wird. Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Typ I NRG1- β ein Substrat für den γ -Sekretase-Komplex darstellt. Nach erfolgtem Shedding von Typ I NRG1- β katalysiert die γ -Sekretase dessen intramembranäre Proteolyse durch einen Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne.

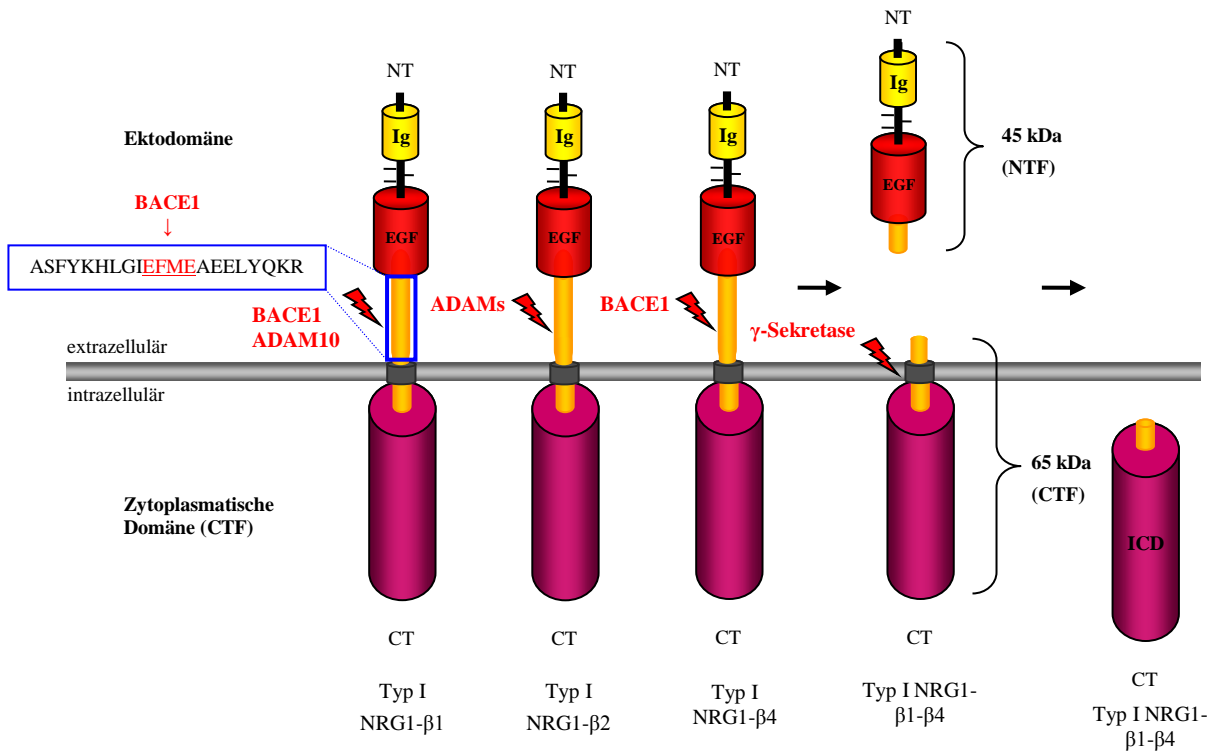


Abb. 28: Schematische Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Dargestellt ist die intramembranäre Proteolyse der verschiedenen Typ I NRG1-Isoformen $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 4$. Die Prozessierung des maturierten Typ I NRG1- β (110 kDa) innerhalb der juxtamembranären Region (Shedding) generiert ein lösliches Fragment (NTF) mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, sowie ein membrangebundenes zytoplasmatisches Fragment (CTF) mit einem Molekulargewicht von 65 kDa.

Die juxtamembranäre Region von Typ I NRG1- $\beta 1$ ist in der Schemazeichnung blau umrahmt. Ihre spezifische Sequenz ist hervorgehoben und ebenfalls blau umrahmt. Das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ wird sowohl durch BACE1 als auch durch ADAM10 katalysiert. Die Schnittstellensequenz von BACE1 innerhalb der juxtamembranären Region ist rot hervorgehoben und durch einen Pfeil markiert.

Typ I NRG1- $\beta 2$ wird durch ADAMs prozessiert, wobei jedoch die vorliegenden Ergebnisse keine Aussage dazu ermöglichen, welche die verantwortliche α -Sekretase ist.

Typ I NRG1- $\beta 4$ wird durch BACE1, jedoch nicht durch die α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17, prozessiert.

Die Freisetzung der intrazellulären Domäne (ICD) aller drei Typ I NRG1- β -Isoformen erfolgt via Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne des zytoplasmatischen Fragments (CTF) durch den γ -Sekretase-Komplex.

4.1. Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1- β

4.1.1. Shedding von Typ I NRG1- β

In Western-Blot-Analysen wurden die verschiedenen Schnittprodukte von Typ I NRG1- β sowie nicht prozessiertes Neuregulin nachgewiesen. Das in dieser Arbeit beschriebene Molekulargewicht der verschiedenen membrangebundenen Fragmente sowie von ungeschnittenem Typ I NRG1- β (Abb. 13 & 17) stimmt mit den Ergebnissen vorheriger Studien überein (Burgess et al. 1995, Montero et al. 2000, Wang et al. 2001).

Entsprechend den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen werden für ungeschnittenes Neuregulin zwei Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektiert, wobei maturiertes Protein im Vergleich zu nicht maturiertem Typ I NRG1- β ein größeres Molekulargewicht aufweist (Burgess et al. 1995, Montero et al. 2000, Wang et al. 2001). Dieser Unterschied von ca. 10 kDa wird durch Glykosylierungen im Bereich der Ektodomäne hervorgerufen (Burgess et al. 1995, Lu et al. 1995). Die lösliche Ektodomäne (N-terminal fragment; NTF) von Typ I NRG1- β wurde aus Zellkulturüberständen in Western-Blot-Analysen mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und 50 kDa detektiert. Andere Arbeitsgruppen beschreiben jedoch ein Molekulargewicht von 40 kDa bzw. 45 kDa (Wen et al. 1994, Loeb und Fischbach 1995, Lu et al. 1995, Wang et al. 2001). Der Größenunterschied von 5 kDa lässt sich durch die Konjugation des 5 kDa großen HA-Tags an den N-Terminus des NTF in dieser Arbeit erklären.

Anstelle einer einzelnen Bande für die lösliche Ektodomäne wurden in dieser Arbeit stets zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und 50 kDa detektiert (Abb. 17). Die Detektion von jeweils zwei Banden sowie deren Größenunterschied von 5 kDa könnten dadurch bedingt sein, dass neben maturiertem auch nicht maturiertes Neuregulin prozessiert wird. Mit Hilfe von „pulse/chase“-Experimenten könnte in folgenden Arbeiten untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die unterschiedlich N-glykosylierten Formen von Typ I NRG1- β während ihrer Maturierung prozessiert werden.

4.1.2. Intramembranäre Proteolyse von Typ I NRG1- β durch den γ -Sekretase-Komplex

In dieser Arbeit konnte durch Inhibition des γ -Sekretase-Komplexes die proteolytische Prozessierung innerhalb der Transmembrandomäne von Typ I NRG1- β 4 gehemmt werden (Abb. 13). Somit ist anzunehmen, dass der γ -Sekretase-Komplex die verantwortliche Protease für die proteolytische Prozessierung innerhalb der Transmembrandomäne von Typ I NRG1- β 4 darstellt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der für Typ III NRG1 (Bao et al. 2003), als auch für andere Transmembranproteine beschriebenen proteolytischen Prozessierung durch den γ -Sekretase-Komplex (Haass und Steiner 2002, Steiner et al. 2008, Struhl und Adachi 2000).

Da sich die Typ I NRG1- β -Isoformen lediglich im Bereich der juxtamembranären Region unterscheiden, kann angenommen werden, dass sich die proteolytische Prozessierung der

weiteren Typ I NRG1- β -Isoformen durch den γ -Sekretase-Komplex nicht von der proteolytischen Prozessierung der β 4-Isoform unterscheidet.

4.2. Shedding von Typ I NRG1- β durch BACE1

4.2.1. Typ I NRG1- β 1 und - β 4 sind Substrate von BACE1

In dieser Arbeit konnte zunächst in Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, dass BACE1 das Shedding von Typ I NRG1- β 4 katalysiert. Dies konnte in Western-Blot-Analysen und SEAP-Enzym-Assay-Analysen bestätigt werden. Sowohl in Western-Blot-Analysen als auch im SEAP-Enzym-Assay konnte gezeigt werden, dass BACE1 neben Typ I NRG1- β 4 das Shedding der β 1-Isoform katalysiert. Typ I NRG1- β 1 stellt dabei das bevorzugte Substrat für BACE1 dar. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Isoformen wird Typ I NRG1- β 2 nicht oder nur wenig durch BACE1 prozessiert (Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19).

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Inhibition der BACE1-Aktivität in HEK 293-B1-Zellen das Shedding von Typ I NRG1- β 1 und - β 4 im SEAP-Enzym-Assay nicht über das Ausmaß des Sheddings der unbehandelten Kontrollzelllinie hinaus reduzieren würde. Erstaunlicherweise resultiert die Inhibition der BACE1-Aktivität in HEK 293-B1-Zellen jedoch in einer Reduktion des Sheddings um 35 % bzw. 30 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelllinie (Abb. 18), wofür es keine plausible Erklärung gibt. Neben Inhibitoranalysen sind daher in weiterführenden Arbeiten BACE1-„Knockout“-Studien *in vitro* als auch *in vivo* erforderlich, um die Bedeutung von BACE1 am Shedding von Typ I NRG1- β 1 und - β 4 zu klären.

Erstaunlicherweise resultiert Überexpression von BACE1 in einer leichten Reduktion des Sheddings der β 2-Isoform im SEAP-Enzym-Assay. Nach Inhibition der BACE1-Aktivität wird deren Shedding sogar noch weiter reduziert (Abb. 18). Da auch in den Western-Blot-Analysen eine Abnahme des Sheddings von Typ I NRG1- β 2 nach BACE1-Inhibition in HEK 293-B1-Zellen beobachtet wird (Abb. 17), kann angenommen werden, dass dieser Effekt nicht spezifisch für den SEAP-Enzym-Assay ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Typ I NRG1- β 2 nicht durch BACE1, sondern durch andere Sekretasen prozessiert wird, wobei Überexpression von BACE1 das Shedding durch diese Sekretasen beeinträchtigen könnte. Mit dieser Vermutung nicht vereinbar ist jedoch die Tatsache, dass bei Inhibition der BACE1-Aktivität das Shedding noch weiter reduziert wird. Letztendlich gibt es keine ausreichende Erklärung für die bei BACE1-Überexpression beobachteten Effekte auf das Shedding der β 2-Isoform. Um die

Bedeutung von BACE1 am Shedding der $\beta 2$ -Isoform zu klären, sind in weiterführenden Arbeiten BACE1-„Knockout“-Studien in vitro als auch in vivo erforderlich.

Unter endogenen Bedingungen unterscheidet sich das durch BACE1 katalysierte Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ in HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen. So wird das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ in SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu HEK 293-Zellen bereits bei einer geringeren BACE1-Inhibitorkonzentration (2 μM ; Abb. 18 & 19) inhibiert. In HEK 293-Zellen, welche eine niedrige endogene BACE1-Expression aufweisen (Westmeyer et al. 2004), zeigt erst eine höhere Inhibitorkonzentration des BACE1-Inhibitors C3 (10 μM ; Abb. 24) Effekte auf das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ (Luo et al. 2011). Während eine niedrigere Inhibitor-Konzentration (2 μM ; Abb. 18) bei endogener BACE1-Aktivität keinen Effekt erzielt (Willem et al. 2006), zeigt dieselbe Konzentration jedoch bei Überexpression von BACE1 (Abb. 18) einen inhibitorischen Effekt auf das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ (Willem et al. 2006). Da erst Überexpression von BACE1 bzw. eine hohe Inhibitorkonzentration einen Effekt auf das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ in HEK 293-Zellen aufweisen, ist anzunehmen, dass diese Isoform zwar ein Substrat von BACE1 darstellt, in HEK 293-Zellen aufgrund der niedrigen endogenen BACE1-Aktivität aber hauptsächlich durch andere Proteasen prozessiert wird.

Im Gegensatz zu Typ I NRG1- $\beta 1$ kann für die $\beta 4$ -Isoform das Shedding durch BACE1 weder in HEK 293-Zellen noch in SH-SY5Y-Zellen bei endogener BACE1-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 18 & 19). Da erst Überexpression von BACE1 einen Effekt auf das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 4$ aufweist (Abb. 18), ist anzunehmen, dass diese Isoform zwar ein Substrat von BACE1 darstellt, in HEK 293-Zellen aufgrund der niedrigen endogenen BACE1-Aktivität aber hauptsächlich durch andere Proteasen prozessiert wird. Auch in SH-SY5Y-Zellen lässt sich kein Effekt auf das Shedding dieser Isoform durch BACE1 nachweisen, sodass anzunehmen ist, dass nicht BACE1, sondern andere Sekretasen für das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 4$ in dieser Zelllinie verantwortlich sind.

Für βAPP wurde bereits gezeigt, dass Überexpression von BACE1 in einem verminderten Shedding durch α -Sekretasen resultiert, vermutlich aufgrund einer Verschiebung des Sheddings durch BACE1 in frühere Kompartimente des sekretorischen Pathways. So erfolgt das Shedding durch BACE1 wahrscheinlich noch bevor βAPP als Substrat für α -Sekretasen zur Verfügung steht (Haass et al. 1995 b, Willem et al. 2004). Ebenso könnte bei einer erhöhten BACE1-Aktivität während der Entwicklung (Willem et

al. 2006) bzw. bei einer Überexpression von BACE1 in vitro das Shedding von Typ I NRG1- β in früheren Kompartimenten des sekretorischen Pathways stattfinden. Das Shedding durch BACE1 könnte somit erfolgen noch bevor Typ I NRG1- β als Substrat für andere Sekretasen zur Verfügung steht. Dies würde erklären, weshalb erst bei Überexpression von BACE1 in HEK 293-Zellen ein Effekt auf das Shedding von Typ I NRG1- β 1 und - β 4 zu beobachten ist (Vgl. Abb. 17 & 18).

4.2.2. BACE1-Schnittstelle

Für Typ I NRG1- β 1 konnte in der MALDI-TOF-MS-Analyse die BACE1-Schnittstelle innerhalb der juxtamembranären Region zwischen Aminosäure-Position Glu²³⁶-Phe²³⁷ und Met²³⁸-Glu²³⁹ (EF-ME) von humanem Typ I NRG1- β 1 charakterisiert werden. Diese Schnittstelle wurde später durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Hu et al. 2008). Auch für Typ III NRG1 konnte dieselbe BACE1-Schnittstelle erst kürzlich innerhalb der juxtamembranären Region identifiziert werden (Fleck et al. 2013). Mit Hilfe von Mutationen durch AS-Austausch (Glu-Phe \rightarrow Ala-Ala) bzw. Deletion von sieben AS (Δ 7) konnte gezeigt werden, dass BACE1 eine Sequenzspezifität für diese Schnittstelle aufweist und dass keine weiteren variablen Schnittstellen in diesem Bereich für BACE1 existieren (Abb. 21 & 22). Die vorliegenden Ergebnisse lassen zudem annehmen, dass die Deletionsmutation (Δ 7) das Shedding durch BACE1 besser blockiert als die Mutation durch AS-Austausch (AA) (Abb. 27; Vgl. Kapitel 3.4.3.).

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Inhibition der BACE1-Aktivität in HEK 293-B1-Zellen das Shedding der AS-Austausch-Mutante (AA) im SEAP-Enzym-Assay nicht über das Ausmaß des Sheddings der unbehandelten Kontrollzelllinie hinaus reduzieren bzw. keinen Effekt auf das Shedding zeigen würde. Die Inhibition der BACE1-Aktivität in HEK 293-B1-Zellen resultiert jedoch erstaunlicherweise in einer Reduktion des Sheddings um ca. 75 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelllinie (Abb. 22), wofür es keine plausible Erklärung gibt.

Die NRG1- β 1-Schnittstelle wird zwar in vielen Vertebraten exprimiert und ist somit hoch konserviert, stellt aber keine optimale Schnittstelle für BACE1 dar (Hu et al. 2008). Auch β APP und APLP werden wenig effizient durch BACE1 geschnitten (Li und Südhof 2004). Dagegen scheint die „schwedische“ Doppelmutation (KM/NL) von β APP eine optimale Schnittstelle für BACE1 darzustellen, denn sie erhöht die proteolytische Aktivität der β -Sekretase, wobei die A β -Produktion um das 10-fache von β APP gesteigert wird (Citron et al. 1992, Cai et al. 1993).

Die Schnittstelle von NRG1- β 1 unterscheidet sich von der β APP-Schnittstelle für BACE1 als auch von den Schnittstellen aller weiteren bisher bekannten BACE1-Substrate. Eine Konsensussequenz für alle bisher bekannten BACE1-Substrate scheint nicht zu existieren (Abb. 29). Ihnen ist jedoch gemeinsam, dass sie bevorzugt nach sauren sowie nach hydrophoben AS-Resten, v.a. nach Leucin oder Phenylalanin, durch BACE1 geschnitten werden (Citron et al. 1995, Grüninger-Leitch et al. 2002, Stockley und O'Neill 2008, Fleck et al. 2013). Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, da hier ebenfalls gezeigt werden konnte, dass der BACE1-Schnitt von Typ I NRG1- β 1 nach sauren (Glutamat) und hydrophoben (Phenylalanin) AS-Resten erfolgt.

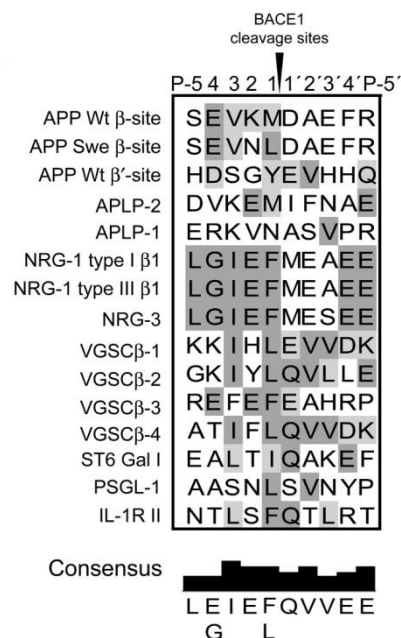


Abbildung entnommen aus Stockley & O'Neill, Cell Mol. Life Sci. 65 (2008) 3265-3289

Abb. 29: BACE1-Substrate und ihre Schnittstellen. Dargestellt sind die AS-Sequenzen von der N-terminalen Position P5 bis zur C-terminalen Position P'5 der bisher bekannten BACE1-Schnittstellen.

4.3. Shedding von Typ I NRG1- β durch ADAMs

4.3.1. Stimuliertes Shedding

Das Shedding von NRG1 sowie anderer Transmembranproteine erfolgt entweder als konstitutives Shedding oder aber wird über second messenger Pathways wie der Proteinkinase C (PKC) reguliert. Die PKC wiederum kann durch Phorbolester wie phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) induziert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt

werden, dass die Freisetzung der Ektodomäne von Typ I NRG1- β 4 durch die Zugabe von PMA gesteigert wird. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche für die Typ I NRG1- β -Isoformen β 1, - β 2 und - β 4 ein durch Behandlung mit PMA gesteigertes Shedding beschreiben (Burgess et al. 1995, Loeb et al. 1998, Han und Fischbach 1999, Montero et al. 2000, Shirakabe et al. 2001, Wang et al. 2001, Horiuchi et al. 2005).

4.3.2. Shedding durch ADAM10

Protein Kinase C regulierte und PMA stimulierbare Sekretasen sind unter anderem die α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 (Lammich et al. 1999, Horiuchi et al. 2005). Um die Bedeutung der für die Alzheimer-Pathologie relevanten α -Sekretase ADAM10 bezüglich des Sheddings der verschiedenen Typ I NRG1- β -Isoformen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Inhibitoranalysen mit spezifischen Metalloprotease-Inhibitoren und ADAM10-Überexpressionsstudien durchgeführt.

Im SEAP-Enzym-Assay konnte gezeigt werden, dass ADAM10 das Shedding der am stärksten neuronal exprimierten Isoform Typ I NRG1- β 1 in HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen katalysiert (Abb. 25 & 26). Da der ADAM- und MMP-Inhibitor TAPI-1 (50 μ M) das Shedding von Typ I NRG1- β 1 im selben Ausmaß wie der ADAM10-spezifische Inhibitor GI (5 μ M) hemmt (Abb. 24), kann angenommen werden, dass TAPI-1 in der hier verwendeten Inhibitorkonzentration ebenfalls das Shedding durch ADAM10 inhibiert. Es ist jedoch zu bedenken, dass TAPI-1 neben ADAM10 v.a. auch ADAM17 sowie andere MMPs inhibiert.

Im SEAP-Enzym-Assay lassen sich unterschiedlich ausgeprägte inhibitorische Effekte durch TAPI-1 auf das Shedding von Typ I NRG1- β 1 beobachten. Dies ist mit der Verwendung unterschiedlicher TAPI-1-Konzentrationen in den verschiedenen SEAP-Enzym-Assays zu erklären. So wird das Shedding der β 1-Isoform bei einer TAPI-1 Konzentration von 50 μ M in HEK 293-Zellen um ca. 50 % reduziert (Abb. 24), dagegen bei einer Konzentration von 25 μ M nur um ca. 30 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 25).

Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Luo et al. zeigen, dass ADAM10 das Shedding von Typ I NRG1- β 1 in vitro katalysiert (Luo et al. 2011). Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Daten von Horiuchi et al., welche zeigen, dass ADAM10 nicht für das Shedding von Typ I NRG1- β 1 verantwortlich ist. Dagegen beschreiben diese ADAM17 als die für das Shedding der β 1-Isoform hauptverantwortliche Sekretase (Horiuchi et al. 2005). Denkbar ist, dass diese

Unterschiede auf der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Versuchsmethoden beruhen. So resultieren die Ergebnisse von Luo et al. aus spezifischem „Knockdown“ von ADAM17 und ADAM10 in HEK 293-Zellen. Die Ergebnisse von Horiuchi et al. resultieren dagegen aus Studien mit „Knockout“ von ADAM17 in E2-Zellen (ADAM17-/-Fibroblasten) mit Kompensation des ADAM17-„Knockout“ durch Überexpression von ADAM10. Da in HEK 293-Zellen ein Effekt auf das Shedding von Typ I NRG1- β 1 sowohl durch ADAM10-Überexpressions- und Inhibitoranalysen in der vorliegenden Arbeit als auch durch „Knockdown“ von ADAM10 (Luo et al. 2011) nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass zumindest in dieser Zelllinie das Shedding der β 1-Isoform durch ADAM10 katalysiert wird.

Allerdings könnte neben ADAM10 auch ADAM17 das Shedding von Typ I NRG1- β 1 katalysieren. Da TAPI-1 v.a. als ein ADAM17-Inhibitor beschrieben wird (Slack et al. 2001), könnte der inhibitorische Effekt von TAPI-1 auf das Shedding der β 1-Isoform (Abb. 25 & 26) auch infolge Inhibition der ADAM17-Aktivität resultieren. Luo et al. beschreiben zwar ADAM10 als die hauptverantwortliche Sekretase für das Shedding der β 1-Isoform, weisen aber auch einen geringen Effekt durch ADAM17 auf das Shedding dieser Isoform in HEK 293-Zellen nach (Luo et al. 2011). Da zudem Horiuchi et al. ADAM17 als die für das Shedding der β 1-Isoform hauptverantwortliche Sekretase in E2-Zellen beschreiben, ist davon auszugehen, dass neben ADAM10 auch ADAM17 eine Bedeutung für das Shedding von Typ I NRG1- β 1 zukommt. Um die physiologische Bedeutung von ADAM10 und ADAM17 bezüglich des Sheddings von Typ I NRG1- β 1 zu klären, sind in weiterführenden Arbeiten ADAM10- und ADAM17-„Knockout“-Studien in vivo erforderlich.

