

Aus dem BioMedizinischen Zentrum (BMC)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Christian Haass

## **Regulierte Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$ durch SPPL2b**

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

vorgelegt von  
Manuel Lehm

aus  
Braunschweig

Jahr  
2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Regina Fluhrer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Schwarz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2016

## Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Regulierte Intramembranproteolyse von  $TNF\alpha$  durch SPPL2b*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorand





*Meinen Eltern*

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD	Morbus Alzheimer
ADAM	Disintegrin und Metalloprotease
AICD	Intrazelluläre Domäne des APP
Aph-1	Anterior-Pharynx-Defective 1
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
APP CTF $\alpha$	C-terminales APP $\alpha$ -Fragment
APP CTF $\beta$	C-terminales APP $\beta$ -Fragment
APPs	Lösliche APP Ektodomäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A $\beta$	Amyloid $\beta$ -Peptid
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
BACE	$\beta$ -APP schneidendes Enzym = $\beta$ -Sekretase
Bri 2 / 3	Britisches Demenzprotein 2 / 3
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-abhängige Degradation
FAD	Familiäre Form des Morbus Alzheimer
FBD	Familiäre Britische Demenz
FDD	Familiäre Dänische Demenz
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
ICD	Intrazelluläres Fragment
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
NTF	N-terminales Fragment
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen-2	Presenilin-Enhancer 2
PS	Presenilin
PS CTF	C-terminales Fragment von Presenilin

PS NTF	N-terminales Fragment von Presenilin
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
S1P	Site-1-Protease
S2P	Site-2-Protease
SCAM	Scanning Cysteine Mutagenesis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP	Signal-Peptid-Peptidase
SPPL	SPP-ähnliche Homologe
SREBP	Sterol-Response-Element-Binding-Protein
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNF $\alpha$ NTF	N-terminales Fragment von TNF $\alpha$
TNF $\alpha$ ICD	Intrazelluläre Domäne von TNF $\alpha$
TOF	Time of Flight (= Flugzeitanalysator)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
(Z-LL) <sub>2</sub> -Keton	1,3-Di-(N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>12</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>14</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Regulierte Intramembranproteolyse</b>	<b>16</b>
1.1.1 Konzept der regulierten Intramembranproteolyse	16
1.1.2 Regulierte Intramembranproteolyse durch S2P	18
1.1.2.1 Physiologie der S2P-Proteasen	19
1.1.2.2 Struktur der S2P-Proteasen	20
1.1.2.3 Substratanforderungen der S2P-Proteasen	21
1.1.3 Intramembranproteolyse durch Rhomboid-Proteasen	22
1.1.3.1 Physiologie der Rhomboid-Proteasen	22
1.1.3.2 Struktur der Rhomboid-Proteasen	23
1.1.3.3 Substratanforderungen der Rhomboid-Proteasen	24
<b>1.2 Regulierte Intramembranproteolyse durch GxGD-Proteasen</b>	<b>25</b>
1.2.1 Regulierte Intramembranproteolyse durch die $\gamma$ -Sekretase	28
1.2.1.1 Physiologie und Struktur der $\gamma$ -Sekretase	29
1.2.1.2 Substratanforderungen der $\gamma$ -Sekretase	31
1.2.1.3 Regulierte Intramembranproteolyse von APP	32
1.2.2 Regulierte Intramembranproteolyse durch Proteasen der SPP/SPPL-Familie	33
1.2.2.1 SPP	34
1.2.2.2 SPPL3	36
1.2.2.3 SPPL2a, b und c	37
1.2.2.4 Regulierte Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$	39
1.2.3 Klinische Relevanz der GxGD-Proteasen	41
1.2.3.1 NOTCH Signalweg	41
1.2.3.2 Morbus Alzheimer	42
1.2.3.3 Familiäre Britische und Familiäre Dänische Demenz	44
1.2.3.4 SPP/SPPL-Proteasen in Immunologie und Infektion	45
<b>1.3 Proteolysemechanismen von <math>\gamma</math>-Sekretase und SPPL2b</b>	<b>46</b>
1.3.1 Sequentielle Proteolyse durch die $\gamma$ -Sekretase	46
1.3.2 Sequentielle Proteolyse durch SPPL2b	48
<b>2 ZIELSETZUNG</b>	<b>50</b>
<b>3 MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Geräte und Materialien</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Reagenzien</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Puffer und Lösungen</b>	<b>55</b>

<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>58</b>
3.4.1	PCR zur Amplifikation und Mutagenese von DNA-Fragmenten	58
3.4.2	cDNA, Oligonukleotide und Konstrukte	59
3.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	64
3.4.4	Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	64
3.4.5	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	65
3.4.6	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	66
3.4.7	DNA-Präparation im kleinen Maßstab	66
3.4.8	Sequenzierung von DNA	67
3.4.9	DNA-Präparation im großen Maßstab	67
<b>3.5</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>68</b>
3.5.1	Verwendete Zelllinien und Kulturmedien	68
3.5.2	Stabile Transfektion von TR-Zellen	68
3.5.3	Transiente Transfektion von TR-Zellen	70
3.5.4	Kryokonservierung von TR-Zellen	70
<b>3.6</b>	<b>Proteinbiochemie</b>	<b>71</b>
3.6.1	Präparation von Zellmembranen	71
3.6.2	<i>In vitro</i> time-course Analyse von SPPL2b	71
3.6.3	Antikörper	72
3.6.4	Immunpräzipitation	72
3.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
3.6.6	Western Blot	74
<b>3.7</b>	<b>Quantifizierung der Bandenintensität und Statistik</b>	<b>75</b>
<b>3.8</b>	<b>MALDI-TOF Massenspektrometrie</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Weiterentwickelte Analysemethoden zur Untersuchung der Intramembranproteolyse von TNF<math>\alpha</math></b>	<b>77</b>
4.1.1	Nachweis der TNF $\alpha$ ICD-Konversion mittels <i>in vitro</i> time-course Analyse	77
4.1.2	Detektion von TNF $\alpha$ ICDs und C-Peptiden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	80
<b>4.2</b>	<b>Das PAL-Motiv ist essentiell für die katalytische Aktivität der SPPL2b Protease</b>	<b>85</b>
4.2.1	Deletion des PAL-Motivs führt zu katalytisch inaktivem SPPL2b	88
4.2.2	Austausch des erweiterten PAL-Motivs stört die ICD-Konversion	89
<b>4.3</b>	<b>Prolin 472 ist die sensitivste Position des PAL-Motivs hinsichtlich der katalytischen Aktivität von SPPL2b</b>	<b>90</b>
4.3.1	<i>In vitro</i> time-course Analysen für SPPL2b Prolin 472	91
4.3.2	Analyse der TNF $\alpha$ ICDs für SPPL2b Prolin 472	95
4.3.3	Analyse der TNF $\alpha$ C-Peptide für SPPL2b Prolin 472	97
4.3.4	Zusammenfassung für SPPL2b Prolin 472	99
<b>4.4</b>	<b>Alanin 473 – „size does matter“</b>	<b>100</b>
4.4.1	<i>In vitro</i> time-course Analysen für SPPL2b Alanin 473	101
4.4.2	Analyse der TNF $\alpha$ ICDs für SPPL2b Alanin 473	106
4.4.3	Analyse der TNF $\alpha$ C-Peptide für SPPL2b Alanin 473	108
4.4.4	Zusammenfassung für SPPL2b Alanin 473	111

<b>4.5</b>	<b>Leucin 474 ist kritisch für die TNF<math>\alpha</math> ICD-Konversion</b>	<b>112</b>
4.5.1	<i>In vitro</i> time-course Analysen für SPPL2b Leucin 474	113
4.5.2	Analyse der TNF $\alpha$ ICDs für SPPL2b Leucin 474	120
4.5.3	Analyse der TNF $\alpha$ C-Peptide für SPPL2b Leucin 474	123
4.5.4	Zusammenfassung für SPPL2b Leucin 474	125
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>126</b>
<b>5.1</b>	<b>Funktionalität des PAL-Motivs in GxGD-Proteasen</b>	<b>127</b>
5.1.1	Analysemethoden der SPPL2b-abhängigen RIP von TNF $\alpha$	127
5.1.1.1	Bewertung der <i>in vitro</i> time-course Analyse	127
5.1.1.2	Bewertung der MALDI-TOF Massenspektrometrie	129
5.1.2	Konservierung des PAL-Motivs in GxGD-Proteasen	131
5.1.3	Erweitertes PAL-Motiv in GxGD-Proteasen	134
<b>5.2</b>	<b>Proteolysemechanismus von SPPL2b</b>	<b>135</b>
5.2.1	Sequentielle Substratkonversion von TNF $\alpha$ durch SPPL2b	135
5.2.1.1	Initiale Endoproteolyse von TNF $\alpha$ durch SPPL2b	136
5.2.1.2	Prozessierung der TNF $\alpha$ C-Peptide	137
5.2.1.3	Sequentielle Konversion der TNF $\alpha$ ICDs	138
5.2.1.4	Bedeutung der Palmitoylierung von TNF $\alpha$	139
5.2.2	Beteiligung des PAL-Motivs am lateral substrate gate	140
5.2.3	Struktur- und Kinetikgrundlagen der Intramembranproteolyse	147
<b>5.3</b>	<b>Analyse des konservierten PAL-Motivs in SPPL2b</b>	<b>152</b>
5.3.1	Aminosäuren-Seitenkettenanforderungen des PAL-Motivs in GxGD-Proteasen	152
5.3.2	FAD-ähnliche Mutationen – SPPL2b A473C & L474F	156
<b>5.4</b>	<b>Gegenüberstellung von SPPL2b und <math>\gamma</math>-Sekretase</b>	<b>158</b>
5.4.1	Proteolysemechanismen der Proteasen im Vergleich	158
5.4.2	Substratanforderungen von SPPL2b und $\gamma$ -Sekretase	160
5.4.3	Physiologie von SPPL2b und $\gamma$ -Sekretase	162
<b>5.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>165</b>
5.5.1	Strukturanalyse und Proteolysemechanismus	165
5.5.2	$\gamma$ -Sekretase-spezifische Inhibitoren und Modulatoren	166
5.5.3	Physiologie der SPP/SPPL-Proteasen	168
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>170</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG – AMINOSÄURECODE</b>	<b>190</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG – TABELLEN</b>	<b>191</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>199</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>200</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) ist ein von Bakterien bis hin zum Menschen konservierter, biochemischer Mechanismus, der sich im Allgemeinen zunächst durch die Abspaltung der extrazellulären Ektodomäne eines Transmembranproteins vollzieht, gefolgt von der eigentlichen Intramembranproteolyse des membranständigen Fragmentes. Dieser zweite Schritt wird durch eine Intramembranprotease aus den drei Klassen der S2P-, der Rhomboid- oder der GxGD-Intramembranproteasen katalysiert.

Die freigesetzten Schnittprodukte der RIP können wiederum an elementaren physiologischen Prozessen wie der Zell-Zell-Kommunikation oder der Zelldifferenzierung beteiligt sein. Hierbei kommen den Schnittprodukten zum Teil extrazelluläre Signalfunktionen oder Beteiligungen an intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen zu.

Allen voran die  $\gamma$ -Sekretase als Vertreter der GxGD-Proteasen ist Gegenstand intensiver medizinischer Forschung, da ihre Prozessierung von APP ein mögliches drug target zur Reduktion von neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden in der Prävention und Behandlung des Morbus Alzheimer darstellt. Neben den Presenilinen, der katalytisch aktiven Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase, existieren auch homologe Proteasen der SPP/SPPL-Familie, wobei die Sequenzmotive YD, GxGD und PAL in allen GxGD-Proteasen konserviert sind. Ein genaues Verständnis der Proteolysemechanismen dieser GxGD-Proteasen ist unabdingbar, um durch die Entwicklung möglichst spezifischer  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren oder -Modulatoren potentielle Kreuzreaktionen einer Pharmakotherapie mit den homologen SPP/SPPL-Proteasen zu minimieren. Aufgrund seiner sehr ähnlichen subzellulären Lokalisation sowie Expression im Zentralnervensystem ist insbesondere die Untersuchung des sequentiellen Proteolysemechanismus von SPPL2b im Vergleich zur  $\gamma$ -Sekretase essentiell. Bei dem als erstes identifizierten SPPL2b-Substrat TNF $\alpha$  handelt es sich um ein Typ-2-Transmembranprotein, dessen Ektodomäne durch ADAM-17 abgespalten wird. Das membranverankerte N-terminale Fragment (TNF $\alpha$  NTF) stellt das direkte Substrat der Intramembranproteolyse durch SPPL2b dar, wobei intrazelluläre Fragmente (TNF $\alpha$  ICDs) und extrazelluläre C-Peptide freigesetzt werden.



In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung des konservierten PAL-Motivs für den Proteolysemechanismus von SPPL2b hinsichtlich der Umsetzung seines Substrates TNF $\alpha$  charakterisiert: hierzu wurden zunächst die bestehenden Analysemethoden zur Untersuchung der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  weiterentwickelt, um eine sensitive und robuste Detektion der TNF $\alpha$  ICDs und C-Peptide zu ermöglichen. Die *in vitro* time-course Analyse erlaubt sowohl die Quantifizierung der zeitabhängigen Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF als auch die Untersuchung der zeitabhängigen TNF $\alpha$  ICD-Konversion, wobei hier erstmals bis dahin unbekannte ICD-Spezies im Western Blot nachgewiesen wurden. Darüber hinaus ermöglicht die Weiterentwicklung der Probenvorbereitung eine sensitivere Untersuchung der TNF $\alpha$  Schnittprodukte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Hierbei wurden erstmals massenspektrometrisch palmitoylierte TNF $\alpha$  ICD-Spezies sowie eine Reihe weiterer, bislang nicht identifizierter TNF $\alpha$  C-Peptide als neuartige Schnittprodukte der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  detektiert.

Über die Anwendung der weiterentwickelten Analysemethoden auf die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  gelang der Nachweis, dass das konservierte PAL-Motiv in SPPL2b essentiell für die Proteolyse von TNF $\alpha$  sowie für die zeitabhängige TNF $\alpha$  ICD-Konversion ist. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurde darüber hinaus gezeigt, dass die funktionellen Anforderungen an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase weitgehend identisch sind. Die experimentellen Befunde könnten zudem hinweisend sein auf die Lokalisation des lateralen Substratzuganges der GxGD-Proteasen.

Anhand der vorliegenden Daten wird eine vergleichende Diskussion der Beteiligung des PAL-Motivs am sequentiellen Proteolysemechanismus von  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b möglich und schafft eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von möglichst spezifischen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren oder -Modulatoren zur Pharmakotherapie des Morbus Alzheimer.

## SUMMARY

Regulated intramembrane proteolysis (RIP) is a biochemical mechanism, conserved from bacteria to human, which is generally initiated by ectodomain shedding of transmembrane proteins, followed by the actual intramembrane proteolysis of the membrane-retained fragments. This second cleavage is catalyzed by one member of the three distinct classes of S2P-, Rhomboid- and GxGD-type intramembrane proteases.

Upon its liberation RIP products can participate in fundamental physiological processes, such as cell-cell communication and cell differentiation. Here, RIP products can take over extracellular signalling functions or are involved in intracellular signal transduction cascades.

Especially  $\gamma$ -secretase, a GxGD-type intramembrane protease, is a main target for pharmaceutical research, as  $\gamma$ -secretase mediated APP processing represents a potential drug target for lowering the levels of neurotoxic A $\beta$  peptides during prevention and treatment of Alzheimer's disease. Besides presenilin, the catalytically active subunit of  $\gamma$ -secretase, the homologous SPP/SPPL proteases exist, which all share the highly conserved YD, GxGD and PAL sequence motifs. A precise understanding of the underlying cleavage mechanisms of the individual GxGD-type intramembrane proteases is indispensable for the development of highly specific  $\gamma$ -secretase inhibitors or modulators, in order to minimize potential cross reactions of pharmacological therapies with the homologous SPP/SPPL proteases. Due to its highly similar subcellular localisation and expression pattern in the brain, analyzing the sequential cleavage mechanism of SPPL2b in comparison to  $\gamma$ -secretase is absolutely essential. The first identified SPPL2b substrate is TNF $\alpha$ , a type 2 membrane protein whose ectodomain is shedded by ADAM-17. The membrane-retained N-terminal fragment (TNF $\alpha$  NTF) constitutes the direct substrate for SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis, leading to the liberation of intracellular fragments (TNF $\alpha$  ICDs) as well as extracellular C-peptide species.

In the present study the functional relevance of the conserved PAL motif for the cleavage mechanism of SPPL2b was characterized with respect to its substrate TNF $\alpha$ : at first, analytical methods for the study of SPPL2b-dependent

intramembrane proteolysis of TNF $\alpha$  were further optimized, in order to allow sensitive and robust detection of TNF $\alpha$  ICDs and C-peptides. The *in vitro* time-course analysis allows quantification of the time-dependent turnover of the direct substrate TNF $\alpha$  NTF as well as the study of the time-dependent TNF $\alpha$  ICD conversion. Here, for the first time, additional, so far unknown ICD species were detected via Western Blot analysis. In addition, the sample preparation for MALDI-TOF mass spectrometry was further developed, allowing the sensitive detection of TNF $\alpha$  cleavage products. Thereby palmitoylated TNF $\alpha$  ICDs as well as additional, previously unknown TNF $\alpha$  C-peptides were, for the first time, detected by mass spectrometry as novel cleavage products of SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis of TNF $\alpha$ .

By applying these advanced analytical methods to the SPPL2b-dependent intramembrane proteolysis of TNF $\alpha$ , the conserved PAL motif of SPPL2b was shown to be essential for TNF $\alpha$  proteolysis as well as the time-dependent TNF $\alpha$  ICD conversion. Via site-directed mutagenesis it was further shown that the functional requirements of the PAL motif amino acid side chains are widely identical between SPPL2b and  $\gamma$ -secretase. Additionally, there is biochemical evidence that might be suggestive of the localization of the lateral substrate gate in GxGD-type intramembrane proteases.

The present data allows for a comparative discussion of the involvement of the PAL motif with respect to the sequential cleavage mechanisms of both  $\gamma$ -secretase and SPPL2b, thus establishing a basis for the development of highly specific  $\gamma$ -secretase inhibitors or modulators for the pharmacotherapy of Alzheimer's disease.

# 1 EINLEITUNG

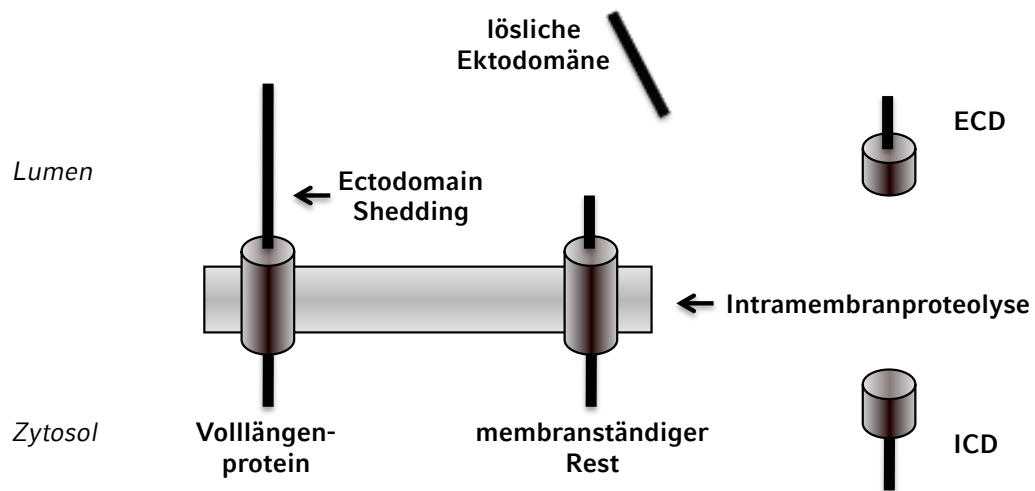
## 1.1 Regulierte Intramembranproteolyse

Die intakte Proteostase, die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase sämtlicher Proteine, ist essentiell für eine funktionale Zellbiologie sowie für eine korrekte Entwicklung multizellulärer Organismen und Krankheitsprävention (Balch et al., 2008). Gleichzeitig stellt die Proteinbiosynthese einen äußerst energieaufwändigen, zellbiologischen Prozess dar (Buttgereit und Brand, 1995); somit kommt insbesondere der Regulierung des Proteinumsatzes, einschließlich der Regulierung des Umsatzes der Transmembranproteine, eine besondere Bedeutung zu. Bei der regulierten Intramembranproteolyse handelt es sich um einen von Bakterien bis hin zum Menschen konservierten biochemischen Mechanismus, der für zahlreiche biologische Prozesse wie die Zell-Zell-Kommunikation oder die Zelldifferenzierung unverzichtbar ist (Brown et al., 2000).

### 1.1.1 Konzept der regulierten Intramembranproteolyse

Die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) vollzieht sich im Allgemeinen durch zwei konsekutive, proteolytische Schritte, die eine kontrollierte Umsetzung von Transmembranproteinen erlauben (Abb. 1.1):

In einem ersten Schritt wird zunächst die luminaire bzw. extrazelluläre Ektodomäne eines Transmembranproteins abgespalten und entsprechend in endolysosomalen Kompartimenten abgebaut respektive sezerniert, weithin auch als „Ectodomain Shedding“ bezeichnet (Schlöndorff und Blobel, 1999). Das Ectodomain Shedding stellt damit gleichzeitig den eigentlich regulierenden Schritt innerhalb der regulierten Intramembranproteolyse dar, da Vollängenproteine in aller Regel keine oder nur schlechte Substrate für die nachfolgende Intramembranproteolyse darstellen (Ausnahme siehe 1.1.3). In einem zweiten Schritt wird der membranständige Rest des Transmembranproteins der eigentlichen Intramembranproteolyse zugeführt, wobei das Protein innerhalb der Transmembrandomäne (TMD) gespalten



**Abb. 1.1 Regulierte Intramembranproteolyse (RIP)**

Der erste Schritt der RIP vollzieht sich durch Abspaltung der luminalen bzw. extrazellulären Ektodomäne eines Transmembranproteins (Ectodomain Shedding). Der membranständige Rest des Transmembranproteins wird in einem zweiten Schritt innerhalb der Transmembrandomäne gespalten (Intramembranproteolyse), wodurch je ein extrazelluläres (ECD) und ein intrazelluläres Fragment (ICD) freigesetzt werden. Nach (Fluhrer et al., 2009).

wird. Hieraus resultieren sowohl ein intrazelluläres (ICD) als auch ein weiteres extrazelluläres Fragment, welche entsprechend freigesetzt werden (Abb. 1.1). Diese Peptide können im Einzelfall wiederum an der Signaltransduktion oder anderen Signalfunktionen partizipieren (Wolfe und Kopan, 2004).

Die Existenz solch eines biochemischen Mechanismus wurde ursprünglich lange Zeit abgelehnt, da für die Intramembranproteolyse zwingend ein  $H_2O$ -Molekül in die hydrophobe Membranebene eindringen müsste. Erst die Studien zur Freisetzung des Morbus Alzheimer-assoziierten Amyloid  $\beta$ -Peptids ( $A\beta$ ) konnten zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen in Zellkultur entsprechende Peptide produziert werden (Haass et al., 1992). Zudem geben neuere Strukturanalysen von einzelnen Intramembranproteasen mittlerweile erste Einblicke, auf welche Weise  $H_2O$ -Moleküle an den Ort der Proteolyse innerhalb der hydrophoben Membranebene gelangen können (Urban und Shi, 2008) (siehe 1.1.2.2ff).

Die Klassifizierung und Systematik der Intramembranproteasen erfolgt nach ihrer jeweiligen nucleophilen Gruppe (Tab. 1.1):

So unterteilt man in S2P bzw. die S2P-Familie als Vertreter der Intramembran-Metalloproteasen, die Rhomboide als Vertreter der Intramembran-Serinproteasen sowie in die Familie der GxGD-Intramembranproteasen als Intramembran-Aspartylproteasen.

Familie:	Klassifikation:	Nucleophile Gruppe:
S2P	Intramembran-Metalloproteasen	Zink
Rhomboide	Intramembran-Serinproteasen	Serin
GxGD-Proteasen	Intramembran-Aspartylproteasen	Aspartat

**Tab. 1.1 Klassifikation der Intramembranproteasen**

Die Klassifikation der Intramembranprotease-Familien erfolgt nach der jeweiligen nucleophilen Gruppe im aktiven Zentrum.