Das Shedding von Typ I NRG1- β 2 wird ebenfalls durch ADAMs katalysiert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit in Inhibitoranalysen mit TAPI-1 gezeigt werden. TAPI-1 inhibiert jedoch neben der Aktivität von ADAM10 und ADAM17 auch die weiterer ADAMs und MMPs, sodass anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden kann, welche Sekretase/n hauptverantwortlich für das Shedding von Typ I NRG1- β 2 ist/sind. Da kein signifikanter Effekt infolge ADAM10-Überexpression auf das Shedding der β 2-Isoform beobachtet wird, ist allerdings anzunehmen, dass ADAM10 keine oder nur eine geringe Bedeutung für das Shedding von Typ I NRG1- β 2 zukommt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Freese et al., welche zeigen, dass spezifischer „Knockdown“ von ADAM10 mittels siRNA keinen Effekt auf das Shedding der NRG1- β 2-Isoform hat und diese Isoform folglich kein Substrat für ADAM10 darstellt

(Freese et al. 2009). ADAM17 wird dagegen von Horiuchi et al. als die sowohl für das konstitutive als auch für das via PMA induzierte Shedding von Typ I NRG1- β 2 hauptverantwortliche Sekretase beschrieben (Horiuchi et al. 2005). Es ist somit anzunehmen, dass ADAM17 das Shedding von Typ I NRG1- β 2 katalysiert.

Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das konstitutive Shedding der β 4-Isoform nicht durch die α -Sekretasen ADAM10 oder ADAM17 katalysiert wird (Abb. 25 & 26). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ADAMs für das stimulierte Shedding dieser Isoform verantwortlich sind (Abb. 23). Für die β 4-Isoform wurde bisher nur das stimulierte und nicht das konstitutive Shedding durch α -Sekretasen untersucht, wobei das stimulierte Shedding nur durch α -Sekretasen im Allgemeinen und nicht im Hinblick auf eine spezifische α -Sekretase analysiert wurde (Burgess et al. 1995, Montero et al. 2000).

Um die physiologische Bedeutung von ADAM10 und ADAM17 bezüglich des Sheddings von Typ I NRG1- β 2 und - β 4 zu klären, sind in weiterführenden Arbeiten ADAM10- und ADAM17-„Knockout“-Studien in vivo erforderlich.

4.3.3. ADAM-Schnittstelle von Typ I NRG1- β

Die Schnittstellensequenz von Neuregulin für ADAMs wird sehr kontrovers diskutiert. So gehen Lu et al. von einer fehlenden Sequenzspezifität aus, in der Annahme, dass für alle NRG-Isoformen die Schnittstelle in der juxtamembranären Region 5-8 AS C-terminal des letzten Disulfid-Loops der EGF-ähnlichen Domäne lokalisiert ist (Lu et al. 1995). Auch Han und Fischbach gehen von einer fehlenden Sequenzspezifität aus und postulieren einen sog. „modified ruler mechanism“. Dieser besagt, dass Neuregulin in einem bestimmten Abstand von einer AS-Sequenz mit sekundärer Faltblattstruktur, die proximal der TMD lokalisiert ist, geschnitten wird. Sie gehen davon aus, dass der Schnitt in einem Abstand von ca. 3-4 AS von der EGF-ähnlichen Domäne erfolgt, zusätzlich aber eine bestimmte Länge der juxtamembranären Region benötigt. Die minimale Länge einer solchen AS-Sequenz scheint für Typ I NRG1- β 1a (pro-ARIA) 11 AS zu betragen (Han und Fischbach 1999).

Andere Arbeitsgruppen beschreiben dagegen spezifische Schnittstellen für α -Sekretasen innerhalb der juxtamembranären Region (Holmes et al. 1992, Falls et al. 1993, Wen et al. 1994) und zeigen für ADAM10 und ADAM17 eine Selektivität für spezifische AS in unmittelbarer Nachbarschaft zur Schnittstelle (Caescu et al. 2009, Luo et al. 2011, Fleck et al. 2013). Die Ergebnisse von Caescu et al. weisen eine Selektivität von ADAM17 für aliphatische hydrophobe AS-Reste an P1', insbesondere von Valin, sowie von Prolin an

P3 bzw. an P5 nach (Caescu et al. 2009). Aktuelle Erkenntnisse zeigen eine Selektivität von ADAM17 für Alanin und in geringerem Ausmaß für Phenylalanin an P1, sowie für Serin an P1' (Fleck et al. 2013). Die Selektivität von ADAM17 an P1' ist ein entscheidendes Merkmal, welches die Substratspezifität von ADAM17 im Vergleich zu ADAM10 und anderen MMPs beeinflussen könnte. ADAM10 bevorzugt an P1' Leucin sowie aromatische AS (Caescu et al. 2009), wie es für die ADAM10-Schnittstelle SF-YK innerhalb der juxtamembranären Region von Typ I NRG1- β 1 und Typ III NRG1- β 1 gezeigt werden konnte (Luo et al. 2011, Fleck et al. 2013). Neben der β 1-Isoform besitzt auch Typ I NRG1- β 2 die AS-Sequenz SF-YK innerhalb der juxtamembranären Region. Da die β 2-Isoform zwar dieselbe Schnittstellensequenz besitzt wie die β 1-Isoform, jedoch vermutlich kein Substrat für ADAM10 darstellt (Freese et al. 2009) (Vgl. 4.3.2.), müssen zusätzliche Faktoren neben einer spezifischen Schnittstellensequenz ausschlaggebend für das Shedding von Neuregulin sein. Ein solcher Faktor könnte z.B. die Länge der juxtamembranären Region sein. So konnte in dieser Arbeit in SEAP-Enzym-Assay-Analysen gezeigt werden, dass u.a. die Länge der juxtamembranären Region einen entscheidenden Einfluss auf das Shedding der verschiedenen Typ I NRG1- β -Isoformen durch ADAMs hat. Je kürzer die juxtamembranäre Region ist, desto stärker kann das Shedding durch TAPI-1 inhibiert werden und desto abhängiger ist somit das Shedding der jeweiligen Typ I NRG1- β -Isoform von ADAM10 und/oder ADAM17 (Abb. 27). Andere Arbeitsgruppen gehen ebenfalls davon aus, dass die Länge der juxtamembranären Region eine entscheidende Bedeutung für das Shedding von Neuregulin hat (Han und Fischbach 1999, Montero et al. 2000). Ferner wird das Shedding der ADAM17-Substrate HB-EGF und TGF- α durch die Kombination aus Länge der juxtamembranären Region und AS-Sequenz bestimmt (Hinkle et al. 2004).

Die Ergebnisse oben genannter Arbeitsgruppen sowie der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die jeweilige Schnittstelle sowohl für ADAM10 als auch für ADAM17 durch das Zusammenspiel der beiden Faktoren AS-Sequenz und Länge der juxtamembranären Region bestimmt wird.

Neben der kontrovers diskutierten Sequenzspezifität sind für die Substraterkennung von ADAM10 und ADAM17 vermutlich weitere Faktoren ausschlaggebend. So könnten Strukturmerkmale außerhalb der katalytischen Domäne die Interaktion von Protease und ihrem Substrat beeinflussen. Dies konnte bereits für ADAM10 gezeigt werden, deren nicht katalytische Domäne entscheidend für die Bindung von Ephrin ist (Janes et al. 2005).

Ferner werden spezifische Stimuli beschrieben, welche entscheidend dafür sind, ob ein Substrat durch ADAM10 oder durch ADAM17 prozessiert wird. So induziert die Behandlung von Zellen mit PMA das Shedding von Transmembranproteinen hauptsächlich infolge Aktivierung von ADAM17. Bei zellulärem Calcium-Ionen-Einstrom wird dagegen das Shedding dieser Proteine durch ADAM10 gefördert (Horiuchi et al. 2007, Le Gall et al. 2009).

ADAM10 und BACE1 schneiden Neuregulin an benachbarten Schnittstellen und ihre Schnittprodukte aktivieren dieselben Signalkaskaden. Allerdings kommt ihnen eine unterschiedliche Bedeutung bezüglich der Myelinisierung des PNS zu. Denn im Gegensatz zu BACE1 kann für ADAM10 in vitro als auch in vivo kein Effekt auf die Myelinisierung des PNS gezeigt werden (Freese et al. 2009, Luo et al. 2011).

Es wurde bisher angenommen, dass sich auch ADAM17 und BACE1 in ihrer Bedeutung bezüglich der Myelinisierung des PNS unterscheiden. Während BACE1 infolge Shedding von Typ III NRG1 die Myelinisierung des PNS induziert (Willem et al. 2006), wird die Bedeutung von ADAM17 bezüglich der Myelinisierung kontrovers diskutiert. Während La Marca et al. eine Hypomyelinisierung in vitro als auch in vivo infolge Shedding von Typ III NRG1 durch ADAM17 nachweisen (La Marca et al. 2011), zeigen die aktuellen Ergebnisse von Fleck et al., dass sowohl BACE1 als auch ADAM17 die Myelinisierung des PNS in vivo induzieren (Fleck et al. 2013).

Typ I NRG1- β 1 wird zwar ebenfalls durch ADAM17 geschnitten (Horiuchi et al. 2005, La Marca et al. 2011), doch konnte gezeigt werden, dass diese Isoform nicht für die Myelinisierung des PNS verantwortlich ist (Michailov et al. 2004, Taveggia et al. 2005, La Marca et al. 2011).

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass Typ I NRG1- β ein Substrat für den γ -Sekretase-Komplex darstellt. Nach erfolgtem Shedding von Typ I NRG1- β katalysiert die γ -Sekretase dessen intramembranäre Proteolyse durch einen Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne.

Mit Hilfe von Inhibitoranalysen und Überexpressionsmodellen konnte in vitro gezeigt werden, dass die β -Sekretase BACE1 das Shedding unterschiedlicher Isoformen von Typ I NRG1- β katalysiert. BACE1 bevorzugt dabei das Shedding der Isoform Typ I NRG1- β 1, gefolgt von Typ I NRG1- β 4. Dagegen wird Typ I NRG1- β 2 nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß durch BACE1 prozessiert.

Da Typ I NRG1- β 1 die Isoform mit der höchsten neuronalen Expression ist und zudem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Typ I NRG1- β 1 im Vergleich zu den anderen Isoformen das bevorzugte Substrat für BACE1 darstellt, wurde in dieser Arbeit die BACE1-Schnittstelle für diese Isoform analysiert. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen konnte die exakte Schnittstelle von BACE1 innerhalb der juxtamembranären Region zwischen Aminosäure-Position Glu²³⁶-Phe²³⁷ und Met²³⁸-Glu²³⁹ (EF-ME) von humanem Typ I NRG1- β 1 charakterisiert werden. Durch Einführen von Mutationen im Bereich dieser Schnittstelle wurde die Spezifität der Schnittstellensequenz verifiziert und die Existenz weiterer Schnittstellen für BACE1

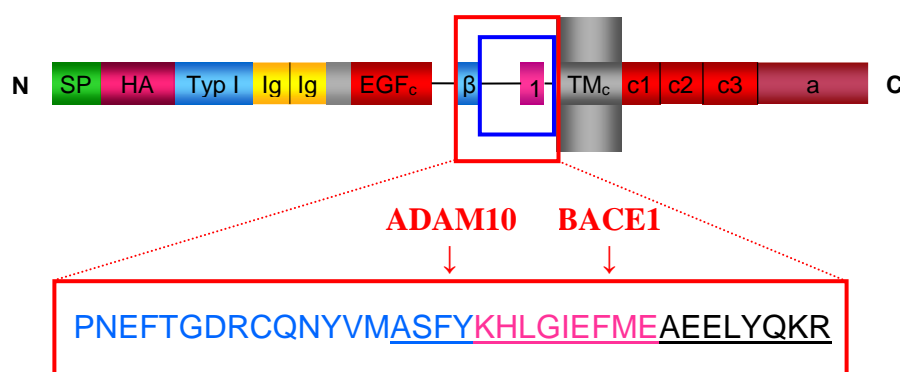


Abb. 30: Schematische Darstellung der Schnittstelle von ADAM10 und BACE1 in Typ I NRG1- β 1.

Die juxtamembranäre Region ist in der Schemazeichnung blau umrahmt. Darunter dargestellt ist die AS-Sequenz der juxtamembranären Region mit der β -EGF-ähnlichen Domäne von Typ I NRG1- β 1, welche der in der Schemazeichnung rot umrahmten Region entspricht. Die juxtamembranäre Region ist unterstrichen. Die Sequenz der β -EGF-ähnlichen Domäne ist analog der Schemazeichnung blau und die spezifische Sequenz der β 1-Isoform rosa hervorgehoben. Die Pfeile markieren die jeweilige Schnittstelle von ADAM10 und BACE1.

ausgeschlossen. Dabei blockiert die Deletion von sieben Aminosäuren ($\Delta 7$) im Bereich der BACE1-Schnittstelle das Shedding durch BACE1 deutlich besser als durch Austausch von zwei Aminosäuren (AA).

Für die α -Sekretase ADAM10 wurde in dieser Arbeit anhand von Überexpressionsmodellen und ADAM10-Inhibitoranalysen *in vitro* gezeigt, dass diese das Shedding von Typ I NRG1- $\beta 1$ katalysiert. Typ I NRG1- $\beta 2$ wird dagegen nicht oder nur in geringem Ausmaß durch ADAM10 prozessiert. Das Shedding der $\beta 2$ -Isoform erfolgt durch TAPI-1 sensible Sekretasen, wobei die vorliegenden Ergebnisse keine Aussage dazu ermöglichen, um welche spezifische Sekretase es sich handelt. Für Typ I NRG1- $\beta 4$ konnte in Inhibitoranalysen und ADAM10-Überexpressionsstudien gezeigt werden, dass das konstitutive Shedding dieser Isoform weder durch ADAM10 noch durch ADAM17 katalysiert wird.

Für α -Sekretasen wird kontrovers eine fehlende Schnittstellen-Sequenzspezifität diskutiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Länge der juxtamembranären Region von Typ I NRG1- β einen entscheidenden Einfluss auf das Shedding durch α -Sekretasen hat. Dabei stellen die Isoformen mit einer kürzeren juxtamembranären Region das bevorzugte Substrat für α -Sekretasen dar.

Tabelle 11: Überblick über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bezüglich des Sheddings von Typ I NRG1- β durch BACE1, ADAM10 und ADAM17.

Rotes Pluszeichen kennzeichnet das Shedding durch die jeweilige Sekretase.

Substrat	BACE1		ADAM10		ADAM17	
Typ I NRG1-$\beta 1$	+	+(1*)	+	+(1**) / -(1***)	(#)	+(1**) / +(1***)
Typ I NRG1-$\beta 2$	-		- / (#)	-(2*)	(#)	+(1***)
Typ I NRG1-$\beta 4$	+		-		-	

(#) Shedding ist TAPI-1 sensibel.

(1*) (Willem et al. 2006, Hu et al. 2008, Luo et al. 2011).

(1**) (Luo et al. 2011).

(1***) (Horiuchi et al. 2005).

(2*) (Freese et al. 2009).

Als weiterführende Arbeit der vorliegenden Dissertation wurde die proteolytische Prozessierung von Typ III NRG1 durch die Sekretasen ADAM10, ADAM17 und BACE1 analysiert (Fleck et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Typ III NRG1 nicht nur C-terminal, sondern auch N-terminal der EGF-ähnlichen Domäne geschnitten wird. Dies ermöglicht die Freisetzung der biologisch aktiven EGF-ähnlichen Domäne, welche durch parakrine Signaltransduktion *in vitro* ErbB3-Rezeptoren aktiviert, sowie *in vivo* die Myelinisierung des PNS stimuliert. Die proteolytische Prozessierung N-terminal der EGF-ähnlichen Domäne wird durch ADAM17 und BACE1 katalysiert. Für den Schnitt C-terminal der EGF-ähnlichen Domäne sind sowohl ADAM10 und ADAM17 als auch BACE1 verantwortlich. Die C-terminal der EGF-ähnlichen Domäne lokalisierte BACE1-Schnittstelle von Typ III NRG1 entspricht dabei der BACE1-Schnittstelle von Typ I NRG1- β 1, welche in der hier vorliegenden Dissertationsarbeit identifiziert wurde.

In künftigen Arbeiten könnten Mutationsanalysen die Schnittstellensequenzen der verschiedenen Typ I NRG1- β -Isoformen für ADAM10 und ADAM17 bzw. die Schnittstellensequenz der β 4-Isoform für BACE1 identifizieren. Zum besseren Verständnis der pathophysiologischen und physiologischen Bedeutung von BACE1 sowie der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 für das Shedding der verschiedenen Typ I NRG1- β -Isoformen könnten in weiterführenden Arbeiten „Knockout“-Studien in neuronalen Zellmodellen als auch *in vivo* beitragen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	A bbildung
ACDL	A cid c luster- d ileucine Motiv
AD	A lzheimer- D emenz-Erkrankung
ADAM	A d isintegrin and m etalloproteinase
AICD	A PP intracellular d omain
AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5- m ethyl-4-isoxazole- p ropionate a cid
AP	A lkalische P hospahatase
APLP	A myloid p recurser l ike p rotein
ApoE	A polipoprotein E
ARIA	A cetylcholin inducing a ctivity
AS	A minosäure
Aβ	A myloid- β -Peptid
βAPP	β -amyloid p recursor p rotein
BACE	β -site A PP cleaving e nzyme
BSA	B ovines S erum A lbumin
Cdk5	C yclin- d ependent k inase 5
CTF	C -terminales F ragment
CRD	C ystein rich d omain
dH ₂ O	d estilliertes W asser
DMEM	D ulbeco´s M odified E agle M edium
DNA	D esoxyribonucleic a cid
ECL	E nhanced chemiluminescence
EGF	E pidermal g rowth f actor
EDTA	E thylendiamintetraacetat
ER	E ndoplasmatisches R etikulum
FAD	F amilial A lzheimer´s d isease
FKS	F etales K älberserum
g	G ramm
GABA	Γ amma aminobutyric a cid
GGA	γ -ear-containing A RF-binding protein
GGF	G lial g rowth f actor

G418	Geneticin 418
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HA	Häm agglutinin
HER	Here gulin
HEK	Human embryonic kidney 293
HRP	Horseradish peroxidase
ICD	Intracellular domain
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LTP	Long-term potentiation
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
miRNA	Mikro RNA
Nct	Nicastrin
NDF	Neu differentiation factor
NICD	Notch intracellular domain
nM	Nanomolar
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NRG	Neuregulin
NSAID	Non steroidal anti inflammatory drugs
NTF	N-terminales Fragment
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEN	Penicillin
PEN-2	Presenilin enhancer-2
PI	Protease Inhibitor
PKC	Protein Kinase C

PMA	Ph orbol-12- my ristate-13- ac etate
PNS	P eripheres N ervensystem
PS	P resenilin
RIP	R egulierte i ntramembranäre P roteolyse
RNA	Ri bonucleic a cid
RT	R aumtemperatur
rw	r ückwä r ts
SDS	S odium d odecylsulfate
siRNA	S mall i nterfering R NA
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzelllinie
SMDF	S ensory a nd m otor n euron d erived f actor
Strep	S treptomycin
Swe	S chweden-Mutation von β APP (KM/NL; 670/671)
TACE	T umor necrosis factor- a lpha c onverting e nzyme
TGN	T rans- G olgi- N etzwerk
TMD	T rans m embrandomäne
upm	U mdrehungen p ro M inute
UTR	U ntranslated r egion
vw	v orwä r ts
wt	W ildtyp
x g x	Erdbeschleunigung, g =9,81 m/s ²
ZNS	Z entrales N ervensystem

7. Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

8. Literaturverzeichnis

- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med. **64**: 146-148.
- Anton, E. S., M. A. Marchionni, K. F. Lee and P. Rakic (1997). "Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex." Development **124**(18): 3501-3510.
- Bammens, L., L. Chávez-Gutiérrez, A. Tolia, A. Zwijsen and B. De Strooper (2011). "Functional and topological analysis of Pen-2, the fourth subunit of the gamma-secretase complex." J Biol Chem **286**(14): 12271-12282.
- Bandyopadhyay, S., L. E. Goldstein, D. K. Lahiri and J. T. Rogers (2007). "Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease." Curr Med Chem **14**(27): 2848-2864.
- Bao, J., D. Wolpowitz, L. W. Role and D. A. Talmage (2003). "Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain." J Cell Biology **161**(6): 1133-1141.
- Barten, D. M. and C. F. Albright (2008). "Therapeutic strategies for Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **37**(2-3): 171-186.
- Bennett, B. D., S. Babu-Kahn, R. Loeloff, J.-C. Louis, E. Curran, M. Citron and R. Vasser (2000 a). "Expression analysis of BACE 2 in brain and peripheral tissues." J. Biol. Chem **275**: 20647-20651.
- Bennett, B. D., P. Denis, M. Haniu, D. B. Teplow, S. Kahn, J. C. Louis, M. Citron and R. Vassar (2000 b). "A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase." J Biol Chem **275**(48): 37712-37717.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." Cancer Res **38**(11 Pt 1): 3751-3757.
- Black, R. A. and J. M. White (1998). "ADAMs: focus on the protease domain." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 654-659.
- Blobel, C. P. (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 32-43.
- Bondareff, W., C. R. Harrington, S. W. McDaniel, C. M. Wischik and M. Roth (1994). "Presence of axonal paired helical filament-tau in Alzheimer's disease: submicroscopic localization." J Neurosci Res **38** (6): 664-669.
- Braak, H., E. Braak, J. Bohl and R. Reintjes (1996). "Age, neurofibrillary changes, A beta amyloid and the onset of Alzheimer's disease." Neurosci Lett **210**: 87-90.
- Braak, H., K. Griffling and E. Braak (1997). "Neuroanatomy of Alzheimer's disease." Alzheimer's Res. **3**: 235-247.
- Bracco, L., C. Piccini and L. Amaducci (1998). "Rate of progression of mental decline in Alzheimer's disease: Summary of european studies. ." Alzheimer Dis. Assoc. Disord. **12**: 347-355.
- Brinkmann, B. G., A. Agarwal, M. W. Sereda, A. N. Garratt, T. Müller, H. Wende, R. M. Stassart, S. Nawaz, C. Humml, V. Velanac, K. Radyushkin, S. Goebbels, T. M. Fischer, R. J. Franklin, C. Lai, H. Ehrenreich, C. Birchmeier, M. H. Schwab and K. A. Nave (2008). "Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system." Neuron **59**(4): 581-595.

- Britsch, S., L. Li, S. Kirchhoff, F. Theuring, V. Brinkmann, C. Birchmeier and D. Riethmacher (1998). "The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system." Genes Dev **12**(12): 1825-1836.
- Buonanno, A. and G. D. Fischbach (2001). "Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 287-296.
- Burden, S. and Y. Yarden (1997). "Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis." Neuron **18**(6): 847-855.
- Burgess, T. L., S. L. Ross, Y. X. Qian, D. Brankow and S. Hu (1995). "Biosynthetic processing of neu differentiation factor. Glycosylation trafficking, and regulated cleavage from the cell surface." J Biol Chem **270**(32): 19188-19196.
- Busciglio, J., A. Lorenzo, J. Yeh and B. A. Yankner (1995). "beta-Amyloid Fibrils Induce Tau Phosphorylation and Loss of Microtubule Binding
" Neuron **14**: 879-888.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti and R. A. Black (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**: 27765-27767.
- Caescu, C. I., G. R. Jeschke and B. E. Turk (2009). "Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10." Biochem J. **424**(1): 79-88.
- Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price and P. C. Wong (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." Nat Neurosci **4**: 233-234.
- Cai, X. D., T. E. Golde and S. G. Younkin (1993). "Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor." Science **259**(5094): 514-516.
- Calaora, V., B. Rogister, K. Bismuth, K. Murray, H. Brandt, P. Leprince, M. Marchionni and M. Dubois-Dalcq (2001). "Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro." J Neurosci **21**(13): 4740-4751.
- Camus, V., P. Payoux, L. Barré, B. Desgranges, T. Voisin, C. Tauber, R. La Joie, M. Tafani, C. Hommet, G. Chételat, K. Mondon, V. de La Sayette, J. P. Cottier, E. Beaufils, M. J. Ribeiro, V. Gissot, E. Vierron, J. Vercoillie, B. Vellas, F. Eustache and D. Guilloteau (2012). "Using PET with 18F-AV-45 (florbetapir) to quantify brain amyloid load in a clinical environment." Eur J Nucl Med Mol Imaging **39**(4): 621-631.
- Canoll, P. D., J. M. Musacchio, R. Hardy, R. Reynolds, M. A. Marchionni and J. L. Salzer (1996). "GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors." Neuron **17**(2): 229-243.
- Cao, X. and T. C. Südhof (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." Science **293**: 115-120.
- Capell, A., D. Beher, S. Prokop, H. Steiner, C. Kaether, M. S. Shearman and C. Haass (2005). "Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway." J Biol Chem **280**(8): 6471-6478.
- Capell, A., J. Grünberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D. J. Selkoe and C. Haass (1998). "The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex." J Biol Chem **273**(6): 3205-3211.
- Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D.B., Walter, J., Haass, C. (2002). "Apical sorting of beta-secretase limits amyloid beta-peptide production." J Biol Chem **277**(7).

- Capell, A., H. Steiner, M. Willem, H. Kaiser, C. Meyer, J. Walter, S. Lammich, G. Multhaup and C. Haass (2000). "Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase." J Biol Chem **275**(40): 30849-30854.
- Carraway, K. L. r., J. L. Weber, M. J. Unger, J. Ledesma, N. Yu, M. Gassmann and C. Lai (1997). "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases." Nature **387**(6632): 512-516.
- Chang, Q. and G. D. Fischbach (2006). "An acute effect of neuregulin 1 beta to suppress alpha 7-containing nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal interneurons." J Neurosci **26**(44): 11295-11303.
- Chantry, A., N. A. Gregson and P. Glynn (1989). "A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization." J Biol Chem **264**(36): 21603-21607.
- Chávez-Gutiérrez, L., A. Tolia, E. Maes, T. Li, P. C. Wong and B. de Strooper (2008). "Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity." J Biol Chem **283**(29): 20096-20105.
- Chyung, J. H., D. M. Raper and D. J. Selkoe (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.
- Citron, M. (2004). "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **5**(9): 677-685.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg and D. J. Selkoe (1992). "Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production." Nature **360**(6405): 672-674.
- Citron, M., D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1995). "Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific." Neuron **14**(3): 661-670.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-923.
- Creemers, J. W., D. Ines Dominguez, E. Plets, L. Serneels, N. A. Taylor, G. Multhaup, K. Craessaerts, W. Annaert and B. De Strooper (2001). "Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family." J Biol Chem **276**(6): 4211-4217.
- Crowther, R. A. and M. Goedert (2000). "Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases." J Struct Biol **130**(2-3): 271-279.
- Dahlgren, K. N., A. M. Manelli, W. B. J. Stine, L. K. Baker, G. A. Krafft and M. J. LaDu (2002). "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability." J Biol Chem **277**(35): 32046-32053.
- Davis, A. A., J. J. Fritz, J. Wess, J. J. Lah and A. I. Levey (2010). "Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo." J Neurosci **30**(12): 4190-4196.
- De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." Neuron **38**: 9-12.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura and F. Van Leuven (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." Nature **391**(6665): 387-390.
- De Strooper, B., L. Umans, F. Van Leuven and H. Van Den Berghe (1993). "Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway." J. Cell Biol **121**(2): 295-304.

- Dickson, D. W. (1997). "The pathogenesis of senile plaques." J Neuropathol Exp Neurol **56**(4): 321-339.
- Dominguez, D., J. Tournoy, D. Hartmann, T. Huth, K. Cryns, S. Deforce, L. Serneels, I. E. Camacho, E. Marjaux, K. Craessaerts, A. J. Roebroek, M. Schwake, R. D'Hooze, P. Bach, U. Kalinke, D. Moechars, C. Alzheimer, K. Reiss, P. Saftig and B. De Strooper (2005). "Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice." J Biol Chem **280**(35): 30797-30806.
- Dries, D. R. and G. Yu (2008). "Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **5**(2): 132-146.
- Edbauer, D., E. Winkler, J. T. Regula, B. Pesold, H. Steiner and C. Haass (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." Nat Cell Biol **5**(5): 486-488.
- Erickson, S. L., K. S. O'Shea, N. Ghaboosi, L. Loverro, G. Frantz, M. Bauer, L. H. Lu and M. W. Moore (1997). "ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice." Development **124**(24): 4999-5011.
- Esch, F. S., P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure and P. J. Ward (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." Science **248**: 1122-1124.
- Etcheberrigaray, R., M. Tan, I. Dewachter, C. Kuiperi, I. Van der Auwera, S. Wera, L. Qiao, B. Bank, T. J. Nelson, A. P. Kozikowski, F. Van Leuven and D. L. Alkon (2004). "Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 11141-11146.
- Fahrenholz, F. and R. Postina (2006). "Alpha-secretase activation-an approach to Alzheimer's disease therapy." Neurodegener Dis **3**(4-5): 255-261.
- Falls, D. L. (2003 a). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." Exp Cell Res **284**(1): 14-30.
- Falls, D. L. (2003 b). "Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions." J Neurocytol **32**(5-8): 619-647.
- Falls, D. L., K. M. Rosen, G. Corfas, W. S. Lane and G. D. Fischbach (1993). "ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family." Cell **72**(5): 801-815.
- Farzan, M., C. E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung and H. Choe (2000). "BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9712-9717.
- Fernandez, P. A., D. G. Tang, L. Cheng, A. Prochiantz, M. A.W.; and M. C. Raff (2000). "Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve." Neuron **28**(1): 81-90.
- Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer and M. Scazufca (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet **366**(9503): 2112-2117.
- Ferris, S. H. and A. Kluger (1997). "Assessing cognition in Alzheimer disease research." Alzheimer Dis. Assoc. Disord. **6**: 45-49.
- Fischbach, G. D. and K. M. Rosen (1997). "ARIA: a neuromuscular junction neuregulin." Annu Rev Neurosci **20**: 429-458.
- Fisher, A. (2008). "M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease--the pivotal role of brain M1 receptors." Neurodegener Dis **5**(3-4): 237-240.

- Flames, N., J. E. Long, A. N. Garratt, T. M. Fischer, M. Gassmann, C. Birchmeier, C. Lai, J. L. Rubenstein and O. Marín (2004). "Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1." Neuron **44**(2): 251-261.
- Fleck, D., F. van Bebber, A. Colombo, C. Galante, B. M. Schwenk, L. Rabe, H. Hampel, B. Novak, E. Kremmer, S. Tahirovic, D. Edbauer, S. Lichtenthaler, B. Schmid, M. Willem and C. Haass (2013). "Dual cleavage of Neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling." Journal of Neuroscience **33**(18): 7856-7869.
- Fraering, P. C., W. Ye, J. M. Strub, G. Dolios, M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, A. van Dorsselaer, R. Wang, D. J. Selkoe and M. Wolfe, S. (2004). "Purification and characterization of the human gamma-secretase complex." Biochemistry **43**(30): 9774-9789.
- Francis, R., G. McGrath, J. Zhang, D. A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M. C. Ellis, A. L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R. L. Myers, C. S. Himes, R. Hiesch, C. Ruble, J. S. Nye and D. Curtis (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." Dev Cell **3**(1): 85-97.
- Freese, C., A. N. Garratt, F. Fahrenholz and K. Endres (2009). "The effects of alpha-secretase ADAM10 on the proteolysis of neuregulin-1." FEBS J **276**(6): 1568-1580.
- Friedhoff, P., M. von Bergen, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (2000). "Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments." Biochim Biophys Acta **1502**(1): 122-132.
- Fukumori, A., R. Fluhner, H. Steiner and C. Haass (2010). "Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis." J Neurosci **30**(23): 7853-7862.
- Furukawa, K., B. L. Sopher, R. E. Rydel, J. G. Begley, D. G. Pham, G. M. Martin, M. Fox and M. P. Mattson (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparinbinding domain." J Neurochem **67**: 1882-1896.
- Garratt, A. N., S. Britsch and C. Birchmeier (2000). "Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell." Bioessays **22**(11): 987-996.
- Garver, T. D., R. A. Lehmann and M. L. Billingsley (1996). "Microtubule assembly competence analysis of freshly-biopsied human tau, dephosphorylated tau and Alzheimer tau." J. Neurosci. Res **44**: 12-20.
- Geldmacher, D. S. and P. J. J. Whitehouse (1997). "Differential diagnosis of Alzheimer's disease." Neurology **48**: 2-9.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James and e. al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-706.
- Goedert, M. (1993). "Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease." Trends Neurosci. **16**(460-465).
- Golde, T. E., S. Estus, L. H. Younkin, D. J. Selkoe and S. G. Younkin (1992). "Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives." Science **255**: 728-730.
- Goodearl, A. D., J. B. Davis, K. Mistry, L. Minghetti, M. Otsu, M. D. Waterfield and P. Stroobant (1993). "Purification of multiple forms of glial growth factor." J Biol Chem **268**(24): 18095-18102.

- Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe and R. M. Nitsch (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils." Science **293** (5534): 1491-1495.
- Goutte, C., M. Tsunozaki, V. A. Hale and J. R. Priess (2002). "APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 775-779.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, ." Proc Natl Acad Sci USA **83**(13): 4913-4917.
- Grüninger-Leitch, F., D. Schlatter, E. Küng, P. Nelböck and H. Döbeli (2002). "Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases." J Biol Chem **277**(7): 4687-4693.
- Haass, C. (2004). "Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." Embo J **23**(3): 483-488.
- Haass, C., A. Capell, M. Citron, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1995 a). "The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein." J Biol Chem **270**(11): 6186-6192.
- Haass, C., A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1993). "β amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." J. Biol. Chem **268**: 3021-3024.
- Haass, C., E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung and D. J. Selkoe (1992 a). "Targeting of cell surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid bearing fragments." Nature **357**: 500-503.
- Haass, C., C. A. Lemere, A. Capell, ;, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt and D. J. Selkoe (1995 b). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." Nat Med. **1**(12): 1291-1296.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow and e. al. (1992 b). "Amyloid β-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." Nature **359**(6393): 322-325.
- Haass, C. and D. J. Selkoe (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 H. Steiner (2002). "Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases,." Trends Cell Biol **12**(12): 556-562.
- Hahn, C. G., H. Y. Wang, D. S. Cho, K. Talbot, R. E. Gur, W. H. Berrettini, K. Bakshi, J. Kamins, K. E. Borgmann-Winter, S. J. Siegel, R. J. Gallop and S. E. Arnold (2006). "Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia." Nat Med **12**(7): 824-828.
- Han, B. and G. D. Fischbach (1999). "The release of acetylcholine receptor inducing activity (ARIA) from its transmembrane precursor in transfected fibroblasts." J Biol Chem **274**(37): 26407-26415.
- Hancock, M. L., S. E. Canetta, L. W. Role and D. A. Talmage (2008). "Presynaptic type III neuregulin1-ErbB signaling targets {α}7 nicotinic acetylcholine receptors to axons." J Cell Biol **181**(3): 511-521.
- Haniu, M., P. Denis, Y. Young, E. A. Mendiaz, J. Fuller, J. O. Hui, B. D. Bennett, S. Kahn, S. Ross, T. Burgess, V. Katta, G. Rogers, R. Vassar and M. Citron (2000). "Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties." J Biol Chem **275**(28): 21099-21106.

- Harari, D., E. Tzahar, J. Romano, M. Shelly, J. H. Pierce, G. C. Andrews and Y. Yarden (1999). "Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase." Oncogene **18**(17): 2681-2689.
- Hardy, J. (1992). "An "anatomical cascade hypothesis" for Alzheimer's disease." Trends Neurosci Lett **15**: 200-201.
- Hardy, J. (1997). "The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?" Proc Natl Acad Sci USA **94**(6): 2095-2097.
- Hardy, J., K. Duff, K. G. Hardy, J. Perez-Tur and M. Hutton (1998). "Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau." Nat Neurosci **1**(5): 355-358.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**: 353-356.
- Harrison, S. M., A. J. Harper, J. Hawkins, G. Duddy, E. Grau, P. L. Pugh, P. H. Winter, C. S. Shilliam, Z. A. Hughes, L. A. Dawson, M. I. Gonzalez, N. Upton, M. N. Pangalos and C. Dingwall (2003). "BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes." Mol Cell Neurosci **24**(3): 646-655.
- Hartley, D. M., D. M. Walsh, C. P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P. M. Vassilev, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1999). "Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons." J. Neurosci. **19**: 8876-8884.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lübke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." Hum Mol Genet **11**(21): 2615-2624.
- He, X., F. Li, W. P. Chang and J. Tang (2005). "GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE)." J Biol Chem **280**(12): 11696-11703.
- Heber, S., J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rüllicke, H. von Kretschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, H. P. Lipp, D. P. Wolfer and U. Müller (2000). "Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members." J Neurosci **20**(21): 7951-7963.
- Hébert, S. S., K. Horré, L. Nicolăi, A. S. Papadopoulou, W. Mandemakers, A. N. Silahatoglu, S. Kauppinen, ;, A. Delacourte and B. De Strooper (2008). "Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(17): 6415-6420.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretschmar, S. Sisodia and U. Müller (2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." Embo J **23**(20): 4106-4115.
- Herrlich, A., E. Klinman, J. Fu, C. Sadegh and H. Lodish (2008). "Ectodomain cleavage of the EGF ligands HB-EGF, neuregulin1-beta, and TGF-alpha is specifically triggered by different stimuli and involves different PKC isoenzymes." FASEB J **22**(12): 4281-4295.
- Hinkle, C. L., S. W. Sunnarborg, D. Loiselle, C. E. Parker, M. Stevenson, W. E. Russell and D. C. Lee (2004). "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency." J Biol Chem **279**(23): 24179-24188.
- Ho, W. H., M. P. Armanini, A. Nuijens, H. S. Phillips and P. L. Osheroff (1995). "Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons." J Biol Chem **270**(24): 14523-14532.

- Hobbs, S. S., S. L. Coffing, A. T. Le, E. M. Cameron, E. E. Williams, M. Andrew, E. N. Blommel, R. P. Hammer, H. Chang and D. J. n. Riese (2002). "Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation." Oncogene **21**(55): 8442-8452.
- Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, R. W. Akita, W. J. Henzel, J. Lee, J. W. Park, D. Yansura, N. Abadi, H. Raab, G. D. Lewis and e. al. (1992). "Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2." Science **256**(5060): 1205-1210.
- Holsinger, R. M., C. A. McLean, K. Beyreuther, C. L. Masters and G. Evin (2002). "Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease." Ann Neurol **51**(6): 783-786.
- Horiuchi, K., S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel (2007). "Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx." Mol Biol Cell **18**(1): 176-188.
- Horiuchi, K., H. M. Zhou, K. Kelly, K. Manova and C. P. Blobel (2005). "Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2." Dev Biol **283**(2): 459-471.
- Hu, X., W. He, C. Diaconu, X. Tang, G. J. Kidd, W. B. Macklin, B. D. Trapp and R. Yan (2008). "Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves." FASEB J. **22**(8): 2970-2980.
- Hu, X., C. W. Hicks, W. He, P. Wong, W. B. Macklin, B. D. Trapp and R. Yan (2006). "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system." Nat Neurosci **9**(12): 1520-1525.
- Huang, Y. Z., S. Won, D. W. Ali, Q. Wang, M. Tanowitz, Q. S. Du, K. A. Pelkey, D. J. Yang, W. C. Xiong, M. W. Salter and L. Mei (2000). "Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses." Neuron **26**(2): 443-455.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T. A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K. J. Kallen, S. Rose-John and A. Ludwig (2003). "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion." Blood **102**(4): 1186-1195.
- Huse, J. T., D. S. Pijak, G. J. Leslie, V. M. Lee and R. W. Doms (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." J Biol Chem **275**(43): 33729-33737.
- Hussain, I., D. Powell, D. R. Howlett, D. G. Tew, T. D. Meek, ;, C. Chapman, I. S. Gloger, K. E. Murphy, C. D. Southan, D. M. Ryan, T. S. Smith, D. L. Simmons, F. S. Walsh, C. Dingwall and G. Christie (1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase." Mol Cell Neurosci **14**: 419-427.
- Hussain, I., D. J. Powell, D. R. Howlett, G. A. Chapman, L. Gilmour, P. R. Murdock, D. G. Tew, ;, T. D. Meek, C. Chapman, K. Schneider, S. J. Ratcliffe and e. al (2000). "ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site." Mol Cell Neurosci **16**(5): 609-619.
- Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R. C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J. M. Kwon, P. Nowotny, P. Heutink and e. al. (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." Nature **393** (6686): 702-705.
- Janes, P. W., N. Saha, W. A. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann and D. B. Nikolov (2005). "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans." Cell **123**(2): 291-304.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger and P. T. J. Lansbury (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**(18): 4693-4697.

- Jessen, K. R. and R. Mirsky (1998). "Origin and early development of Schwann cells." Microsc Res Tech **41**(5): 393-402.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." Nat Rev Neurosci **6**(9): 671-682.
- Jonsson, T., J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen, E. G. Jönsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. Watts and K. Stefansson (2012). "A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline." Nature **488**(7409): 96-99.
- Jorissen, E., J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C. P. Blobel, M. Glatzel, B. De Strooper and P. Saftig (2010). "The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex." J Neurosci **30**(14): 4833-4844.
- Kaether, C., C. Haass and H. Steiner (2006). "Assembly, trafficking and function of gammasecretase." Neurodegener Dis **3**: 275-283.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-736.
- Kao, S. C., A. M. Krichevsky, K. S. Kosik and L. H. Tsai (2004). "BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons." J Biol Chem **279**(3): 1942-1949.
- Kawasumi, M., Y. Hashimoto, T. Chiba, K. Kanekura, Y. Yamagishi, M. Ishizaka, H. Tajima, T. Niikura and I. Nishimoto (2002). "Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults." Neurosignals **11**: 236-250.
- Kim, D. Y., B. W. Carey, H. Wang, L. A. Ingano, A. M. Binshtok, M. H. Wertz, W. H. Pettingell, P. He, V. M. Lee, C. J. Woolf and D. M. Kovacs (2007). "BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity." Nat Cell Biol **9**(7): 755-764.
- Kim, S. H., T. Ikeuchi, C. Yu and S. S. Sisodia (2003). "Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates." J Biol Chem **278**(36): 33992-34002.
- Kim, S. H., Y. I. Yin, Y. M. Li and S. S. Sisodia (2004). "Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway." J Biol Chem **279**(47): 48615-48619.
- Kitazume, S., K. Nakagawa, R. Oka, Y. Tachida, K. Ogawa, Y. Luo, M. Citron, H. Shitara, C. Taya, H. Yonekawa, J. C. Paulson, E. Miyoshi, N. Taniguchi and Y. Hashimoto (2005). "In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase." J Biol Chem **280**(9): 8589-8595.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T. C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki and S. Ishiura (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor." protein. Biochem J **343**: 371-375.
- Kojro, E., P. Föger, C. Prinzen, A. Kanarek, D. Rat, K. Endres, F. Fahrenholz and R. Postina (2010). "Statins and the Squalene Synthase Inhibitor Zaragozic Acid Stimulate the Non-Amyloidogenic Pathway of Amyloid- β Protein Precursor Processing by Suppression of Cholesterol Synthesis." Journal of Alzheimer's Disease **20**(4): 1215-1231.

- Koo, E. H. and S. L. Squazzo (1994). "Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway." J Biol Chem **269**(26): 17386-17389.
- Kramer, R., N. Bucay, D. J. Kane, L. E. Martin, J. E. Tarpley and L. E. Theill (1996). "Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4833-4838.
- Kuhn, P. H., K. Koroniak, S. Hög, A. Colombo, U. Zeitschel, M. Willem, C. Volbracht, U. Schepers, A. Imhof, A. Hoffmeister, C. Haass, S. Roßner, S. Bräse and S. F. Lichtenthaler (2012). "Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons." EMBO J, **31**(14): 3157-3168.
- Kuhn, P. H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J. W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner and S. F. Lichtenthaler (2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." Embo J **29**(17): 3020-3032.
- Kwon, O. B., M. Longart, D. Vullhorst, D. A. Hoffman and A. Buonanno (2005). "Neuregulin-1 reverses long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses." J Neurosci **25**(41): 9378-9383.
- La Marca, R., F. Cerri, K. Horiuchi, A. Bachi, M. L. Feltri, L. Wrabetz, C. P. Blobel, A. Quattrini, J. L. Salzer and C. Taveggia (2011). "TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination." Nat Neurosci **14**(7): 857-865.
- Laird, F. M., H. Cai, A. V. Savonenko, M. H. Farah, K. He, T. M. Melnikova, H. Wen, H. C. Chiang, G. Xu, V. E. Koliatsos, D. R. Borchelt, D. L. Price, H. K. Lee and P. C. Wong (2005). "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions." J Neurosci **25**(50): 11693-11709.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft and Klein W.L. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 6448-6453.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass and F. Fahrenholz (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.
- Lammich, S., S. Schöbel, A. K. Zimmer, S. F. Lichtenthaler and C. Haass (2004). "Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region." Embo Rep **5**(6): 620-625.
- Laudon, H., E. M. Hansson, K. Melén, A. Bergman, M. R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne and J. Näslund (2005). "A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1." J Biol Chem **280**(42): 35352-35360.
- Le Gall, S. M., P. Bobé, K. Reiss, K. Horiuchi, X. D. Niu, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig and C. P. Blobel (2009). "ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , L-selectin, and tumor necrosis factor α ." Mol Biol Cell **20**(6): 1785-1794.
- Lee, S. F., S. Shah, H. Li, C. Yu, W. Han and G. Yu (2002). "Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch." J Biol Chem **277**(47): 45013-45019.
- Lee, V. M. and J. Q. Trojanowski (1999). "Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models." Neuron **24**(3): 507-510.
- Leimeroth, R., C. Lobsiger, A. Lüssi, V. Taylor, U. Suter and L. Sommer (2002). "Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells." Dev Biol **246**(2): 245-258.

- Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang and e. al. (1995 a). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.
- Levy-Lahad, E., E. M. Wijsman, E. Nemens, L. Anderson, K. A. Goddard, J. L. Weber, T. D. Bird and G. D. Schellenberg (1995 b). "A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1." Science **269**(5226): 970-973.
- Lewis, J., E. McGowan, J. Rockwood, H. Melrose, P. Nacharaju, M. Van Slegtenhorst, K. Gwinn-Hardy, M. Paul Murphy, M. Baker, X. Yu, K. Duff, J. Hardy, A. Corral, W. L. Lin, S. H. Yen, D. W. Dickson, P. Davies and M. Hutton (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." Nat Genet **25**(4): 402-405.
- Li, B., R. S. Woo, L. Mei and R. Malinow (2007). "The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity." Neuron **54**(4): 583-597.
- Li, L., S. Cleary, M. A. Mandarano, W. Long, C. Birchmeier and F. E. Jones (2002). "The breast proto-oncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland." Oncogene **21**(32): 4900-4907.
- Li, Q. and T. C. Südhof (2004). "Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1." J Biol Chem **279**(11): 10542-10550.
- Lichtenthaler, S. F. (2011). "Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential." J Neurochem **116**(1): 10-21.
- Lichtenthaler, S. F., D. I. Dominguez, G. G. Westmeyer, K. Reiss, C. Haass, P. Saftig, B. De Strooper and B. Seed (2003). "The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1." J Biol Chem **278**(49): 48713-48719.
- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti and J. Tang (2000). "Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 1456-1460.
- Liu, X., H. Hwang, L. Cao, M. Buckland, A. Cunningham, J. Chen, K. R. Chien, R. M. Graham and M. Zhou (1998). "Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13024-13029.
- Liu, Y., B. Ford, M. A. Mann and G. D. Fischbach (2001). "Neuregulins increase alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus." J Neurosci **21**(15): 5660-5669.
- Liu, Y., Y. M. Tao, R. S. Woo, W. C. Xiong and L. Mei (2007). "Stimulated ErbB4 internalization is necessary for neuregulin signaling in neurons." Biochem Biophys Res Commun **354**(2): 505-510.
- Loeb, J. A. and G. D. Fischbach (1995). "ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain." J Cell Biol **130**(1): 127-135.
- Loeb, J. A., E. T. Susanto and G. D. Fischbach (1998). "The neuregulin precursor proARIA is processed to ARIA after expression on the cell surface by a protein kinase C-enhanced mechanism." Mol Cell Neurosci **11**(1-2): 77-91.
- Longart, M., M. Chatani-Hinze, C. M. Gonzalez, D. Vullhorst and A. Buonanno (2007). "Regulation of ErbB-4 endocytosis by neuregulin in GABAergic hippocampal interneurons." Brain Res Bull **73**(4-6): 210-219.
- Lu, H. S., S. Hara, L. W. Wong, M. D. Jones, V. Katta, G. Trail, A. Zou, D. Brankow, S. Cole, S. Hu and e. al (1995). "Post-translational processing of membrane-associated neu differentiation factor proisoforms expressed in mammalian cells." J Biol Chem **270**(9): 4775-4783.