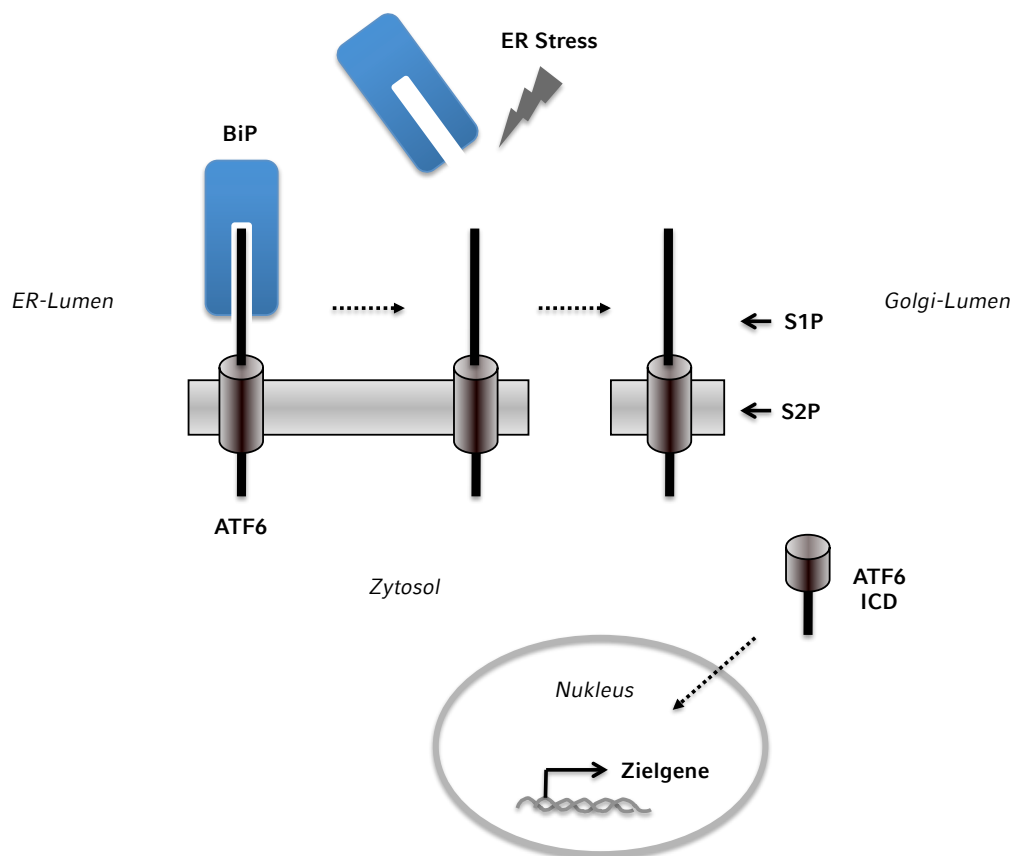
Gemein ist allen bis dato identifizierten Intramembranproteasen, dass es sich ausnahmslos um polytope Transmembranproteine mit mehreren Transmembrandomänen handelt. Die teils erheblichen biochemischen und physiologischen Unterschiede innerhalb sowie zwischen diesen distinkten Klassen von Intramembranproteasen werden nachfolgend beleuchtet.

### 1.1.2 Regulierte Intramembranproteolyse durch S2P

Bei der S2P-Familie, der ersten etablierten Intramembranprotease, handelt es sich um die Vertreter der Intramembran-Metalloproteasen (Rawson et al., 1997). Ein konserviertes HExxH-Motiv ist im Falle der S2Ps verantwortlich für die Komplexierung eines Zink<sup>2+</sup>-Iones (Urban und Shi, 2008). Die S2P-Familie ist von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert, wobei es sich bei humanem S2P um ein polytopes Transmembranprotein mit 519 Aminosäuren handelt. Für Eukaryoten gut etabliert ist die biologische Funktion von S2Ps hinsichtlich der „ER stress response“ sowie der Regulation des Lipidmetabolismus (Brown et al., 2000).

### 1.1.2.1 Physiologie der S2P-Proteasen

Zelluläre Stressbedingungen wie erhöhte Temperatur oder eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine führen zu einem erhöhten Chaperon-Bedarf im endoplasmatischen Retikulum (ER). Ein ER-ständiges Chaperon BiP bindet an den membranständigen Transkriptionsfaktor ATF6 und dissoziiert unter ER-Stressbedingungen ab (Shen et al., 2005) (Abb. 1.2). Dabei kommt es zur Demaskierung von ATF6-Lokalisierungssignalen, woraufhin ATF6 zum Golgi-Apparat transportiert wird (Shen et al., 2002). ATF6 durchläuft hier zunächst das Ectodomain Shedding durch S1P (Site-1-Protease), danach vollzieht S2P (Site-2-Protease) die Intramembranproteolyse (Shen und Prywes, 2004). Auf diese Weise erfolgt die Freisetzung der zytosolischen



**Abb. 1.2 ER stress response durch S2P-abhängige RIP von ATF6**

Unter ER-Stressbedingungen dissoziiert das ER-ständige Chaperon BiP vom membranständigen Transkriptionsfaktor ATF6. Dies erlaubt den Transport zum Golgi-Apparat, wo ATF6 die RIP durch S1P und S2P durchläuft. Die freigesetzte ATF6 ICD induziert nach Translokation in den Nukleus die Expression ER-Stress-relevanter Proteine. Nach (Zhang et al., 2006).

ATF6-Domäne (ATF6 ICD), welche nach Translokation in den Nukleus die Expression ER-Stress-relevanter Proteine induziert (Abb. 1.2). Diese zelluläre Stressantwort wird als ER stress response bezeichnet. Zahlreiche weitere Substrate für die S2P-abhängige RIP sind ebenfalls an der Regulation der ER stress response beteiligt (Kondo et al., 2007; Stirling und O'hare, 2006; Zhang et al., 2006; Eleveld-Trancikova et al., 2010; Murakami et al., 2006).

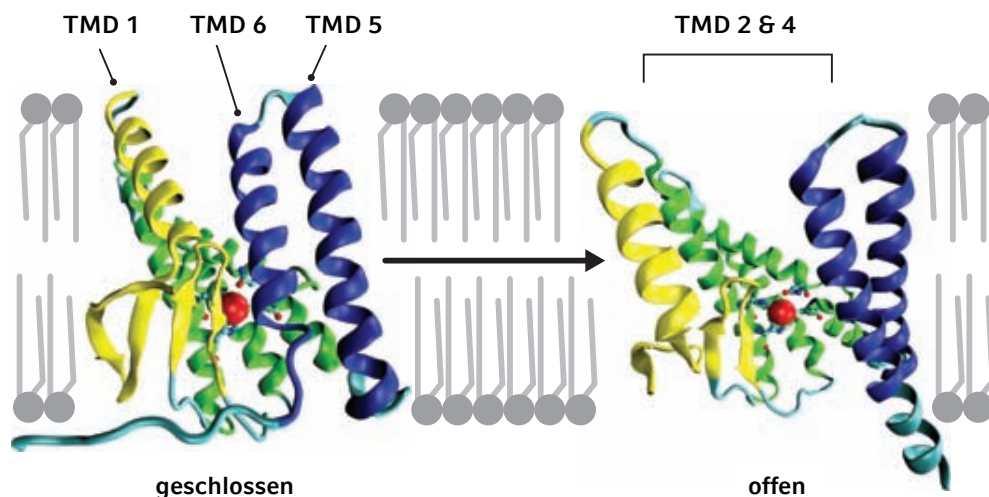
Auch die Regulation des Lipidmetabolismus beruht zumindest teilweise auf der S2P-abhängigen RIP (Brown und Goldstein, 1999). Ein Absinken der Cholesterin-Konzentration innerhalb der ER-Membran erlaubt den Transport des polytopen Sterol-Response-Element-Binding-Protein (SREBP) vom ER hin zum Golgi-Apparat (Radhakrishnan et al., 2008), wo nach S1P-vermittelter Abspaltung der ersten TMD ein direktes Substrat für die Intramembranproteolyse durch S2P entsteht (Sakai et al., 1998; Duncan et al., 1997). Die dadurch freigesetzte N-terminale SREBP ICD induziert nach Translokation in den Nukleus die Expression von Lipidmetabolismus-relevanten Genen wie z.B. der HMG-CoA Reduktase (Brown und Goldstein, 1999).

#### 1.1.2.2 Struktur der S2P-Proteasen

Während bis dato noch keine Strukturinformationen von eukaryotischen S2Ps existieren, konnte mittels Röntgenstrukturanalyse die Kristallstruktur von S2P aus *Methanocaldococcus jannaschii* (mjS2P), einem Archaeon, mit einer Auflösung von 3.3 Angström bestimmt werden (Feng et al., 2007) (Abb. 1.3). Zwar wurde zur Kristallisation von mjS2P nur ein N-terminales Fragment verwendet, allerdings zeigte dies dennoch proteolytische Aktivität. Das Fragment besteht aus drei hoch konservierten TMDs, welche gemeinsam das strukturelle Grundgerüst der S2Ps bilden und gleichsam das katalytische Zentrum inklusive HExxH-Motiv in TMD 2 beherbergen (Feng et al., 2007). Gemeinsam mit dem koordinierten  $\text{Zink}^{2+}$ -Ion kommt so das aktive Zentrum innerhalb der hydrophoben Membranebene zu liegen.

Das aktive Zentrum von mjS2P ist hydratisiert, außerdem existiert ein Wasser-permeabler Kanal ausgehend von der zytoplasmatischen Membranseite (Feng et al., 2007). Dies erklärt die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für  $\text{H}_2\text{O}$ -





**Abb. 1.3 Struktur von mjS2P**

Röntgenstrukturanalyse von S2P aus *Methanocaldococcus jannaschii* (mjS2P), in geschlossener und offener Konformation. Das katalytische Zink-Atom ist als rote Kugel hervorgehoben. Nach (Feng et al., 2007).

Moleküle, einer zwingenden Voraussetzung für jede Form der Proteolyse (Urban und Shi, 2008).

### 1.1.2.3 Substratanforderungen der S2P-Proteasen

Bezüglich der Substratanforderungen an die S2P-abhängige RIP wurde bisher für alle Substrate das Ectodomain Shedding bzw. die Abspaltung einer TMD aus einem polytopen Vorläuferprotein mittels S1P als Voraussetzung für die S2P-abhängige Intramembranproteolyse beschrieben. Im Folgenden werden beide Prozesse vereinfachend als Ectodomain Shedding bezeichnet. Ein RxxL-Motiv wurde hierbei als Erkennungssequenz für den S1P-Schnitt identifiziert (Duncan et al., 1997). Darüber hinaus besteht eine negative Korrelation zwischen der Länge der extrazellulären Domäne und der Effizienz der Intramembranproteolyse durch S2P (Shen und Prywes, 2004). Bis dato wurden exklusiv Typ-2-Transmembranproteine bzw. abgespaltene TMDs in Typ-2-Orientierung als direkte Substrate der S2P-abhängigen RIP beschrieben. In diesem Zusammenhang scheint die Topologie bzw. die Orientierung der Substrate zum aktiven Zentrum der Protease entscheidend zu sein. Des Weiteren wurde im Falle des Substrates SREBP gezeigt, dass zwei zentral gelegene Aminosäuren innerhalb der N-terminalen TMD von SREBP für die

S2P-abhängige Intramembranproteolyse wichtig sind (Ye et al., 2000). Zusätzlich erfolgt eine physiologische Regulation der S2P-abhängigen RIP über die Koloalisation von S2P und Substrat, wie am Beispiel von ATF6 oder SREBP ersichtlich. Sowohl ATF6 als auch SREBP müssen auf einen Stimulus hin zunächst den Golgi-Apparat erreichen, bevor sie als Substrate für S1P und S2P zur Verfügung stehen (Shen et al., 2002; Radhakrishnan et al., 2008).

### 1.1.3 Intramembranproteolyse durch Rhomboid-Proteasen

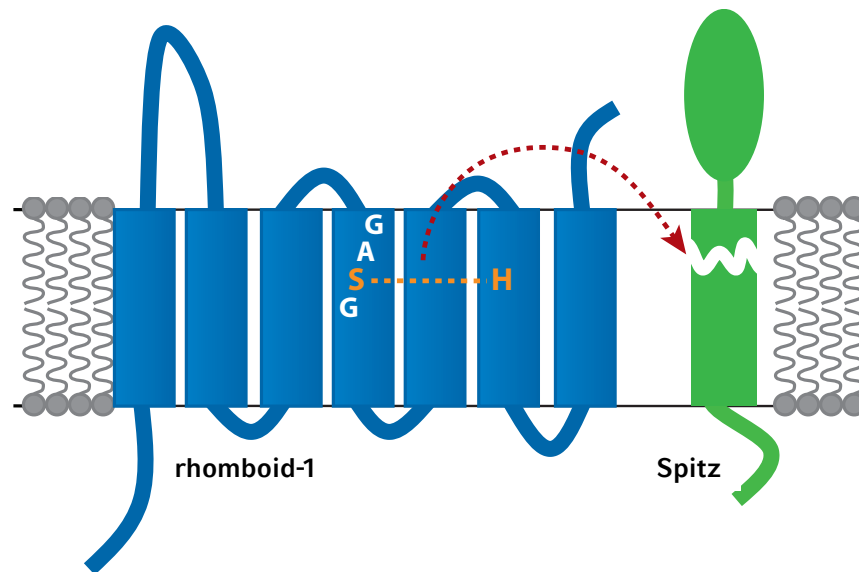
Rhomboiden sind die Vertreter der Intramembran-Serinproteasen, einer ebenfalls von Bakterien bis hin zum Menschen konservierten Familie von Intramembranproteasen (Lemberg und Freeman, 2007a).

#### 1.1.3.1 Physiologie der Rhomboid-Proteasen

Als Begründer der Rhomboid-Proteasen wurde das *Drosophila* rhomboid-1 identifiziert (Urban et al., 2001). Eine Mutation im rhomboid-Gen von *Drosophila melanogaster* bewirkt eine rautenförmige Deformität im Kopfbereich (Mayer und Nusslein-Volhard, 1988). Dieser Phänotyp birgt deutliche Ähnlichkeit zu dem Knockout von Spitz, einem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Es stellte sich in der Folge heraus, dass *Drosophila* rhomboid-1 über die Intramembranproteolyse von Spitz ein Hauptregulator der EGF-abhängigen Signaltransduktion ist (Lee et al., 2001) (Abb. 1.4).

Nebst Spitz unterliegen darüber hinaus auch die *Drosophila* Wachstumsfaktoren Gurken und Keren der Rhomboid-abhängigen Intramembranproteolyse (Urban et al., 2002).

In Säugern sind momentan 5 unterschiedliche Rhomboid-Proteasen bekannt, wobei sich deren subzelluläre Lokalisationen über sämtliche sekretorischen Kompartimente sowie die mitochondriale Innenmembran erstrecken (Lemberg und Freeman, 2007b). Für drei dieser 5 Rhomboid-Proteasen sind diverse Substrate bekannt, wodurch die Rhomboid-abhängige Intramembranproteolyse physiologisch wichtige Regulationsfunktionen übernimmt, wie beispielsweise die Fusion von Mitochondrien oder die Initiation der Apoptose (Lemberg und Freeman, 2007b).



**Abb. 1.4 Rhomboid-abhängige Intramembranproteolyse von Spitz**

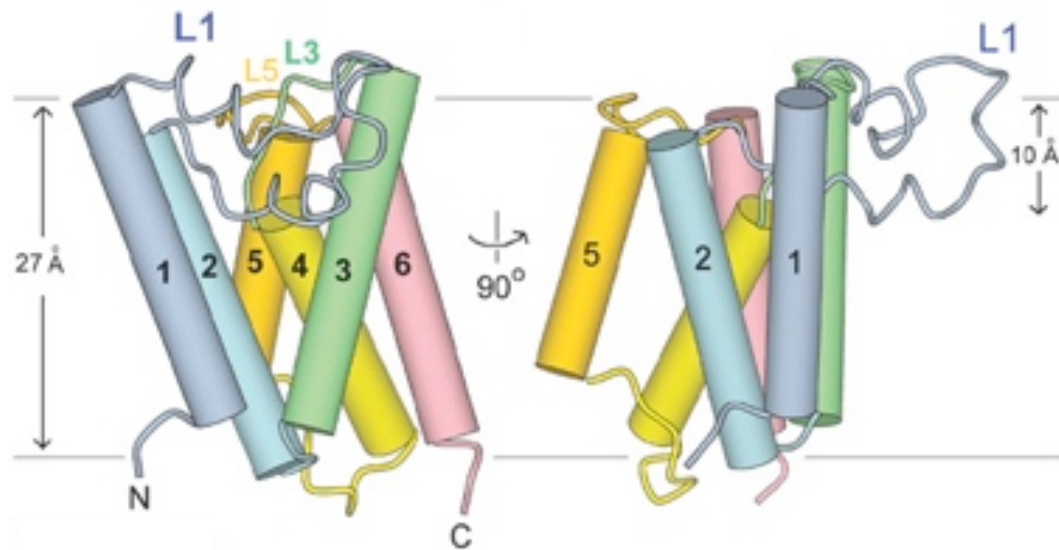
Die *Drosophila* Intramembranprotease rhomboid-1 schneidet das Substrat Spitz ohne vorhergehendes Ectodomain Shedding innerhalb seiner TMD. Die freigesetzte Ektodomäne von Spitz stellt einen Hauptregulator der EGF-abhängigen Signaltransduktion dar. Nach (Freeman, 2008).

### 1.1.3.2 Struktur der Rhomboid-Proteasen

Die Röntgenstrukturanalyse von Rhomboiden gelang anhand der bakteriellen Rhomboid-Protease GlpG aus *Escherichia coli* bzw. *Haemophilus influenzae* (Wang et al., 2006b; Wu et al., 2006; Ben-Shem et al., 2007; Lemieux et al., 2007). Wie im Falle von S2P ist auch das aktive Zentrum des Rhomboids GlpG mit seinen katalytisch aktiven Resten innerhalb der hydrophoben Membranebene lokalisiert (Wang et al., 2006b) (Abb. 1.5).

Hier handelt es sich um eine katalytische Diade eines Serin- sowie eines Histidin-Restes. Das aktive Zentrum mitsamt diesen beiden Aminosäure-Resten kommt innerhalb eines strukturellen Grundgerüsts aus 6 TMDs zu liegen (Abb. 1.5). Dabei wird das Serin von TMD 4 und das katalytische Histidin von TMD 6 gestellt, wobei die stabile Interaktion dieser beiden TMDs durch ein GxxxG Helixdimerisierungs-Motiv in TMD 6 sichergestellt wird (Wang et al., 2006b).

Auch bei diesem Rhomboid-Vertreter findet sich, wie bei S2P, eine Wasser-permeable Aussparung, die den Zugang von H<sub>2</sub>O-Molekülen zum aktiven Zentrum erklärt (Urban und Shi, 2008).



**Abb. 1.5 Struktur von GlpG**

Röntgenstrukturanalyse von GlpG aus *Escherichia coli*, in Vorderansicht (links) und Seitenansicht (rechts). Vorder- und Seitenansicht sind um 90° zueinander gedreht. Nach (Wang et al., 2006b).

### 1.1.3.3 Substratanforderungen der Rhomboid-Proteasen

Im Gegensatz zu S2P und den meisten Intramembran-Aspartylproteasen benötigen Rhomboide für eine effiziente Intramembranproteolyse ihrer Substrate kein vorhergehendes Ectodomain Shedding (Urban et al., 2001). Als Rhomboid-Substrate fungieren folglich Volllängenproteine, so dass die Abspaltung der Substrat-Ektodomäne nicht regulierend auf die proteolytische Aktivität der Rhomboide wirken kann. Daher kommt der räumlichen Trennung von Protease und Substrat in diesem Fall eine besondere Bedeutung zu (Freeman, 2008).

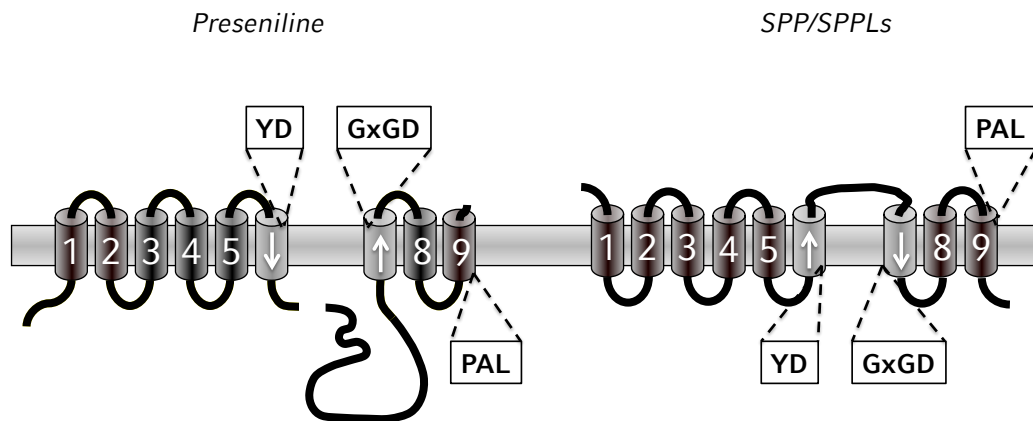
Darüber hinaus wurden in Säugern über ihre Sequenzhomologie 9 weitere, proteolytisch nicht aktive Rhomboide identifiziert. Diese inaktiven Rhomboide (inhibitorische Rhomboide, iRhoms) bzw. Derlins sind vermutlich durch horizontalen Gentransfer und nachfolgende Mutation des aktiven Zentrums entstanden (Koonin et al., 2003). Eine mögliche Funktion der iRhoms ist, dass sie über eine kompetitive Bindung der Substrate diese vor der proteolytischen Aktivität aktiver Rhomboide schützen und so regulativ eingreifen (Adrain und Freeman, 2012).

Nahezu alle Substrate der aktiven Rhomboide weisen eine Membrantopologie vom Typ 1 auf. Kürzlich wurden allerdings mit Typ-2-Transmembranproteinen und polytopen Membranproteinen einige Ausnahmen von dieser Regel beschrieben (Fleig et al., 2012; Tsruya et al., 2007). Insgesamt scheinen die Rhomboide daher bezüglich der Substratselektivität promiskuitiver zu sein als die zuvor besprochenen S2P-Intramembranproteasen.

## **1.2 Regulierte Intramembranproteolyse durch GxGD-Proteasen**

Die GxGD-Proteasen stellen die Vertreter der Intramembran-Aspartylproteasen (Haass und Steiner, 2002). Hierzu gehören zum einen die Preseniline PS1 und PS2, welche die katalytisch aktive Komponente der  $\gamma$ -Sekretase bilden, zum anderen die Mitglieder der SPP/SPPL-Familie, die Signal-Peptid-Peptidase (SPP) sowie die SPP-ähnlichen (SPPL) Proteasen SPPL2a, b, c und SPPL3. Das gemeinsame Merkmal dieser Gruppe stellt das konservierte, namensgebende GxGD-Motiv dar. Formal gehört die bakterielle Typ IV Prepilin-Peptidase (TFPP) ebenfalls zur Familie der GxGD-Proteasen. Allerdings zeigt TFPP nur einen entfernten Verwandtschaftsgrad auf und wird daher hier nicht weiter berücksichtigt (LaPointe, 2000).

Sowohl die Preseniline als auch SPP sowie SPPLs weisen untereinander lediglich eine sehr begrenzte Sequenzhomologie auf. Bei allen Vertretern handelt es sich allerdings um polytope Transmembranproteine mit insgesamt je 9 TMDs (Abb. 1.6). Hervorzuheben ist hierbei die invertierte Membrantopologie zwischen den Presenilinen einerseits und den Proteasen der SPP/SPPL-Familie andererseits. Demzufolge ist das aktive Zentrum und dessen Orientierung zur Membranebene ebenfalls invertiert. Sehr wahrscheinlich ist dies der Grund dafür, weshalb die  $\gamma$ -Sekretase lediglich Typ-1-Transmembranproteine als Substrate akzeptiert, wohingegen SPP/SPPLs Typ-2-Transmembranproteine schneiden (Fluhrer et al., 2009). Das für diese Klasse von Intramembranproteasen namensgebende GxGD-Motiv ist in TMD 7 lokalisiert und trägt einen der beiden katalytisch aktiven Aspartyl-Reste (Steiner et al., 1999; Wolfe et al., 1999).



**Abb. 1.6 GxGD-Intramembranproteasen**

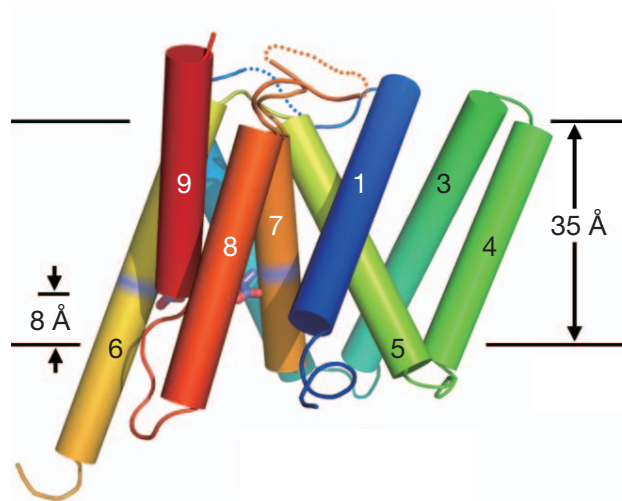
Gemeinsam konstituieren die Preseniline und die SPP/SPPLs die Familie der GxGD-Intramembranproteasen. Alle Vertreter besitzen 9 TMDs und weisen drei hoch konservierte Sequenzmotive auf, die YD-, GxGD- und PAL-Motive. Zudem besteht eine invertierte Membrantopologie im Vergleich von Presenilinen und SPP/SPPLs. Nach (Fluhrer et al., 2009).

Darüber hinaus existieren zwei weitere zwischen den Presenilinen und den SPP/SPPLs konservierte Sequenzmotive, das YD- sowie das PAL-Motiv (Weihofen et al., 2002). Diese Motive sind in herkömmlichen, löslichen Aspartylproteasen nicht konserviert, sondern finden sich exklusiv bei den GxGD-Proteasen (Steiner et al., 2000). Daher ist ein Analogieschluss von bekannten Aspartylproteasen auf den exakten Proteolysemechanismus von GxGD-Proteasen nur bedingt möglich.

Das YD-Motiv in TMD 6 stellt den zweiten katalytisch aktiven Aspartyl-Rest (Wolfe et al., 1999). Für einen funktionalen Proteolysemechanismus sind zwei sich gegenüberliegende Aspartyl-Reste zwingend erforderlich, was bereits eine räumliche Nähe der beiden YD- und GxGD-Motive impliziert. Das PAL-Motiv, lokalisiert in TMD 9, ist das dritte hoch konservierte Motiv der GxGD-Proteasen. Sowohl für PS1 als auch für SPP konnte die Bedeutung des PAL-Motivs hinsichtlich der katalytischen Aktivität der Proteasen bereits gezeigt werden (Wang et al., 2004; 2006a), allerdings noch nicht für die anderen GxGD-Proteasen. Im Falle von PS1 konnte darüber hinaus mittels Scanning Cysteine Mutagenesis (SCAM) gezeigt werden, dass sich das PAL-Motiv in enger räumlicher Nähe zum YD-Motiv und damit zum aktiven Zentrum befindet (Sato et al., 2008; Tolia et al., 2008).

Analog zu S2P und den Rhomboiden stellt die Aktivierung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls auch für die GxGD-Proteasen eine zwingende Voraussetzung der proteolytischen Aktivität dar. Mittlerweile konnte mittels Röntgenstrukturanalyse die Kristallstruktur eines Presenilin-Homologen aus *Methanoculleus marisnigri* (mmPSH), einem Archaeon, mit einer Auflösung von 3.3 Angström bestimmt werden (Li et al., 2012) (Abb. 1.7).

Das strukturelle Grundgerüst von mmPSH besteht aus 9 TMDs, wobei das aktive Zentrum mit den beiden katalytischen Aspartyl-Resten aus dem YD- (TMD 6) und GxGD-Motiv (TMD 7) innerhalb der hydrophoben Membranebene zu liegen kommt (Abb. 1.7). Die katalytischen Aspartyl-Reste befinden sich ebenfalls in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander, wenn auch nicht ganz so nah wie es zur Aktivierung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls vonnöten wäre (Li et al., 2012). Möglicherweise beruht dies auf Kristallisationsartefakten oder auf einer fehlenden Substratinteraktion. Von den beiden katalytischen Aspartyl-Resten ausgehend befindet sich eine Wasser-permeable Höhle, die sich bis zur zytosolischen Membranseite erstreckt (Li et al., 2012) und so den Zugang von H<sub>2</sub>O-Molekülen zum aktiven Zentrum erklärt. Neben den TMDs 6 und 7 ist ebenso das konservierte PAL-Motiv in



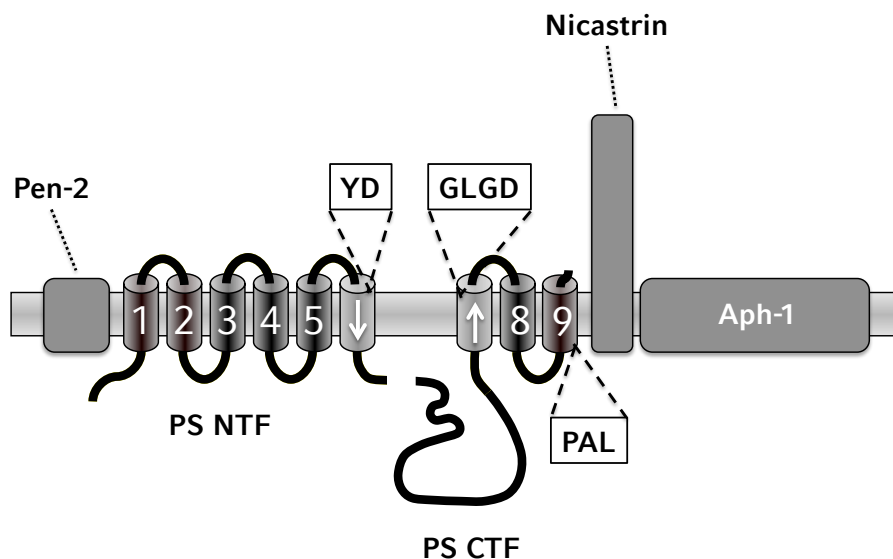
**Abb. 1.7 Struktur von mmPSH**

Röntgenstrukturanalyse eines Presenilin-Homologen aus *Methanoculleus marisnigri* (mmPSH). Nach (Li et al., 2012).

TMD 9 am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt, was die Befunde der bisherigen biochemischen und SCAM-Experimente bestätigt (Li et al., 2012). Von den eukaryotischen Presenilinen oder SPP/SPPLs sind bis dato noch keine Strukturanalysen mit atomarer Auflösung bekannt.

### 1.2.1 Regulierte Intramembranproteolyse durch die $\gamma$ -Sekretase

Berühmt für ihre zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer (siehe 1.2.3.2), stellt die  $\gamma$ -Sekretase das Gründungsmitglied sowie den bislang bestuntersuchtesten Vertreter der GxGD-Proteasen dar (Steiner et al., 2008). Das große Alleinstellungsmerkmal der  $\gamma$ -Sekretase unter den Intramembranproteasen besteht darin, dass es sich bei ihr um einen Multiprotein-Komplex aus 4 Membranproteinen handelt (Abb. 1.8): die erstmalige Rekonstitution der  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität in Hefe identifizierte neben den katalytisch aktiven Presenilinen PS1 und PS2 die drei Membranproteine (1) Nicastrin, (2) Anterior-Pharynx-Defective 1 (Aph-1) sowie (3) Presenilin-Enhancer 2 (Pen-2) als zwingende Komplexpартner für



**Abb. 1.8 Die  $\gamma$ -Sekretase**

Bei der  $\gamma$ -Sekretase handelt es sich um einen Multiprotein-Komplex aus den 4 Membranproteinen Presenilin (PS), Nicastrin, Aph-1 und Pen-2. PS ist die katalytisch aktive Untereinheit und beherbergt die YD-, GxGD- und PAL-Motive. Zudem wird PS endoproteolytisch in PS NTF und PS CTF gespalten. Nach (Fluhrer et al., 2009).



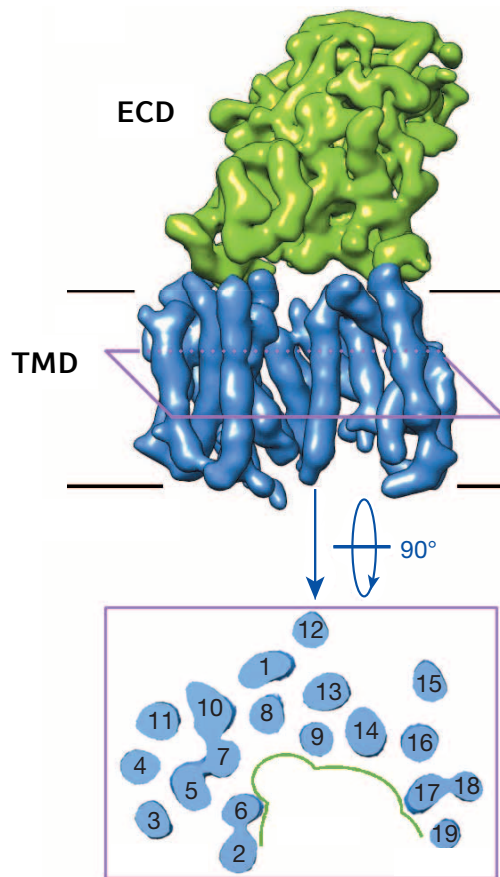
ihre katalytische Aktivität (Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003). Jeder  $\gamma$ -Sekretase-Komplex besteht aus je einem Presenilin, PS1 oder PS2, sowie Nicastrin, Aph-1 und Pen-2. Hieraus ergibt sich eine Stöchiometrie der Komponenten von 1:1:1:1 (Sato et al., 2007).

### 1.2.1.1 Physiologie und Struktur der $\gamma$ -Sekretase

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der  $\gamma$ -Sekretase um einen Multiprotein-Komplex handelt, mit einer Gesamtgröße von etwa 230 kDa sowie insgesamt 19 TMDs, gestaltet sich die Bestimmung der atomaren Struktur der nativen  $\gamma$ -Sekretase außerordentlich schwierig. Die bisher beste Strukturanalyse der  $\gamma$ -Sekretase gelang mittels Kryo-Elektronenmikroskopie (Lu et al., 2014) (Abb. 1.9). Mit einer Auflösung von 5.4 Angström im TMD-Bereich erlaubt diese Struktur allerdings nach wie vor keine Zuordnung der individuellen Komplexpartner der  $\gamma$ -Sekretase.

Bis dato sind die strukturellen Informationen bezüglich des genauen Aufbaus der  $\gamma$ -Sekretase bzw. der Zugänglichkeit von Substraten und H<sub>2</sub>O-Molekülen noch nicht endültig geklärt. Dennoch zeigt die neueste Strukturanalyse eine Hufeisen-förmige Struktur des TMD-Bereiches, dem die große globuläre Nicastrin-Ektodomäne übergelagert ist (Lu et al., 2014) (Abb. 1.9). Dies könnte erklären, warum lediglich Substrate mit kurzer Ektodomäne an die  $\gamma$ -Sekretase binden (Esler et al., 2002).

Bezüglich der Funktion der drei nicht katalytisch aktiven Komplexpartner ist folgendes bekannt: Nicastrin wurde zunächst als Substrat-Akzeptor interpretiert (Shah et al., 2005; Zhang et al., 2012), was jedoch kontrovers diskutiert wird (Chávez-Gutiérrez et al., 2008; Martin et al., 2009; Zhao et al., 2010). Für Aph-1 sind keine spezifischen Funktionen bekannt, allerdings wird Aph-1 durch zwei Gene kodiert, aph-1a und aph-1b. Zusätzlich wurden für Aph-1a unterschiedliche Splicevarianten identifiziert, Aph-1a short (Aph-1aS) sowie Aph-1a long (Aph-1aL) (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002). Pen-2 wurde als Stabilisator der  $\gamma$ -Sekretase beschrieben (Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2004). Die Kombination der unterschiedlichen  $\gamma$ -Sekretase-Komponenten erlaubt so die Bildung von 6 distinkten  $\gamma$ -Sekretase-Komplexen (Serneels et al., 2009; Shirotani et al., 2004), wobei die funktionelle



**Abb. 1.9 Struktur der humanen  $\gamma$ -Sekretase**

Kryo-Elektronenmikroskopie des humanen  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes. Die Nicastrin Ektodomäne (ECD) ist in grün dargestellt, während die 19 TMDs des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes blau eingefärbt sind. Ein horizontaler Schnitt zeigt die Hufeisenförmige Struktur des TMD-Bereiches auf. Nach (Lu et al., 2014).

Relevanz solch unterschiedlicher  $\gamma$ -Sekretase-Komplexe gegenwärtig kontrovers diskutiert wird (Shirotani et al., 2007; Serneels et al., 2009).

Die Komplex-Assemblierung der  $\gamma$ -Sekretase beginnt zunächst mit der Assoziation von Nicastrin und Aph-1 im ER (LaVoie et al., 2003), gefolgt von der Bindung eines Presenilins. Die finale Integration von Pen-2 führt zur Endoproteolyse des Presenilins (siehe unten) und induziert den Transport der  $\gamma$ -Sekretase in spätere sekretorische Kompartimente (Luo et al., 2003). Innerhalb des Golgi-Apparates erfolgt die Komplexglykosylierung von Nicastrin, im Anschluss kommt es zum Weitertransport der  $\gamma$ -Sekretase zur Plasmamembran sowie zur Reinternalisierung in endosomal/lysosomale

Kompartimente und zur Ausübung der proteolytischen Aktivität (Kaether et al., 2002; Pasternak et al., 2003).

Als „Presenilinase“-Aktivität wird die während der Komplexassemblierung auftretende Endoproteolyse des Presenilins zu einem N-terminalen (PS NTF) und einem C-terminalen Fragment (PS CTF) bezeichnet (Thinakaran et al., 1996). Diese Endoproteolyse findet innerhalb einer hydrophoben Domäne statt, die zwischen den TMDs 6 und 7 der Preseniline liegt. Schon frühzeitig wurde angenommen, dass es sich bei dieser Endoproteolyse um einen autokatalytischen Schnitt der Preseniline handelt, da eine Mutation der katalytischen Aspartyl-Reste in PS1 ebenfalls die Spaltung inhibiert (Wolfe et al., 1999). Eine Bestätigung dieser Annahme gelang anhand des Nachweises eines sequentiellen Proteolysemechanismus der hydrophoben Domäne, der mechanistisch analog zur Intramembranproteolyse der  $\gamma$ -Sekretase-Substrate verläuft und gleichsam durch Mutationen in Presenilin in seiner Präzision beeinflusst wird (Fukumori et al., 2010) (siehe auch 1.3.1). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Proteolysevorgänge von der selben enzymatischen Aktivität katalysiert werden.

#### **1.2.1.2 Substratanforderungen der $\gamma$ -Sekretase**

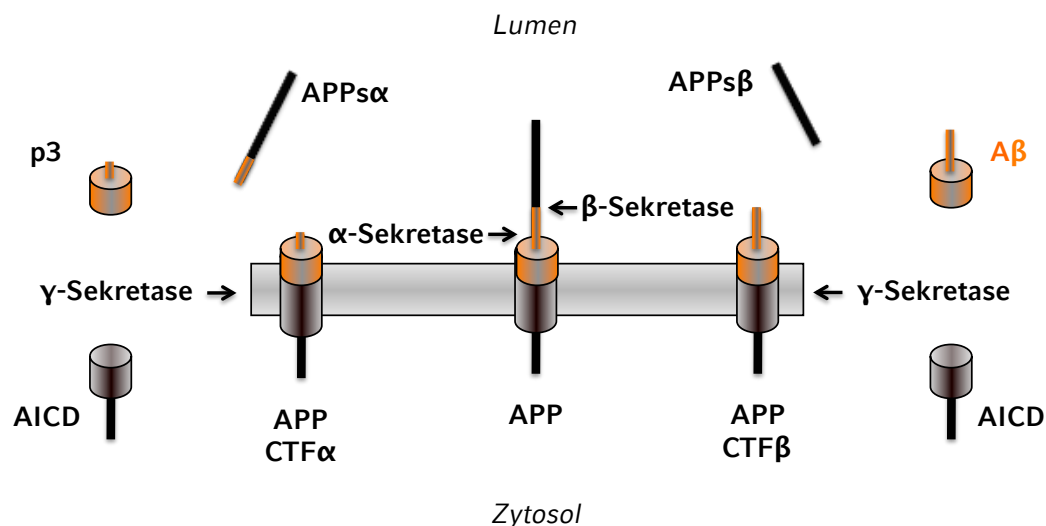
Mittlerweile wurden insgesamt mehr als 90 Substrate für die  $\gamma$ -Sekretase beschrieben (Haapasalo und Kovacs, 2011), die am besten untersuchten hierunter sind der NOTCH-Rezeptor (NOTCH) (siehe 1.2.3.1) sowie das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) (siehe unten). Alle bis dato identifizierten Substrate der  $\gamma$ -Sekretase sind Typ-1-Transmembranproteine, für deren effiziente Proteolyse ein initiales Ectodomain Shedding notwendig ist. Bisher konnte nur die Bindung von Substraten mit kurzer Ektodomäne an die  $\gamma$ -Sekretase nachgewiesen werden (Esler et al., 2002). Analog zu S2P besteht darüber hinaus auch für die  $\gamma$ -Sekretase eine negative Korrelation zwischen der Effizienz der Intramembranproteolyse und der Länge der Substrat-Ektodomäne (Struhl und Adachi, 2000). Aufgrund der Vielzahl an bekannten Substraten wurde die  $\gamma$ -Sekretase auch als „Proteasom der Membran“ diskutiert (Kopan und Ilagan, 2004). Allerdings existieren auch Typ-1-Transmembranproteine, welche keine Substrate für die  $\gamma$ -Sekretase darstellen

(Hemming et al., 2008). Gleichsam scheint es innerhalb der TMDs und den Juxtamembrandomänen von Typ-1-Transmembranproteinen gewisse Sequenz- oder Strukturdeterminanten zu geben, welche bestimmen wie gut ein Typ-1-Transmembranprotein durch  $\gamma$ -Sekretase gespalten wird (Hemming et al., 2008; Ren et al., 2007). Demzufolge muss die Beschreibung der  $\gamma$ -Sekretase als „Proteasom der Membran“ kritisch diskutiert werden.

### 1.2.1.3 Regulierte Intramembranproteolyse von APP

Aufgrund seiner fundamentalen Rolle in der molekularen Pathogenese des Morbus Alzheimer (siehe 1.2.3.2) ist die regulierte Intramembranproteolyse von APP einer der bestuntersuchtesten Prozesse der  $\gamma$ -Sekretase, von zentraler Bedeutung ist hier die Freisetzung von Amyloid  $\beta$ -Peptiden ( $A\beta$ ). Die Prozessierung von APP wird in einen amyloidogenen und einen nicht-amyloidogenen Weg unterteilt (Abb. 1.10):

Im Rahmen des nicht-amyloidogenen Weges führt die  $\alpha$ -Sekretase das Ectodomain Shedding von APP aus. Als mögliche  $\alpha$ -Sekretasen kommen hierbei die Metalloproteasen ADAM-9, ADAM-10 und ADAM-17 in Frage (Asai et al., 2003; Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999). Unter physio-



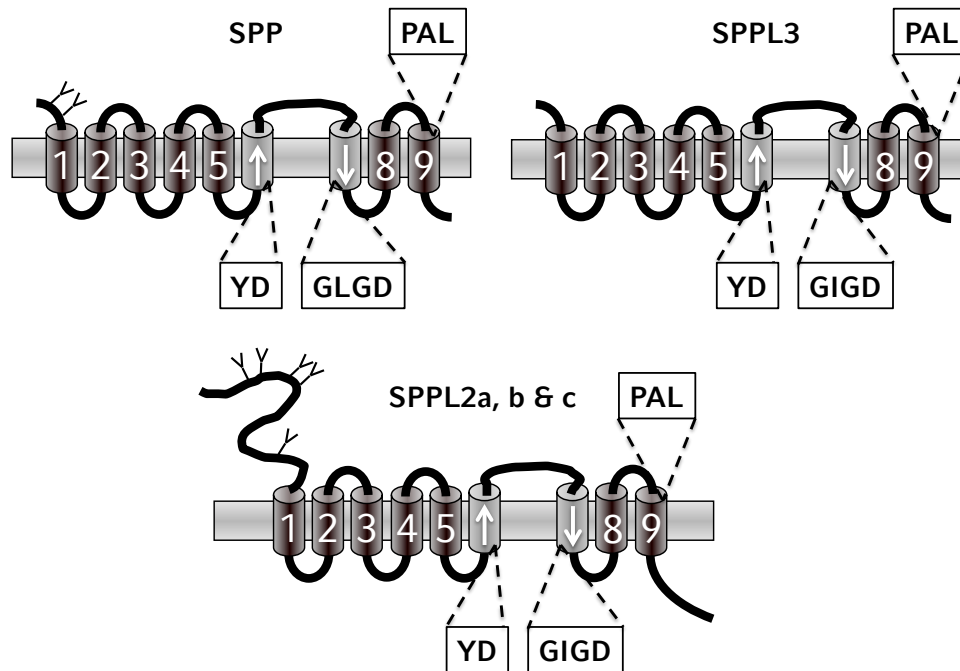
**Abb. 1.10  $\gamma$ -Sekretase-abhängige RIP von APP**

Die Prozessierung von APP wird in zwei Wege eingeteilt: Im Rahmen des nicht-amyloidogenen Weges (links) wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase gesheddet, die  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Intramembranproteolyse produziert AICD und p3. Innerhalb des amyloidogenen Weges (rechts) hingegen vollzieht die  $\beta$ -Sekretase das Ectodomain Shedding von APP, die  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Intramembranproteolyse setzt AICD und  $A\beta$ -Peptide (orange) frei. Nach (Lichtenthaler et al., 2011).

logischen Bedingungen jedoch konstituiert ADAM-10 die vornehmlich relevante  $\alpha$ -Sekretase (Kuhn et al., 2010). Der initiale Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase führt zur Sekretion von APPs $\alpha$ , woraufhin das membranständige APP CTF $\alpha$  durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert werden kann (Abb. 1.10). Hierbei kommt es zur Freisetzung der zytosolischen APP ICD (AICD) sowie zur Sekretion des drei kDa großen Peptids p3 (Haass et al., 1993; Kimberly et al., 2001). Die AICD besitzt lediglich eine kurze Halbwertszeit, eine mögliche transkriptionelle Wirkung nach Bindung an Adapterproteine und Translokation in den Nukleus wird diskutiert (Cao und Südhof, 2001; Edbauer et al., 2002; Hébert et al., 2006; Leissring et al., 2002; Pardossi-Piquard et al., 2005). Die Schnittstelle der  $\alpha$ -Sekretase liegt innerhalb der A $\beta$ -Sequenz, so dass bei diesem Prozessierungsweg die Freisetzung von A $\beta$ -Peptiden verhindert wird. Der amyloidogene Weg hingegen wird durch das Ectodomain Shedding von APP mittels  $\beta$ -Sekretase, BACE1, eingeleitet (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Dies führt zur Sekretion von APPs $\beta$ , während das membranständige APP CTF $\beta$  wiederum durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert wird (Abb. 1.10). Die AICD wird auch hier ins Zellinnere freigesetzt; allerdings kommt es nun zur Sekretion von A $\beta$ -Peptiden in den Extrazellulärraum, da die Schnittstelle von BACE1 weiter N-terminal liegt als die der  $\alpha$ -Sekretase (Abb. 1.10). Diese können in der Folge zu neurotoxischen A $\beta$ -Oligomeren, Fibrillen oder Plaques aggregieren (Haass und Selkoe, 2007). Von hoher Relevanz ist hierbei der molekulare Proteolysemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase, der zur Bildung mehrerer A $\beta$ -Peptide mit unterschiedlicher Länge führt (siehe 1.2.3.2).

### **1.2.2 Regulierte Intramembranproteolyse durch Proteasen der SPP/SPPL-Familie**

Als weitere Vertreter der GxGD-Proteasen wurden neben der  $\gamma$ -Sekretase SPP und die SPP-ähnlichen homologen Proteasen (SPPLs) identifiziert (Grigorenko et al., 2002; Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002). In Säugern existieren 5 unterschiedliche Vertreter der SPP/SPPL-Familie: SPP an sich sowie SPPL2a, b, c und SPPL3. Diese einzelnen Familienmitglieder weisen distinkte subzelluläre Lokalisationen und daher mutmaßlich auch unterschiedliche physiologische Funktionen auf (Krawitz et al., 2005; Voss et al., 2013).



**Abb. 1.11 Die SPP/SPPL-Familie**

Topologie der Intramembranproteasen der SPP/SPPL-Familie. SPPL3 ist der kleinste Vertreter der SPP/SPPL-Familie. SPPL2a, b & c werden N-terminal komplex glykosyliert, auch SPP selbst beherbergt N-terminale Glykosylierungskonsensusmotive (Y). Pfeile stellen den Verlauf der Aminosäuresequenz von N- nach C-terminal dar. Nach (Voss et al., 2013).

### 1.2.2.1 SPP

#### Struktur von SPP

Die Signal-Peptid-Peptidase (SPP) stellt das Gründungsmitglied der SPP/SPPL-Familie dar. Wie SPP selbst weist die gesamte SPP/SPPL-Familie eine ähnliche Topologie zu den Presenilinen auf. Sämtliche SPP/SPPL-Proteasen sind integrale Transmembranproteine mit 9 TMDs, darüber hinaus sind die Sequenzmotive YD, GxGD und PAL entsprechend in den TMDs 6, 7 und 9 konserviert (Friedmann et al., 2004) (Abb. 1.11).

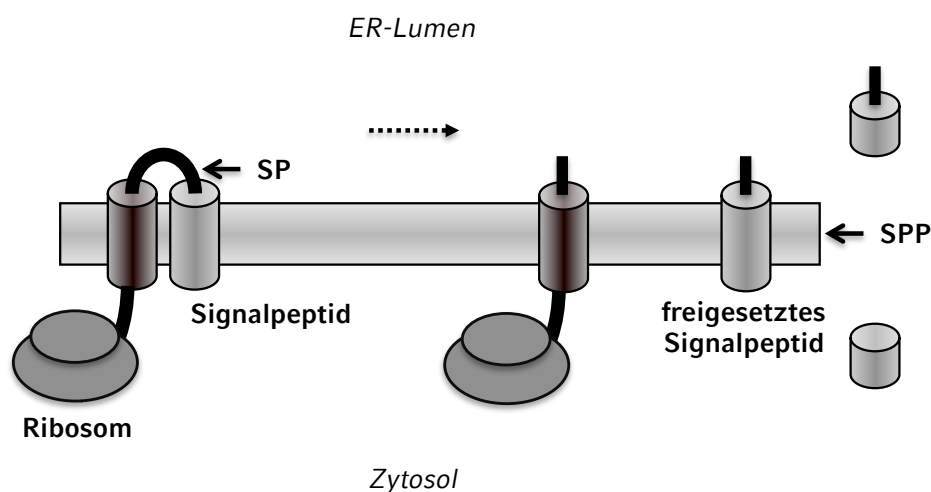
#### Substratanforderungen von SPP

Mittels eines hydrophoben Signalpeptids werden Membranproteine und sekretierte Proteine kotranslational zum ER transportiert, wo ihre Integration in die ER-Membran bzw. ihre Translokation in das ER-Lumen stattfinden (Blobel, 1980). Diese zumeist N-terminal lokalisierten Signalpeptide adaptieren dabei die Topologie eines Typ-2-Transmembranproteins und werden durch die Signalpeptidase (SP) vom naszierenden Protein abgespalten

(Martoglio und Dobberstein, 1998) (Abb. 1.12). Dieser initiale Schnitt durch SP gleicht dem Ectodomain Shedding, so dass darauffolgend die Intramembranproteolyse der innerhalb der ER-Membran verbliebenen Signalpeptide durch SPP erfolgen kann (Weihofen und Martoglio, 2003). Eine Inhibition des initialen Schnittes durch SP führt entsprechend zu einer starken Reduktion der SPP-abhängigen Intramembranproteolyse (Lemberg und Martoglio, 2002).