- Ludwig, A., C. Hundhausen, M. H. Lambert, N. Broadway, R. C. Andrews, D. M. Bickett, M. A. Leesnitzer and J. D. Becherer (2005). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." Comb Chem High Throughput Screen **8**(2): 161-171.
- Lue, L. F., Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel and J. Rogers (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol **155**(3): 853-862.
- Luo, X., M. Prior, W. He, X. Hu, X. Tang, W. Sheng, S. Yadav, S. Kiryu-Seo, R. Miller, B. D. Trapp and R. Yan (2011). "Cleavage of Neuregulin-1 by BACE1 or ADAM10 produces differential effects on myelination." J Biol Chem **286**(27): 23967-23974.
- Luo, Y., B. Bolon, S. Kahn, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J. C. Louis, Q. Yan, W. G. Richards, M. Citron and R. Vassar (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." Nat Neurosci **4**: 231-232.
- Mandelkow, E. M. and E. Mandelkow (1998). "Tau in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol **8**(11): 425-427.
- Marcello, E., F. Gardoni, M. Di Luca and I. Pérez-Otaño (2010). "An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **285**(14): 10376-10384.
- Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, M. S. Chen, O. Bermingham-McDonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, K. Kobayashi and e. al. (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system." Nature **362**(6418): 312-318.
- Maretzky, T., K. Reiss, A. Ludwig, J. Buchholz, F. Scholz, E. Proksch, d. S. B., D. Hartmann and P. Saftig (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**(26): 9182-9187.
- Maskos, K., C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, G. A. Ellestad, P. Reddy, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, R. Davis, H. R. Clarke, M. Petersen, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, C. J. March, R. J. Paxton, R. A. Black and W. Bode (1998). "Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3408-3412.
- Massagué, J. (1990). "Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors." J Biol Chem **265**(35): 21393-21396.
- Masters, C. L., G. Multhaup, G. Simms, J. Pottgiesser, R. N. Martins and K. Beyreuther (1985b). "Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels." Embo J **4**(11): 2757-2763.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985 a). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci USA **82**(12): 4245-4249.
- Meakin, P. J., A. J. Harper, D. L. Hamilton, J. Gallagher, A. D. McNeilly, L. A. Burgess, L. M. Vaanholt, K. A. Bannon, J. Latham, I. Hussain, J. R. Speakman, D. R. Howlett and M. L. Ashford (2012). "Reduction in BACE1 decreases body weight, protects against diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity in mice." Biochem J **441**(1): 285-296.
- Mei, L. and W. C. Xiong (2008). "Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia." Nat Rev Neurosci **9**(6): 437-452.

- Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." Nature **378**(6555): 386-390.
- Meyer, D., T. Yamaai, A. Garratt, E. Riethmacher-Sonnenberg, D. Kane, L. E. Theill and C. Birchmeier (1997). "Isoform-specific expression and function of neuregulin." Development **124**(18): 3575-3586.
- Meziane, H., J. C. Dodart, C. Mathis, S. Little, J. Clemens, S. M. Paul and A. Ungerer (1998). "Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12683-12688.
- Michailov, G. V., M. W. Sereda, B. G. Brinkmann, T. M. Fischer, B. Haug, C. Birchmeier, L. Role, C. Lai, M. H. Schwab and K. A. Nave (2004). "Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness." Science **304**(5671): 700-703.
- Mihailovich, M., R. Thermann, F. Grohovaz, M. W. Hentze and D. Zacchetti (2007). "Complex translational regulation of BACE1 involves upstream AUGs and stimulatory elements within the 5' untranslated region." Nucleic Acids Res **35**(9): 2975-2985.
- Montero, J. C., L. Yuste, E. Díaz-Rodríguez, A. Esparís-Ogando and A. Pandiella (2000). "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." Mol Cell Neurosci **16**(5): 631-648.
- Morris, H. R., M. N. Khan, J. C. Janssen, J. M. Brown, J. Perez-Tur, M. Baker, M. Ozansoy, J. Hardy, M. Hutton, N. W. Wood, A. J. Lees, T. Revesz, P. Lantos and M. N. Rossor (2001). "The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia." Arch Neurol **58**(11): 1813-1816.
- Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood and L. McConlogue (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." J Neurosci **20**(11): 4050-4058.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad and L. Lannfelt (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." Nat Genet **1**(5): 345-347.
- Nagara, Y., M. Hagiya, N. Hatano, E. Futai, S. Suo, Y. Takaoka, Y. Murakami, A. Ito and S. Ishiura (2012). "Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by γ -secretase complex." Biochem Biophys Res Commun **417**(1): 462-467.
- Naslund, J., V. Haroutunian, R. Mohs, K. L. Davis, P. Davies, P. Greengard and J. D. Buxbaum (2000). "Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline." Jama **283**(12): 1571-1577.
- Oberto, M., I. Soncin, P. Bovolín, S. Voyron, M. De Bortoli, C. Dati, A. Fasolo and I. Perroteau (2001). "ErbB-4 and neuregulin expression in the adult mouse olfactory bulb after peripheral denervation." Eur J Neurosci **14**(3): 513-521.
- Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng and F. M. LaFerla (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(8): 1063-1070.
- Ohno, M., E. A. Sametsky, L. H. Younkin, H. Oakley, S. G. Younkin, M. Citron, R. Vassar and J. F. Disterhoft (2004). "BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease." Neuron **41**(1): 27-33.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, H. A. Lane and N. E. Hynes (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." Embo J **19**(13): 3159-3167.

- Oyama, F., N. J. Cairns, H. Shimada, R. Oyama, K. Titani and Y. Ihara (1994). "Down's syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination." J Neurochem **62**(3): 1062-1066.
- Ozaki, M., M. Sasner, R. Yano, H. S. Lu and A. Buonanno (1997). "Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit." Nature **390**(6661): 691-694.
- Page, R. M., K. Baumann, M. Tomioka, B. I. Pérez-Revuelta, A. Fukumori, H. Jacobsen, A. Flohr, T. Luebbbers, L. Ozmen, H. Steiner and C. Haass (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**(2): 677-683.
- Pan, D. and G. M. Rubin (1997). "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis." Cell **90**(2): 271-280.
- Park, S. K., D. Solomon and T. Vartanian (2001). "Growth factor control of CNS myelination." Dev Neurosci **23**(4-5): 327-337.
- Patel, N. V., M. J. Acarregui, J. M. Snyder, J. M. Klein, M. X. Sliwkowski and J. A. Kern (2000). "Neuregulin-1 and human epidermal growth factor receptors 2 and 3 play a role in human lung development in vitro." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(4): 432-440.
- Peles, E., S. S. Bacus, R. A. Koski, H. S. Lu, D. Wen, S. G. Ogden, R. B. Levy and Y. Yarden (1992). "Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells." Cell **69**(1): 205-216.
- Pike, C. J., B. J. Cummings, R. Monzavi and C. W. Cotman (1994). "Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrogliosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease." Neuroscience **63**(2): 517-531.
- Pitcher, G. M., S. Beggs, R. S. Woo, L. Mei and M. W. Salter (2008). "ErbB4 is a suppressor of long-term potentiation in the adult hippocampus." Neuroreport **19**(2): 139-143.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven and F. Fahrenholz (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." J Clin Invest **113**(10): 1456-1464.
- Prokop, S., K. Shirotani, D. Edbauer, C. Haass and H. Steiner (2004). "Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex." J Biol Chem **279**(22): 23255-23261.
- Reisberg, B., J. Sadavoy, L. W. Lazarus, L. F. Jarvik and e. al (1996). "Comprehensive review of geriatric psychiatry." Am. Assoc. Geriatric Psych. Am. Psych. Press.: 345-369.
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann and P. Saftig (2005). "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling." Embo J **24**(4): 742-752.
- Rentschler, S., J. Zander, K. Meyers, D. France, R. Levine, G. Porter, S. A. Rivkees, G. E. Morley and G. I. Fishman (2002). "Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 10464-10469.
- Rieff, H. I., L. T. Raetzman, D. W. Sapp, H. H. Yeh, R. E. Siegel and G. Corfas (1999). "Neuregulin induces GABA(A) receptor subunit expression and neurite outgrowth in cerebellar granule cells." J Neurosci **19**(24): 10757-10766.
- Rio, C., H. I. Rieff, P. Qi, T. S. Khurana and G. Corfas (1997). "Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration." Neuron **19**(1): 39-50.

- Roberson, E. D. and L. Mucke (2006). "100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease." Science **314**(5800): 781-784.
- Roch, J. M., E. Masliah, A. C. Roch-Levecq, M. P. Sundsmo, D. A. Otero, I. Veinbergs and T. Saitoh (1994). "Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7450-7454.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. L. Ikeda, Y., H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda and e. al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." Nature **376**(6543): 775-778.
- Rogers, J. T., L. M. Leiter, J. McPhee, C. M. Cahill, S. S. Zhan, H. Potter and L. N. Nilsson (1999). "Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences." J Biol Chem **274**(10): 6421-6431.
- Rogers, J. T., J. D. Randall, C. M. Cahill, P. S. Eder, X. Huang, H. Gunshin, L. Leiter, J. McPhee, S. S. Sarang, T. Utsuki, N. H. Greig, D. K. Lahiri, R. E. Tanzi, A. I. Bush, T. Giordano and S. R. Gullans (2002). "An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript." J Biol Chem **277**(47): 45518-45528.
- Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst and C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." J Biol Chem **274**(6): 3531-3540.
- Rooke, J., D. Pan, T. Xu and G. M. Rubin (1996). "KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis." Science **273**(5279): 1227-1231.
- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerrière, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg and D. Campion (2006). "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy." Nat Genet **38**(1): 24-26.
- Rowe, C. C., U. Ackerman, W. Browne, R. Mulligan, K. L. Pike, G. O'Keefe, H. Tochon-Danguy, G. Chan, S. U. Berlangieri, G. Jones, K. L. Dickinson-Rowe, H. P. Kung, W. Zhang, M. P. Kung, D. Skovronsky, T. Dyrks, G. Holl, S. Krause, M. Friebe, L. Lehman, S. Lindemann, L. M. Dinkelborg, C. L. Masters and V. L. Villemagne (2008). "Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism." Lancet Neurol **7**(2): 129-135.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." J Cell Biology **164**(5): 769-779.
- Sambamurti, K., R. Kinsey, B. Maloney, Y. W. Ge and D. K. Lahiri (2004). "Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter." FASEB J **18**(9).
- Samuels, S. C. and K. L. Davis (1998). "Experimental approaches to cognitive disturbance in Alzheimer's disease." Harv Rev Psychiatry **6**(1): 11-22.
- Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M. M. Condron, D. B. Teplow and C. Haass (2001). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch." Embo Rep **2**(9): 835-841.
- Sato, T., T. S. Diehl, S. Narayanan, S. Funamoto, Y. Ihara, B. De Strooper, H. Steiner, C. Haass and M. S. Wolfe (2007). "Active gamma-secretase complexes contain only one of each component." J Biol Chem **282**(47): 33985-33993.
- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts and e. al. (1993). "Association of

apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." Neurology **43**(8): 1467-1472.

Savonenko, A. V., T. Melnikova, F. M. Laird, K. A. Stewart, D. L. Price and P. C. Wong (2008). "Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(14): 5585-5590.

Schlessinger, J. (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." Cell Calcium **110**(6): 669-672.

Schlöndorff, J. and C. P. Blobel (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.

Schmechel, D. E. S., A. M.; Strittmatter, W. J.; Crain, B. J.; Hulette, C. M.; Joo, S. H.; Pericak-Vance, M. A.; Goldgaber, D.; Roses, A. D. (1993). "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci USA **90**(20): 9649-9653.

Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger and R. Kopan (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." Nature **393**(6683): 382-386.

Seals, D. F. and S. A. Courtneidge (2003). "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions." Genes Dev **17**(1): 7-30.

Selkoe, D. J. (1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." Neuron **6**: 487-498.

Selkoe, D. J. (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." J. Biol. Chem **271**: 18295-18298.

Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." Nature **399**(6738 Suppl): A23-31.

Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev **81**(2): 741-766.

Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." Science **298**(5594): 789-791.

Selkoe, D. J. and D. Schenk (2003). "Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **43**: 545-584.

Seubert, P., T. Oltersdorf, M. G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D. L. Davis, K. Bryant, L. C. Fritz, D. Galasko, L. J. Thal and e. al (1993). "Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide." Nature **361**(6409): 260-263.

Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst and e. al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." Nature **359**(6393): 325-327.

Shah, N. M., M. A. Marchionni, I. Isaacs, P. Stroobant and D. J. Anderson (1994). "Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate." Cell Calcium **77**(3): 349-360.

Shah, S., S. F. Lee, K. Tabuchi, Y. H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C. E. r. Dann, T. Südhof and G. Yu (2005). "Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor." Cell Calcium **122**(3): 435-447.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi and e. al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**: 754-760.

- Shirakabe, K., S. Wakatsuki, T. Kurisaki and A. Fujisawa-Sehara (2001). "Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin." J Biol Chem **276**(12): 9352-9358.
- Shirotani, K., D. Edbauer, M. Kostka, H. Steiner and C. Haass (2004). "Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1." J Neurochem **89**(6): 1520-1527.
- Shirotani, K., M. Tomioka, E. Kremmer, C. Haass and H. Steiner (2007). "Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes." Neurobiol Dis **27**(1): 102-107.
- Shoji, M., T. E. Golde, J. Ghiso, T. T. Cheung, S. Estus, L. M. Shaffer, X. D. Cai, D. M. McKay, R. Tintner, B. Frangione and S. G. Younkin (1992). "Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing." Science **258**(5079): 126-129.
- Singer, O., R. A. Marr, E. Rockenstein, L. Crews, N. G. Coufal, F. H. Gage, I. M. Verma and E. Masliah (2005). "Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model." Nat Neurosci **8**(10): 1343-1349.
- Sinha, S., J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensari, W. S., D. Walker, V. John and e. al (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain." Nature **402**(6761): 537-540.
- Sisodia, S. S. (1992). " β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(13): 6075-6079.
- Sisodia, S. S., E. H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck and D. L. Price (1990). "Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing." Science **248**(4954): 492-495.
- Skovronsky, D. M., D. B. Moore, M. E. Milla, R. W. Doms and V. M. Lee (2000). "Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloidbeta precursor protein in the trans-golgi network." J Biol Chem **275**(4): 2568-2575.
- Slack, B. E., L. K. Ma and C. C. Seah (2001). "Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme." Biochem J **357**((Pt 3)): 787-794.
- Small, S. A. and S. Gandy (2006). "Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis." Neuron **52**(1): 15-31.
- Sprecher, C. A., F. J. Grant, G. Grimm, P. J. O'Hara, F. Norris, K. Norris and D. C. Foster (1993). "Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family." Biochemistry **32**(17): 4481-4486.
- Stachel, S. J., C. A. Coburn, T. G. Steele, K. G. Jones, E. F. Loutzenhiser, A. R. Gregro, H. A. Rajapakse, M. T. Lai, M. C. Crouthamel, M. Xu, K. Tugusheva, J. E. Lineberger, B. L. Pietrak, A. S. Espeseth, X. P. Shi, E. Chen-Dodson, M. K. Holloway, S. Munshi, A. J. Simon, L. Kuo and J. P. Vacca (2004). "Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1)." J Med Chem **47**(26): 6447-6450.
- Stefansson, H., E. Sigurdsson, V. Steinthorsdottir, S. Bjornsdottir, T. Sigmundsson and e. al. (2002). "Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia." American Journal of Human Genetics **71**(4): 877-892.
- Steiner, H., ; and C. Haass (2000). "Intramembrane proteolysis by presenilins." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 217-224.

- Steiner, H., R. Fluhner and C. Haass (2008). "Intramembrane Proteolysis by {gamma}-Secretase." J Biol Chem **283**(44): 29627-29631.
- Steiner, H., M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M. L. Grim, R. Baumeister, K. Fechteler and C. Haass (2000). "Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases." Nat Cell Biol **2**(11): 848-851.
- Steinthorsdottir, V., H. Stefansson, S. Ghosh, B. Birgisdottir, S. Bjornsdottir, A. C. Fasquel, O. Olafsson, K. Stefansson and J. R. Gulcher (2004). "Multiple novel transcription initiation sites for NRG1." Genes Cells **342**(1): 97-105.
- Stockley, J. H. and C. O'Neill (2008). "Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease." Cell Mol Life Sci **65**(20): 3265-3289.
- Struhl, G. and A. Adachi (2000). "Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins." Mol Cell **6**(3): 625-636.
- Takasugi, N., T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran and T. Iwatsubo (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." Nature **422**(6930).
- Tanzi, R. E. (1996). "Neuropathology in the Down's syndrome brain." Nat. Med **2**(1): 31-32.
- Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit and R. L. Neve (1987). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." Science **235**(4791): 880-884.
- Taveggia, C., P. Thaker, A. Petrylak, G. L. Caporaso, A. Toews, D. L. Falls, S. Einheber and J. L. Salzer (2008). "Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination." Glia **56**(3): 284-293.
- Taveggia, C., G. Zanazzi, A. Petrylak, H. Yano, J. Rosenbluth, S. Einheber, X. Xu, R. M. Esper, J. A. Loeb, P. Shrager, M. V. Chao, D. L. Falls, L. Role and J. L. Salzer (2005). "Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons." Neuron **47**(5): 681-694.
- Terry, R. D. (2006). "Alzheimer's disease and the aging brain." J Geriatr Psychiatry Neurol **19**(3): 125-128.
- Terry, R. D., N. K. Gonatas and M. Weiss (1964). "The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease." Trans Am Neurol Assoc. **89**: 12.
- Thinakaran, G., D. R. Borchelt, M. K. Lee, H. H. Slunt, L. Spitzer, G. Kim, T. Ratovitsky, F. Davenport, C. Nordstedt, M. Seeger, J. Hardy, A. I. Levey, S. E. Gandy, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, D. L. Price and S. S. Sisodia (1996). "Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo." Neuron **17**(1): 181-190.
- Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem **283**(44): 29615-29619.
- Tilley, L., K. Morgan and N. Kalsheker (1998). "Genetic risk factors in Alzheimer's disease, ." Mol Pathol **51**(6): 293-304.
- Trachtenberg, J. T. and W. J. Thompson (1996). "Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor." Nature **379**(6561): 174-177.
- Turner, R. T. r., G. Koelsch, L. Hong, P. Castanheira, J. Ermolieff, A. K. Ghosh and J. Tang (2001). "Subsite specificity of memapsin 2 (beta-secretase): implications for inhibitor design." Biochemistry **40**(40): 10001-10006.
- Vassar, R. (2001). "The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease." J Mol Neurosci **17**(2): 157-170.

- Vassar, R. (2004). "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **23**(1-2): 105-114.
- Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff and e. al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* **286**: 735-741.
- Vassar, R. and M. Citron (2000). "Abeta-Generating Enzymes." *Neuron* **27**(3): 419-422.
- Von Koch, C. S., H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L. H. T. van der Ploeg, D. L. Price and S. S. Sisodia (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." *Neurobiol. Aging* **18**(6): 661-669.
- Wahle, T., K. Prager, N. Raffler, C. Haass, M. Famulok and J. Walter (2005). "GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network." *Mol Cell Neurosci* **29**(3): 453-461.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-539.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-539.
- Walter, J., R. Fluhrer, B. Hartung, M. Willem, C. Kaether, A. Capell, S. Lammich, G. Multhaup and C. Haass (2001). "Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase." *J Biol Chem* **276**(18): 14634-14641.
- Wang, J. Y., S. J. Miller and D. L. Falls (2001). "The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain." *J Biol Chem* **276**(4): 2841-2851.
- Wang, R., D. Sweeney, S. E. Gandy and S. S. Sisodia (1996). "The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry." *J Biol Chem* **271**(50): 31894-31902.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi and F. Solomon (1992). "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10758-10762.
- Weggen, S., J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde and E. H. Koo (2001). "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity." *Nature* **414**(6860): 212-216.
- Weidemann, A., S. Eggert, F. B. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C. L. Masters, K. Beyreuther and G. Evin (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." *Biochemistry* **41**(8): 2825-2835.
- Wen, D., E. Peles, R. Cupples, S. V. Suggs, S. S. Bacus, Y. Luo, G. Trail, S. Hu, S. M. Silbiger, R. B. Levy and e. al. (1992). "Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit." *Cell* **69**(3): 559-572.
- Wen, D., S. V. Suggs, D. Karunakaran, N. Liu, R. L. Cupples, Y. Luo, A. M. Janssen, N. Ben-Baruch, D. B. Trollinger, V. L. Jacobsen and e. al. (1994). "Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1909-1919.

- Wen, Y., W. H. Yu, B. Maloney, J. Bailey, J. Ma, I. Marié, T. Maurin, L. Wang, H. Figueroa, M. Herman, P. Krishnamurthy, L. Liu, E. Planel, L. F. Lau, D. K. Lahiri and K. Duff (2008). "Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing." Neuron **57**(5): 680-690.
- Westmeyer, G. G., M. Willem, S. F. Lichtenthaler, G. Lurman, G. Multhaup, I. Assfalg-Machleidt, K. Reiss, P. Saftig and C. Haass (2004). "Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme." J Biol Chem **279**(51): 53205-53212.
- Weyer, S. W., M. Klevanski, A. Delekate, V. Voikar, D. Aydin, M. Hick, M. Filippov, N. Drost, K. L. Schaller, M. Saar, M. A. Vogt, P. Gass, A. Samanta, A. Jäschke, M. Korte, D. P. Wolfer, J. H. Caldwell and U. C. Müller (2011). "APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP." Embo J **30**(11): 2266-2280.
- White, J. M. (2003). "ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 598-606.
- Willem, M., I. Dewachter, N. Smyth, T. Van Dooren, P. Borghgraef, C. Haass and F. Van Leuven (2004). "beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice." Am J Pathol **165**(5): 1621-1631.
- Willem, M., A. N. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. DeStrooper, P. Saftig, C. Birchmeier and C. Haass (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." Science **314**(5799): 664-666.
- Willem, M., S. Lammich and C. Haass (2009). "Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE 1)." Semin Cell Dev. Biol **20**(2): 175-182.
- Wisniewski, K., G. A. Jervis, R. C. Moretz and H. M. Wisniewski (1979). "Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia." Ann. Neurol. **5**(3): 288-294.
- Wolfe, M. S., W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly and D. J. Selkoe (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." Nature **398**(6727): 513-517.
- Wolfsberg, T. G. and J. M. White (1996). "ADAMs in fertilization and development." Dev Biol **180**(2): 389-401.
- Wolpowitz, D., T. B. A. Mason, P. Dietrich, M. Mendelsohn, D. A. Talmage and e. al. (2000). "Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin1 gene are required for maintenance of peripheral synapses." Neuron **25**(1): 79-91.
- Wong, H. K., T. Sakurai, F. Oyama, K. Kaneko, K. Wada, H. Miyazaki, M. Kurosawa, B. De Strooper, P. Saftig and N. Nukina (2005). "beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase." J Biol Chem **280**(24): 23009-23017.
- Woo, R. S., X. M. Li, Y. Tao, E. Carpenter-Hyland, Y. Z. Huang, J. Weber, H. Neiswender, X. P. Dong, J. Wu, M. Gassmann, C. Lai, W. C. Xiong, T. M. Gao and L. Mei (2007). "Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release." Neuron **54**(4): 599-610.
- Yamazaki, T., E. H. Koo and D. J. Selkoe (1996). "Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization." J Cell Sci **109** (Pt 5): 999-1008.
- Yan, R., M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashier, N. C. Stratman, W. R. Mathews, A. E. Buhl and e. al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." Nature **402**(6761): 533-537.

- Yan, R., J. B. Munzner, M. E. Shuck and M. J. Bienkowski (2001). "BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells." J Biol Chem **276**(36): 34019-34027.
- Yang, L. B., K. Lindholm, R. Yan, M. Citron, W. Xia, X. L. Yang, T. Beach, L. Sue, P. Wong, D. Price, R. Li and Y. Shen (2003). "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." Nat Med **9**(1): 3-4.
- Yang, X., Y. Kuo, P. Devay, C. Yu and L. Role (1998). "A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis." Neuron **20**(2): 255-270.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.
- Yokozeki, T., S. Wakatsuki, K. Hatsuzawa, R. A. Black, I. Wada and A. Sehara-Fujisawa (2007). "Meltrin beta (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi apparatus: fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells." Genes Cells **12**(3): 329-343.
- Yu, G., M. Nishimura, S. Arawaka, D. Levitan, L. Zhang, A. Tandon, Y. Q. Song, E. Rogaeva, F. Chen, T. Kawarai, A. Supala, L. Levesque, H. Yu, D. S. Yang, E. Holmes, P. Milman, Y. Liang, D. M. Zhang, D. H. Xu, C. Sato, E. Rogaev, M. Smith, C. Janus, Y. Zhang, R. Aebersold, L. S. Farrer, S. Sorbi, A. Bruni, P. Fraser and P. St George-Hyslop (2000). "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." Nature **407**(6800): 48-54.
- Yuste, L., J. C. Montero, A. Esparís-Ogando and A. Pandiella (2005). "Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin." Cancer Res **65**(15): 6801-6810.
- Zhang, D., M. X. Sliwkowski, M. Mark, G. Frantz, R. Akita, Y. Sun, K. Hillan, C. Crowley, J. Brush and P. J. Godowski (1997). "Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9562-9567.
- Zhang, Z., P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein and B. A. Yankner (2000). "Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of b-APP and transmembrane cleavage of Notch-1." Nat. Cell Biol **2**(7): 463-465.
- Zhao, Y. Y., D. R. Sawyer, R. R. Baliga, D. J. Opel, X. Han, M. A. Marchionni and R. A. Kelly (1998). "Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes." J Biol Chem **273**(17): 10261-10269.
- Zheng, H., M. Jiang, M. E. Trumbauer, D. J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. W. Smith, R. P. Heavens, G. R. Dawson, S. Boyce, M. W. Conner, K. A. Stevens, H. H. Slunt, S. S. Sisoda, H. Y. Chen and L. H. Van der Ploeg (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." Cell **81**(4): 525-531.
- Zhou, H. M., G. Weskamp, V. Chesneau, U. Sahin, A. Vortkamp, K. Horiuchi, R. Chiusaroli, R. Hahn, D. Wilkes, P. Fisher, R. Baron, K. Manova, C. T. Basson, B. Hempstead and C. P. Blobel (2004). "Essential role for ADAM19 in cardiovascular morphogenesis." Mol Cell Biol **24**(1): 96-104.