### Physiologie von SPP

SPP wird durch ein KKXX Retentionssignal im ER zurückgehalten (Krawitz et al., 2005; Urny et al., 2003). Der SPP-abhängigen Prozessierung von Signalpeptiden innerhalb der ER-Membran kommen wichtige Funktionen zu, insbesondere im adaptiven Immunsystem sowie in der Pathophysiologie von Infektionen (siehe 1.2.3.4). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von SPP an der ER-abhängigen Degradation (ERAD) von Membranproteinen diskutiert (Christianson et al., 2012). Hierzu könnte die Beobachtung passen, dass SPP mit missgefalteten Membranproteinen der ER-Membran interagiert (Crawshaw et al., 2004; Schrul et al., 2010). Außerdem scheint die ERAD im Menschen wie auch in *Plasmodium falciparum* (siehe 1.2.3.4) von der proteolytischen



**Abb. 1.12 SPP-abhängige RIP der Signalpeptide**

Die Signalpeptide von nascenten Proteinen werden innerhalb des ER durch die SPP-abhängige RIP prozessiert. Zunächst spaltet die Signalpeptidase (SP) das Signalpeptid ab, vergleichbar dem Ectodomain Shedding. Das nun freigesetzte Signalpeptid wird daraufhin der Intramembranproteolyse durch SPP zugeführt.

Aktivität von SPP abhängig zu sein (Chen et al., 2014; Harbut et al., 2012). *In vivo* spielt SPP bereits während früher Entwicklungsphasen eine fundamentale Rolle. So führt der Knockdown von SPP im Zebrafisch (*Danio rerio*) zu massivem zentralnervösem Zelltod (Krawitz et al., 2005). Die Überexpression einer inaktiven SPP-Mutante ruft einen identischen Phänotyp hervor, so dass der beobachtete Phänotyp sehr wahrscheinlich von der proteolytischen Aktivität der SPP-Protease abhängt. Auch in *Caenorhabditis elegans* sowie *Drosophila melanogaster* wurden SPP-abhängige Defekte der Embryonalentwicklung nachgewiesen (Casso et al., 2005; Grigorenko et al., 2004). Über welche genauen Mechanismen diese SPP-abhängigen Entwicklungsdefekte vermittelt werden, ist bis dato noch nicht geklärt.

#### 1.2.2.2 SPPL3

Den kleinsten Vertreter der SPP/SPPL-Familie stellt SPPL3 dar (Abb. 1.11). SPPL3 weist mit 70% die höchste Sequenzhomologie zu SPP auf, ist allerdings im Gegensatz zu SPP selbst nicht glykosyliert. Die zelluläre Lokalisierung von SPPL3 wurde als ER-ständig (Krawitz et al., 2005) bzw. Golgi-Apparat (Friedmann et al., 2006) beschrieben. Auch der Knockdown von SPPL3 in *Danio rerio* zeigt mit zentralnervösem Zelltod einen sehr ähnlichen Phänotyp zu SPP (Krawitz et al., 2005); darüber hinaus wird ein SPP-Substrat *in vitro* ebenfalls von SPPL3 geschnitten (Nyborg et al., 2006). Zunächst wurden SPP und SPPL3 daher als möglicherweise funktionell redundant diskutiert (Krawitz et al., 2005; Nyborg et al., 2006).

Neuere Erkenntnisse stellen dies allerdings in Frage: inaktives SPPL3 kann im Gegensatz zu SPP keine Signalpeptide als Substrat binden (Schrul et al., 2010). Außerdem resultierte der Knockout des SPPL3 Orthologen in *Drosophila melanogaster* nicht in einer Phänokopie des SPP Knockout (Casso et al., 2012), was für distinkte physiologische Funktionen spricht. Kürzlich wurde als erstes eigenständiges SPPL3-Substrat das Foamy Virus Hüllprotein (FVenv) beschrieben (Voss et al., 2012), wobei FVenv im Gegensatz zu bisherigen Substraten der SPP/SPPL-Familie als Volllängenprotein in der Topologie eines Typ-3-Transmembranproteins von SPPL3 umgesetzt werden kann. Auch diese Beobachtung spricht für funktionelle Unterschiede zwischen SPP und SPPL3. Ein natives Substrat für SPPL3 ist nicht beschrieben.



### 1.2.2.3 SPPL2a, b und c

Die verbliebene Gruppe der SPPL2-Proteasen, SPPL2a, b und c, hebt sich anhand einiger Details von der restlichen SPP/SPPL-Familie ab (Friedmann et al., 2004): so verfügen alle drei SPPL2-Varianten über ein Signalpeptid am N-Terminus, außerdem über eine verhältnismäßig große und zudem komplexglykosylierte Domäne N-terminal der ersten TMD (Abb. 1.11). Eine *in vivo* Relevanz der SPPL2-Familie zeigt der Knockdown des einzigen SPPL2-Vertreters in *Danio rerio*, welcher zu einer vergrößerten Schwanzvene mit Akkumulation von Erythrozyten führt (Krawitz et al., 2005).

#### SPPL2a und SPPL2b

Sowohl SPPL2a als auch SPPL2b werden kotranslational in die ER-Membran integriert, SPPL2a wird daraufhin zu Endolysosomen transportiert (Friedmann et al., 2006; Krawitz et al., 2005). Die endolysosomale Lokalisation von SPPL2a ist abhängig von einer C-terminalen Signalsequenz, nur unter Überexpression der Protease sind geringe Mengen an der Plasmamembran nachweisbar (Behnke et al., 2011). SPPL2b dagegen wird hauptsächlich an der Plasmamembran detektiert, in geringen Mengen ebenfalls im Golgi-Apparat und in Endolysosomen (Krawitz et al., 2005; Martin et al., 2008).

Unter endogenen Bedingungen im Mausmodell wurde kürzlich gezeigt, dass SPPL2a und SPPL2b differentielle subzelluläre Lokalisationen mit nur minimaler Überlappung sowie differentielle Expressionsmuster in murinen Geweben aufweisen (Schneppenheim et al., 2014). Diese differentielle Lokalisation und verschiedenen Expressionsmuster könnten auf physiologische Unterschiede zwischen SPPL2a und SPPL2b hinweisen, obwohl bisherige Studien im Zellkulturmodell weitgehend überlappende Substratspektren für beide Proteasen identifizierten.

#### SPPL2c

SPPL2c wiederum kolokalisiert bei transienter Expression in HeLa-Zellen zusammen mit Calnexin im ER (Friedmann et al., 2006). Allerdings konnte bis heute weder ein Substrat noch eine physiologische Rolle von SPPL2c identifiziert werden. Aufgrund der polymorphen und intronlosen Struktur des SPPL2c-Genes sowie des bislang fehlenden Nachweises seiner

Protease:	Substrate:	Referenz:
SPPL2a	TNF $\alpha$	(Fluhrer et al.; Friedmann et al., 2006)
	Bri2	(Martin et al., 2008)
	FasL	(Kirkin et al., 2007)
	CD74 (Maus)	(Schneppenheim et al., 2014)
	FVenv	(Voss et al., 2012)
	TMEM106B	(Brady et al., 2014)
SPPL2b	TNF $\alpha$	(Fluhrer et al.; Friedmann et al., 2006)
	Bri2	(Martin et al., 2008)
	Transferrinrezeptor 1	(Zahn et al., 2013)
	FVenv	(Voss et al., 2012)
	(TMEM106B)	(Brady et al., 2014)

**Tab. 1.2 Bekannte Substrate von SPPL2a & b**

Die bekannten Substrate von SPPL2a und SPPL2b sind weitgehend überlappend. Nach (Voss et al., 2013).

nativen Expression auf Proteinebene wird diskutiert, ob es sich bei SPPL2c lediglich um ein Pseudogen handelt (Ponting et al., 2002). Für SPPL2a und SPPL2b hingegen wurden mittlerweile eine Reihe von Substraten identifiziert (Tab. 1.2), neben Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) unter anderem Bri2 (Martin et al., 2008) oder Fas-Ligand (Kirkin et al., 2007).

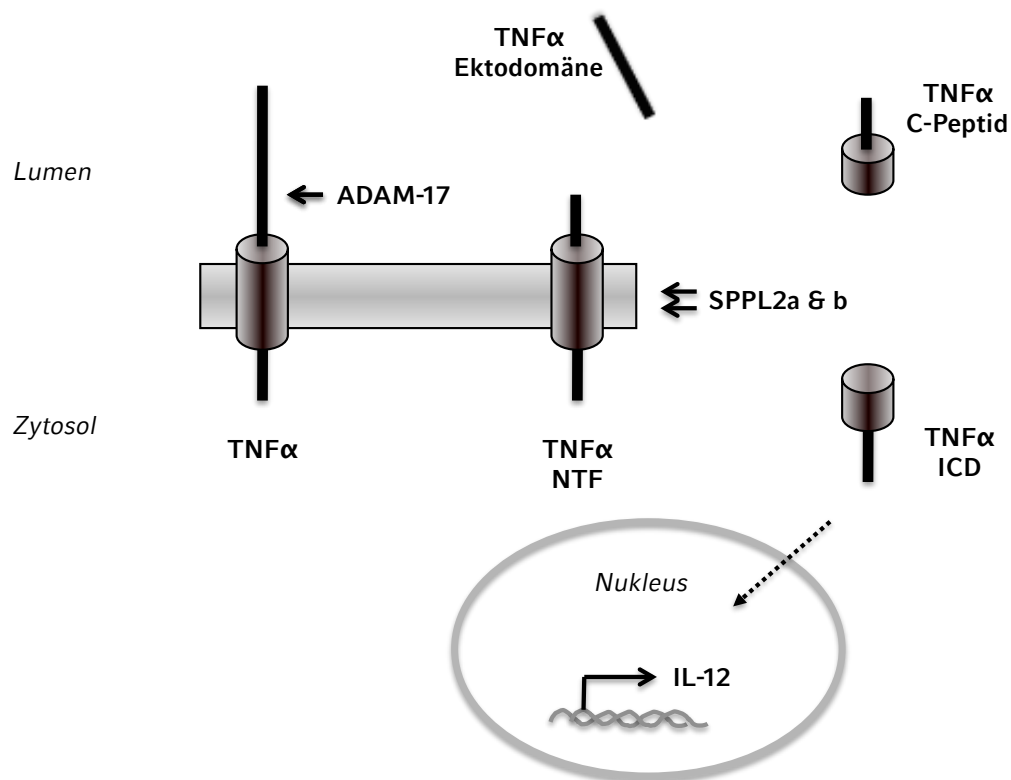
#### Substratanforderungen der SPPL2-Familie

Bei allen bisher bekannten Substraten der SPPL2-Proteasen handelt es sich um Typ-2-Transmembranproteine, in Einklang mit der verglichen zur  $\gamma$ -Sekretase invertierten Membrantopologie der SPP/SPPL-Familie. Ebenso wurde für sämtliche bisher bekannten Substrate (Tab. 1.2) ein initiales Ectodomain Shedding beschrieben, welches für eine effiziente SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse notwendig ist. Zudem besteht eine negative Korrelation zwischen der Effizienz des Substratumsatzes von SPPL2b und der Länge der Ektodomäne seiner Substrate (Martin et al., 2009). Darüber hinaus existieren Sequenz- oder Strukturdeterminanten innerhalb der luminalen Juxtamembran- sowie der intrazellulären Domäne der Substrate, die eine effiziente Proteolyse durch SPPL2b erlauben (Martin et al., 2009). Im

Fälle der TMD scheint die effiziente Proteolyse durch SPPL2b im Wesentlichen eine Störung der  $\alpha$ -Helix zu erfordern, was einer Sekundärstruktur-Determinante entspricht (Fluhrer et al., 2012).

#### 1.2.2.4 Regulierte Intramembranproteolyse von $\text{TNF}\alpha$

Das als erstes identifizierte Substrat für SPPL-Proteasen ist das Typ-2-Transmembranprotein  $\text{TNF}\alpha$  (Fluhrer et al., 2006; Friedmann et al., 2006). Im Sinne der regulierten Intramembranproteolyse beginnt die Prozessierung von  $\text{TNF}\alpha$  mit Ectodomain Shedding durch ADAM-17 (Black et al., 1997) (Abb. 1.13). Die auf diese Weise sekretierte Ektodomäne von  $\text{TNF}\alpha$  fungiert als elementar wichtiges, proinflammatorisches Zytokin und Signalmolekül des Immunsystems. Nach Ectodomain Shedding verbleibt ein membranverankertes, N-terminales Fragment ( $\text{TNF}\alpha$  NTF), welches das direkte Substrat



**Abb. 1.13** SPPL2a & b-abhängige RIP von  $\text{TNF}\alpha$

$\text{TNF}\alpha$  wird mittels SPPL2a & b-abhängiger RIP prozessiert. Nach Ectodomain Shedding durch ADAM-17 und Freisetzung der löslichen Ektodomäne wird  $\text{TNF}\alpha$  NTF durch SPPL2a oder SPPL2b innerhalb der TMD geschnitten. Die freigesetzte  $\text{TNF}\alpha$  ICD könnte nach Translokation in den Nukleus die Expression von Interleukin-12 (IL-12) induzieren. Nach (Fluhrer et al., 2009).

der Intramembranproteolyse durch SPPL2a und SPPL2b darstellt. Endprodukte dieser Intramembranproteolyse stellen das sekretierte bzw. luminale TNF $\alpha$  C-Peptid sowie die zytosolischen TNF $\alpha$  ICDs dar (Fluhrer et al., 2006) (Abb. 1.13).

In dendritischen Zellen bewirkt die Freisetzung der TNF $\alpha$  ICD über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen die Expression von Interleukin-12 (IL-12) im Sinne einer negativen Rückkopplung (Friedmann et al., 2006). Eine Möglichkeit wäre die direkte Translokation der TNF $\alpha$  ICD in den Nukleus mitsamt Ausübung einer transkriptionellen Regulation von Zielgenen, so wie es für die APP ICD (AICD) vorgeschlagen wurde (Cao und Südhof, 2001).

Darüber hinaus wurde eine Palmitoylierung von TNF $\alpha$  innerhalb der ICD-Sequenz an Position Cystein 30 beschrieben (Utsumi et al., 2001), wodurch TNF $\alpha$  möglicherweise in Lipid Rafts lokalisiert (Poggi et al., 2013; Zhang et al., 2009). Auch für SPPL2b wurde eine Lokalisation in Lipid Rafts diskutiert (Nyborg et al., 2006), im Sinne einer Koloalisation von Protease und Substrat könnte so eine effiziente Proteolyse von TNF $\alpha$  in Lipid Rafts gewährleistet werden (Poggi et al., 2013). Unklar bleibt jedoch, inwiefern die Palmitoylierung von TNF $\alpha$  für den Proteolysemechanismus von SPPL2b von funktioneller Relevanz ist.

### 1.2.3 Klinische Relevanz der GxGD-Intramembranproteasen

Aufgrund der Diversität der Substrate ist der biochemische Mechanismus der regulierten Intramembranproteolyse essentiell für die Regulation von mehreren physiologischen Vorgängen. Darüber hinaus werden die diversen Intramembranproteasen mit einigen humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Nachfolgend seien exemplarisch die wichtigsten klinischen Implikationen der GxGD-Intramembranproteasen besprochen.

#### 1.2.3.1 NOTCH Signalweg

Knockouts einzelner Komponenten der  $\gamma$ -Sekretase zeigen in der Maus und in *Caenorhabditis elegans* einen NOTCH-ähnlichen Phänotyp (Baumeister et al., 1997; De Strooper et al., 1999; Levitan und Greenwald, 1995; Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). Daher scheint NOTCH unter physiologischen Bedingungen, insbesondere während der Embryonal- bzw. Fetalentwicklung, das wichtigste Substrat der  $\gamma$ -Sekretase darzustellen.

Das Volllängenprotein NOTCH wird zunächst durch Furin im Golgi-Apparat (S1 Schnitt) prozessiert, woraufhin NOTCH als Heterodimer zur Plasmamembran transportiert wird (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Nach Ligandenbindung startet die NOTCH-Signaltransduktion mittels  $\gamma$ -Sekretase-abhängiger RIP: das Ectodomain Shedding (S2 Schnitt) geschieht durch ADAM-10 oder ADAM-17 (Brou et al., 2000; Hartmann et al., 2002), hierdurch wird die NOTCH Ektodomäne freigesetzt. Der membranverankerte Rest wird der  $\gamma$ -Sekretase zugeführt (S3 Schnitt). Die eigentliche Intramembranproteolyse setzt nun die intrazelluläre Domäne von NOTCH (NICD) frei, welche nach Translokation in den Nukleus die Expression von verschiedenen NOTCH Zielgenen bewirkt (Kopan und Ilagan, 2009).

Dieser NOTCH Signalweg steuert essentielle Zelldifferenzierungsvorgänge, beispielsweise in B- und T-Zellen (Bray, 2006; Hadland et al., 2001). NOTCH-Mutationen können daher zu unkontrollierter Zellproliferation oder T-Zell-Leukämien führen (Aster et al., 2008; Weng et al., 2004). Die pharmakologische Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase stellt in diesen Fällen einen möglichen therapeutischen Ansatz dar (Real et al., 2009).

### 1.2.3.2 Morbus Alzheimer

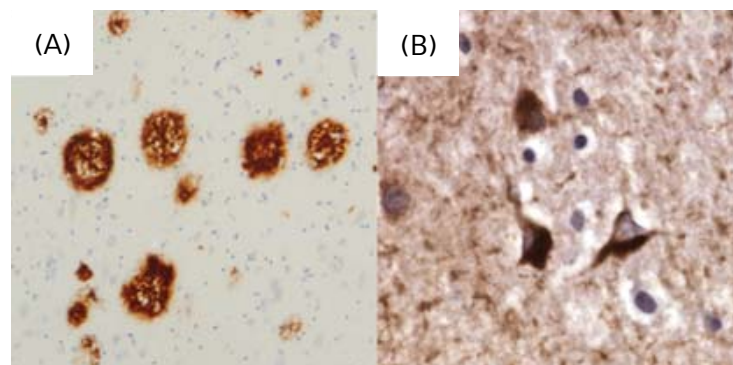
Die häufigste Form der Demenz ist Morbus Alzheimer (AD), eine neurodegenerative Erkrankung, welche typischerweise nach dem 65. Lebensjahr diagnostiziert wird. Die Erstbeschreibung dieser Erkrankung erfolgte durch den deutschen Psychiater Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907), nach dessen Namen sie uns seither bekannt ist. Typische Frühsymptome der AD sind Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, im interindividuell sehr unterschiedlichen Erkrankungsverlauf zunehmend gefolgt von kognitiven und neuropsychologischen Auffälligkeiten wie Sprachstörungen, Orientierungs- und Merkfähigkeitsstörungen oder psychotischen Symptomen, ultimativ bis hin zum Tode der Betroffenen.

Eine zentrale Rolle innerhalb der Pathogenese der AD nimmt die Prozessierung von APP sowie die Produktion der unterschiedlichen A $\beta$ -Spezies durch die  $\gamma$ -Sekretase ein (siehe 1.2.1.3). Unter Zellkulturbedingungen produziert die  $\gamma$ -Sekretase hauptsächlich die Produkt-Spezies A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38, und zwar im Verhältnis von 1:10:1 (Page et al., 2008). Für eine Vielzahl von Mutationen innerhalb der Preseniline oder in APP, welche zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führen, konnte eine Erhöhung der A $\beta$ -Gesamtmenge oder des Verhältnisses von produziertem A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 festgestellt werden (Hardy, 1997). A $\beta$ 42 ist amyloidogener als die kürzeren Spezies A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38 (Jarrett et al., 1993) und zugleich Hauptbestandteil der extrazellulären Amyloid-Plaques, einem der zwei neuropathologischen Hauptcharakteristika der AD (Haass und Selkoe, 2007) (Abb. 1.14-A). Die intrazellulären neurofibrillären Tangles hingegen, das zweite Hauptcharakteristikum der AD, bestehen aus zumeist hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Abb. 1.14-B). Diese Sequestration des Mikrotubuli-assoziierten Tau bewirkt eine Destabilisierung eben jener, dendritischer oder axonaler Mikrotubuli (Friedhoff et al., 1998; Grundke-Iqbal et al., 1986).

Die bereits dargelegten Erkenntnisse zur APP-Prozessierung sowie weitere experimentelle und genetische Befunde als auch die neuropathologisch darstellbare, neokortikale Progression von Amyloid-Plaques (Braak und Braak, 1991) führten zur Formulierung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Hardy und

Higgins, 1992; Hardy und Selkoe, 2002; Selkoe, 2001a; 2001b). Demnach stellen die A $\beta$ -Peptide bzw. eine pathologische Erhöhung des Verhältnisses von A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 die kausale Entität der AD dar. Durch Überproduktion oder verringerten Abbau von A $\beta$ , Verschiebung des Schnittmusters der  $\gamma$ -Sekretase oder Veränderungen der A $\beta$ -Oligomerisierung kommt es so vermutlich zu einer toxischen Schädigung der Neurone bzw. der neuronalen Synapsen.

In den letzten Jahren sind insbesondere niedermolekulare A $\beta$ -Aggregate, die A $\beta$ -Oligomere, in den Fokus geraten als mutmaßlich pathogenetische Entität (Haass und Selkoe, 2007). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass sowohl aus murinem Gewebe isolierte A $\beta$ -Oligomere (Lesné et al., 2006) als auch direkt aus humanen Hirnproben gewonnene A $\beta$ -Oligomere (Shankar et al., 2008) im Tiermodell Gedächtnisstörungen induzieren können. Erst kürzlich wurde in einer isländischen Population die erste bekannte, gegenüber AD protektive Mutation in APP identifiziert, welche über eine Verringerung des Schnittes der  $\beta$ -Sekretase zu einer Reduktion an A $\beta$ -Peptiden führt (Jonsson et al., 2012). Dies stellt derzeit den neuesten Beleg für die Amyloid-Kaskaden-Hypothese dar.



**Abb. 1.14 Neuropathologische Hauptcharakteristika des Morbus Alzheimer**

(A) Immunhistochemische Färbung gegen A $\beta$  mit Nachweis von zahlreichen Amyloid-Plaques.

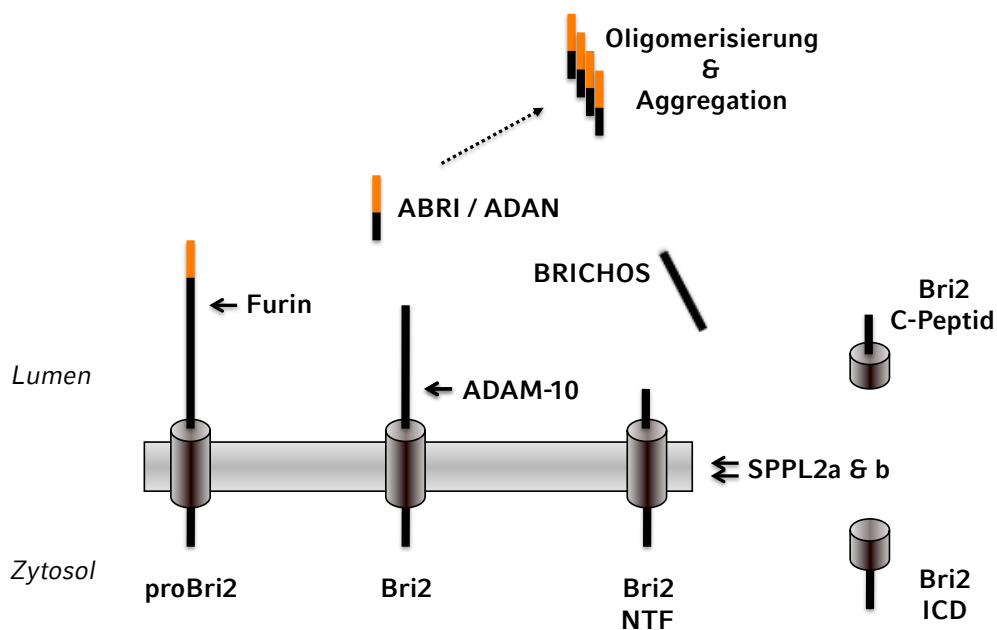
(B) Immunhistochemische Färbung gegen Tau mit Nachweis von intrazellulären, neurofibrillären Tangles.

Nach (Serrano-Pozo et al., 2011).

### 1.2.3.3 Familiäre Britische und Familiäre Dänische Demenz

Sowohl bei der Familiären Britischen (FBD) als auch bei der Familiären Dänischen Demenz (FDD) handelt es sich um sehr seltene, dementielle Erkrankungen des Menschen (Del Campo und Teunissen, 2014). Typischerweise manifestieren sich in beiden Fällen nach dem 40. Lebensjahr eine zerebelläre Ataxie sowie ein progressives dementielles Syndrom. Neuropathologisch sind beide Erkrankungen durch eine umfassende Demyelinisierung, der kortikalen Ablagerung von Amyloid-Plaques mitsamt Amyloidangiopathie sowie durch intrazelluläre, Tau-positive Neurofibrillen gekennzeichnet (Mead et al., 2000; Vidal et al., 2009).