9. Danksagung

Ich danke herzlich vor allem Herrn Prof. Dr. Christian Haass, dass er mir die Durchführung meiner Dissertation in seinem Labor am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München ermöglicht hat.

In besonderem Maße danke ich Herrn PD Dr. Michael Willem für seine umfangreiche Betreuung, für fruchtbare Diskussionen und seine engagierte fachliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfe bei der Bewältigung kleiner und größerer Probleme im Laboralltag, vor allem Katharina Schraner, sowie Božidar Novak, Sven Lammich, Sonja Zilow, Ann-Katrin Ludwig, Keiro Shirotani, Regina Fluhrer, Anja Capell, Dominik Büll, Peer-Hendrik Kuhn, Katrin Fellerer und Alice Sülzen. Herrn Tilman Schlunk vom Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-MS-Analysen.

Sehr herzlich danke ich Dr. Gundula Behrens vom Institut für Epidemiologie und Präventivmedizin der medizinischen Fakultät an der Universität Regensburg für die langjährige Freundschaft und ihre großartige Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Gefördert wurde meine Dissertation durch den Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin im Rahmen des „Förderprogramms für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der LMU, wofür ich Herrn Prof. Dr. Heesemann meinen besonderen Dank ausspreche.

Mein großer Dank gilt auch der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mir mein Studium und die Durchführung meiner Promotion finanziell sehr erleichtert hat.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter, meinem Bruder und Timo, dass Ihr stets zu mir gehalten und mich immer so herzlich und tatkräftig unterstützt und ermutigt habt.

10. Lebenslauf

Linnea Rabe

Geburtsdatum: 26.03.1981

Staatsangehörigkeit: deutsch

Facharztausbildung

03/2009 -08/2011	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München
Seit 08/2011	Assistenzärztin an der Frauenklinik des Rotkreuz-klinikums München

Promotion

Seit 02/2005	Experimentelle Doktorarbeit im Labor für Alzheimer- und Parkinson-Forschung bei Professor Christian Haass am Adolf Butenandt Institut der LMU mit dem Thema „Regulierte intramembranäre Proteolyse von Typ I Neuregulin 1-β“
--------------	--

Studium

10/2001 – 05/2008	Ludwig-Maximilians-Universität München, Studium der Humanmedizin
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
05/2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Stipendien

05/2004-06/2008	Studienstiftung des Deutschen Volkes
02/2005-07/2006	Stipendium des Promotionstudiengangs „Molekulare Medizin“ im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe der LMU)

Schulausbildung

09/1987 – 07/1996	Freie-Waldorf-Schule Essen
09/1996 – 06/2000	Rudolf-Steiner-Schule München-Ismaning
06/2000	Abitur als externer Teilnehmer am Werner-Heisenberg-Gymnasium Garching
	Karl-von-Frisch-Abiturienten-Preis im Leistungskurs-fach Biologie

11. Publikation

Dual Cleavage of Neuregulin 1 Type III by BACE1 and ADAM17 Liberates Its EGF-Like Domain and Allows Paracrine Signaling

Daniel Fleck,¹ Frauke van Bebber,² Alessio Colombo,^{2,5} Chiara Galante,¹ Benjamin M. Schwenk,² Linnea Rabe,¹ Heike Hampel,¹ Bozidar Novak,¹ Elisabeth Kremmer,³ Sabina Tahirovic,² Dieter Edbauer,^{1,2,4} Stefan F. Lichtenthaler,^{2,4,5} Bettina Schmid,^{2,4} Michael Willem,¹ and Christian Haass^{1,2,4}

¹Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, ²German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 80336 Munich, Germany, ³Institute of Molecular Immunology, Helmholtz Center Munich, 81377 Munich, Germany, ⁴Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), 80336 Munich, Germany, and ⁵Neuroproteomics, Technical University of Munich, 81377 Munich, Germany

Proteolytic shedding of cell surface proteins generates paracrine signals involved in numerous signaling pathways. Neuregulin 1 (NRG1) type III is involved in myelination of the peripheral nervous system, for which it requires proteolytic activation by proteases of the ADAM family and BACE1. These proteases are major therapeutic targets for the prevention of Alzheimer's disease because they are also involved in the proteolytic generation of the neurotoxic amyloid β -peptide. Identification and functional investigation of their physiological substrates is therefore of greatest importance in preventing unwanted side effects. Here we investigated proteolytic processing of NRG1 type III and demonstrate that the ectodomain can be cleaved by three different sheddases, namely ADAM10, ADAM17, and BACE1. Surprisingly, we not only found cleavage by ADAM10, ADAM17, and BACE1 C-terminal to the epidermal growth factor (EGF)-like domain, which is believed to play a pivotal role in signaling, but also additional cleavage sites for ADAM17 and BACE1 N-terminal to that domain. Proteolytic processing at N- and C-terminal sites of the EGF-like domain results in the secretion of this domain from NRG1 type III. The soluble EGF-like domain is functionally active and stimulates ErbB3 signaling in tissue culture assays. Moreover, the soluble EGF-like domain is capable of rescuing hypomyelination in a zebrafish mutant lacking BACE1. Our data suggest that NRG1 type III-dependent myelination is not only controlled by membrane-retained NRG1 type III, but also in a paracrine manner via proteolytic liberation of the EGF-like domain.

Introduction

Protease signaling is an important cellular mechanism in health and disease, and sheddases often liberate membrane-bound substrates for paracrine signaling (Turk et al., 2012). Sheddases are also involved in the generation of the Alzheimer's disease-associated amyloid β -peptide from the amyloid precursor pro-

tein (APP) (Lichtenthaler et al., 2011). Production of amyloid β -peptide is initiated by the β -site APP-cleaving enzyme (BACE1 or β -secretase) (Haass, 2004), which is therefore a promising drug target for the treatment of Alzheimer's disease (De Strooper et al., 2010). Physiologically, BACE1 is required to process Neuregulin 1 (NRG1) type III, a key regulator of myelination in the peripheral nervous system (PNS; Hu et al., 2006; Willem et al., 2006; Birchmeier and Nave, 2008; Brinkmann et al., 2008). Therefore, understanding the precise function of BACE1 in NRG1 type III processing and signaling is crucial to avoid side effects upon therapeutic inhibition of BACE1. NRG1 is predominantly expressed in neurons and multiple variants are generated by alternative splicing. All NRG1 isoforms contain an epidermal growth factor (EGF)-like domain, which binds and activates ErbB receptor tyrosine kinases (Falls, 2003; Mei and Xiong, 2008). Although most isoforms are single transmembrane domain (TMD) proteins, NRG1 type III contains two TMDs and forms a hairpin-like protein with the EGF-like domain in its extracellular loop (Fig. 1A; Wang et al., 2001).

NRG1 type III is essential for Schwann cell development in both mouse and zebrafish and determines myelin sheath thickness (Wolpowitz et al., 2000; Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005; Monk and Talbot, 2009; Perlin et al., 2011). BACE1

Received July 16, 2012; revised Feb. 15, 2013; accepted March 20, 2013.

Author contributions: S.T., D.E., S.F.L., B.S., M.W., and C.H. designed research; D.F., F.v.B., A.C., C.G., B.M.S., L.R., H.H., B.N., and M.W. performed research; E.K. contributed unpublished reagents/analytic tools; D.F. and C.H. analyzed data; D.F., F.v.B., and C.H. wrote the paper.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft Collaborative Research Center (Grant #SFB596 "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration" A9 to M.W. and C.H., A16 to B.S., and Z2 to E.K.), the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013)/ERC Grant Agreement No. 321366-Amyloid (advanced grant to C.H.), the Helmholtz Young Investigator program (to D.E.), the Hans and Ilse Breuer Foundation (fellowship to D.F.), the Federal Ministry of Education and Research ("IG Alzheimer" to M.W. and C.H., Competence Network for Neurodegenerative Diseases (KNDD) to S.F.L. and C.H.). We thank Dr. Boris Schmidt (Technical University of Darmstadt) for kindly providing the inhibitor GL254023X, Dr. Paul Saftig (University Kiel) and Galderma for kindly providing the inhibitor GL 506-3, and Drs. Ignasi Forné, Lars Israel, and Axel Imhof (Center for Protein Analysis, Ludwig-Maximilians-University, Munich) for support with the MS analysis.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to either Christian Haass or Michael Willem, Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstrasse 44, 80336 Munich, Germany. E-mail: christian.haass@dzne.jmu.de or michael.willem@med.uni-muenchen.de.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3372-12.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/337856-14\$15.00/0

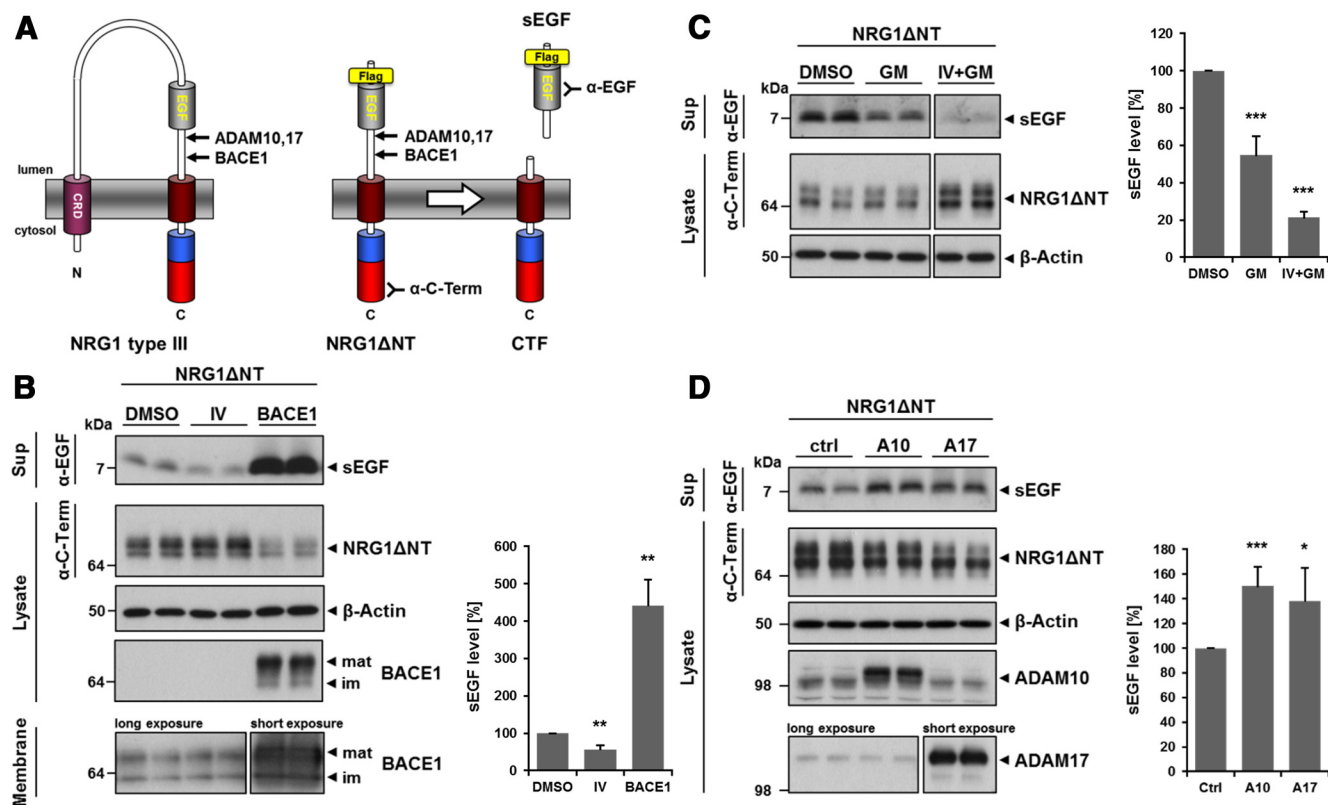


Figure 1. BACE1, ADAM10, and ADAM17 cleave in the stalk region of NRG1 type III. **A**, Schematic representation of NRG1ΔNT. NRG1ΔNT comprises the EGF-like domain and the C terminus but lacks the N terminus of NRG1 type III. A Flag-tag was inserted immediately N-terminal of the EGF-like domain to facilitate immunoprecipitation for MS analysis. Shedding of NRG1ΔNT by BACE1, ADAM10, or ADAM17 releases an sEGF domain that was detected directly in the supernatant using an EGF antibody. NRG1ΔNT was detected in the cell lysate with a C-terminal antibody. CRD indicates cysteine-rich domain. **B**, BACE1 is shedding NRG1 type III in the stalk region. HEK293 cells transfected with NRG1ΔNT were treated with the specific BACE1 inhibitor IV (10 μM) or cotransfected with BACE1. Note that, due to its rapid turnover, the CTF generated by shedding can only be detected upon γ-secretase inhibition (data not shown). Expression of transfected and endogenous BACE1 was confirmed in cell lysates and isolated membranes (bottom). mat indicates mature; im, immature. Bar graph: Quantification of experiments (mean ± SD; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, two-tailed unpaired Student's t test, inhibitor: n = 5, overexpression: n = 6). **C**, **D**, ADAM10 and ADAM17 contribute to the shedding of NRG1 type III in the stalk region. **C**, Cells expressing NRG1ΔNT were treated with the broad-spectrum ADAM inhibitor GM6001 (GM, 25 μM). Coinhibition of ADAMs and BACE1 was achieved by combined treatment with GM and inhibitor IV (25 and 10 μM, respectively). **D**, Coexpression of NRG1ΔNT with ADAM10 (A10) or ADAM17 (A17). Bar graphs in **C**, **D**: Quantification of experiments (mean ± SD; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, two-tailed unpaired Student's t test, in **C**, n = 5; in **D**, n = 6).

knock-out mice exhibit severe hypomyelination and accumulation of uncleaved NRG1 type III, demonstrating that NRG1 type III is a natural BACE1 substrate (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). NRG1-mediated signaling requires proteolytic processing and shedding in the stalk (juxtamembrane) region of NRG1 type I, and NRG1 type II releases the ectodomain as a paracrine signal. Conversely, shedding of NRG1 type III generates a membrane-tethered N-terminal fragment (NTF), which presents the EGF-like domain as juxtacrine signal (Falls, 2003). Because BACE1 knock-out mice still show some degree of myelination, other proteases may compensate for the loss of BACE1 (Velanac et al., 2012). Indeed, members of the ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) family also cleave NRG1 (Montero et al., 2000; Shirakabe et al., 2001; Horiuchi et al., 2005; La Marca et al., 2011; Luo et al., 2011), and the NRG1 type III NTF generated by ADAM10 activates ErbB receptors similar to the BACE1-processed fragment (Luo et al., 2011).

Based on the finding that recombinant soluble NRG1 type III NTFs are sufficient for signaling *in vitro* (Syed et al., 2010), we searched for a proteolytic pathway that would physiologically liberate a signaling-competent EGF-like domain from NRG1 type III. We found that the EGF-like domain of NRG1 type III is liberated by a dual BACE1 or ADAM17 cleavage. Moreover, the soluble EGF-like (sEGF) domain not only stimulates ErbB3 re-

ceptor phosphorylation, but also rescues hypomyelination in a *bace1* mutant zebrafish.

Materials and Methods

cDNA constructs, primers, and lentivirus production. NRG1 type III β1a (GenBank: AF194438.1) cDNA was cloned into the pcDNA4-myc-HisA vector (Invitrogen) using EcoRI and XhoI restriction sites. For the construct V5-IIINRG1, a V5-tag (GKPIPNLLGLDST) was inserted directly after M1 by fusion PCR. The V5-IIINRG1-HA construct was generated by introduction of an HA-tag (YPYDVPDYA) between V281 and M282. For the truncated construct NRG1ΔNT, the respective NRG1 type III sequence was subcloned into the pSecTag2A (Invitrogen) vector that features an N-terminal secretion signal. A suboptimal Furin cleavage site (RAVRSL) after the secretion signal sequence was optimized (RARRSV) by QuikChange mutagenesis (Stratagene) and a Flag-tag (DYKDDDDK) was inserted N-terminal of I236. The constructs α- and β-sEGF were generated by subcloning the respective sequences from V5-IIINRG1-HA into the modified pSecTag2A vector using the SfiI and XhoI restriction sites. BACE1 and ADAM10 expression constructs have been described previously (Capell et al., 2000; Wild-Bode et al., 2006). The construct expressing ADAM17 was kindly provided by Dr. R.A. Black at Amgen and has been described previously (Black et al., 1997). For expression in primary neurons, V5-IIINRG1-HA was cloned into a lentiviral expression vector AD149FhSynW2 under control of the human synapsin promoter using the NheI and EcoRI restriction sites. Lentiviral particles were produced in HEK293FT cells as described previously (Orozco et al.,

2012). Briefly, HEK293FT cells were cotransfected with the lentiviral expression construct psPAX2 and pVSVg for 24 h. After another 24 h, supernatant was collected and virus particles were concentrated by ultracentrifugation and resuspended in neurobasal medium. The sequences of all constructs were verified by sequencing. Construct and oligonucleotide sequences are available upon request.

Stable cell lines, transfection, and inhibitor treatment. HEK293T cells (Invitrogen) and MCF-7 cells (Karey and Sirbasku, 1988) were cultured in DMEM with Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). CHO ldlD cells deficient in O-linked glycosylation were a kind gift from Monty Krieger and have been described previously (Kingsley et al., 1986). CHO wild-type (wt) and ldlD cells were cultured in DMEM with 10% fetal calf serum and nonessential amino acids. Transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The following inhibitors were dissolved in DMSO and used at the indicated final concentrations for 12–24 h: BACE1 inhibitor IV (5 or 10 μ M; Calbiochem); GM6001, a broad-spectrum inhibitor of matrix metalloproteinases and ADAMs (25 μ M; Enzo Life Sciences), the ADAM10-specific inhibitor GI254023X (5 μ M; a kind gift from Dr. Schmidt, Technical University of Darmstadt, described previously by Ludwig et al., 2005), and the ADAM17-specific inhibitor GL 506–3 (5 μ M; a kind gift from Galderma). O-linked glycosylation was blocked with benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside (4 mM; Merck).

Primary neuronal culture, transduction, and inhibitor treatment. Hippocampal neurons were prepared from embryonic day 18 Sprague-Dawley rat embryos as described previously (Orozco et al., 2012) and cultured in neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), Pen/Strep, and 2 mM L-glutamine. After 4 d *in vitro*, cells were incubated with lentiviral particles for 8 h, and after 2 d, transduction inhibitor treatment was performed for 16 h. Supernatants and cells were collected and analyzed by immunoblotting.

Primary Schwann cell culture. Primary rat Schwann cells were prepared as described previously (Einheber et al., 1997) and proliferation was induced using high-glucose DMEM with Glutamax (Invitrogen), 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 2 μ M forskolin (Sigma-Aldrich), and 10 μ g/ml pituitary extract (Sigma-Aldrich). One day before the experiment, cells were washed twice with HBSS (Invitrogen) and proliferation was stopped by maintaining the cells in DMEM with Glutamax, 10% FBS, and 2 mM L-glutamine.

Antibodies. The following monoclonal neopeptide-specific antibodies were generated by immunization with the respective peptides: 4F10: rat, SFYKHLGIEF; 10E8: mouse, MEAEELYQKR; 7E6: mouse, QTAP-KLSTs. Hybridoma supernatants were used 1:40 for immunoblotting. The following antibodies were used for immunoblotting: antibody to NRG1 C terminus (pRb, 1:10000, SC348; Santa Cruz Biotechnology), to NRG1 EGF-like domain (HRG β pRb, 1:2000, Ab-2; Thermo Scientific), to β -actin (1:5000; Sigma-Aldrich), to BACE1 (pRb, 1:1000, AB5940; Millipore), to ADAM17/TACE (pRb, 1:1000, ab39162; Abcam), to ADAM10 (pRb, 1:5000, 422751; Calbiochem), to Calnexin (pRb, 1:10000; Stressgen), to V5-tag (1:5000; Invitrogen), to HA-tag (HRP-conjugated mRat, 1:2000, 3F10; Roche), to ErbB3 (pRb, 1:1000, sc-285, C-17; Santa Cruz Biotechnology), to p-ErbB3 (pRb, 1:1000, sc-135654, Tyr1328; Santa Cruz Biotechnology), to AKT (mRb, 1:4000, C67E7; Cell Signaling Technology), and to p-AKT (mRb, 1:3000, D9E XP Ser473; Cell Signaling Technology). Secondary antibodies were HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG (pGoat, 1:10000; Promega) or anti-rat IgG (pGoat, 1:4000, sc-2006; Santa Cruz Biotechnology).

Sample preparation and immunoblotting. Medium was conditioned overnight, immediately cooled upon collection, and supplemented with protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich). Cell debris was removed by centrifugation (5 min, 5500 \times g, 4°C) and the supernatant was subjected directly to standard SDS-PAGE. For total cell lysates, cells were washed with ice-cold PBS, scraped off, and pelleted by centrifugation (5 min, 1000 \times g, 4°C). Cells were lysed in lysis buffer (20 mM citrate, pH 6.4, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) freshly supplemented with protease inhibitor mixture for 30 min on ice. After clarification (15 min, 10000 \times g, 4°C), protein concentration was determined with the BCA protein assay (Pierce) and equal amounts of protein were subjected to SDS-PAGE.

Proteins were transferred onto PVDF (Immobilon-P; Millipore) or nitrocellulose (Protran; Whatman) membranes and the indicated antibodies were used for immunodetection. Bound antibodies were detected with HRP-conjugated secondary antibodies using the chemiluminescence detection reagents ECL and ECL Plus (GE Healthcare). For quantification, images were acquired with a Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm) and analyzed with the Multi Gauge V3.0 software.

siRNA-mediated knock-down and membrane preparation. For RNA interference, cells were plated in polylysine-coated dishes and reverse transfected with siGENOME pool targeting ADAM10 (10 nM; Thermo Scientific), ON-TARGETplus SMARTpool targeting ADAM17 (15 nM; Dharmacon) or respective controls using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Fresh medium was added 24 h after transfection and (if applicable) substrate cDNA was transfected 48 h after initial transfection. Medium was conditioned starting 68 h after siRNA transfection and cells were harvested 12–24 h later. For detection of endogenous BACE1, ADAM10 and ADAM17 cell membranes were prepared as described previously (Sastre et al., 2001).

MS analysis after immunoprecipitation. Conditioned medium was prepared as described above and incubated with anti-Flag M2 or anti-HA (Sigma-Aldrich) agarose beads overnight (rotation, 4°C). Beads were washed three times with IP/MS buffer (0.1% N-octylglucoside, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 140 mM NaCl) and two times with water. Immunoprecipitated proteins were eluted with trifluoroacetic acid/acetone/nitrile/water (0.3%/40%) saturated with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI-TOF) analysis was performed as described previously (Okochi et al., 2002) using Voyager DE STR (Applied Biosystems). Molecular masses were calibrated using the Sequazyme Peptide Mass Standards Kit (Applied Biosystems).

Preparation of sEGF domains and phosphorylation assays. sEGF domains were expressed in CHO wt and CHO ldlD cells and supernatants were conditioned for 24 h. After quantification of their initial abundance by Western blotting, medium from control cells was used to adjust the concentrations of the EGF-like domains in the supernatants by dilution. Equal concentrations were controlled by Western blotting again (and further adjustment was done if necessary) and the adjusted supernatants were used for phosphorylation assays. The assay was performed as follows: subconfluent MCF-7 or purified primary Schwann cells were incubated with conditioned media containing equal amounts of EGF-like domains for 30 min. Medium from cells expressing an empty vector was used as negative control and incubation with 0.5 nM recombinant NRG1 EGF-like domain (NRG1- β 1, 396-HB/CF; R&D Systems) served as a positive control. Cells were then washed with ice-cold PBS and lysates were prepared as described above using a modified RIPA buffer supplemented with phosphatase inhibitor mixture (PhosSTOP; Roche). Eventually, the phosphoprotein/total protein readout of the assay was normalized to the Western blot intensities of the EGF-like domains in the media used for stimulation.

Zebrafish maintenance and transgenic lines used. All zebrafish embryos were raised at 28°C in E3 media (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) and were staged as described previously (Kimmel et al., 1995). To suppress the growth of mold, methylene blue (10^{−5}%) was added to E3 media. Animals of either sex were used for this study. All experiments were performed in accordance with animal protection standards of the Ludwig-Maximilians University Munich and have been approved by the government of Upper Bavaria (Regierung von Oberbayern, München, Germany). In addition to the AB wt strain, a transgenic zebrafish line, Tg(*claudin k*:GFP) in which the *claudin k* promoter drives expression of a membrane-bound GFP (Münzel et al., 2012), was also used. This transgenic line is hereafter referred to as *claudin k*:GFP. Furthermore, a newly generated *bace1* mutant (van Bebber et al., 2013) was crossed to *claudin k*:GFP, and *bace1* homozygous mutants carrying the *claudin k*:GFP were used to analyze the activity of NRG1 type III-derived β -sEGF *in vivo*.

mRNA injections and image acquisition. β -sEGF mRNA was synthesized *in vitro* using the mMessage mMACHINE kit (Ambion) according to standard protocols. β -sEGF mRNA was injected at a concentration of 425 ng/ μ l in fertilized eggs at the one-cell stage. Zebrafish larvae were

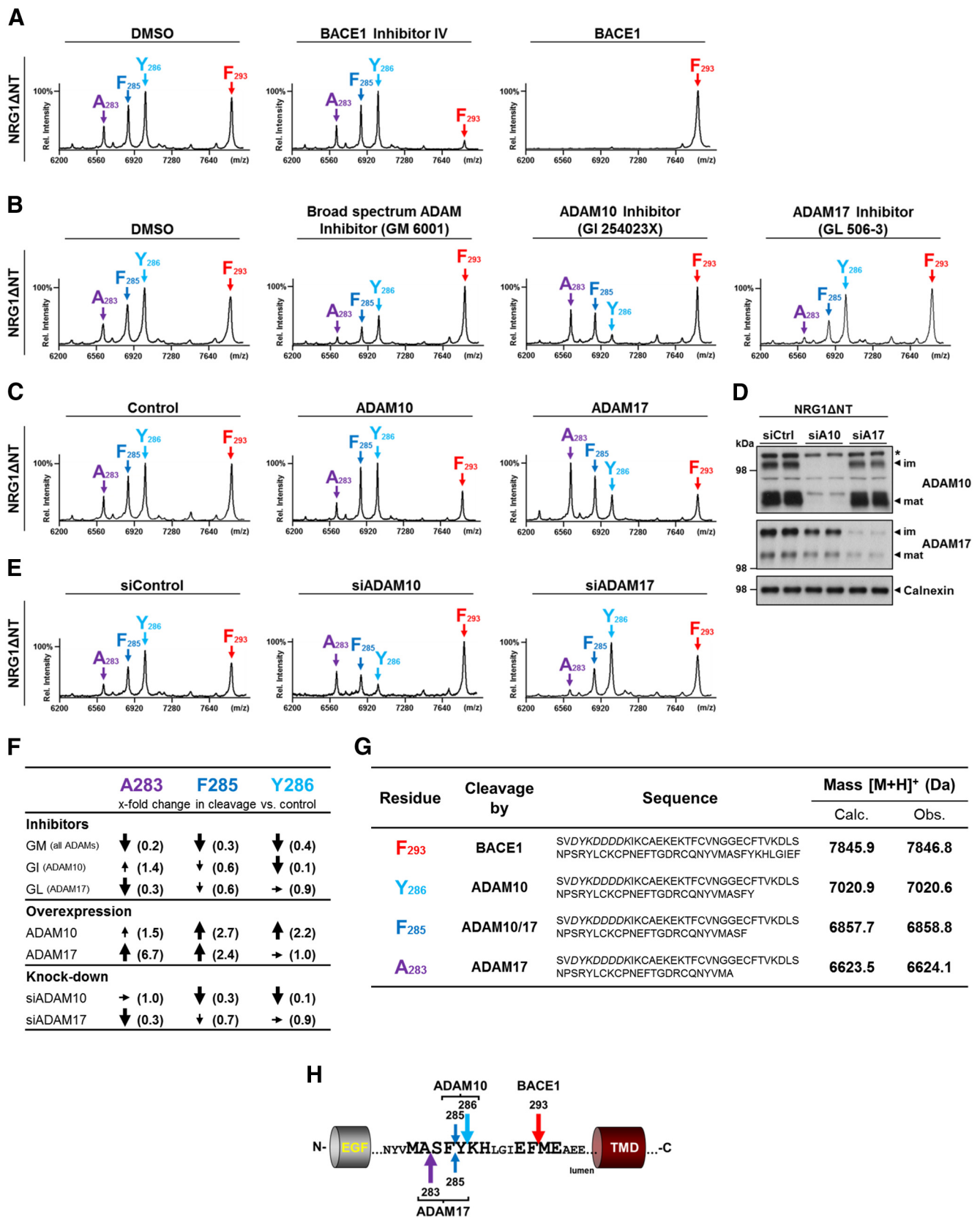


Figure 2. Identification of shedding sites of BACE1, ADAM10, and ADAM17 in the stalk region of NRG1 type III. **A**, BACE1 cleaves NRG1 type III after F293. Supernatants of Figure 1B were immunoprecipitated with Flag-agarose beads and precipitated sEGF peptides were analyzed by MALDI-TOF MS. The peptide corresponding to a cleavage after F293 is generated by BACE1 (red arrow). Note that with overexpression of BACE1, the other peaks are below detection limit. **B**, **C**, ADAM10 and ADAM17 shed NRG1 type III after A283, F285, and Y286. Cells expressing NRG1ΔNT were either treated with indicated inhibitors (GM6001, 25 μM; GI254023X and GL506-3, 5 μM) or cotransfected with indicated proteases and supernatants were analyzed as in **A**. ADAM-specific peaks were compared with the peak caused by BACE1 in each spectrum. Broad-spectrum ADAM inhibition (GM6001) reduced cleavage at all ADAM cleavage sites. Inhibition and overexpression of ADAM10 revealed its main cleavage sites to be after Y286 and F285 (light blue and blue arrows, respectively). Conversely, ADAM17 cleaved NRG1ΔNT mainly after A283 (Figure legend continues.)

anesthetized with tricaine (0.016% w/v) at 3 d postfertilization (dpf) and oriented in 3% methylcellulose on coverslips. Fluorescence of *claudin* *k*:GFP was imaged with an LSM510 META inverted confocal microscope (Zeiss). Pictures were assembled in Photoshop 8.0 (Adobe Systems). Brightness and contrast were adjusted with ImageJ.

Results

Juxtamembrane cleavage of NRG1 type III by ADAM10, ADAM17, and BACE1

To investigate NRG1 type III processing in living cells, we generated a truncated Flag-tagged NRG1 type III construct comprising the C-terminal region, the transmembrane domain, the juxtamembrane region, and the EGF-like domain (NRG1 Δ NT; Fig. 1A). Expression of the truncated protein not only facilitates the analysis of proteolytic processing within living cells, but also allows the determination of potential cleavage sites by MS. We coexpressed three different sheddases suggested to be involved in NRG1 type III processing, BACE1, ADAM10, and ADAM17 (Montero et al., 2000; Hu et al., 2006; Willem et al., 2006; La Marca et al., 2011; Luo et al., 2011), or repressed their endogenous activities with inhibitors. Inhibition of endogenous BACE1 (by the BACE1 inhibitor IV) resulted in reduced liberation of the EGF-like domain into the supernatant (Fig. 1B). Conversely, ectopic BACE1 expression strongly enhanced shedding reflected by significantly increased amounts of the sEGF domain in the supernatant and reduced substrate levels in the cell lysate (Fig. 1B). Due to its rapid turnover by the γ -secretase (Bao et al., 2003, 2004), the C-terminal fragment (CTF) resulting from shedding could only be detected upon γ -secretase inhibition (data not shown).

We then investigated whether both ADAM10 and ADAM17 were also able to cleave NRG1 Δ NT. The broad-spectrum ADAM inhibitor GM6001 significantly reduced the amount of sEGF detected in the supernatant. Combined inhibition of BACE1 and ADAMs by treatment with both inhibitor IV and GM6001 almost completely abolished endogenous shedding activity, as reflected by strongly reduced amounts of sEGF in the supernatant and the accumulation of NRG1 Δ NT substrate within the cell lysate (Fig. 1C). Consistent with these findings, ectopic expression of either ADAM10 or ADAM17 resulted in enhanced shedding of NRG1 Δ NT and subsequent sEGF accumulation in the conditioned media (Fig. 1D). These results suggest that BACE1, ADAM10, and ADAM17 are able to cleave NRG1 type III between the extracellular EGF-like domain and the C-terminal transmembrane domain.

Identification of BACE1, ADAM10, and ADAM17 cleavage sites within the juxtamembrane region of NRG1 type III

To map the cleavage sites of the respective proteases, we immunoprecipitated the sEGF domain from the supernatants of NRG1 Δ NT-expressing HEK293 cells using antibodies to the Flag epitope (Fig. 1A). Isolated peptides were analyzed using MALDI-TOF MS. Mass spectra derived from the supernatant of control cells revealed four prominent peptide species corresponding to cleavages after A283, F285, Y286, and F293 (Fig. 2A, G). To identify the specific cleavage sites of the three sheddases shown to be involved in processing of NRG1 Δ NT, we inhibited their endogenous activities with selective inhibitors or enhanced their cleavage by overexpression of the corresponding protease. This revealed that the peptide peak at 7846.8 kDa corresponding to a cleavage site after F293 was strongly reduced upon inhibition of endogenous BACE1 (Fig. 2A). Conversely, production of the same peptide was greatly enhanced to the expense of all other cleavage products upon BACE1 overexpression (Fig. 2A), indicating competing shedding activities.

Similarly, we analyzed the secreted EGF-like domains upon overexpression or inhibition of ADAM proteases. Inhibition of ADAMs with the broad-spectrum ADAM inhibitor GM6001 decreased the abundance of the three peptides A283, F285, and Y286 compared with the peptide generated by BACE1, suggesting that these peptides are indeed generated by protease activities associated with members of the ADAM family (Fig. 2B, F). To identify the cleavage sites of ADAM10 and ADAM17, we used inhibitors that preferentially inhibit either ADAM10 (GI254023X) or ADAM17 (GL506–3). Inhibition of ADAM10 reduced the intensity of peaks corresponding to cleavages after F285 and Y286 but increased cleavage after A283. Conversely, blocking ADAM17 resulted in reduced cleavage after A283 (and, to a minor extent, after F285), whereas cleavage after Y286 remained unaffected (Fig. 2B, F). Consistent with these findings, overexpression of either protease caused increased cleavage after the sites affected by their respective inhibitors (Fig. 2C, F). Therefore, ADAM10 expression leads to enhanced cleavage after residues F285 and Y286, whereas expression of ADAM17 increases cleavage after residues A283 and F285 (Fig. 2C).

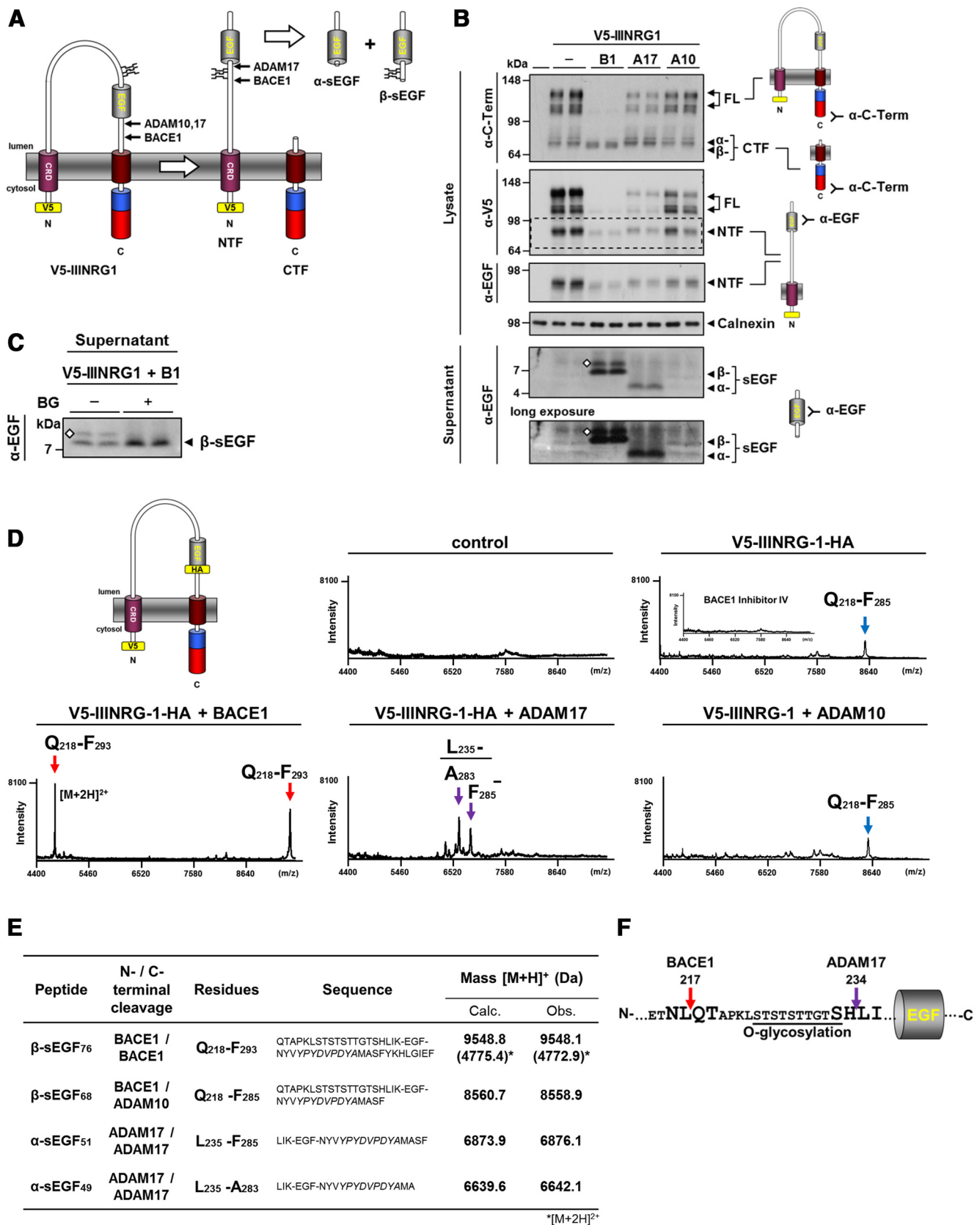
To verify these cleavage sites under endogenous conditions, we knocked down ADAM10 and ADAM17 in HEK293 cells expressing NRG1 Δ NT. The siRNA pools efficiently reduced the protein levels of ADAM10 and ADAM17 (Fig. 2D). As before, sEGF peptides were isolated from the conditioned medium and analyzed by MALDI-TOF MS (Fig. 2E). Knock-down of ADAM10 dramatically reduced cleavage after Y286 and F285, whereas cleavage after A283 was unaffected. Conversely, reduction of ADAM17 strongly impaired cleavage after A283 and reduced cleavage after F285 to some extent, whereas cleavage after Y286 was not affected (Fig. 2E, F). These findings suggest that BACE1 specifically cleaves NRG1 type III after F293, whereas ADAM17 cleaves after A283 and, to some extent, also after F285. ADAM10 processes NRG1 type III after Y286, but also shares the minor cleavage site after F285 with ADAM 17 (Fig. 2H).

Processing of NRG1 type III liberates the EGF-like domain

Shedding is thought to activate NRG1 type III by generating a membrane-tethered NTF comprising the EGF-like domain (Falls, 2003; Fig. 3A). However, we hypothesized that the resulting NTF may even be further processed by sheddases to liberate an sEGF domain (Fig. 3A). To examine this possibility, we expressed full-length NRG1 type III with an N-terminal V5-tag (V5-IIINRG1) in HEK293 cells and coexpressed BACE1,

←

(Figure legend continued.) (purple arrows). **D, E**, Knock-down of ADAM10 and ADAM17 confirms shedding sites. Cells expressing NRG1 Δ NT were transfected with siRNA (10 nM) against ADAM10 (siA10) or ADAM17 (siA17) and a nontargeting siRNA as a control (siCtrl). **D**, Western blot analysis of membrane preparations confirmed efficient downregulation of both the immature (im) and mature (mat) form of ADAM10 and ADAM17. **E**, sEGF peptides were isolated from the supernatant and analyzed as in **B, F**. Summary of MS data for ADAM10 and ADAM17 cleavage after A283, F285, and Y286. Peak intensities (areas) of ADAM-specific peaks were normalized to the signal generated by BACE1 in each spectrum (mean \pm SD; $n = 3$). The normalized peak intensities then were compared with the respective controls. Changes of cleavage (fold) under different conditions (inhibition, overexpression, and knock-down of ADAM10 and ADAM17) are summarized as follows: increased: $>1.6\times$ (\uparrow , big arrows), mildly increased: $1.5\text{--}1.2\times$ (\uparrow , small arrows) unchanged: $1.1\text{--}0.9\times$ (\rightarrow), mildly decreased: $0.8\text{--}0.5\times$ (\downarrow , small arrows), or decreased: $<0.4\times$ (\downarrow , big arrows). **G**, List of peptides identified by MS. Peptide sequences with corresponding protease(s) are given and observed (Obs.) peptide masses are compared with calculated (Calc.) masses. Italic letters indicate Flag-tag; [M+H] $^+$, a singly charged peptide. **H**, Graphic representation of shedding sites in the stalk region of NRG1 type III. Cleavage sites of BACE1, ADAM10, and ADAM17 are shown and preferred cleavage positions of ADAM10 and ADAM17 are indicated by longer arrows, respectively.



ADAM10, or ADAM17 (Fig. 3B). Expression of either protease was controlled as before (Fig. 1) and comparable amounts were observed (data not shown). Full-length V5-IIINRG1 was detected as multiple bands, suggesting intensive posttranslational modification such as glycosylation (Fig. 3B). Decreased full-length protein was present in the lysate upon coexpression of either protease. This was most apparent when BACE1 was overexpressed (Fig. 3B). The CTF generated upon BACE1 overexpression (β -CTF) migrated slightly faster than the CTFs generated by either ADAM (α -CTF; Fig. 3B). This is consistent with the BACE1 cleavage site being closer to the transmembrane domain than the cleavage sites identified for ADAM10 and ADAM17 (Fig. 2H). We also analyzed the cell lysate for the NTF generated upon shedding of NRG1 type III. Detection with an antibody against the N-terminal V5-tag and reprobing with an anti-EGF antibody confirmed that the observed NTF still contained the EGF-like domain (Fig. 3B, dashed box).

Enhanced proteolytic cleavage of the full-length V5-IIINRG1 should lead to the accumulation of the NTF as cleavage product. However, we did not detect higher amounts of NTF in cells coexpressing one of the three sheddases, but rather observed reduced NTF levels especially upon BACE1 or ADAM17 coexpression (Fig. 3B). Because this may be indicative of further NTF processing by these proteases, we analyzed the supernatants for soluble peptides liberated from the membrane-bound NTF. Both BACE1 and ADAM17 were found to liberate sEGF domains of different sizes (β -sEGF and α -sEGF) into the medium (Fig. 3B). Moreover, processing of V5-IIINRG1 by endogenous proteases also resulted in the secretion of a β -sEGF, albeit to a much smaller extent (Fig. 3B, long exposure). β -sEGF, but not α -sEGF, migrated as a double band, suggesting posttranslational modifications (Fig. 3B). A serine/threonine-rich stretch, which may be a site for O-linked glycosylation, is located close to the N terminus of the EGF-like domain (Fig. 3A). We treated cells expressing V5-IIINRG1 and BACE1 with benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside, a specific blocker of O-linked glycosylation. Western blot analysis of supernatants using an antibody against the EGF-like domain revealed that inhibition of O-glycosylation abolished formation of the higher-molecular-weight band and caused β -sEGF to appear as a single peptide (Fig. 3C). This dem-

onstrates that, in contrast to α -sEGF, β -sEGF is subject to O-linked glycosylation.

A second BACE1 and ADAM17 cleavage N-terminal of the EGF-like domain

The results described above suggest that the EGF-like domain is released by cleavages that occur both N-terminal and C-terminal of the EGF-like domain. To identify the putative cleavage site(s), we used a combined immunoprecipitation/MALDI-TOF MS approach. An HA-tag was inserted immediately after the EGF-like domain to enable immunoprecipitation. This construct (V5-IIINRG1-HA; Fig. 3D) was transiently expressed in HEK293 cells with and without BACE1, ADAM10, or ADAM17. Western blot analysis of lysates and supernatants confirmed the generation of membrane-tethered and soluble fragments from this construct in a similar fashion to the untagged construct (data not shown). MS analysis of peptides secreted from cells expressing V5-IIINRG1-HA yielded one major peak at 8558.9 kDa (Fig. 3D). This corresponds to a peptide (β -sEGF₆₈) having Q218 as an N-terminal residue and F285 as a C-terminal residue (Fig. 3E). Although the C terminus is the result of endogenous ADAM-mediated shedding in the stalk region after F285 (Fig. 2H), the N terminus results from a novel cleavage after L217, 16 residues N-terminal of the EGF-like domain. Inhibition of endogenous BACE1 activity with the specific inhibitor IV abolished generation of the peptide, suggesting BACE1-mediated processing after L217 (Fig. 3D, inset). Strikingly, this novel cleavage site (ETNLQQTAP) resembles that of the Swedish mutation of APP (EVNLDAEF), which strongly increases BACE1-mediated processing (Citron et al., 1992, 1995; Cai et al., 1993). Consistent with this, coexpression of BACE1 strongly enhanced cleavage at this novel site and, in agreement with the shedding data shown above (Fig. 2H), produced a slightly larger peptide (β -sEGF₇₆) ending with the BACE1 shedding site F293 at its C terminus (Fig. 3D,E).

Expression of ADAM17 liberated a shorter sEGF from V5-IIINRG1-HA beginning with L235 and ending after either A283 or F285, respectively (α -sEGF₄₉ and ₅₁; Fig. 3D,E). This is consistent with the data obtained for ADAM17-mediated processing of NRG1- Δ NT (Fig. 2H). The newly identified ADAM17 cleavage site after H234 is located immediately N-terminal of the EGF-like domain and is therefore responsible for the observed size difference of α -sEGF and β -sEGF (Fig. 3F). Cleavage at this site excludes the serine/threonine-rich stretch from α -sEGF and explains why, in contrast to β -sEGF, α -sEGF is not subject to O-linked glycosylation (Fig. 3B,C,F). These findings demonstrate that BACE1 and ADAM17, but not ADAM10, are capable of liberating the EGF-like domain from NRG1 type III by dual cleavage (Fig. 3A).