Der Pathomechanismus beruht sowohl für FBD als auch für FDD auf Mutationen im *itm2b*-Gen, welches für das Bri2-Protein kodiert (Vidal et al., 1999; 2000). In beiden Fällen wird das native STOP-Codon zerstört, so dass ein C-terminal verlängertes Bri2-Protein entsteht (Abb. 1.15). Das



**Abb. 1.15 SPPL2a & b-abhängige RIP von Bri2**

Bri2 wird mittels SPPL2a & b-abhängiger RIP prozessiert. Dem eigentlichen Ectodomain Shedding durch ADAM-10 vorweggeschaltet wird das Propeptid des proBri2 durch Furin oder Furin-ähnliche Proteasen sekretiert. Im Falle von FBD und FDD ist das Bri2 STOP-Codon mutiert, so dass verlängerte Propeptide (orange, ABRI & ADAN) sekretiert werden. ABRI und ADAN sind amyloidogen und führen zur Ausbildung von Oligomeren und Plaques.



Volllängenprotein proBri2 enthält ein C-terminales Propeptid, welches noch vor Ectodomain Shedding und Intramembranproteolyse durch Furin oder Furin-ähnliche Proteasen sekretiert wird (Choi et al., 2004; Kim et al., 1999). Auf diese Weise kommt es initial sowohl bei FBD als auch FDD zur Sekretion des mutierten und verlängerten Bri2 Propeptids (Abb. 1.15).

Diese verlängerten Propeptide (ABRI & ADAN) sind analog zu A $\beta$ 42 ebenfalls amyloidogen und führen zur Bildung von Oligomeren, Fibrillen und Amyloid-Plaques (Akiyama et al., 2004; Marcora et al., 2014). Aufgrund der Amyloidformation besteht eine frappierende Ähnlichkeit bezüglich der molekularen Pathomechanismen zwischen FBD und FDD einerseits und der AD andererseits (siehe 1.2.3.2).

#### **1.2.3.4 SPP/SPPL-Proteasen in Immunologie und Infektion**

Proteasen der SPP/SPPL-Familie zeigen überraschend mannigfaltige Funktionen in immunologischen wie infektiologischen Prozessen. So ist beispielsweise die SPP-abhängige Proteolyse von Signalpeptiden an der kontinuierlichen Immunüberwachung durch das adaptive Immunsystem beteiligt. Hierbei werden die von SPP freigesetzten Peptide entweder über polymorphe MHC-I- (Hage et al., 2008) oder über nicht-polymorphe HLA-E-Komplexe (Lemberg et al., 2001) präsentiert. Ebenso werden die N-terminalen Signalpeptid-Fragmente der humanen Leukozyten-Antigene (HLA) HLA-A, -B und -C nach ihrer Freisetzung ins Zytoplasma aktiv zurück in das ER-Lumen transportiert, wo sie an HLA-E binden (Braud et al., 1997). Auf diese Weise werden dem adaptiven Immunsystem die Expressionsniveaus der humanen HLAs rückgemeldet und erlauben so eine Überwachung der Körperzellen (Braud et al., 1998; Martoglio und Dobberstein, 1998).

Infektiologisch interessant ist die Tatsache, dass das Hepatitis C Virus (HCV) auf die SPP-abhängige Proteolyse zurückgreift. Dabei durchläuft das HCV-Polyprotein eine regulierte Intramembranproteolyse durch sukzessive Schnitte von SP und SPP. Die SPP-abhängige Proteolyse ist notwendig für die korrekte Maturierung sowie für die Infektiosität von HCV (McLauchlan et al., 2002; Okamoto et al., 2008). Daher stellt SPP auch ein mögliches drug target für die Therapie der Hepatitis C dar.

Das SPP-Orthologe des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*, PfSPP, ist darüber hinaus ein potentielles drug target für die Behandlung der Malaria tropica. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der proteolytischen Aktivität von PfSPP zu einer drastischen Störung des Wachstums-Zyklus der Plasmodien führt (Marapana et al., 2012; Nyborg et al., 2006). Analog zu der mutmaßlichen Funktion des Säuger-SPP im Rahmen der ERAD, könnte auch die proteolytische Aktivität von PfSPP essentiell sein für eine ERAD-artige Protein-Qualitätskontrolle der Plasmodien (Harbut et al., 2012).

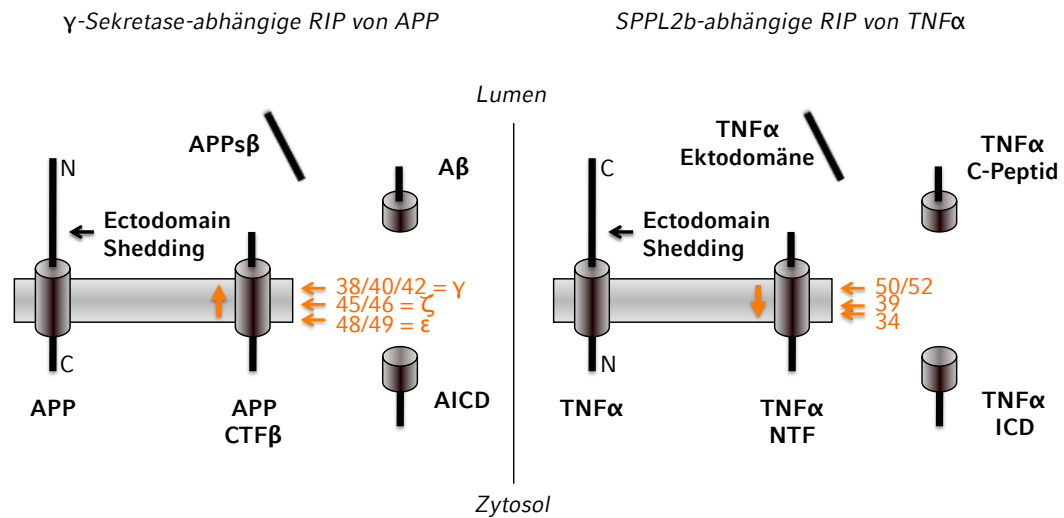
Auch bei dem ersten, kürzlich beschriebenen Substrat von SPPL3, FVenv, handelt es sich um ein virales Protein (Voss et al., 2012). Bis dato gibt es keinerlei Hinweise auf eine humanpathogenetische Relevanz des Humanen Foamy Virus (HFV). Da es sich bei HFV andererseits um ein Retrovirus handelt, wird es als möglicher Vektor für humane Gentherapien diskutiert (Liu et al., 2007). Inwiefern eine Inhibition der SPPL3-abhängigen Intramembranproteolyse Auswirkungen auf den Wachstums-Zyklus dieses Virus hat, wurde bisher noch nicht untersucht.

## 1.3 Proteolysemechanismen von $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b

### 1.3.1 Sequentielle Proteolyse durch die $\gamma$ -Sekretase

Sowohl für die  $\gamma$ -Sekretase als auch für SPPL2b wurde gezeigt, dass ihre jeweiligen Substrate innerhalb der TMD mehrmals geschnitten werden können (Fluhrer et al., 2006; Qi-Takahara et al., 2005; Sastre et al., 2001). Im Falle des amyloidogenen Weges (siehe 1.2.1.3) produziert die  $\gamma$ -Sekretase ausgehend von APP CTF $\beta$  mehrere A $\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge (Abb. 1.16), was sich auf den sequentiellen Proteolysemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase zurückführen lässt:

In einem ersten, endoproteolytischen Schritt wird APP innerhalb der Zytoplasma-nahen TMD geschnitten, wodurch die AICD bereits freisetzt wird. Dieser initiale  $\epsilon$ -Schnitt erfolgt an Position 48 oder 49 der A $\beta$ -Domäne (Abb. 1.17), so dass zunächst A $\beta$ 48 oder A $\beta$ 49 entstehen (Qi-Takahara et al., 2005).

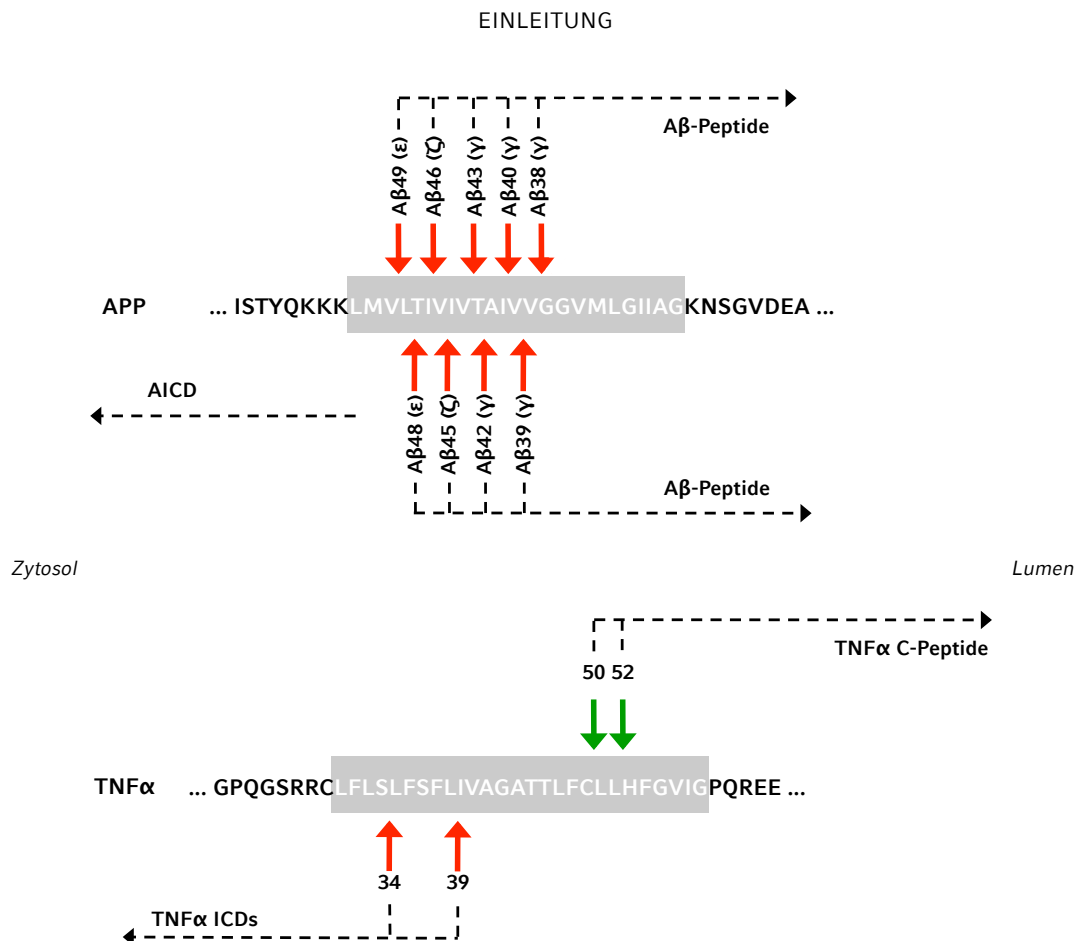


**Abb. 1.16 Prozessierung von APP und TNFα**

Nach Ectodomain Shedding werden APP und TNFα durch die γ-Sekretase bzw. SPPL2b innerhalb der TMD mehrmals geschnitten. Dieser sequentielle Proteolysemechanismus schreitet im Falle der γ-Sekretase vom Zytosol nach luminal voran, bei SPPL2b in entgegengesetzter Richtung. Die Nummerierung der Intramembranschnitte bezieht sich stets auf die entsprechende Aminosäureposition innerhalb der Aβ-Domäne bzw. TNFα FL. Nach (Fluhrer et al., 2009).

Konsekutiv werden diese Aβ-Peptide in weiteren, sequentiellen Schnitten in Richtung Lumen getrimmt, mit dem ζ-Schnitt an Position 46 sowie den γ-Schnitten an den Positionen 38, 40 oder 42 (Funamoto et al., 2004) (Abb. 1.16 & 1.17).

Diese Carboxypeptidase-artigen Schnitte erfolgen jeweils im Abstand von etwa drei Aminosäuren bis zur Freisetzung des finalen Produktes. Die korrespondierenden Fragmente aus drei oder 4 Aminosäuren konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Takami et al., 2009). Abhängig von der exakten Position des initialen ε-Schnittes wurden daher zwei Produktlinien postuliert, welche in der Freisetzung entweder von Aβ42 und Aβ38 (Aβ48 - Aβ45 - Aβ42 - Aβ38) oder von Aβ40 (Aβ49 - Aβ46 - Aβ43 - Aβ40) resultieren (Qi-Takahara et al., 2005) (Abb. 1.17).



**Abb. 1.17 Sequentielle Schnitte von Aβ und TNFα ICD**

Die bekannten Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase in APP (oben) und der SPPL2b-Protease in TNFα (unten). Sowohl APP als auch TNFα werden sequentiell mehrfach geschnitten, die annotierten TMDs der Substrate sind grau hinterlegt. Im Falle der  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP wurden zwei Produktlinien postuliert, die von der Position des initialen  $\epsilon$ -Schnittes abhängen (Qi-Takahara et al., 2005). Nach (Fluhrer et al., 2009).

### 1.3.2 Sequentielle Proteolyse durch SPPL2b

Analog zur  $\gamma$ -Sekretase wurden im Falle der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNFα ebenfalls mehrere Produkte mit unterschiedlicher Länge gefunden (Fluhrer et al., 2006). Aufgrund der im Vergleich zur  $\gamma$ -Sekretase invertierten Membrantopologie von SPPL2b betrifft dies hier jedoch die TNFα ICD, welche von luminal hin zur zytoplasmatischen Seite der Membran getrimmt wird (Abb. 1.16):

Der initiale Schnitt von TNFα erfolgt vermutlich zwischen den Positionen 49 und 50 des TNFα NTF (Abb. 1.17), woraufhin ein TNFα C-Peptid N-terminal beginnend mit Leucin 50 freigesetzt wird (Fluhrer et al., 2006). Mittels

Radiosequenzierung wurden allerdings auch geringe Mengen eines TNF $\alpha$  C-Peptids identifiziert, welches N-terminal erst mit Histidin 52 beginnt. Die bis heute massenspektrometrisch nachgewiesenen Hauptprodukte der TNF $\alpha$  ICDs umfassen Peptide mit einem C-terminalen Serin 34 (TNF $\alpha$  ICD 1 - 34) oder Leucin 39 (TNF $\alpha$  ICD 1 - 39) (Fluhrer et al., 2006) (Abb. 1.17).

Der sequentielle Proteolysemechanismus scheint zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase konserviert zu sein. In Einklang hierzu führt eine Mutation des zum katalytischen Aspartat direkt benachbarten Glycins des GxGD-Motivs in beiden Proteasen sowohl zu einer Verlangsamung des initialen proteolytischen Schnittes als auch zu einer verlangsamten sequentiellen Konversion von A $\beta$  bzw. der TNF $\alpha$  ICD hin zu kleineren Produkt-Spezies (Fluhrer et al., 2008).

Als Hinweis auf einen ähnlichen Aufbau der aktiven Zentren kommt es zudem zu einer Kreuzreaktivität bestimmter  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (GSIs) mit Proteasen der SPP/SPPL-Familie: so inhibieren GSIs, die das aktive Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase binden (Li et al., 2000), ebenfalls die proteolytische Aktivität von SPPL2b (Fluhrer et al., 2006). Andererseits existieren mit DAPT (Dovey et al., 2001) und (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton (Weihofen et al., 2000) auch spezifische Substanzen, welche präferentiell die  $\gamma$ -Sekretase oder die SPP/SPPL-Proteasen inhibieren (Fluhrer et al., 2006; Martin et al., 2008; Weihofen et al., 2003).

Aufgrund seiner präferentiellen Lokalisation an der Plasmamembran sowie geringen Mengen in Endolysosomen ist insbesondere SPPL2b der subzellulären Verteilung der  $\gamma$ -Sekretase sehr ähnlich, zudem sind beide Proteasen im Zentralnervensystem stark exprimiert. Mit TNF $\alpha$  als erstmalig identifiziertem Substrat ist daher gerade die Untersuchung des sequentiellen Proteolysemechanismus von SPPL2b im Vergleich zur APP-Prozessierung der  $\gamma$ -Sekretase essentiell, um potentielle Kreuzreaktionen einer Pharmakotherapie dieser Proteasen zu minimieren. Bisher wurden lediglich die funktionellen Auswirkungen des GxGD-Motivs auf beide Proteasen untersucht. Für einen umfassenden Vergleich der sequentiellen Proteolysemechanismen von SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase ist es daher essentiell, sowohl das YD- als auch das PAL-Motiv hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz für die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  zu charakterisieren.

## 2 ZIELSETZUNG

Intramembranproteolyse ist ein von Bakterien bis hin zum Menschen konservierter, biochemischer Mechanismus, der durch die drei Klassen der S2P-, der Rhomboid- und der GxGD-Intramembranproteasen katalysiert wird. Allen voran die  $\gamma$ -Sekretase als Vertreter der GxGD-Proteasen ist Gegenstand intensiver medizinischer Forschung, da ihre Prozessierung von APP ein mögliches drug target zur Reduktion von neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden in der Prävention und Behandlung des Morbus Alzheimer darstellt. Ein genaues Verständnis der Proteolysemechanismen der GxGD-Proteasen ist unabdingbar, um durch die Entwicklung möglichst spezifischer  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren oder -Modulatoren potentielle Kreuzreaktionen einer Pharmakotherapie mit den homologen SPP/SPPL-Proteasen zu minimieren.

SPPL2b ist aufgrund seiner sehr ähnlichen subzellulären Lokalisation, seiner Expression im Zentralnervensystem sowie der Ähnlichkeit seiner Struktur des aktiven Zentrums das Enzym mit der höchsten Kreuzreaktionswahrscheinlichkeit in Bezug auf  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren oder -Modulatoren. Unter den bekannten Substraten von SPPL2b ist TNF $\alpha$  von besonderem Interesse, da der Umsetzung von TNF $\alpha$  analog zur  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP ein sequentieller Proteolysemechanismus zugrunde liegt. Die Untersuchung der SPPL2b-abhängigen Prozessierung von TNF $\alpha$  ist daher sehr gut für einen Vergleich der Proteolysemechanismen beider Proteasen geeignet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen zunächst die bestehenden Analysemethoden zur Untersuchung der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  weiterentwickelt und verfeinert werden, um eine sensitive und robuste Detektion der Produkte, der TNF $\alpha$  ICDs und C-Peptide, zu ermöglichen. Zum einen gilt es, den zeitabhängigen Umsatz des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF mittels eines robusten *in vitro* Assays quantifizieren zu können. Darüber hinaus soll hierbei auch die zeitabhängige Konversion der TNF $\alpha$  ICDs abgebildet werden. Weiterhin wird die Anwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Identifikation von TNF $\alpha$  ICD und C-Peptid-Spezies adaptiert, um möglicherweise bisher nicht nachweisbare

Schnittprodukte der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  detektieren zu können. Insbesondere gilt es hierbei festzustellen, ob massenspektrometrisch der Nachweis palmitoylierter TNF $\alpha$  ICD-Spezies möglich ist.

Bezüglich des Proteolysemechanismus der GxGD-Proteasen muss festgehalten werden, dass sowohl innerhalb der Preseniline als auch in allen SPP/SPPL-Proteasen die Sequenzmotive YD, GxGD und PAL hoch konserviert sind, wobei das PAL-Motiv in SPPL-Proteasen bislang noch nicht formal charakterisiert wurde. Daher ist ein weiteres Ziel dieser Dissertation, die weiterentwickelten Analysemethoden auf die funktionelle Charakterisierung des PAL-Motivs in SPPL2b anzuwenden.

Falls eine generelle funktionale Bedeutung des PAL-Motivs in SPPL2b nachgewiesen werden kann, sollen die genauen Anforderungen an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs hinsichtlich katalytischer Aktivität und sequentieller Konversion der TNF $\alpha$  ICDs bestimmt werden. Hierzu wird eine zielgerichtete Mutagenese des PAL-Motivs in SPPL2b vorgenommen, um eine Interpretation der Daten im Vergleich zur  $\gamma$ -Sekretase zu ermöglichen. In Anlehnung an die zentrale Stellung der  $\gamma$ -Sekretase in der Pathogenese des Morbus Alzheimer wird ein besonderer Fokus auf der Analyse von Mutationen liegen, die, sofern sie innerhalb der Preseniline auftreten, zu einer familiären Variante des Morbus Alzheimer führen.

Anhand der experimentellen Befunde wird eine vergleichende Diskussion der sequentiellen Proteolysemechanismen der  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b möglich. Die erhobenen Daten könnten hierbei zum einen eine Basis schaffen, um die generelle Bedeutung des konservierten PAL-Motivs innerhalb der gesamten Klasse der GxGD-Intramembranproteasen zu untersuchen. Zum anderen könnten sie eine Grundlage darstellen für die Entwicklung von möglichst spezifischen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren oder -Modulatoren zur selektiven Pharmakotherapie des Morbus Alzheimer.

### 3 MATERIAL & METHODEN

#### 3.1 Geräte und Materialien

In Tabelle 3.1 findet sich eine Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien.

Geräte & Materialien	Hersteller
37°C Inkubator (Heracell)	Thermo Fisher Scientific
Agarose-Gelelektrophoresekammer (PerfectBlue)	PEQLAB
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec
Chemilumineszenz-Detektor (FluorChem IS-8900)	Alpha Innotech
Filme (Universalfilm Super RX)	Fuji
Filmentwickler (Curix 60)	Agfa
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C (HFU 80)	Heraeus
Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
Kühlschrank 4°C	Elektrolux
Lamina Flow Bench (Hera Safe HS12)	Heraeus
Magnetrührer (KMO2 basic)	IKA Labortechnik
Massenspektrometer (MALDI-TOF Voyager-DE STR)	Applied Biosystems
Mikroskop (Wilovert S 10x 4/10/20)	Hund
Mikrowelle	Bosch
Milli-Q® Academic	Millipore
N <sub>2</sub> -Tank (Chronos)	Messer Griesheim
PCR-Maschine (Mastercycler)	Eppendorf
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
Pipetten, serologisch (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt
Pipetten (P2, P20, P200, P1000)	Gilson
Pipetten, serologisch steril (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen steril mit Filter (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt
Pipettierhelfer (accu-jet® pro)	BRAND
Power Supply (PowerPac™)	Bio-Rad
Reagenz- und Zentrifugenröhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt



Geräte & Materialien	Hersteller
Reaktionsgefäße (500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Schüttler (KM2)	Edmund Bühler
SDS-PAGE Kammer (Mini-PROTEAN 3)	Bio-Rad
Standzentrifuge (J-20XP) & Rotor (JA10)	Beckman Coulter
Thermoschüttler (Thermomixer® compact)	Eppendorf
Transfermembran (Nitrocellulose, Protran®, 0.1 µm)	Whatman
Transfermembran (PVDF, Immobilon-P, 0.45 µm)	Merck Millipore
UV-Lampe (UV/White Light Transilluminator)	UVP
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
Waage (Standard & Analytical Plus)	Ohaus
Wasserbad (Typ 1003)	GFL
Western Blot-Transferkammer (Mini Trans-Blot Cell)	Bio-Rad
Zellkultur-Platten (12 well, 60x15 mm, 100x17 mm)	Nunc
Zentrifuge (Heraeus Biofuge Pico)	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge 4°C (Heraeus Biofuge Fresco)	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge für Falcons (Heraeus Megafuge 16)	Thermo Fisher Scientific

**Tab. 3.1      Verwendete Geräte und Materialien**

## 3.2 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 3.2 gelistet.

Reagenz	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Acetonitril	Merck Millipore
Acrylamid	Serva
Agarose	Invitrogen
Alkalische Phosphatase	Roche
Amersham ECL Western Blot Detektion	GE Healthcare
Amersham ECL Plus Western Blot Detektion	GE Healthcare
Ampicillin	Merck
APS	Merck
Bacto-Agar	BD

# MATERIAL & METHODEN

Reagenz	Hersteller
Bacto-Trypton	BD
Bacto-Yeast-Extrakt	BD
Blasticidin	Invitrogen
Bromphenolblau	Fluka
CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure)	Sigma
Chloroform	Merck
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DDM ( <i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside)	Sigma
DMEM plus GlutaMax	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
Doxycyclin	BD Biosciences
DTT (Dithiotreitol)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen
Flag M2 Agarose	Sigma
FuGENE <sup>®</sup> HD	Promega
Glycerin (86%)	Merck
Glycin	Biomol
HCl	Sigma
I-Block Reagenz	Tropix
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Lipofectamine <sup>®</sup> 2000	Invitrogen
Methanol	Merck
NaCl	Roth
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	Sigma
NaOH	Merck
Nonidet P-40 (IGEPAL <sup>®</sup> CA-630)	Sigma
NucleoBond <sup>®</sup> PC 500	Macherey-Nagel
NucleoSpin <sup>®</sup> MN-Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid-Kit	Macherey-Nagel
N-Octylglucoside	Santa Cruz

Reagenz	Hersteller
Opti-MEM®	Invitrogen
Orange G	Sigma
Penicillin / Streptomycin	PAA
Poly-L-Lysin	Sigma
Protein-A-Sepharose	Sigma
SDS	Serva
SeeBlue® Plus2 Standard	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Roche
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
TFA (Trifluoressigsäure)	Roth
Tricine	Biomol
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Biomol
Tween® 20	Roth
Zeocin	Invitrogen
(Z-LL) <sub>2</sub> -Keton (1,3-Di-(N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone)	Calbiochem

**Tab. 3.2      Verwendete Reagenzien**

Soweit möglich wurden, wenn nicht anderweitig vermerkt, sämtliche Reagenzien im Reinheitsgrad *p.a.* verwendet.

### 3.3 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Puffer & Lösungen	Zusammensetzung
Agaroselösung 1% (bzw. 2%)	1 g/l Agarose (bzw. 2 g/l) in TAE-Puffer Aufkochen zum Lösen
Anodenpuffer für Schägger-Gel 1x	200 mM Tris-HCl pH 8.9
Basis-Puffer	80% SPP Stock-Puffer 20% Bideist H <sub>2</sub> O
Blotpuffer 1x	25 mM Tris 192 mM Glycin

# MATERIAL & METHODEN

Puffer & Lösungen	Zusammensetzung
CaCl <sub>2</sub> -Puffer	50 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM Tris-HCl pH 8.0
DNA-Ladepuffer 1x	30% Glycerin 10 mM EDTA 0.05% Orange G
Einfriermedium	5% DMSO in FCS
Hypoton-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7.6 1 mM EDTA 1 mM EGTA
I-Block	1 g/l Tropix I-Block Reagenz 0.1% Tween 20 in PBS
IP/MS-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0 140 mM NaCl 5 mM EDTA 0.1% n-Octylglucoside
Kathodenpuffer für Schägger-Gel 1x	100 mM Tris-HCl pH 8.25 100 mM Tricine 0.1% SDS
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Yeast-Extrakt 5 g/l NaCl 6 g/l Agar (für LB Agarplatten) Autoklavieren
Lower-Tris 1x	375 mM Tris-HCl pH 8.8 0.1% SDS
Matrix-Puffer	2.5% TFA 50% Acetonitril Sättigen mit $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure
PBS 1x	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Protein-A-Sepharose	100 g/l Protein-A-Sepharose 2 g/l BSA in STEN Schütteln für 1h bei 4°C

Puffer & Lösungen	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer 1x	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1% SDS
SDS-Probenpuffer 1x	5% Upper-Tris 8.6% Glycerin 2% SDS 0.2% DTT 0.16 mg/l Bromphenolblau Aufkochen auf 95°C zum Lösen
SPP Stock-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.8 50 mM Kaliumacetat 2 mM Magnesiumacetat 125 mM Sucrose 1 mM DTT
STEN	50 mM Tris-HCl pH 7.6 150 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8.0 0.2% Nonidet P-40
TAE 1x	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8.0
TBST 1x	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 7.6 0.05% Tween 20
1 M Tris-HCl pH 7.6	121.1 g Tris Bidest H <sub>2</sub> O @ 1 l mit HCl auf pH 7.6 einstellen
Tris-Tricine Puffer 1x	10 mM Tris 10 mM Tricine 0.1% SDS
Upper-Tris 1x	125 mM Tris-HCl pH 6.8 0.1% SDS in Bidest H <sub>2</sub> O

**Tab. 3.3      Verwendete Puffer und Lösungen**

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde, wenn nicht anderweitig vermerkt, stets Bidest H<sub>2</sub>O, bezogen über eine Milli-Q® Academic (Merck Millipore) Wasseraufbereitungsanlage, verwendet.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 PCR zur Amplifikation und Mutagenese von DNA-Fragmenten

Mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden sämtliche in dieser Arbeit benötigten Konstrukte amplifiziert sowie unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden zielgerichtete Mutationen eingeführt. Tabelle 3.4 zeigt den Standardansatz einer PCR.

Bestandteil	Endkonzentration
Template DNA	5 ng / $\mu$ l
Oligonukleotide 1 und 2	Je 250 nM
dNTPs	25 $\mu$ M
Polymerase-spezifischer Puffer	Nach Herstellerangabe (1x)
Polymerase (Pfu, Stratagene oder Taq, Promega)	2.5 u oder 5 u
Bidest H <sub>2</sub> O, autoklaviert	@ 100 $\mu$ l Reaktionsansatz

**Tab. 3.4 Standardansatz einer PCR**

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis vorbereitet, Tabelle 3.5 zeigt das Standardprogramm zur Durchführung der PCR, wie es zur Klonierung der SPPL2b-Konstrukte verwendet wurde.

Schritt	Temperatur	Zeit / Wiederholungen
1	T = 94°C	2 min
2	T = 94°C	30 sec
3	T = 45°C	30 sec
4	T = 72°C	2:30 min
5	GOTO 2	10 Wiederholungen
6	T = 94°C	30 sec
7	T = 50°C	30 sec
8	T = 72°C	2:30 min
9	GOTO 6	20 Wiederholungen
10	T = 72°C	10 min
HOLD	T = 4°C	$\infty$

**Tab. 3.5 Standardprogramm der PCR**

### 3.4.2 cDNA, Oligonukleotide und Konstrukte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten cDNAs sind in Tabelle 3.6 wiedergegeben.

Gen	Gene ID # (NCBI)	Bezug	Referenz
SPPL2b	56928	Human Brain cDNA library	Krawitz et al., 2005
TNF $\alpha$	7124	ATCC (Klon AAA61198)	Fluhrer et al., 2006

**Tab. 3.6      Verwendete cDNAs**

Für die Mutagenese und Klonierung der hier beschriebenen Konstrukte wurden die in Tabelle 3.7 aufgeführten Oligonukleotide eingesetzt.

Name	Sequenz
SPPL2b fw EcoRI	5' cggaattcatggtgcacgtggtctcc 3'
SPPL2b 280 fw BamHI	5' cgcgatcccaacaacagctgccc 3'
SPPL2b 280 rv BamHI	5' cgcgatcctgcacttgccaagggc 3'
SPPL2b HA rv XhoI	5' ccgctcgagctagcgtagtcgggcacgtcgtagggtaagcgccgagggccaggctgggttac 3'
SPPL2b $\Delta$ PAL fw	5' gtggcactggccctgatgcagcgtggccagctctacctggtgccctgcacgctggtgacg 3'
SPPL2b $\Delta$ PAL rv	5' cgtcaccagcgtgcagggcaccaggtagagctggccacgctgcatcagggccagtgccac 3'
SPPL2b PALPIS fw	5' ttgccagctctccaatctccatcacctgcacgctggtgacgagctgcgctgtggcgctc 3'
SPPL2b PALPIS rv	5' ggtgatggagattggaagagctggcaagccacgctgcatcagggccagtgccacgaatgt 3'
SPPL2b P472A fw	5' gatgcagcgtggccagggcgtctctctacctg 3'
SPPL2b P472A rv	5' caggtagaggagagcggcctggccacgctgcatc 3'
SPPL2b P472G fw	5' gatgcagcgtggccagggcgtctctctacctg 3'
SPPL2b P472G rv	5' caggtagaggagagcggcctggccacgctgcatc 3'
SPPL2b P472L fw	5' gatgcagcgtggccagctcgtctctctacctg 3'
SPPL2b P472L rv	5' caggtagaggagagcagctggccacgctgcatc 3'
SPPL2b A473C fw	5' cagcgtggccagccctgctctctacctggtg 3'
SPPL2b A473C rv	5' caccaggtagaggagcagggtggccacgctg 3'
SPPL2b A473G fw	5' cagcgtggccagccgctctctacctggtg 3'
SPPL2b A473G rv	5' caccaggtagaggagcgggtggccacgctg 3'
SPPL2b A473L fw	5' cagcgtggccagccctctctctacctggtg 3'
SPPL2b A473L rv	5' caccaggtagaggaggggctggccacgctg 3'
SPPL2b A473V fw	5' cagcgtggccagccgtctctctacctggtg 3'

Name	Sequenz
SPPL2b A473V rv	5' caccaggtagaggaggacggctggccacgctg 3'
SPPL2b L474A fw	5' cgtggccagcccgcgtctctacctggtgcc 3'
SPPL2b L474A rv	5' gggcaccaggtagagagcagcgggctggccacg 3'
SPPL2b L474F fw	5' cgtggccagcccgcgtttctctacctggtgcc 3'
SPPL2b L474F rv	5' gggcaccaggtagagaaaagcgggctggccacg 3'
SPPL2b L474G fw	5' cgtggccagcccgcgtggtctctacctggtgcc 3'
SPPL2b L474G rv	5' gggcaccaggtagagaccagcgggctggccacg 3'
SPPL2b L474I fw	5' cgtggccagcccgcgtattctctacctggtgcc 3'
SPPL2b L474I rv	5' gggcaccaggtagagaatagcgggctggccacg 3'
SPPL2b L474V fw	5' gcgtggccagcccgcgtcctctacctggtgcc 3'
SPPL2b L474V rv	5' gggcaccaggtagaggacagcgggctggccacgc 3'

**Tab. 3.7 Oligonukleotide**

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit hergestellten SPPL2b-Konstrukte finden sich in Tabelle 3.8, zusammen mit den jeweils pro PCR benötigten Oligonukleotiden.

Für eine effiziente Klonierung der SPPL2b Mutanten wurde mittels PCR (siehe 3.4.1) zunächst ein Hilfsvektor kloniert, der die cDNA-Sequenz für die Aminosäuren 1 - 280 von SPPL2b enthält (SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A). Die hierbei verwendeten Restriktionsschnittstellen sind EcoRI und BamHI.

In einem zweiten Schritt wurde zur Mutagenese des PAL-Motivs die cDNA-Sequenz für die Aminosäuren 281 - 592 von SPPL2b kloniert, wozu jeweils drei einzelne PCR-Ansätze (siehe 3.4.1) nötig waren (Oligos siehe Tab. 3.8): Zunächst werden PCR 1) und 2) getrennt voneinander durchgeführt. Nachfolgend kann in PCR 3) die mutierte cDNA für die Aminosäuren 281 - 592 von SPPL2b kloniert werden, wofür jeweils gleiche Mengen der beiden ersten PCR-Produkte unter Zugabe des fw-Oligos der PCR 1) und des rv-Oligos der PCR 2) verwendet werden.

Abschließend wird das Produkt der PCR 3) in den Hilfsvektor (SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A) kloniert, um die entsprechend mutierte cDNA-Gesamtsequenz von SPPL2b zu erhalten. Die hierbei verwendeten Restriktionsschnittstellen sind BamHI und XhoI.



## MATERIAL &amp; METHODEN

Konstrukt	Oligonukleotide (je PCR)	cDNA	Zielvektor
SPPL2b 1 - 280	SPPL2b fw EcoRI SPPL2b 280 rv BamHI	SPPL2b wt	pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b ΔPAL	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b ΔPAL rv 2) SPPL2b ΔPAL fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b PALPIS	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b PALPIS rv 2) SPPL2b PALPIS fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b P472A	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b P472A rv 2) SPPL2b P472A fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b P472G	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b P472G rv 2) SPPL2b P472G fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b P472L	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b P472L rv 2) SPPL2b P472L fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b A473C	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b A473C rv 2) SPPL2b A473C fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b A473G	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b A473G rv 2) SPPL2b A473G fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/T0/myc/his A (Invitrogen)

Konstrukt	Oligonukleotide (je PCR)	cDNA	Zielvektor
SPPL2b A473L	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b A473L rv 2) SPPL2b A473L fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b A473V	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b A473V rv 2) SPPL2b A473V fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b L474A	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b L474A rv 2) SPPL2b L474A fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b L474F	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b L474F rv 2) SPPL2b L474F fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b L474G	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b L474G rv 2) SPPL2b L474G fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b L474I	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b L474I rv 2) SPPL2b L474I fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)
SPPL2b L474V	1) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b L474V rv 2) SPPL2b L474V fw SPPL2b HA rv XhoI 3) SPPL2b 280 fw BamHI SPPL2b HA rv XhoI	SPPL2b wt	SPPL2b 1 - 280 in pcDNA 4/TO/myc/his A (Invitrogen)

Tab. 3.8 Klionierte SPPL2b-Konstrukte

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte, die bereits im Labor etabliert waren, sind in Tabelle 3.9 beschrieben.

Konstrukt	Beschreibung	Vektor	Quelle (Referenz)
SPPL2b wt	humanes SPPL2b wt HA-Tag C-terminal	pcDNA4/TO/ myc/his A (Invitrogen)	Prof. Regina Fluhner (Krawitz et al., 2005)
SPPL2b D421A	humanes SPPL2b D421A HA-Tag C-terminal	pcDNA4/TO/ myc/his A (Invitrogen)	Prof. Regina Fluhner (Fluhner et al., 2006)
TNF $\alpha$ FL	humanes TNF $\alpha$ Flag-Tag N-terminal V5-Tag C-terminal	pcDNA 3.1/Hygro(+) (Invitrogen)	Prof. Regina Fluhner (Fluhner et al., 2008)
TNF $\alpha$ NTF	humanes TNF $\alpha$ NTF Flag-Tag N-terminal V5-Tag C-terminal	pcDNA 3.1/Hygro(+) (Invitrogen)	Prof. Regina Fluhner (Fluhner et al., 2008)
TNF $\alpha$ NTF Flag	humanes TNF $\alpha$ NTF V5-Tag N-terminal Flag-Tag & AP C-terminal	pcDNA 3.1/Hygro(+) (Invitrogen)	Prof. Regina Fluhner (unpubliziert)

**Tab. 3.9**      **Bereits etablierte Konstrukte**

Alle SPPL2b-Konstrukte tragen C-terminal einen HA-Tag (YPYDVPDYA), die Resistenz des Vektors pcDNA 4/TO/myc/his A ist Ampicillin für *E. coli* und Zeocin für eukaryotische Zellen.

Die TNF $\alpha$ -Konstrukte tragen einen Flag-Tag (DYKDDDDK) am N-Terminus sowie einen V5-Tag (GKPIPNLLGLDST) am C-Terminus. Hiervon ausgenommen ist das Konstrukt TNF $\alpha$  NTF Flag, bei dem Flag- und V5-Tag vertauscht sowie C-terminal Alanin und Prolin zur Stabilisierung des Proteins angefügt wurden. Dies ermöglicht die Detektion der TNF $\alpha$  C-Peptide mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (siehe 3.8).

Die beiden Konstrukte ohne Ektodomäne, TNF $\alpha$  NTF und TNF $\alpha$  NTF Flag, umfassen jeweils die Aminosäuren 1 - 80 von TNF $\alpha$ . Für alle TNF $\alpha$ -Konstrukte wurden HindIII und XhoI als Restriktionsschnittstellen verwendet.

Die Resistenz des Vektors pcDNA 3.1/Hygro(+) ist Ampicillin für *E. coli* und Hygromycin für eukaryotische Zellen.

### 3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

*Agarose | DNA-Ladepuffer | DNA-Marker | NucleoSpin<sup>®</sup> MN-Kit*

Die Analyse von DNA-Fragmenten sowie die präparative Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für PCR-Produkte bis zu einer erwarteten Größe von ~ 500 Basenpaaren wurde 2%ige Agarose verwendet, für größere PCR-Produkte 1%ige Agarose. Vor dem Laden wurden die DNA-haltigen Proben mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt, als Größenstandard wurde 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) eingesetzt. Unter UV-Licht wurde die Ethidiumbromid-gefärbte DNA detektiert.

Zur präparativen Aufreinigung von PCR-Produkten diente das NucleoSpin<sup>®</sup> MN-Kit (Macherey-Nagel). Hierzu wurden entsprechende DNA-Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und nachfolgend nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 3.4.4 Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

*EcoRI, HindIII, XhoI | Alkalische Phosphatase | T4 DNA Ligase | Ligationspuffer*

Im Rahmen der SPPL2b-Klonierungen erfolgte die Spaltung von DNA mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen: verwendet wurden EcoRI und XhoI (beide New England Biolabs, 20 U/μl), im Fall von TNFα-Klonierungen auch HindIII (Fermentas, 10 U/μl). Zu etwa 1 bis 5 μg DNA wurden je 1 μl Restriktionsendonuklease sowie entsprechender Enzym-Puffer (nach Herstellerangaben) zugegeben und für mindestens 1 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gespaltenen DNA-Fragmente wiederum mittels NucleoSpin<sup>®</sup> MN-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aus der Lösung aufgereinigt.

Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Autoligation vor Verwendung zusätzlich am 3'-Ende dephosphoryliert. Hierzu wurde je 1 μg Vektor-DNA nach Herstellerangaben mit 2 μl Alkalischer Phosphatase (Roche, 1 U/μl) und Dephosphorylierungspuffer (Roche) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die dephosphorylierte DNA wiederum nach Herstellerangaben mittels NucleoSpin<sup>®</sup> MN-Kit aus der Lösung aufgereinigt.

Zur Ligation der DNA wurden etwa 100 ng linearisierter Vektor und 500 ng des entsprechenden Insert-Konstruktes verwendet, die mit den jeweils identischen Restriktionsendonukleasen gespalten worden waren. Nach Zugabe von 10 U T4 DNA Ligase (Roche, 5 U/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l T4 DNA Ligase Puffer wurde der Reaktionsansatz mit autoklaviertem Bidest H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 2 h.

### **3.4.5 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli***

#### *LB-Medium | CaCl<sub>2</sub>-Puffer*

Zur Vervielfältigung der hier beschriebenen Konstrukte wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  hergestellt. Hierzu wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  in 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht als Schüttelkultur bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0.5 wurden die angeimpften *E. coli* mit 1.500 g bei 4°C pelletiert und anschließend in 15 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Im Anschluss an eine Inkubation auf Eis von 20 min wurden die Bakterien erneut pelletiert und in 1 ml CaCl<sub>2</sub>-Puffer mit 20% Glycerin aufgenommen.

Die nun chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden in Aliquots zu je 100  $\mu$ l aufgeteilt und bei - 80°C bis zur Verwendung gelagert.

### 3.4.6 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

*LB-Medium | Ampicillin | LB-Agarplatten*

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes (siehe 3.4.4) wurde für 10 min auf Eis inkubiert, so dass sich die DNA an die Bakterienoberfläche anlagern konnte. Durch einen nachfolgenden Hitzeschock von 60 sec bei 42°C folgte die Aufnahme der exogenen Plasmid-DNA in die kompetenten Zellen. Nach einer Kühlung auf Eis für ~ 30 Sekunden wurde 1 ml warmes LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und im Thermoschüttler bei 37°C für 30 min regeneriert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien für 1 min bei 6.000 g abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l frischem LB-Medium aufgenommen.

Zur Selektion wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.4.7 DNA-Präparation im kleinen Maßstab

*LB-Medium | Ampicillin | NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kit*

Zur Kontrollanalyse der subklonierten DNA-Fragmente sind zunächst geringe Mengen Plasmid-DNA ausreichend. Hierzu wurde eine Bakterienkolonie der LB-Agarplatte in je 3 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (= LB<sub>Amp</sub>) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach Zentrifugation mit 6.000 g für 1 min wurde der Aufschluss des Bakterienpellets und die DNA-Isolation mittels NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Größe des Inserts wurde durch Verdau mit den entsprechenden zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen (Tab. 3.8) und Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

### 3.4.8 Sequenzierung von DNA

Die im kleinen Maßstab gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend sequenziert, um die korrekte Klonierung und Mutagenese der Konstrukte zu verifizieren. Hierzu wurden die DNA-Proben entsprechend der Dienstleister-Angaben aufbereitet und verschickt (GATC Biotech). Die durch Sanger-Sequencing erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mithilfe von CLC Main Workbench (CLC bio) analysiert.

### 3.4.9 DNA-Präparation im großen Maßstab

*LB-Medium | Ampicillin | NucleoBond® PC 500*

Eine DNA-Präparation im großen Maßstab erfolgte mithilfe NucleoBond® PC 500 (Macherey-Nagel). Hierzu wurde in 200 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium ein Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Pelletierung bei 5.500 g und 4°C für 20 min erfolgte die weitere Präparation nach Herstellerangaben.

### 3.5 Zellkultur

#### 3.5.1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für sämtliche Versuche immortalisierte humane embryonale Nierenzellen HEK 293 (T-REx™-293, Invitrogen) als Ausgangszelllinie verwendet (= TR-Zellen). Dieses Zellkulturmodell basiert auf der Transfektion von kultivierten Zellen aus humanem, embryonalem Nierengewebe mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus 5 (Graham et al., 1977). Die Verwendung des T-REx™-Systems erlaubte die zeitlich kontrollierte Induktion der Genexpression (Yao et al., 1998) der SPPL2b-Konstrukte durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin (BD Biosciences). Zur Inhibition der proteolytischen Aktivität von SPPL2b wurde bei Bedarf 30 µM (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton (1,3-Di-(N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl)aminoacetone) zugesetzt.

Die Zelllinien wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in Kultur gehalten, als Grundmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus GlutaMax (Invitrogen). Dem Grundmedium wurden außerdem 10% fetales Kälberserum (FCS, Invitrogen) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) zugesetzt. Als Selektionsmittel dienten nach Bedarf Blasticidin (5 µg/ml) und Zeocin (200 µg/ml, beide Invitrogen), in Tabelle 3.9 sind alle stabil transfizierten Zelllinien aufgeführt. Die Zelllinien TR -, TR SPPL2b wt und TR SPPL2b D421A, bei der eines der katalytisch aktiven Aspartate von SPPL2b zu einem Alanin mutiert ist, waren im Labor vorhanden und wurden bereits beschrieben (Krawitz et al., 2005; Fluhrer et al., 2006).

#### 3.5.2 Stabile Transfektion von TR-Zellen

Zur Etablierung der stabilen TR-Zellen mit Expression der entsprechenden SPPL2b-Konstrukte wurden T-REx™-293 Zellen bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert. Die Transfektion von 1 - 2 µg des entsprechenden Expressionsvektors wurde mit 4 µl Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Kurz gefasst wurden hierbei zunächst die DNA und Lipofectamine® jeweils separat in 500 µl Opti-MEM® (Invitrogen) aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend



wurden beide Ansätze gemischt, für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die nachfolgende Selektion von positiven Klonen geschah durch Zugabe des Selektionsmittels Zeocin 24 h nach Transfektion. Zur Gewinnung von Einzelzellklonen wurden die Zellen durch starke Verdünnung vereinzelt, auf eine 10 cm Zellkultur-Platte aufgetragen und nach etwa 7 Tagen in 12 well Platten isoliert vermehrt.

Name	Expressionsvektor	Resistenz
TR - *	-	Blasticidin
TR SPPL2b wt *	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b wt	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b D421A*	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b D421A	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b ΔPAL	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b ΔPAL	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b PALPIS	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b PALPIS	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b P472A	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b P472A	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b P472G	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b P472G	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b P472L	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b P472L	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b A473C	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b A473C	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b A473G	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b A473G	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b A473L	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b A473L	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b A473V	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b A473V	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b L474A	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b L474A	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b L474F	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b L474F	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b L474G	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b L474G	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b L474I	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b L474I	Blasticidin/Zeocin
TR SPPL2b L474V	pcDNA 4/TO/myc/his A   SPPL2b L474V	Blasticidin/Zeocin

**Tab. 3.9 Stabile Zelllinien**

\* Die stabilen Zelllinien TR - , TR SPPL2b wt und TR SPPL2b D421A waren bereits im Labor vorhanden.

### 3.5.3 Transiente Transfektion von TR-Zellen

Um SPPL2b zusammen mit einem Substrat TNF $\alpha$  zu koexprimieren, wurden die TR-Zellen mit dem entsprechenden TNF $\alpha$ -Konstrukt transient transfiziert. Hierzu wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete 6 cm Zellkultur-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert.

Die Transfektion von 1 - 2  $\mu$ g der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben, entweder mittels Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen) oder FuGENE<sup>®</sup> HD (Promega). Nach 24 h erfolgte ein Austausch des Mediums und die Expression des SPPL2b-Konstruktes wurde durch Doxycyclin für mindestens 48 h induziert.

Anschließend erfolgte die Absammlung der Zellproben für die nachfolgenden proteinbiochemischen Versuche auf Eis. Nach Waschen mit eiskaltem 1x PBS wurden die Zellen abgeschabt und bei 3.000 g und 4°C für 5 min pelletiert.

### 3.5.4 Kryokonservierung von TR-Zellen

#### *Einfriermedium*

Zur Kryokonservierung wurden 10 cm Zellkultur-Platten mit TR-Zellen bis zur Konfluenz inkubiert, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 5 min bei 500 g abzentrifugiert. Die Pellets wurden in je 1 ml Einfriermedium vorsichtig resuspendiert, in Gefrier Röhrchen transferiert und sofort auf Eis gelagert. Nach Einfrieren bei -80°C wurden die Kryokonserven zur Langzeitaufbewahrung in einen N<sub>2</sub>-Tank überführt.

### 3.6 Proteinbiochemie

#### 3.6.1 Präparation von Zellmembranen

*Hypoton-Puffer | cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) | Basis-Puffer*

Zur Isolierung von Zellmembranen wurden die entsprechenden Zellpellets in 800 µl Hypoton-Puffer mit 1x Protease-Inhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die geschwollenen Zellen wurden durch 15x Hindurchpressen durch eine 0.6 mm Kanüle aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation von Nuclei und Mitochondrien bei 4°C und 2.400 g für 5 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert bei 4°C und 16.000 g für 45 min. Nach Abheben des zytosolischen Überstandes steht das Membranpellet zur weiteren Verfügung.

Im Falle des Nachweises von Calnexin als Ladekontrolle wurde das Pellet direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Für den Nachweis von SPPL2b und TNFα hingegen sowie für die Durchführung der *in vitro* time course-Experimente (siehe 3.6.2) wurde das Pellet zunächst in 50 - 100 µl Basis-Puffer aufgenommen.