Membrane-bound and soluble fragments of NRG1 type III are detected by neo-epitope-specific antibodies to BACE1 cleavage sites

To further validate and facilitate detection of NRG1 type III fragments, we generated neo-epitope-specific antibodies against the above identified cleavage sites. Monoclonal antibodies 10E8 and 4F10 were raised against the neo-epitopes generated by BACE1-mediated shedding in the stalk region (epitopes M₂₉₄EAEELYQKR and SFYKHLGIEF₂₉₃, respectively). An additional antibody was raised against the novel BACE1 cleavage site N-terminal of the EGF-like domain (7E6, epitope Q₂₁₈TAPKLSTSS; Fig. 4A). We then investigated whether these antibodies are suitable as sensitive tools for the

←
(Figure legend continued.) an EGF antibody (dashed box). Analysis of the supernatants revealed that BACE1 and ADAM17 liberate sEGF domains of different sizes (β -sEGF and α -sEGF, respectively). The diamonds denote posttranslational modification. **C**, The β -sEGF is subject to O-linked glycosylation. Cells expressing V5-IIINRG1 and BACE1 were treated or not with a blocker of O-glycosylation (benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside, BG, 4 mM). Soluble β -sEGF was detected with an antibody against the EGF-like domain. The diamond denotes O-linked glycosylation. **D**, Cleavage of NRG1 type III NTF before Q218 by BACE1 and before L235 by ADAM17 liberates the EGF-like domain. For immunoprecipitation, an HA-tag was inserted immediately after the EGF-like domain into the construct shown in **A**. To determine the exact cleavage sites, fragments were isolated from supernatants by IP with HA agarose and analyzed by MALDI-TOF MS. BACE1 liberated a fragment comprising residues Q218-F293, whereas ADAM17 generated smaller fragments containing residues L235-F285 and L235-A283. Processing by endogenous proteases or by coexpressed ADAM10 caused low level secretion of a fragment with a BACE1-cleaved N terminus and an ADAM-cleaved C terminus (Q218-F285). Inhibition of BACE1 (BACE1 inhibitor IV, 10 μ M) abolished secretion of the EGF-like domain completely (inset in second panel). **E**, List of peptides identified by MS. Peptide sequences (without residues of the EGF-like domain) and corresponding proteases are listed. Observed masses (Obs.) are compared with calculated (Calc.) masses. Peptide numbers indicate number of residues comprised by each peptide (excluding the HA-tag). [M+H]⁺ indicates singly charged peptide; [M+2H]²⁺, a doubly charged peptide; italic letters, HA-tag. **F**, Graphic representation of BACE1 and ADAM17 cleavage sites N-terminal of the EGF-like domain. Cleavage sites and the serine/threonine-rich region where O-linked glycosylation occurs are indicated.

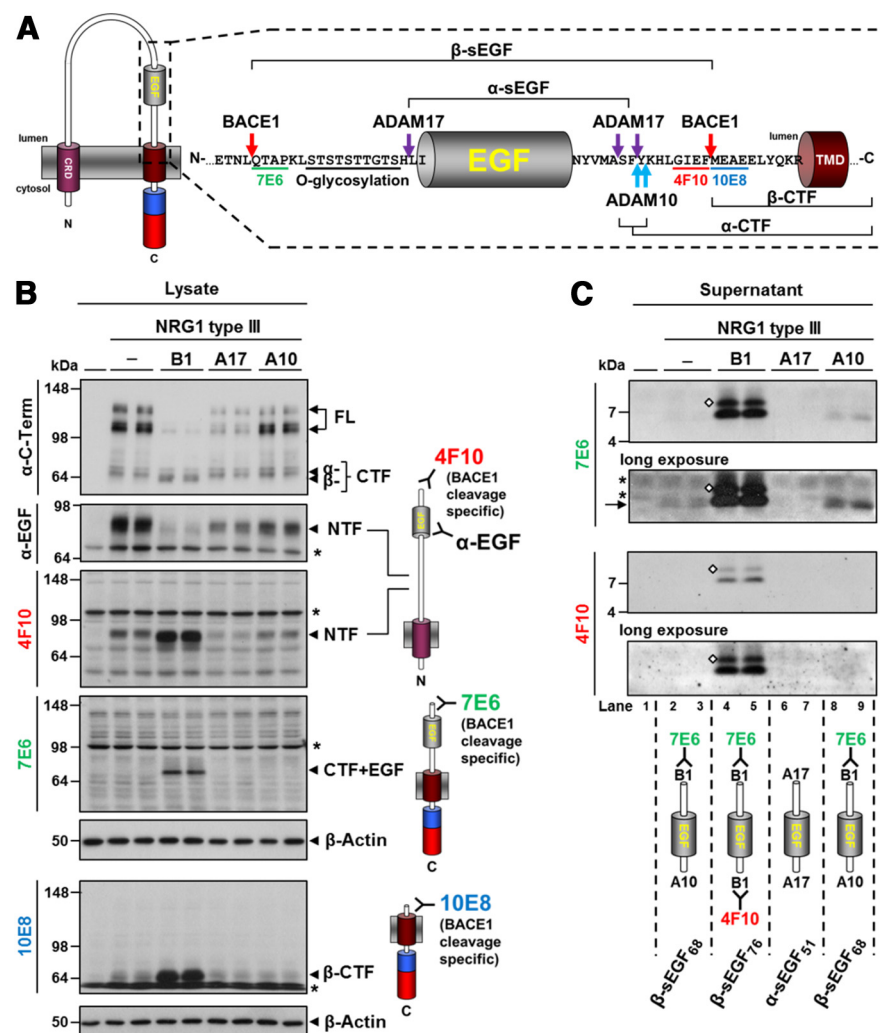


Figure 4. Monoclonal antibodies generated against BACE1 cleavage sites in NRG1 type III detect membrane-bound and soluble fragments. **A**, Scheme summarizing identified cleavage sites in NRG1 type III. Cleavage sites of respective proteases are marked by arrows and α -sEGF and β -sEGF and α -CTF and β -CTF are indicated. Epitopes of the generated antibodies and the site of glycosylation are shown. **B**, Membrane-tethered NRG1 type III fragments are recognized by antibodies raised against BACE1 cleavage sites. Total lysates of cells expressing untagged NRG1 type III and BACE1 (B1), ADAM17 (A17), or ADAM10 (A10) were analyzed by Western blotting. BACE1-cleaved fragments were detected with the indicated antibodies. **C**, Antibodies 7E6 and 4F10 recognize β -sEGF. Media from **B** were analyzed by Western blot. The N terminus of β -sEGF was detected using 7E6 and the C terminus was detected with 4F10. Note that in the case of endogenous processing or ADAM10 overexpression, the β -sEGF is liberated by N-terminal BACE1 cleavage (7E6 signal in lanes 2 and 3 and lanes 8 and 9, indicated by an arrow) but not C-terminal BACE1 shedding (no 4F10 signal in lanes 2 and 3 and lanes 8 and 9). Overexpression of ADAM17 prevents formation of β -sEGF (no signals for either antibody in lanes 6 and 7). Diamonds indicate glycosylation. Asterisks indicate unspecific background bands that are also present in the untransfected control (lane 1).

detection of the different processing products generated by BACE1, ADAM10, and ADAM17.

In cell lysates of HEK293 cells coexpressing NRG1 type III and either protease, antibody 4F10 selectively detected NTFs generated by BACE1- but not ADAM-mediated shedding (Fig. 4B). Upon coexpression of BACE1, the 7E6 antibody detected the CTF (comprising the EGF-like domain) resulting from BACE1 cleavage after L216 (Fig. 4B). This indicates that, upon elevated BACE1 expression, cleavage may first occur N-terminal of the EGF-like domain. Antibody 10E8 confirmed the generation of the β -CTF upon shedding of NRG1 type III by BACE1, but not by ADAMs (Fig. 4B). Being specific for the BACE1-generated neo-epitopes, the antibodies did not recognize the full-length NRG1 type III.

Western blot analysis of supernatants with antibodies 7E6 and 4F10 (specific to the BACE1 cleaved N and C terminus of the EGF-like domain, respectively) revealed robust amounts of soluble β -sEGF₇₆ upon expression of BACE1 (Fig. 4C, lanes 4 and 5). As determined by MS (Fig. 3D, E), endogenous protease activity in HEK293 cells generates β -sEGF₆₈ through ADAM10-mediated (C-terminal) shedding and BACE1-mediated (N-terminal) cleavage. Consistent with this, we detected low amounts of β -sEGF₆₈ with the 7E6 antibody (Fig. 4C, lanes 2 and 3, arrow), whereas the 4F10 antibody did not recognize this fragment due to the absence of a BACE1-generated C-terminal epitope. Accordingly, enhanced shedding by ectopic expression of ADAM10 further increased the amounts of β -sEGF₆₈ in the supernatant (Fig. 4C, compare lanes 8 and 9 with lanes 2 and 3). ADAM17-mediated cleavage N- and C-terminal of the EGF-like domain releases α -sEGF₄₉ (Fig. 3D, E), which does not contain the epitopes recognized by 7E6 or 4F10 (Fig. 4A). Consistent with that, overexpression of ADAM17 prevented overexpression formation of β -sEGF₆₈, and no 7E6 signal is observed in lanes 6 and 7 in Figure 4C. Therefore, the neo-epitope-specific antibodies are sensitive and selective tools for the investigation of NRG1 type III processing, and their specific immunoreactivity with defined processing products confirms the cleavage sites described above.

Dual cleavage of NRG1 type III in primary neurons releases the EGF-like domain

The neo-epitope-specific antibodies characterized in Figure 4 were used to investigate proteolytic processing of NRG1 type III in primary hippocampal neurons. To allow detection of NRG1 proteolytic fragments in neurons, we expressed V5-IIINRG1-HA using lentiviral transduction and studied its processing by endogenous secretases (Fig. 5). As revealed by Western blot analysis of lysates, shedding of V5-IIINRG1-HA in neurons generated a CTF and an NTF containing the EGF-like domain (Fig. 5A). Inhibition of BACE1 activity (by the BACE inhibitor IV) decreased the overall turnover of the full-length precursor and decreased generation of the CTF. This was amplified by concomitant inhibition of ADAM proteases (by IV + GM6001), supporting the idea that BACE1 and ADAMs can compete for shedding in the stalk region of NRG1 type III under physiological conditions. CTFs and NTFs resulting from BACE1 shedding only were specifically detected with antibodies 10E8 and 4F10 and their generation was completely abolished upon inhibition of BACE1. Using antibody 7E6 for immunodetection, we did not observe a CTF containing the EGF-like domain (CTF+EGF; Fig. 4B) that would be generated by a single BACE1 cleavage of NRG1 type III after L216

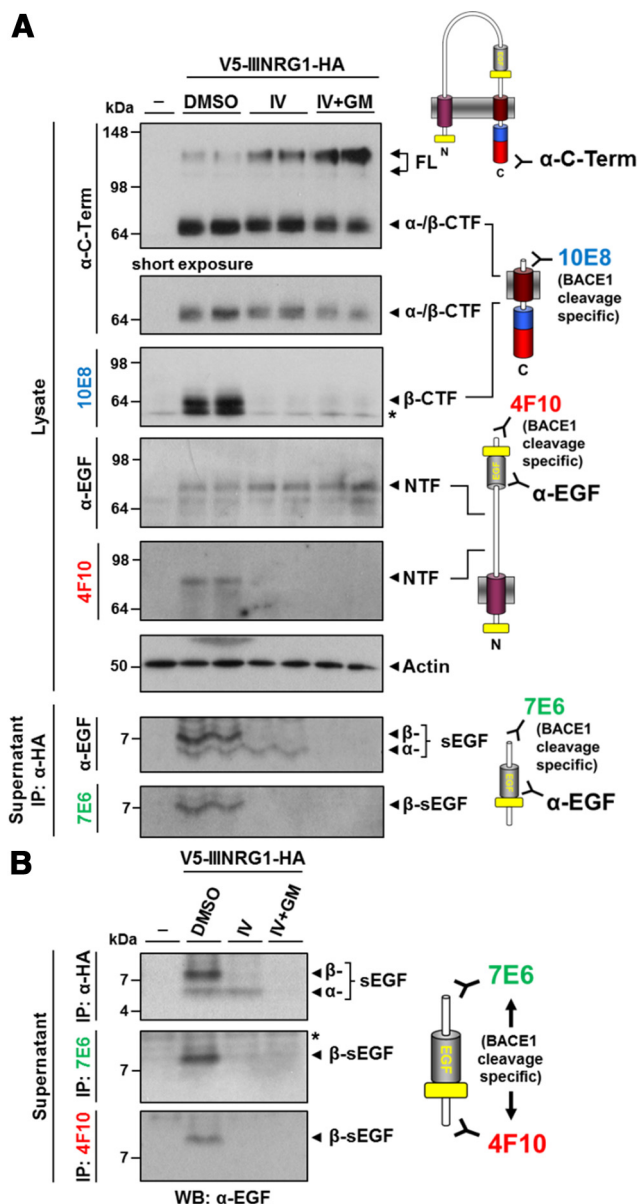


Figure 5. Cleavage of NRG1 type III in primary neurons releases the EGF-like domain. **A**, Processing of NRG1 type III in primary neurons generates both a membrane-tethered and an sEGF domain. V5-IIINRG1-HA was expressed in primary hippocampal neurons and cells were treated with indicated inhibitors (BACE1 inhibitor IV, 5 μ M; ADAM inhibitor GM6001, 25 μ M) for 16 h. Cells were lysed, conditioned supernatants were immunoprecipitated with HA-agarose beads, and protein levels were determined by immunoblotting with indicated antibodies. β -CTFs and NTFs generated by BACE1 cleavage were specifically detected by antibodies 10E8 and 4F10, respectively. Additional cleavages N-terminal of the EGF-like domain by BACE1 and ADAMs liberated β -sEGF and α -sEGF into the supernatant, respectively. **B**, BACE1 cleavage N- and C-terminal of the EGF-like domain liberates β -sEGF from neurons. Supernatants from neurons as described in **A** were immunoprecipitated with antibodies against the HA-tag or previously identified BACE1 cleavage sites (7E6 and 4F10). Purified peptides were detected using an α -EGF antibody.

(data not shown). This is consistent with the concept that, physiologically, the EGF-like domain of NRG1 type III is tethered to the membrane via its NTF (Taveggia et al., 2005). As observed in non-neuronal cells (Fig. 3), additional N-terminal cleavages release the EGF-like domain into the supernatant (β -sEGF and α -sEGF, respectively; Fig. 5A). Blocking BACE1 activity selectively prevented generation of the slightly larger β -sEGF, whereas the shorter α -sEGF was abolished upon ADAM inhibition. Reprobing of the membrane

with the 7E6 antibody (Fig. 5A) revealed that the β -sEGF contains a BACE1-generated N terminus. We then performed immunoprecipitations from supernatants of neurons expressing V5-IIINRG1-HA using the neo-epitope-specific antibodies 7E6 and 4F10 (Fig. 5B). With both antibodies, the slightly larger β -sEGF, but not the smaller α -sEGF (lower band in upper panel of Fig. 5B), was detected, further confirming the identified BACE1 cleavage sites.

These findings demonstrate that processing of NRG1 type III by endogenous BACE1 and ADAM proteases in primary neurons results in the release of the EGF-like domain as β -sEGF and α -sEGF.

α -sEGF and β -sEGF activate ErbB3 receptors in a paracrine fashion

Myelination in the PNS is proposed to be regulated through the juxtacrine activation of ErbB receptors on Schwann cells by the NRG1 type III NTF-tethered EGF-like domain on axonal membranes (Wang et al., 2001; Birchmeier and Nave, 2008). In particular, stimulation of ErbB3 receptor phosphorylation and subsequent activation of the downstream PI3 kinase signaling pathway has been shown to promote PNS myelination (Newbern and Birchmeier, 2010). Because we were able to show that the EGF-like domain of NRG1 type III is liberated by BACE1 and ADAM17, we also investigated whether these small, sEGF domains were functional and if they could signal through ErbB3 receptors in a paracrine fashion. We expressed α -sEGF and β -sEGF in CHO wt cells and collected conditioned media (Fig. 6A). MCF-7 cells that express the ErbB3 receptor and are known to allow monitoring of NRG1 signaling via ErbB3 (Luo et al., 2011) were then incubated with the conditioned media containing equal concentrations of α -sEGF or β -sEGF or with supernatants from cells transfected with an empty vector. The ability of the sEGF domains to activate ErbB3 receptors and initiate PI3 kinase downstream signaling was monitored via phosphorylation of ErbB3 and AKT. Stimulation with 0.5 nM recombinant NRG1 EGF-like domain served as a positive control. Western blot analysis of total and phosphorylated levels of ErbB3 and AKT confirmed robust activation of both receptor and downstream signaling pathway upon stimulation with α -sEGF and β -sEGF (Fig. 6B, left). No significant differences between α -sEGF and β -sEGF in ErbB3 and AKT activation were observed (Fig. 6C).

In contrast to the smaller α -sEGF, β -sEGF contains a serine/threonine-rich sequence that can be O-glycosylated (Fig. 3C). To determine whether this difference in glycosylation affects activation of ErbB3 and AKT signaling we expressed α -sEGF and β -sEGF in CHO IdLD cells (Kingsley et al., 1986), which are deficient in O-linked glycosylation (Fig. 6A). Treatment of MCF-7 cells with conditioned media containing α -sEGF or nonglycosylated β -sEGF again stimulated activation of ErbB3 and AKT signaling in a very similar way (Fig. 6B, right; C). This suggests that O-linked glycosylation does not significantly alter the ability of β -sEGF to activate and signal through ErbB3 receptors.

Schwann cells are the recipient cells of NRG1 type III-mediated signaling during PNS myelination. Therefore, we repeated the experiments described above and incubated purified rat primary Schwann cells with α -sEGF and β -sEGF. Western blot analysis of phosphorylated ErbB3 and AKT levels in these cells confirmed our previous results. No difference in the activation of ErbB3 and AKT was observed upon stimulation with either α -sEGF or glycosylated or nonglycosylated β -sEGF (Fig. 6D).

These findings are in conflict with a recent study claiming an inhibitory effect of ADAM17-processed NRG1 type III on PNS

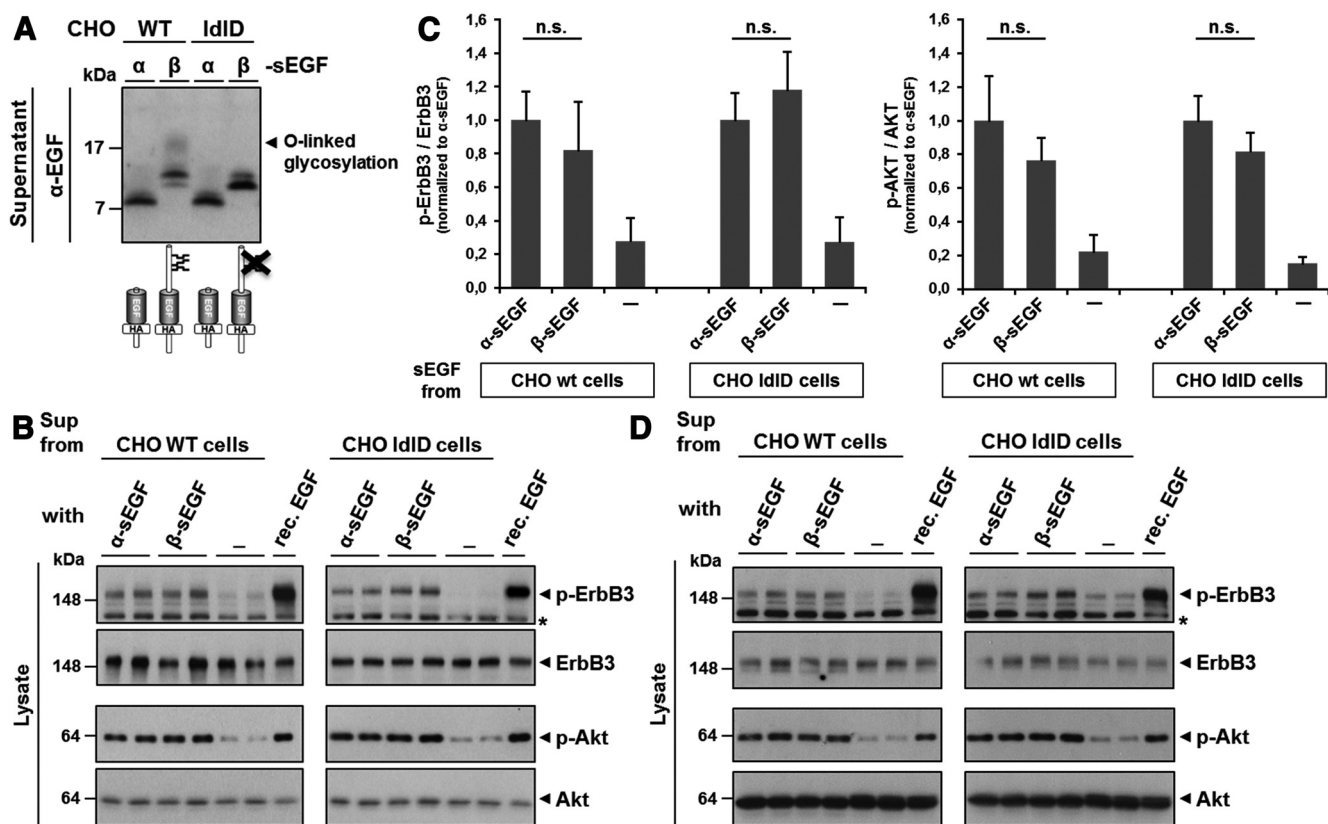


Figure 6. sEGF domains activate ErbB3 receptors on MCF-7 and Schwann cells and initiate AKT downstream signaling. **A**, Preparation of α-sEGF and glycosylated and nonglycosylated β-sEGF using CHO cells. α-sEGF and β-sEGF constructs were expressed in wt and O-glycosylation deficient (IdID) CHO cells. Conditioned supernatants were analyzed by Western blotting and the concentrations of α-sEGF and β-sEGF were adjusted by dilution with medium from control cells. O-linked glycosylation causes β-sEGF to migrate as an additional and diffuse band of higher molecular weight, which is abolished in CHO IdID cells. **B–D**, α-sEGF and β-sEGF activate ErbB3 receptors and AKT signaling in MCF-7 and primary Schwann cells independently of glycosylation. MCF-7 cells (**B**) and primary Schwann cells (**D**) were incubated with supernatants from **A** or from cells expressing an empty vector as a control. A recombinant NRG1 EGF-like domain (0.5 nM) was used as a positive control. After cell lysis, the levels of (phosphorylated) ErbB3 and AKT were determined by Western blotting. Quantification of phosphorylated protein/total protein ratio of experiments with MCF-7 cells is shown in **C** (mean ± SD; n.s., not significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed unpaired Student's t test, $n = 3$).

myelination (La Marca et al., 2011). In this study, a slightly different ADAM17 cleavage site (G290) was identified. Moreover, although a recombinant NRG1 EGF-like domain cleaved by BACE1 induced AKT signaling in Schwann cells, an ADAM17-cleaved fragment failed to do so. We therefore investigated whether the different cleavage sites found for ADAM17 (G290 and A283) may explain the discrepancy in signaling of ADAM17- and BACE1-generated sEGF. We constructed sEGF domains that only differ in their very C-terminal residues. β-sEGF-F was designed to end with F293, simulating BACE1 processing, whereas β-sEGF-G terminates at G290, mimicking the ADAM17 cleavage site proposed by La Marca et al. (2011). Conditioned media containing similar amounts of the peptides (Fig. 7A) were then used to stimulate MCF-7 (Fig. 7B,C) and rat primary Schwann cells (Fig. 7D) as before. No difference in ErbB3 activation or induction of downstream AKT signaling in these cells was observed upon stimulation with β-sEGF-F or β-sEGF-G.

These findings demonstrate that sEGF domains generated from NRG1 type III by BACE1 and ADAM17 are biologically active and signal through ErbB3 receptors on Schwann cells in a paracrine manner.

β-sEGF promotes PNS myelination *in vivo*

We also investigated whether the sEGF domain possesses signaling activity *in vivo*. We expressed the BACE1-derived β-sEGF in homozygous mutant *bace1* (*bace1*^{−/−}) zebrafish (van Bebber et

al., 2013) and investigated whether the β-sEGF could compensate for the lack of BACE1-mediated NRG1 type III processing. To visualize myelination *in vivo*, we generated *bace1*^{−/−} mutants expressing GFP under the control of the *claudin k* promoter, which labels Schwann cells and oligodendrocytes (Fig. 8A,B; Münzel et al., 2012). Phenotypically, *bace1* homozygous zebrafish mutants become distinguishable from their wt siblings at 3 dpf due to severely reduced Schwann cell myelination (Fig. 8A,B). Myelination of lateral line axons by Schwann cells in the PNS is severely impaired, whereas myelination of Mauthner axons by oligodendrocytes in the CNS is unaffected (Fig. 8A,B). The observed selective hypomyelination in the PNS of *bace1*^{−/−} zebrafish is consistent with the reduced myelination of BACE1 knock-out mice (Willem et al., 2006). To determine whether paracrine signaling could stimulate myelination, *bace1*^{−/−} zebrafish carrying the *claudin k*:GFP transgene were injected with β-sEGF mRNA and analyzed at 3 dpf for rescued myelination. In 24 of 63 *bace1*^{−/−} zebrafish, hypomyelination in the PNS was partially rescued upon expression of β-sEGF (Fig. 8B,C).