#### 3.6.2 *In vitro* time-course Analyse von SPPL2b

*Basis-Puffer | Chloroform | Methanol | SDS-Probenpuffer*

Um eine *in vitro* time-course Analyse von SPPL2b Mutanten durchzuführen, wurde das isolierte Membranpellet (siehe 3.6.1) in 100 µl Basis-Puffer aufgenommen und nachfolgend in 5 Aliquots zu je 20 µl geteilt. Die einzelnen Aliquots wurden jeweils für 0, 1, 2, 4 oder 6 h im Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der individuellen Inkubationszeit wurde jede Probe bis zum Ende des längsten Zeitpunkts (6 h) auf Eis gelagert.

Zur Abtrennung von Lipiden erfolgte anschließend eine Fällung der Proteine mit 120 µl Chloroform und Methanol (CHCl<sub>3</sub> / MeOH 1:2) für 30 min auf Eis. Nach Zentrifugation bei 4°C und 16.000 g für 20 min wurde das jeweilige Pellet in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 65°C aufgeköcht.

### 3.6.3 Antikörper

Sämtliche in dieser Studie verwendeten Antikörper finden sich in Tabelle 3.10.

Name	Epitop	Organismus	Bezug
3F10 HRP	HA-Tag (YPYDVPDYA)	Ratte	Roche
6908 poly	HA-Tag (YPYDVPDYA)	Kaninchen	Sigma
Flag M2	Flag-Tag (DYKDDDDK)	Maus	Roche
V5 mono	V5-Tag (GKIPNPLLGLDST)	Maus	Invitrogen
V5 poly	V5-Tag (GKIPNPLLGLDST)	Kaninchen	Chemicon
$\alpha$ -Kaninchen HRP	IgG Kaninchen	Maus	Promega
$\alpha$ -Maus HRP	IgG Maus	Maus	Promega

**Tab. 3.10 Antikörper**

### 3.6.4 Immunpräzipitation

*STEN | Protein-A-Sepharose | SDS-Probenpuffer*

Die Detektion bestimmter Proteine erfolgte nach zuvoriger Anreicherung mittels Immunpräzipitation. Dies betraf SPPL2b aus Zelllysats (mittels 6908 poly) sowie die extrazellulären Fragmente TNF $\alpha$  C-Peptid und TNF $\alpha$  Ektodomäne aus konditioniertem Medium (mittels V5 poly).

Hierzu wurde das Ausgangsmaterial mit je 1  $\mu$ l der entsprechenden Antikörper-Lösung sowie 20  $\mu$ l Protein-A-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Im Anschluss an die Immunpräzipitation wurden die Proben dreimal mit je 1ml STEN gewaschen und nachfolgend in 20  $\mu$ l 2x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 65°C aufgekocht.

### 3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

*Acrylamid | Lower-Tris | Upper-Tris | SDS-Laufpuffer | TEMED | APS*

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Proteinmasse wurde unter denaturierenden Bedingungen die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Tabelle 3.11 zeigt die Zusammensetzung sowohl der

Bestandteil	Trenngel (16 ml)	Sammelgel (10 ml)
H <sub>2</sub> O	8.0 ml	6.5 ml
Acrylamid (40%)	4.0 ml	1.0 ml
4x Lower-Tris	4.0 ml	-
4x Upper-Tris	-	2.5 ml
TEMED	30 µl	30 µl
APS	30 µl	30 µl

**Tab. 3.11 Rezeptur für 10% SDS-Gele**

Sammelgele als auch der 10% Trenngele, welche zur Analyse von SPPL2b verwendet wurden. Für die Auftrennung und Analyse sämtlicher TNF $\alpha$  Fragmente wurden Tris-Tricine Gradientengele verwendet (nach Schagger und von Jagow, 1987), deren Zusammensetzung in Tabelle 3.12 wiedergegeben ist.

Die Vorbereitung der Gele sowie die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte mittels des Mini-PROTEAN 3-Systems (Bio-Rad). Zuvor in 2x SDS-Probenpuffer aufgekochte Proben wurden mit einer Glasspritze (Hamilton) in die Taschen des Sammelgels gegeben. Bis zum Erreichen des Trenn- oder Zwischengels wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt, anschließend mit 120 V. Als Größenstandard dienten jeweils 10 µl SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Standard (Invitrogen).

Bestandteil	Trenngel	Zwischengel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	-	3.5 ml	4.2 ml
Acrylamid	4 ml	1.5 ml	0.5 ml
Glycerin	3.0 ml	-	-
Kathodenpuffer	3.5 ml	2.5 ml	1.55 ml
TEMED	65 µl	70 µl	50 µl
APS	6.5 µl	8 µl	10 µl

**Tab. 3.12 Rezeptur für Schagger-Gele**

### 3.6.6 Western Blot

*Isopropanol | Transfermembranen | Blotpuffer | I-Block | TBST | ECL-Reagenz*

Nach erfolgter SDS-PAGE zur Auftrennung wurden die Proteine mittels Western Blot detektiert. Für den Transfer der Proteine wurden im Normalfall Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Transfermembranen (Immobilon-P, Merck Millipore) verwendet, die kurz mit Isopropanol benetzt, in Bidest H<sub>2</sub>O gewaschen und in Blotpuffer für einige Minuten inkubiert worden waren. Der eigentliche Transfer erfolgte mittels des Mini-PROTEAN 3-Systems (Bio-Rad) für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA.

Für den Nachweis der TNF $\alpha$  C-Peptide wurden spezielle Nitrocellulose-Transfermembranen mit einer Porengröße von 0.1  $\mu$ m (Protran<sup>®</sup>, Whatman) eingesetzt, wobei diese Membranen nach erfolgtem Proteintransfer zusätzlich für 5 min in kochendem PBS inkubiert wurden.

Im Anschluss an den Proteintransfer wurden die Membranen zur Reduktion des Hintergrundes mit I-Block Reagenz (Tropix) für 1 h bei RT inkubiert, bevor über Nacht bei 4°C der gewünschte Primärantikörper zugegeben wurde (3F10 HRP 1:2.000; V5 mono 1:1.500; Flag M2 1:1.000 in I-Block).

Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurde wiederum für 1 h bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert ( $\alpha$ -Kaninchen HRP 1:20.000;  $\alpha$ -Maus HRP 1:10.000 in I-Block), welche zur Erzeugung der Chemilumineszenz an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt sind. Hiervon ausgenommen waren mit 3F10 HRP inkubierte Membranen, da dieser Primärantikörper bereits an HRP gekoppelt ist.

Nach erneutem dreimaligen Waschen in 1x TBST wurden die Membranen mittels Amersham ECL Western Blot Detektions-Reagenz (GE Healthcare) nach Herstellerangaben entwickelt. Die Proteine wurden anschließend anhand der Chemilumineszenz auf Universalfilm Super RX (Fuji) detektiert.

### 3.7 Quantifizierung der Bandenintensität und Statistik

#### *ECL Plus-Reagenz*

Im Falle der *in vitro* time-course Experimente wurden nach herkömmlicher Entwicklung des Western Blots zusätzlich die Bandenintensitäten quantifiziert. Hierzu fand das Amersham ECL Plus Western Blot Detektions-System (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben Verwendung, welches eine über längere Zeit stabile Chemilumineszenz ermöglicht. Als Chemilumineszenz-Detektor wurde FluorChem IS-8900 (Alpha Innotec) genutzt, mittels der zugehörigen Software AlphaView™ Q wurden die Bandenintensitäten im linearen Bereich erfasst und quantifiziert. Zur Subtraktion des Hintergrundes diente ein entsprechender Kontrollausschnitt des identischen Western Blots.

Zur quantitativen Erfassung der proteolytischen Aktivität der SPPL2b Mutanten im Vergleich zu SPPL2b wt wurde die Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF folgendermaßen bestimmt:

Jeweils für SPPL2b wt sowie SPPL2b Mutante getrennt voneinander wurde die Intensität von TNF $\alpha$  NTF zum Zeitpunkt  $t = 0$  h auf 100% festgelegt. Für alle folgenden Zeitpunkte wurde wiederum die Intensität von TNF $\alpha$  NTF bestimmt und in Bezug gesetzt zur entsprechenden Ausgangsintensität. Auf diese Weise errechnet sich für die Zeitpunkte 1, 2, 4 und 6 h die jeweilige prozentuale Restintensität des Substrates TNF $\alpha$  NTF, getrennt voneinander für SPPL2b wt und die SPPL2b Mutante.

Aus drei unabhängigen Experimenten wurde für jeden Zeitpunkt der Mittelwert der prozentualen Restintensitäten gebildet sowie die Standardabweichung (SD) berechnet. Mittels beidseitigem t-Test wurde auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen SPPL2b wt und SPPL2b Mutante getestet, wobei die Signifikanzniveaus der p-Werte hier entsprechend abgebildet wurden zu \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) bzw. \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

### 3.8 MALDI-TOF Massenspektrometrie

*Basis-Puffer | SPP Stock-Puffer | DDM | Flag M2 Agarose | IP/MS-Puffer | Matrix-Puffer*

Eine qualitative Analyse von potentiell veränderten Produkt-Spezies der TNF $\alpha$  ICDs und C-Peptide erfolgte über die MALDI-TOF Massenspektrometrie. Im Falle der TNF $\alpha$  ICDs wurden TR-Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt oder der entsprechenden SPPL2b Mutante transient mit N-terminal Flag-markiertem TNF $\alpha$  FL transfiziert. Nach einer Inkubation von mindestens 24 h wurden die Zellpellets abgesammelt und wie beschrieben Zellmembranen präpariert (siehe 3.6.1). Nach Aufnahme in 250  $\mu$ l Basis-Puffer und Inkubation im Thermoschüttler bei 37°C für 1 h erfolgte die Lyse durch Zugabe von 50  $\mu$ l *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM) 10% sowie 700  $\mu$ l SPP Stock-Puffer, zu einer Endkonzentration von etwa 2% DDM. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Zur Immunpräzipitation der TNF $\alpha$  ICDs erfolgte die Zugabe von 10  $\mu$ l Flag M2 Agarose zum löslichen Überstand.

Im Falle der TNF $\alpha$  C-Peptide wurde analog transient transfiziert mit C-terminal Flag AP-markiertem TNF $\alpha$  NTF, um eine unspezifische Degradation der C-Peptide im Medium zu verhindern. Nach einer Inkubation von mindestens 24 h wurde das konditionierte Medium abgenommen, für 30 min bei 5.500 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 20  $\mu$ l Flag M2 Agarose versetzt.

Die Immunpräzipitation aller Proben erfolgte über Nacht bei 4°C, im Anschluss wurde dreimal mit IP/MS-Puffer und zweimal mit Bidest H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Elution gebundener Peptide wurden zu der Flag M2 Agarose 10  $\mu$ l Matrix-Puffer hinzugegeben, wovon 6x 0.8  $\mu$ l auf eine Probenplatte aufgetragen wurden. Die Analyse der Peptide erfolgte durch Dr. Akio Fukumori mit einem MALDI-TOF Voyager-DE STR (Applied Biosystems) Massenspektrometer im linearen Modus und externer Kalibration. Die Rohdaten wurden mittels Data Explorer® (Applied Biosystems) und GPMW (Lighthouse data) ausgewertet und auf die Masse der TNF $\alpha$  ICD 1 - 39 bzw. des TNF $\alpha$  C-Peptides 50 normiert.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Weiterentwickelte Analysemethoden zur Untersuchung der Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$

Unter den bekannten Substraten von SPPL2b ist TNF $\alpha$  von besonderem Interesse, da der Umsetzung von TNF $\alpha$  analog zur  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP ein sequentieller Proteolysemechanismus zugrunde zu liegen scheint (siehe auch 1.2.2.4 & 1.3.2). Vermutlich beginnt die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  mit einem initialen Schnitt zwischen den Aminosäuren 49 und 50 des TNF $\alpha$  NTF, woraufhin ein TNF $\alpha$  C-Peptid N-terminal beginnend mit Leucin 50 freigesetzt wird (Fluhrer et al., 2006). Massenspektrometrisch konnten bislang TNF $\alpha$  ICDs mit einem C-terminalen Serin 34 (TNF $\alpha$  ICD 1 - 34) oder Leucin 39 (TNF $\alpha$  ICD 1 - 39) nachgewiesen werden (Fluhrer et al., 2006), der massenspektrometrische Nachweis von potentiell palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs (siehe 1.2.2.4) gelang bisher jedoch nicht.

Eine erste Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die bereits etablierten Analysemethoden der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  weiterzuentwickeln und zu adaptieren, um eine sensitive und robuste Detektion der Schnittprodukte zu gewährleisten. Zur Analyse der katalytischen Aktivität von SPPL2b wurden zwei unabhängige Untersuchungstechniken angewandt. Zum einen ein *in vitro* Assay (= *in vitro* time-course Analyse) zur Quantifizierung der Substratumsetzung und zur Untersuchung der zeitabhängigen TNF $\alpha$  ICD-Konversion (siehe 4.1.1), andererseits die MALDI-TOF Massenspektrometrie (siehe 4.1.2) zur eindeutigen Identifikation der verschiedenen TNF $\alpha$  Produkt-Spezies.

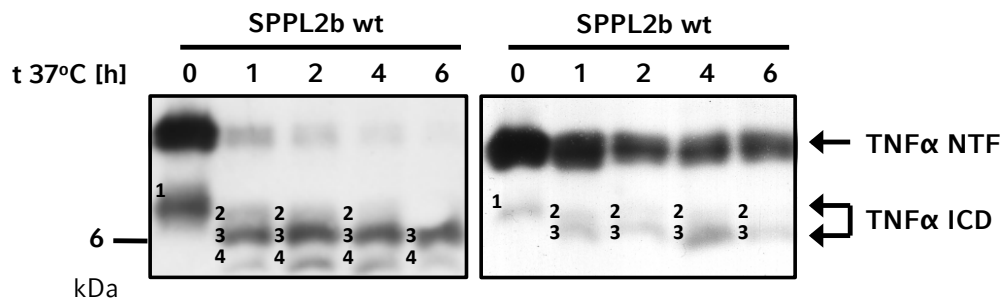
#### 4.1.1 Nachweis der TNF $\alpha$ ICD-Konversion mittels *in vitro* time-course Analyse

Um nachfolgend den Einfluss von Mutationen des PAL-Motivs auf die katalytische Aktivität von SPPL2b quantifizieren sowie die Konversion der TNF $\alpha$  ICDs genauer studieren zu können, ist eine Beobachtung des zeitlichen

Verlaufs der Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  nötig. Hierzu wurde die *in vitro* time-course Analyse (nach Fluhrer et al., 2008) angewendet (siehe 3.6.2). Die Adaptierung dieses *in vitro* Assays beinhaltete hier einerseits die Festlegung auf die wesentlichen Messzeitpunkte des time courses, was die standardisierte Beobachtung der Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF durch verschiedene Mutanten im Vergleich ermöglicht. Andererseits wurde die Acrylamid-Konzentration innerhalb der Trenngel-Fraktion des Tris-Tricine Gradientengels erhöht (siehe 3.6.5), um im Rahmen der TNF $\alpha$  ICD-Konversion potentiell kleinere ICD-Spezies im Western Blot (WB) nachweisen zu können.

Zur Analyse wurde die Membranfraktion aus HEK293 Zellen isoliert, die den SPPL2b Wildtyp (SPPL2b wt) sowie das Substrat TNF $\alpha$  koexprimieren. Diese Membranpräparationen wurden für unterschiedlich lange Zeiträume bei 37°C inkubiert und die resultierenden TNF $\alpha$ -Produkte mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die exogene Expression des Substrates TNF $\alpha$  FL (N-terminal Flag- und C-terminal V5-markiert) erlaubte den Nachweis von TNF $\alpha$  NTF und TNF $\alpha$  ICDs mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers in Membranpräparationen sowie der TNF $\alpha$  Ektodomäne mit einem anti-V5 Antikörper in Zellkulturüberständen (zur Prozessierung von TNF $\alpha$  siehe 1.2.2.4).

Die Analyse dieser Membranfraktionen zeigte eine Umsetzung des direkten Substrates, TNF $\alpha$  NTF, wie früher beschrieben (Fluhrer et al., 2008). Dies ist erkennbar an der im Zeitverlauf sukzessiven Abnahme der Bandenintensität von TNF $\alpha$  NTF (Abb. 4.1), welches von SPPL2b proteolytisch gespalten wird. Die Betrachtung der intrazellulären Produkte dieser Intramembranproteolyse, den TNF $\alpha$  ICD-Spezies, zeigte für SPPL2b wt die bereits beschriebene Konversion (Fluhrer et al., 2008) von längeren (Peptid 1 bei Zeitpunkt 0 h) hin zu kürzeren ICDs (Peptide 2, 3 & 4 ab Zeitpunkt 1 h) (Abb. 4.1, links). Zu beachten ist hierbei, dass bereits zum Zeitpunkt 0 h Produkte (Peptid 1) nachweisbar sind. Dies rührt höchst wahrscheinlich aus der Tatsache, dass SPPL2b auch vor der *in vitro* Inkubation katalytisch aktiv ist und es bereits während der Isolation der Membranfraktion zur Proteolyse von TNF $\alpha$  NTF kommt. Mittels der hier angewandten Erhöhung der Acrylamid-Konzentration innerhalb der Trenngel-Fraktion gelang gleichsam der erstmalige Nachweis zusätzlicher, kleinerer TNF $\alpha$  ICD-Spezies im WB (Abb. 4.1, links, Peptid 4).



**Abb. 4.1 Zwei unabhängige SPPL2b wt *in vitro* time-course Analysen**

Stabil SPPL2b wt exprimierende HEK293 Zellen wurden transient mit TNFα FL kotransfiziert. Isolierte Membranfraktionen wurden *in vitro* für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. TNFα Fragmente wurden mittels anti-Flag WB detektiert. Über die Zeit kommt es zur Konversion von längeren (1) hin zu kürzeren (2,3,4) TNFα ICDs. Zwei unabhängige Experimente mit Tris-Tricine Gradientengelen (links & rechts).

Die proteolytische Aktivität von SPPL2b wt wies im direkten Vergleich zweier unabhängiger Experimente eine technisch bedingte inhärente Variabilität auf. So war der verbliebene TNFα NTF-Spiegel in den späten Zeitpunkten 4 und 6 h in einem Experiment (Abb. 4.1, rechts) deutlich höher als in einer anderen, unabhängigen time-course Analyse (Abb. 4.1, links). Typischerweise bleiben nach 1 h Inkubation noch ca. 20 - 40% des initialen TNFα NTF-Spiegels nachweisbar (Abb. 4.8ff). Die Hauptursache hierfür ist in der transienten Transfektion von TNFα zu sehen. Aufgrund der Vielzahl an zu untersuchenden SPPL2b Mutanten wurde die transiente Transfektion von TNFα gewählt, wodurch sich stets gewisse Schwankungen des Substratspiegels ergeben. Zusätzlich zeigte sich eine gewisse Variabilität auf Ebene der TNFα ICD-Konversion. Hoch reproduzierbar wurden die Peptide 2 und 3 ab 1 h Inkubation nachgewiesen (Abb. 4.1, links & rechts). Aufgrund einer inkonstanten Transfereffizienz des WB können jedoch insbesondere die kleineren TNFα ICD-Spezies nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der Sensitivität wurde so in einem Experiment Peptid 4 zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen (Abb. 4.1, rechts), im anderen Fall bereits zum Zeitpunkt 1 h (Abb. 4.1, links).

Um im Rahmen der Analyse der katalytischen Aktivität einzelner SPPL2b Mutanten die technisch bedingte Variabilität zu minimieren, wurde im Folgenden stets ein paarweiser Ansatz gewählt: jeweils eine SPPL2b Mutante

wurde im direkten Vergleich zu SPPL2b wt charakterisiert (siehe 4.2.1ff). Hierbei erfolgte pro Zeitpunkt eine Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel in der Mutante bezogen auf das parallel durchgeführte Experiment mit SPPL2b wt (siehe 3.7). Eine Mittelwertbildung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermöglichte die Erfassung von signifikanten Unterschieden zwischen SPPL2b wt und PAL-Motiv Mutanten im Umsatz von TNF $\alpha$  NTF (siehe 4.3.1ff). Auf diese Weise wird ebenfalls der Variabilität im Rahmen der Membranpräparationen und der time-course Analyse Rechnung getragen, da sowohl SPPL2b Mutante als auch SPPL2b wt parallel unter identischen Bedingungen präpariert werden.

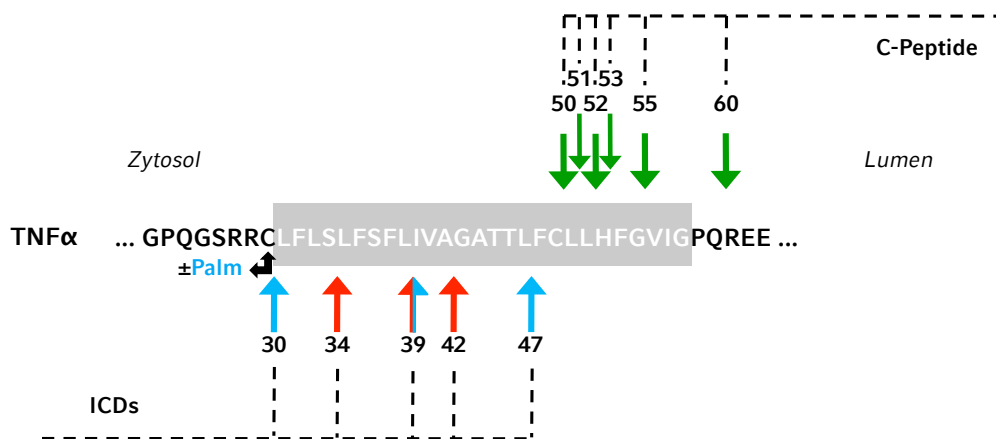
#### **4.1.2 Detektion von TNF $\alpha$ ICDs und C-Peptiden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie**

Zur qualitativen Charakterisierung der TNF $\alpha$  Produkte, die durch SPPL2b-abhängige Proteolyse entstehen, und zum Nachweis potentiell veränderter Produkt-Spezies durch SPPL2b Mutanten wurden TNF $\alpha$  ICDs und TNF $\alpha$  C-Peptide mittels der Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie analysiert (siehe 3.8).

Zunächst wurden zum Nachweis der TNF $\alpha$  ICD-Spezies SPPL2b wt und N-terminal Flag-markiertes TNF $\alpha$  FL in HEK293 Zellen koexprimiert. Die gebildeten TNF $\alpha$  ICDs wurden mittels anti-Flag Immunopräzipitation isoliert und massenspektrometrisch identifiziert (siehe 3.8). Abbildung 4.2 gibt einen schematischen Überblick über die nachgewiesenen TNF $\alpha$  Produkt-Spezies; im Anhang finden sich stets die zur Identifizierung verwendeten, theoretischen Massen, hierbei wurde eine N-terminale Acetylierung des Start-Methionins als cotranslationale Modifizierung zu Grunde gelegt (Fluhrer et al., 2006).

Die Analyse der TNF $\alpha$  ICD-Spezies in der Massenspektrometrie ergab eine Reihe charakteristischer Peptide. Unter anderem wurden die bereits beschriebenen TNF $\alpha$  ICDs 1 - 34 sowie 1 - 39 (Abb. 4.3-A, rot) nachgewiesen (Fluhrer et al., 2006). Interessanterweise resultieren die ICD-Spezies mit höchster Intensität aus der Palmitoylierung an Cystein 30 (siehe 1.2.2.4) (Abb. 4.3-A, blau). Der Nachweis, dass es sich bei diesen Peaks um palmitoylierte

## ERGEBNISSE



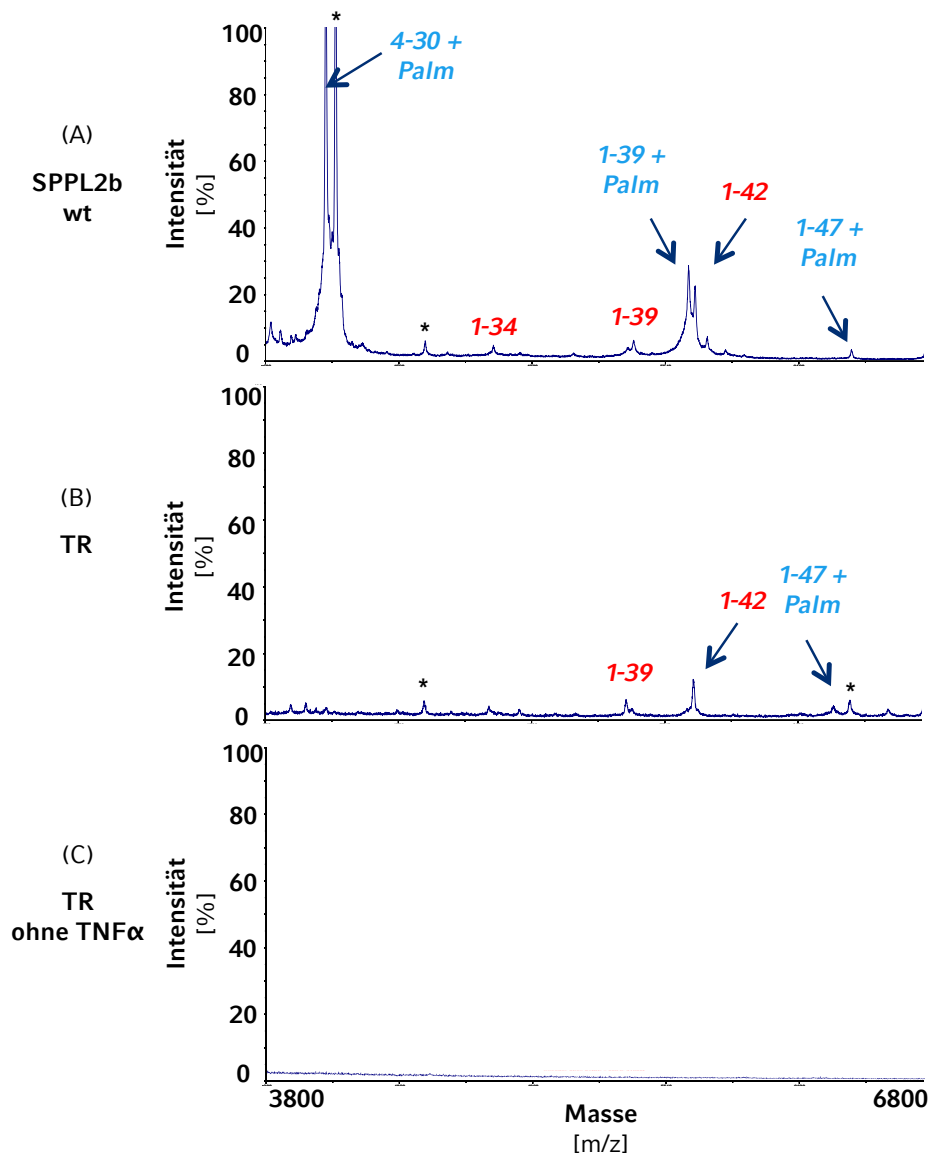
**Abb. 4.2 Schematische Übersicht der mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie nachweisbaren TNFα Produkt-Spezies**

Die in der MALDI-TOF Massenspektrometrie gemessenen Produkt-Spezies der TNFα ICDs umfassen Sequenzen bis zur markierten Aminosäure und sind palmitoyliert (blau) oder nicht palmitoyliert (rot). Die gemessenen TNFα C-Peptide beginnen N-terminal entsprechend (grün). TNFα ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert sein (Utsumi et al., 2001) ( $\pm$ Palm) und tragen sehr wahrscheinlich eine N-terminale Acetylierung (Fluhrer et al., 2006).