Finally, we used our zebrafish model to further test *in vivo* whether the C terminus of the EGF-like domain generated by ADAM17 cleavage abolishes its signaling capacity, as observed by La Marca et al. (2011). We injected mRNA encoding a NRG1 type III EGF-like domain terminating at either G290 (β-sEGF-G; La Marca et al., 2011) or A283 (β-sEGF-A; this study) into *bace1*^{−/−} zebrafish. Both mRNAs partially rescued the PNS hypomyelination.

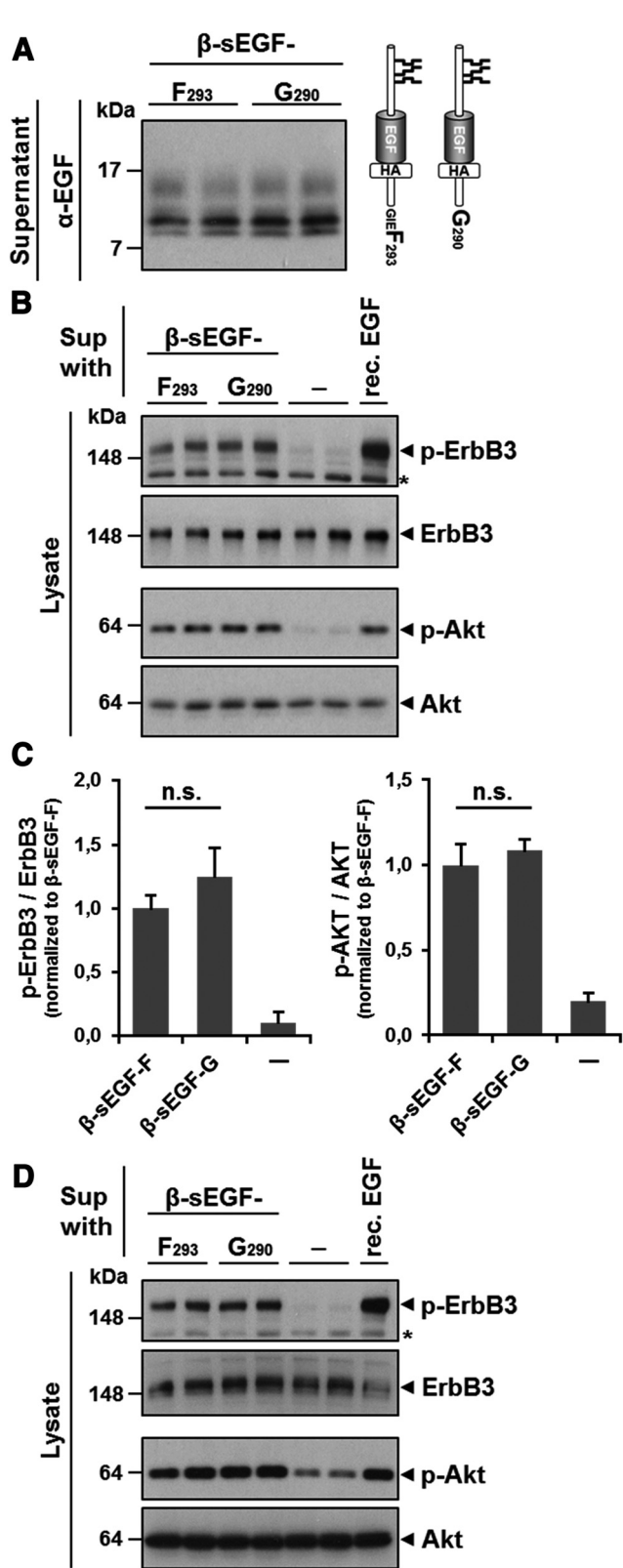


Figure 7. β -sEGF generated by BACE1- or ADAM17-mediated shedding similarly activates ErbB3 receptors and AKT downstream signaling. **A**, β -sEGF-F and β -sEGF-G mimic shedding of NRG1 type III by BACE1 and ADAM17. The constructs β -sEGF-F and β -sEGF-G have identical N termini but comprise C termini generated by either BACE1- or ADAM17-mediated shedding: F₂₉₃, BACE1 shedding; G₂₉₀, ADAM17 shedding (see Results for details). Conditioned supernatant was collected from CHO wt cells and analyzed by Western blot. **B–D**, β -sEGF-F and β -sEGF-G activate ErbB3 receptors and AKT signaling in MCF-7 and primary Schwann cells. MCF-7 cells (**B**) and primary Schwann cells (**D**) were incubated with supernatants from **A** or from

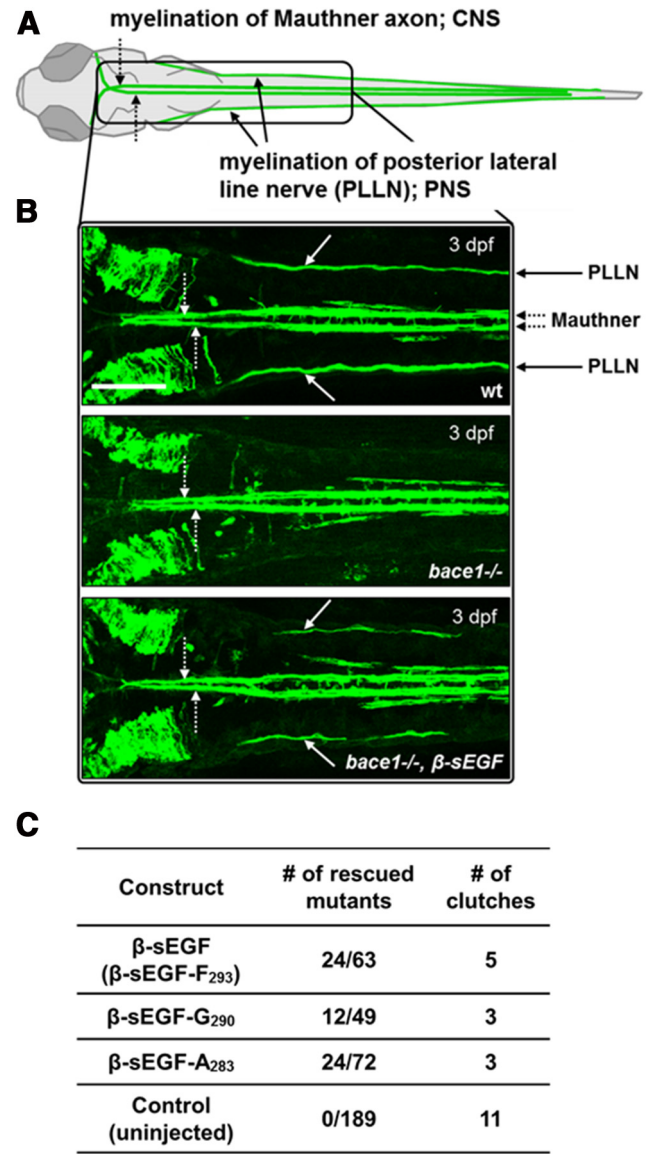


Figure 8. The soluble NRG1 type III EGF-like domain liberated by BACE1 promotes PNS myelination *in vivo*. **A**, The transgenic *claudin k:GFP* line allows visualization of myelin sheaths in zebrafish larvae. Schematic view of *claudin k:GFP* labeled myelin around Mauthner axons (CNS, dotted arrows) and lateral line axons (PNS, arrows) at 3 dpf (dorsal view). **B**, The sEGF domain rescues PNS myelination defect in *bace1*^{-/-} zebrafish carrying the *claudin k:GFP* transgene. Dorsal views of wt, uninjected *bace1*^{-/-} mutants (*bace1*^{-/-}) and *bace1* mutants injected with β -sEGF mRNA (*bace1*^{-/-}, β -sEGF). Middle: In *bace1*^{-/-} mutants myelination of the Mauthner axons (dotted arrows) is not affected, whereas myelination of the lateral line axons is severely reduced to absent (arrows in other panels). Bottom: Upon injection of β -sEGF mRNA, *bace1*^{-/-} mutants display a partial rescue of hypomyelination in the PNS. Scale bar, 100 μ m. **C**, sEGF domains generated by ADAM17-mediated shedding of NRG1 type III also promote PNS myelination. In addition to β -sEGF (**B**), β -sEGF constructs with C termini mimicking ADAM17 mediated shedding (β -sEGF-G₂₉₀ and β -sEGF-A₂₈₃; see Results for details) were injected into *bace1*^{-/-} mutant zebrafish. Regardless of their very C-terminal residues, all constructs partially rescued the hypomyelination phenotype.

cells expressing an empty vector as a control. Recombinant NRG1 EGF-like domain (0.5 nM) was used as a positive control. Cells were lysed and levels of (phosphorylated) ErbB3 and AKT were determined by Western blotting. Quantification of phosphorylated protein/total protein ratio of experiments with MCF-7 cells is shown in **C** (mean \pm SD; n.s., not significant, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, two-tailed unpaired Student's *t* test, n = 3).

tion, similar to the rescue observed with β -sEGF (Fig. 8C). Although it is not possible to compare quantitatively the extent of the rescue effects, the results nevertheless provide strong evidence that the ADAM17-cleaved C terminus of the EGF-like domain does not abolish its signaling ability, as was claimed previously (La Marca et al., 2011).

In conclusion, our findings demonstrate that the sEGF domain of NRG1 type III liberated by N-terminal BACE1 cleavage promotes PNS myelination *in vivo*.

Discussion

Release of growth factors by proteolytic processing has emerged as an important regulator of many signaling pathways. For example, shedding particularly regulates signaling of ErbB receptor ligands (Sanderson et al., 2006). Sheddases either generate signaling-competent, membrane-retained proteins or release ectodomains that subsequently signal in a paracrine manner. At the same time, ectodomain shortening also triggers intramembrane cleavage of the remaining membrane fragments by intramembrane-cleaving proteases, releasing the substrate's intracellular domains into the cytosol, which may then act as transcription factors (Blobel et al., 2009; Lal and Caplan, 2011).

NRG1 type III is subject to such processing, which is also called regulated intramembrane proteolysis (Brown et al., 2000). Shedding in its stalk region activates NRG1 type III by generating a membrane-anchored NTF that presents the EGF-like domain to the luminal space and signals to ErbB receptors in a juxtacrine/contact-dependent manner (Falls, 2003; Taveggia et al., 2005). In addition, the resulting NRG1 CTF is cleaved by the γ -secretase and regulates transcription in neurons (Bao et al., 2003, 2004; Chen et al., 2010). Analysis of knock-out mouse models established BACE1 and ADAM17 as important NRG1 type III sheddases that control myelination in the PNS. Although BACE1-mediated shedding of NRG1 type III promotes myelination (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006), shedding by ADAM17 was shown to inhibit this process (La Marca et al., 2011). This differential regulation was suggested to be due to small differences in the C termini of the NRG1 type III NTFs generated after shedding by BACE1 or ADAM17 (La Marca et al., 2011).

Despite the proposed importance, most NRG1 type III cleavage sites have only been investigated *in vitro* using short recombinant peptides in cleavage assays. Moreover, although the CTF resulting from shedding is eventually turned over by the γ -secretase, little is known about further processing of the corresponding NTF. It has been suggested that cleavage close to its N-terminal cysteine-rich TMD could release a large, soluble fragment containing the EGF-like domain (Wang et al., 2001). However, it remained unclear which proteases could mediate such a second cleavage event and whether the resulting soluble protein would possess signaling activity. We have now analyzed proteolytic processing of NRG1 type III in living cells to investigate whether, indeed, an sEGF domain was generated. To confirm the biological activity of such an sEGF domain, we generated a zebrafish mutant that lacks BACE1 and allows *in vivo* rescuing assays.

We first investigated the cleavages occurring between the EGF-like domain and the C-terminal TMD. Consistent with Montero et al. (2000), who suggested that the region from methionine 282 to tyrosine 286 may be a site of ADAM-mediated cleavage, we now assigned the ADAM17 cleavage to alanine 283 and, to a minor extent, to phenylalanine 285. Cleavage between alanine 283 and serine 284 fits well with the substrate preference of ADAM 17, which is known to favor alanine residues at the P1

position and to cleave several substrates with serine at P1' (Caescu et al., 2009). For BACE1 and ADAM10, we report cleavage sites after phenylalanine 293 and phenylalanine 285, respectively, thereby confirming previous data from assays with recombinant proteins (Hu et al., 2008; Luo et al., 2011). In the case of ADAM10, we also observed cleavage after tyrosine 286, which has not been reported previously. These findings demonstrate homogenous shedding of NRG1 type III by BACE1 10 residues N-terminal of the TMD and heterogeneous shedding by ADAM10 and ADAM17 at close but distinct sites 7–10 residues N-terminal of the BACE1 cleavage site. We note that the shedding sites reported here for ADAM10 (Y286) and ADAM17 (A283 and F285) differ from the sites reported by others (La Marca et al., 2011; Luo et al., 2011). For ADAM10, the difference is marginal and may be due to the different experimental setups, namely *in vitro* digest of recombinant peptides (Luo et al., 2011) and cellular expression system (this study). For ADAM17, it is currently unclear why Luo et al. (2011) and we could not observe cleavage after G290 as reported by La Marca et al. (2011). However, the fact that the cleavage site motifs of ADAM10 and ADAM17 are fairly similar to each other and that both enzymes can cleave peptides *in vitro* at the same peptide bonds (Caescu et al., 2009) support our finding of close cleavage sites for these proteases within the stalk region of NRG1 type III.

BACE1- and ADAM-mediated shedding of NRG1 type III was also detected under endogenous protease levels in primary neurons. Although we cannot compare the contribution of individual proteases quantitatively, we observed additive effects of BACE1 and ADAM inhibitors, supporting the idea that these enzymes compete for shedding in the stalk region of NRG1 type III in neurons.

In addition to the shedding events taking place C-terminal of the EGF-like domain, we observed proteolytic processing at novel sites located N-terminal of the EGF-like domain, which indicated that the EGF-like domain may be secreted. We observed liberation of the EGF-like domain from NRG1 type III by additional N-terminal cleavages in HEK cells and primary neurons generating α -sEGF and β -sEGF. Using MS and site-specific antibodies, we were able to demonstrate that BACE1 is responsible for the N-terminal cleavage generating β -sEGF in both cell types. Interestingly, the novel BACE1 cleavage site resembles the BACE1 cleavage site in APP with the Swedish mutation. This mutation dramatically increases the affinity of BACE1 to its substrate (Citron et al., 1992, 1995), strongly indicating that this site may be used efficiently *in vivo*. In addition to BACE1, ADAM17 (but not ADAM10) was also found to cleave at another novel site close to the N terminus of the EGF-like domain, thereby generating α -sEGF. The detection of a similar fragment in the supernatant of primary neurons expressing NRG1 type III suggests that α -sEGF is generated by ADAM17-mediated cleavage in these cells as well. However, due to the lack of antibodies against the novel ADAM17 cleavage site, we currently cannot exclude an additional contribution of other ADAMs.

Both α -sEGF and β -sEGF are functionally active and induce ErbB3 receptor phosphorylation and AKT downstream signaling in MCF-7 and Schwann cells. Moreover, we demonstrated the *in vivo* signaling potential of β -sEGF as an instructive factor in the process of peripheral myelination, because β -sEGF was able to rescue the peripheral hypomyelination in a *bace1* mutant zebrafish.

Our data are in agreement with a recent study reporting paracrine stimulation of Schwann cells and myelination by recombinant NRG1 type III (Syed et al., 2010). However, whereas this

study used a mixture of recombinant peptides comprising the entire NRG1 type III N terminus, we now provide evidence for the generation of signaling-competent, soluble NRG1 type III fragments by BACE1- and ADAM17-mediated proteolysis. Unfortunately, it is not possible to generate an N-terminally uncleavable NRG1 type III NTF, so we cannot investigate whether NRG1 type III signaling in the context of myelination occurs exclusively via the sEGF domain. However, our results, together with the data of others (Syed et al., 2010), suggest that this novel paracrine signaling pathway may at least partially contribute to NRG1 type III signaling.

We observed a similar activation of ErbB3 and AKT in Schwann cells after stimulation with ADAM17-generated α -sEGF (C terminus A283) and BACE1 generated β -sEGF (C terminus F293). In contrast, others did not detect such activation upon stimulation with an EGF-like domain cleaved by ADAM17 (C terminus G290, La Marca et al., 2011). Because this was attributed to the very C-terminal residues of the EGF-like domain, we sought to reconcile these controversial findings by investigating the impact of these residues on ErbB activation. However, we could not detect any difference regarding ErbB signaling between sEGF domains terminating at the identified BACE1 (F293) or the ADAM17 cleavage sites (A283 and G290). Likewise, neither C termini attributed to ADAM17 cleavage prevented rescue of the hypomyelination phenotype in a *bace1*^{-/-} zebrafish model. Moreover, in support of our findings, another study recently found no difference in ErbB activation by the membrane-anchored EGF-like domain after BACE1 (C terminus F293) or ADAM10 (C terminus F285, which excludes G290) processing (Luo et al., 2011). We currently have no definite explanation for the observed discrepancies; however, *in vitro* digests with recombinant peptides and enzymes imply the risk of additional cleavages that would not occur in a cellular environment. Such an additional cleavage within the EGF-like domain might abolish its signaling capacity and could partially account for the observed differences.

In summary, we have shown here that cleavage of NRG1 type III by BACE1 and ADAM17 at as-yet-unknown sites releases the EGF-like domain from its membrane anchor and allows for paracrine signaling of NRG1 type III via ErbB receptors. The proteases involved in NRG1 type III processing are major drug targets in the prevention or therapy of Alzheimer's disease and cancer (Duffy et al., 2011; Vassar and Kandalepas, 2011). The fact that these proteases have multiple—and until now unappreciated—roles in NRG1 signaling calls for caution when manipulating their activities in the course of therapy.

References

- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161:1133–1141. [CrossRef Medline](#)
- Bao J, Lin H, Ouyang Y, Lei D, Osman A, Kim TW, Mei L, Dai P, Ohlemiller KK, Ambrose RT (2004) Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos. *Nat Neurosci* 7:1250–1258. [CrossRef Medline](#)
- Birchmeier C, Nave KA (2008) Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* 56:1491–1497. [CrossRef Medline](#)
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385:729–733. [CrossRef Medline](#)
- Blöbel CP, Carpenter G, Freeman M (2009) The role of protease activity in ErbB biology. *Exp Cell Res* 315:671–682. [CrossRef Medline](#)
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Müller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA (2008) Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59:581–595. [CrossRef Medline](#)
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391–398. [CrossRef Medline](#)
- Caescu CI, Jeschke GR, Turk BE (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J* 424:79–88. [CrossRef Medline](#)
- Cai XD, Golde TE, Yoonkin SG (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514–516. [CrossRef Medline](#)
- Capell A, Steiner H, Willem M, Kaiser H, Meyer C, Walter J, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2000) Maturation and propeptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* 275:30849–30854. [CrossRef Medline](#)
- Chen Y, Hancock ML, Role LW, Talmage DA (2010) Intramembranous valine linked to schizophrenia is required for neuregulin 1 regulation of the morphological development of cortical neurons. *J Neurosci* 30:9199–9208. [CrossRef Medline](#)
- Citron M, Oltschendorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672–674. [CrossRef Medline](#)
- Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ (1995) Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14:661–670. [CrossRef Medline](#)
- De Strooper B, Vassar R, Golde T (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6:99–107. [CrossRef Medline](#)
- Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, McGowan PM (2011) The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics* 8:9. [CrossRef Medline](#)
- Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, Salzer JL (1997) The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neuexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol* 139:1495–1506. [CrossRef Medline](#)
- Falls DL (2003) Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *J Neurocytol* 32:619–647. [CrossRef Medline](#)
- Haass C (2004) Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483–488. [CrossRef Medline](#)
- Horiuchi K, Zhou HM, Kelly K, Manova K, Blöbel CP (2005) Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2. *Dev Biol* 283:459–471. [CrossRef Medline](#)
- Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9:1520–1525. [CrossRef Medline](#)
- Hu X, He W, Diaconu C, Tang X, Kidd GJ, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2008) Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *FASEB J* 22:2970–2980. [CrossRef Medline](#)
- Karey KP, Sirbasku DA (1988) Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 beta-estradiol. *Cancer Res* 48:4083–4092. [CrossRef Medline](#)
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253–310. [CrossRef Medline](#)
- Kingsley DM, Kozarsky KF, Hobbie L, Krieger M (1986) Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell* 44:749–759. [CrossRef Medline](#)
- Lal M, Caplan M (2011) Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions. *Physiology (Bethesda)* 26:34–44. [CrossRef Medline](#)
- La Marca R, Cerri F, Horiuchi K, Bachi A, Feltri ML, Wrabetz L, Blöbel CP, Quattrini A, Salzer JL, Taveggia C (2011) TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination. *Nat Neurosci* 14:857–865. [CrossRef Medline](#)
- Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H (2011) Regulated intramembrane proteolysis—lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem* 117:779–796. [CrossRef Medline](#)

- Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD (2005) Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:161–171. [CrossRef Medline](#)
- Luo X, Prior M, He W, Hu X, Tang X, Shen W, Yadav S, Kiryu-Seo S, Miller R, Trapp BD, Yan R (2011) Cleavage of neuregulin-1 by BACE1 or ADAM10 protein produces differential effects on myelination. *J Biol Chem* 286:23967–23974. [CrossRef Medline](#)
- Mei L, Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437–452. [CrossRef Medline](#)
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700–703. [CrossRef Medline](#)
- Monk KR, Talbot WS (2009) Genetic dissection of myelinated axons in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 19:486–490. [CrossRef Medline](#)
- Montero JC, Yuste L, Díaz-Rodríguez E, Esparís-Ogando A, Pandiella A (2000) Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* 16:631–648. [CrossRef Medline](#)
- Münzel EJ, Schaefer K, Obirei B, Kremmer E, Burton EA, Kuscha V, Becker CG, Brösamle C, Williams A, Becker T (2012) Claudin k is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish. *Glia* 60:253–270. [CrossRef Medline](#)
- Newbern J, Birchmeier C (2010) Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin Cell Dev Biol* 21:922–928. [CrossRef Medline](#)
- Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous γ -secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* 21:5408–5416. [CrossRef Medline](#)
- Orozco D, Tahirovic S, Rentzsch K, Schwenk BM, Haass C, Edbauer D (2012) Loss of fused in sarcoma (FUS) promotes pathological Tau splicing. *EMBO Rep* 13:759–764. [CrossRef Medline](#)
- Perlin JR, Lush ME, Stephens WZ, Piotrowski T, Talbot WS (2011) Neuronal Neuregulin 1 type III directs Schwann cell migration. *Development* 138:4639–4648. [CrossRef Medline](#)
- Sanderson MP, Dempsey PJ, Dunbar AJ (2006) Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors* 24:121–136. [CrossRef Medline](#)
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2:835–841. [CrossRef Medline](#)
- Shirakabe K, Wakatsuki S, Kurisaki T, Fujisawa-Sehara A (2001) Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem* 276:9352–9358. [CrossRef Medline](#)
- Syed N, Reddy K, Yang DP, Taveggia C, Salzer JL, Maurel P, Kim HA (2010) Soluble neuregulin-1 has bifunctional, concentration-dependent effects on Schwann cell myelination. *J Neurosci* 30:6122–6131. [CrossRef Medline](#)
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681–694. [CrossRef Medline](#)
- Turk B, Turk du SA, Turk V (2012) Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J* 31:1630–1643. [CrossRef Medline](#)
- van Bebber F, Hruscha A, Willem M, Schmid B, Haass C (2013) Loss of Bace2 in zebrafish affects melanocyte migration and is distinct from Bace1 knock out phenotypes. *J Neurochem*. Advance online publication. Retrieved February 14, 2013. doi:10.1111/jnc.12198. [CrossRef Medline](#)
- Vassar R, Kandalepas PC (2011) The β -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 3:20. [CrossRef Medline](#)
- Velanac V, Unterbarnscheidt T, Hinrichs W, Gummert MN, Fischer TM, Rossner MJ, Trimarco A, Brivio V, Taveggia C, Willem M, Haass C, Möbius W, Nave KA, Schwab MH (2012) Bace1 processing of NRG1 type III produces a myelin-inducing signal but is not essential for the stimulation of myelination. *Glia* 60:203–217. [CrossRef Medline](#)
- Wang JY, Miller SJ, Falls DL (2001) The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem* 276:2841–2851. [CrossRef Medline](#)
- Wild-Bode C, Fellerer K, Kugler J, Haass C, Capell A (2006) A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J Biol Chem* 281:23824–23829. [CrossRef Medline](#)
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, De Strooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664–666. [CrossRef Medline](#)
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79–91. [CrossRef Medline](#)