TNFα ICDs handelt, gelang mittels Analyse eines an Cystein 30 mutiertem TNFα Konstrukt (Fluhrer et al., unpubliziert) (siehe 5.1.1.2). Der erstmalige massenspektrometrische Nachweis einer palmitoylierten TNFα ICD lässt sich hierbei durch die Anwendung eines adaptierten Protokolls (siehe 3.8) erklären, bei der auf die ursprünglich im Matrix-Puffer verwendete Ameisensäure (Fluhrer et al., 2006) verzichtet wurde. Auf diese Weise konnten unter Vermeidung einer sauren Hydrolyse palmitoylierte TNFα ICD-Spezies mittels MALDI-TOF identifiziert werden, welche die Aminosäuren 4 - 30, 1 - 39 und 1 - 47 umfassen (Abb. 4.3-A, blau).

Zum Nachweis der spezifischen SPPL2b-abhängigen Produktion dieser TNFα ICDs wurde TNFα FL auch in HEK293 Zellen exprimiert, die über keine exogene Expression der Protease SPPL2b verfügen (Abb. 4.3-B). Erwartungsgemäß wurden hier nur sehr geringe Mengen an Produkt-Spezies detektiert, und zwar die nicht palmitoylierten TNFα ICDs 1 - 39 und 1 - 42 (Abb. 4.3-B, rot) sowie die palmitoylierte TNFα ICD 1 - 47 (Abb. 4.3-B, blau). Diese im Vergleich zur Situation unter Überexpression von SPPL2b wt (Abb. 4.3-A) sehr geringen Mengen an vornehmlich längeren TNFα ICDs spricht für eine geringe katalytische Restaktivität, vereinbar mit dem endogenen

Hintergrund an nativem SPPL2b in den verwendeten HEK293 Zellen. Im Falle der Leerkontrolle aus untransfizierten HEK293 Zellen (Fluhrer et al., unpubliziert) wurden keinerlei TNF $\alpha$  ICDs detektiert (Abb. 4.3-C).

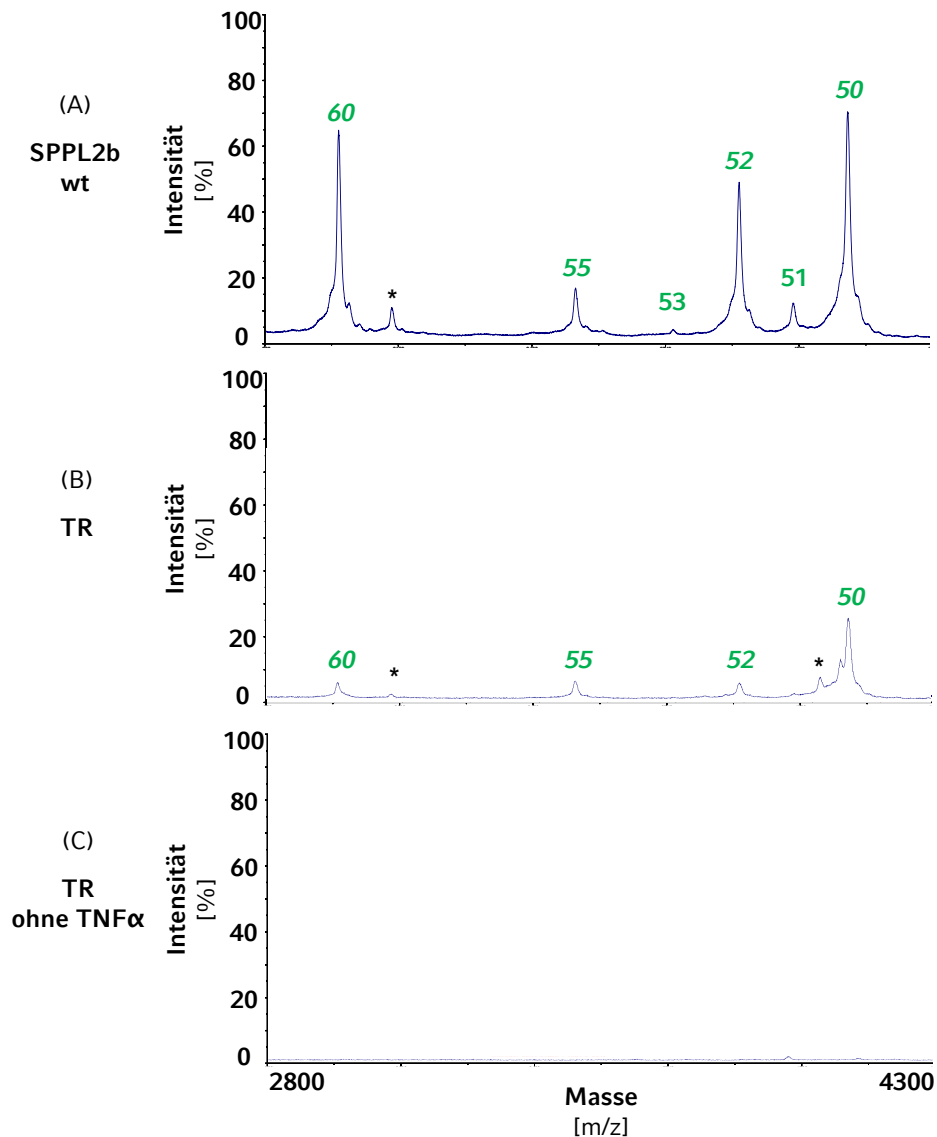


**Abb. 4.3 MALDI-TOF Analyse der TNF $\alpha$  ICDs**

(A, B, C) Nach Kotretransfektion von TNF $\alpha$  FL in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder ohne exogene SPPL2b-Expression (B) bzw. untransfizierten HEK293 Zellen (C) wurden mittels anti-Flag Immunopräzipitation TNF $\alpha$  ICDs isoliert und per MALDI-TOF MS analysiert. (C) aus (Fluhrer et al., unpubliziert). TNF $\alpha$  ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert (Palm) sein (blau) oder sind nicht palmitoyliert (rot). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNF $\alpha$  Produkt-Spezies zuzuordnen.

Definierte TNF $\alpha$  C-Peptid-Spezies konnten bisher ausschließlich mittels Radiosequenzierung nachgewiesen werden (Fluhrer et al., 2006; 2008). Zur Detektion via MALDI-TOF MS wurde ein C-terminal Flag AP-markiertes TNF $\alpha$  NTF kloniert (siehe 3.4.2), bei dem die C-terminalen Aminosäuren Alanin und



**Abb. 4.4 MALDI-TOF Analyse der TNF $\alpha$  C-Peptide**

(A, B, C) Zur Detektion der TNF $\alpha$  C-Peptide wurde ein C-terminal Flag AP-markiertes TNF $\alpha$  NTF in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder ohne exogene SPPL2b-Expression (B) transient kotransfiziert bzw. untransfizierte HEK293 Zellen (C) verwendet, anti-Flag immunopräzipitiert und per MALDI-TOF MS analysiert. (C) aus (Fluhrer et al., unpubliziert). Die Produkte stellen C-Peptide dar, deren N-Termini mit den Aminosäuren 50, 51, 52, 53, 55 oder 60 beginnen. Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNF $\alpha$  Produkt-Spezies zuzuordnen.

Prolin vor Degradation des C-Peptids durch Carboxypeptidasen des Mediums schützen. Die Koexpression dieses Konstruktes mit SPPL2b wt in HEK293 Zellen ermöglichte nach anti-Flag Immunpräzipitation aus konditioniertem Medium (siehe 3.8) erstmals den massenspektrometrischen Nachweis von TNF $\alpha$  C-Peptiden. Neben den bereits bekannten TNF $\alpha$  C-Peptiden beginnend ab den Aminosäuren 50 und 52 (Fluhrer et al., 2006) konnten erstmalig neue TNF $\alpha$  C-Peptide nachgewiesen werden, die mit den Aminosäuren 51, 53, 55 oder 60 beginnen (Abb. 4.4-A). Die letztgenannte Spezies, ein TNF $\alpha$  C-Peptid beginnend mit Aminosäure 60, stellt ein neues, abundantes Produkt und damit das kleinste bisher beschriebene TNF $\alpha$  C-Peptid dar.

Wiederum vereinbar mit dem endogenen SPPL2b-Hintergrund der verwendeten HEK293 Zellen wurden ohne Überexpression der Protease nur sehr geringe Mengen an C-Peptiden nachgewiesen (Abb. 4.4-B), nämlich die TNF $\alpha$  C-Peptide 50, 52, 55 und 60. In der Leerkontrolle aus untransfizierten HEK293 Zellen (Fluhrer et al., unpubliziert) wurden ebenfalls keinerlei TNF $\alpha$  C-Peptide nachgewiesen (Abb. 4.3-C).

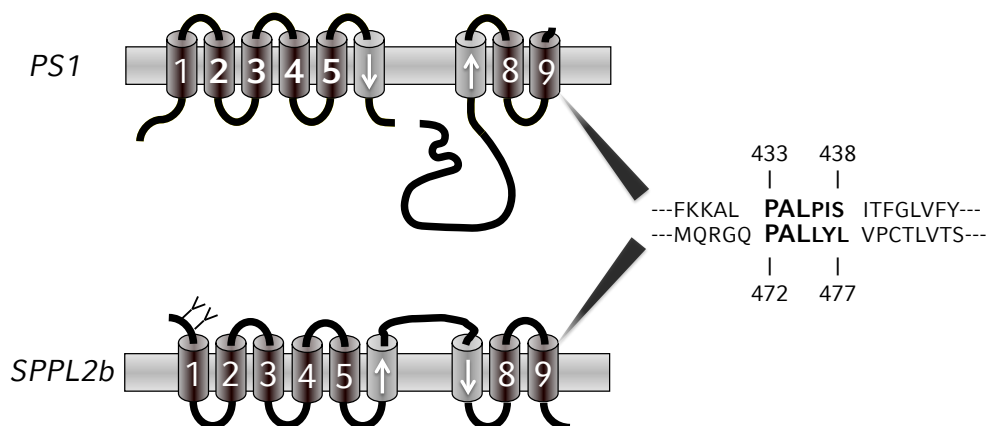
Zusammenfassend konnten durch die soeben beschriebenen, adaptierten Analysemethoden neue TNF $\alpha$  Produkt-Spezies für die SPPL2b wt Protease mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Auf der Ebene der TNF $\alpha$  ICDs gelang durch das Weglassen der Ameisensäure im Matrix-Puffer der erste massenspektrometrische Nachweis von palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs als Produkt der SPPL2b-abhängigen Proteolyse von TNF $\alpha$ . Die Verwendung des Flag AP-markierten TNF $\alpha$  NTFs ermöglichte darüber hinaus den massenspektrometrischen Nachweis sowohl von bekannten als auch von neuen TNF $\alpha$  C-Peptiden. In Kombination mit der zuvor beschriebenen *in vitro* time-course Analyse (siehe 4.1.1) wurde im Folgenden eine Charakterisierung der katalytischen Aktivität von SPPL2b PAL-Motiv Mutanten durchgeführt.



## 4.2 Das PAL-Motiv ist essentiell für die katalytische Aktivität der SPPL2b Protease

Eine Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin herauszufinden, ob das konservierte C-terminale PAL-Motiv von funktioneller Bedeutung für die katalytische Aktivität der SPPL2b Protease ist. Hierzu wurden die einzelnen Aminosäuren des PAL-Motivs systematisch mutiert. Anschließend wurde die Funktionalität dieser PAL-Motiv Varianten in Bezug auf den Umsatz des SPPL2b Substrates TNF $\alpha$  analysiert.

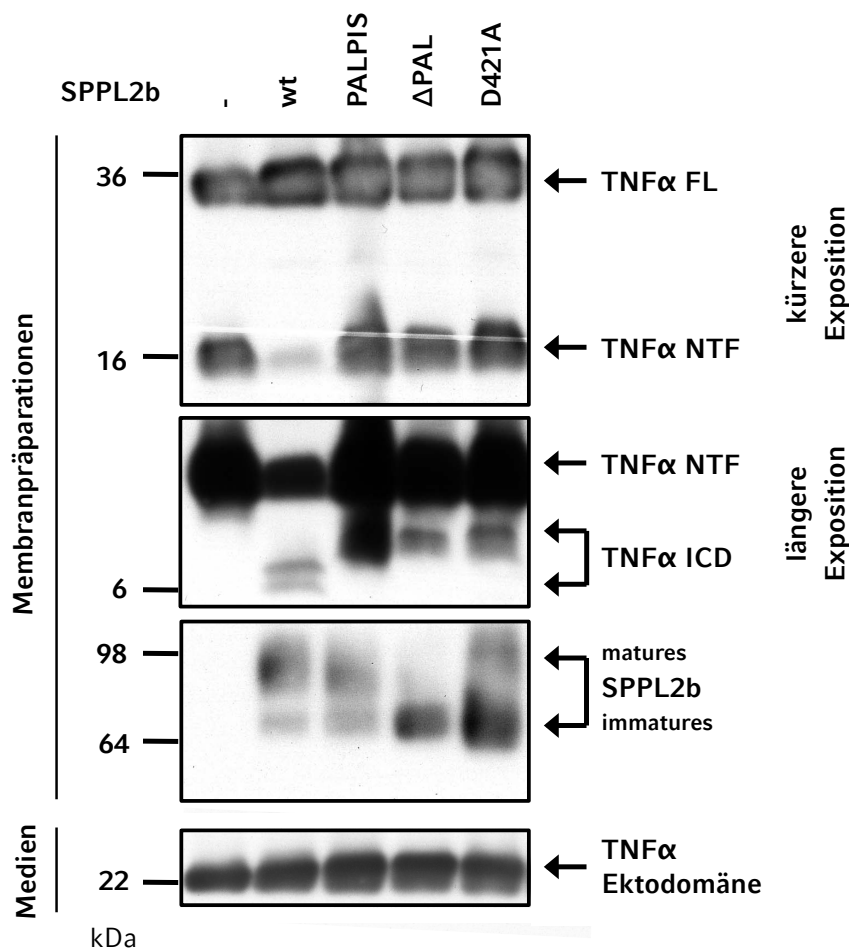
Für den Nachweis einer grundsätzlichen funktionellen Bedeutung des PAL-Motivs hinsichtlich der proteolytischen Aktivität von SPPL2b wurden zunächst zwei verschiedene SPPL2b-Varianten kloniert. Zum einen wurde das PAL-Motiv, die Aminosäuren 472 bis 474 von SPPL2b, deletiert (SPPL2b  $\Delta$ PAL), um die grundsätzliche Bedeutung des eigentlichen PAL-Motivs zu analysieren. Zum anderen wurde die Sequenz des erweiterten PAL-Motivs, die Aminosäuren 472 bis 477 in SPPL2b, gegen die Aminosäuren 433 bis 438 von PS1 ausgetauscht (SPPL2b PALPIS), um auch die Bedeutung des erweiterten PAL-Motivs der beiden Subfamilien zu adressieren. Das erweiterte PAL-Motiv wurde dabei definiert als diejenige Aminosäuresequenz, welche innerhalb der Preseniline als PALPIS bzw. innerhalb der SPP/SPPL-Familie als PALLYL



**Abb. 4.5 Gegenüberstellung des erweiterten PAL-Motivs**

Das PAL-Motiv in TMD 9 ist innerhalb der Familie der Presenilin-Proteine, PS1 und PS2, als PALPIS und innerhalb der SPP/SPPL-Familie als PALLYL konserviert. Der Ausschnitt stellt die jeweilige Aminosäuresequenz von PS1 und SPPL2b dar. SPPL2b besitzt N-terminale Glykosylierungs-Konsensusmotive (Y), die Pfeile stellen den Verlauf der Aminosäuresequenz von N- nach C-terminal dar.

konserviert ist (Abb. 4.5). In Ermangelung guter Antikörper gegen natives SPPL2b wurden zur Detektion im WB sämtliche SPPL2b-Varianten C-terminal HA-markiert. Zur Analyse der katalytischen Aktivität der SPPL2b Mutanten wurde TNF $\alpha$  FL (N-terminal Flag- und C-terminal V5-markiert) kotransfiziert. In Membranpräparationen von HEK293 Zelllinien mit stabiler Expression der SPPL2b Mutanten zeigten sich identische Expressionslevel von TNF $\alpha$  FL (Abb. 4.6). Ebenso fand sich kein Unterschied in der Menge an sezernierter TNF $\alpha$  Ektodomäne im konditionierten Medium (Abb. 4.6). Dies schließt einen Effekt der PAL-Motiv Mutationen auf den ersten Schritt der regulierten



**Abb. 4.6 Mutationen innerhalb des PAL-Motivs von SPPL2b beeinflussen die Prozessierung von TNF $\alpha$**

HEK293 Zelllinien mit stabiler Expression von SPPL2b wt oder den entsprechenden SPPL2b Mutanten wurden transient mit TNF $\alpha$  FL kotransfiziert. In den hieraus isolierten Membranpräparationen wurden TNF $\alpha$  FL und TNF $\alpha$  Fragmente mittels anti-Flag WB nachgewiesen. SPPL2b wurde mittels anti-HA WB detektiert. Die TNF $\alpha$  Ektodomäne wurde aus konditioniertem Medium mittels anti-V5 IP und WB nachgewiesen.

Intramembranproteolyse (siehe 1.1.1), das Ectodomain Shedding, aus. Allerdings wurde das membranständige Fragment TNF $\alpha$  NTF, das direkte Substrat von SPPL2b, nur durch SPPL2b wt in nachweisbarer Menge umgesetzt. Wie bei der katalytisch inaktiven Mutante SPPL2b D421A (Fluhrer et al., 2006) akkumulierte TNF $\alpha$  NTF sowohl bei Koexpression von SPPL2b PALPIS als auch von SPPL2b  $\Delta$ PAL (Abb. 4.6).

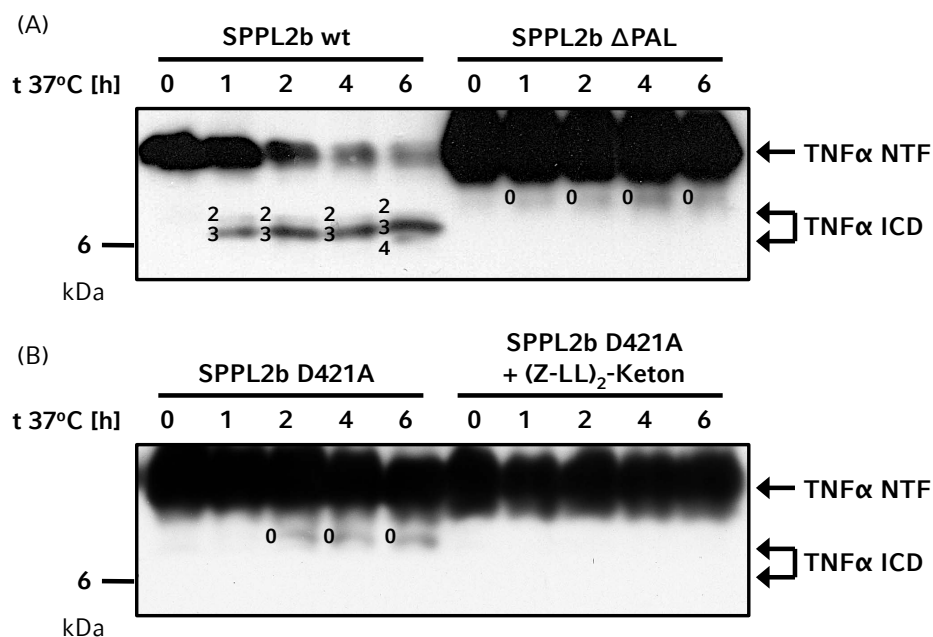
Nur bei Expression von SPPL2b wt konnten die auf normaler Höhe migrierenden intrazellulären Produkte der Intramembranproteolyse, die TNF $\alpha$  ICDs, zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abb. 4.6). Bei den im Falle der Mutanten SPPL2b PALPIS, SPPL2b  $\Delta$ PAL sowie SPPL2b D421A bei längerer Exposition detektierten, leicht höher migrierenden Banden (Abb. 4.6) handelt es sich um einen inkonsistent auftretenden Befund, der bislang ausschließlich bei SPPL2b Mutanten ohne oder mit geringer katalytischer Aktivität nachgewiesen wurde (Fluhrer et al., unpubliziert). Vermutlich stellen dies sehr große TNF $\alpha$  ICDs dar, die nach dem initialen Schnitt des Substrates von der jeweiligen SPPL2b Mutante nicht mehr weiter zu kleineren ICDs prozessiert werden (siehe 4.2.1). Die hier verwendeten HEK293 Zellen exprimieren zudem endogenes SPPL2b (siehe 4.1.2), welches über eine Dimerisierung selbst mit katalytisch inaktiven Mutanten wie SPPL2b D421A gegebenenfalls eine geringe katalytische Restaktivität erklären (siehe 5.1.2) und so zur Produktion von höher migrierenden, größeren TNF $\alpha$  ICDs führen könnte. Um eine funktionelle Rolle des PAL-Motivs bei der sequentiellen Konversion von TNF $\alpha$  ICDs zu untersuchen (siehe 5.2.1), wurden im Folgenden die SPPL2b PAL-Motiv Mutanten mittels *in vitro* time-course Analyse untersucht (siehe 4.2.1ff).

Darüber hinaus zeigte SPPL2b  $\Delta$ PAL, analog zu SPPL2b D421A, eine veränderte Maturierung der Protease im Vergleich zu allen anderen SPPL2b-Varianten. Dies ist anhand der deutlichen Verringerung des Verhältnisses von maturem zu immaturem SPPL2b erkennbar. Die korrekte Faltung von Proteinen ist entscheidend für ihre nachfolgende Maturierung bzw. Komplexglykosylierung in sekretorischen Kompartimenten (Braakman und Bulleid, 2011). Daher könnte die fehlerhafte Maturierung von SPPL2b  $\Delta$ PAL darauf hinweisen, dass die Deletion des PAL-Motivs zu umfangreicheren strukturellen Veränderungen von SPPL2b führt (siehe 5.1.2).

#### 4.2.1 Deletion des PAL-Motivs führt zu katalytisch inaktivem SPPL2b

Zur exakten Untersuchung der Auswirkung von SPPL2b  $\Delta$ PAL auf die TNF $\alpha$  ICD-Konversion erfolgte der paarweise Vergleich mit SPPL2b wt anhand der *in vitro* time-course Analyse.

Bei dieser Untersuchung zeigte SPPL2b  $\Delta$ PAL verglichen mit SPPL2b wt eine starke Akkumulation des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF. Eine Abnahme des Substratspiegels über die Zeit war ebenfalls nicht nachweisbar (Abb. 4.7-A), was für eine deutlich reduzierte katalytische Aktivität von SPPL2b  $\Delta$ PAL spricht. Die detaillierte Analyse der TNF $\alpha$  ICDs ergab für SPPL2b wt die bekannte Konversion von größeren (Peptide 2 & 3 bei Zeitpunkt 1 h) hin zu kleineren ICD-Spezies (Peptide 3 & 4 bei Zeitpunkt 6 h), wohingegen für SPPL2b  $\Delta$ PAL nur ein deutlich höher migrierendes Peptid 0 nachweisbar war (Abb. 4.7-A). Bei diesem Peptid 0 handelt es sich vermutlich um eine sehr große TNF $\alpha$  ICD, welche von SPPL2b  $\Delta$ PAL nicht weiter konvertiert werden kann und die inkonsistent auftretende Bande bei SPPL2b Mutanten ohne



**Abb. 4.7** SPPL2b  $\Delta$ PAL & D421A *in vitro* time-course Analysen

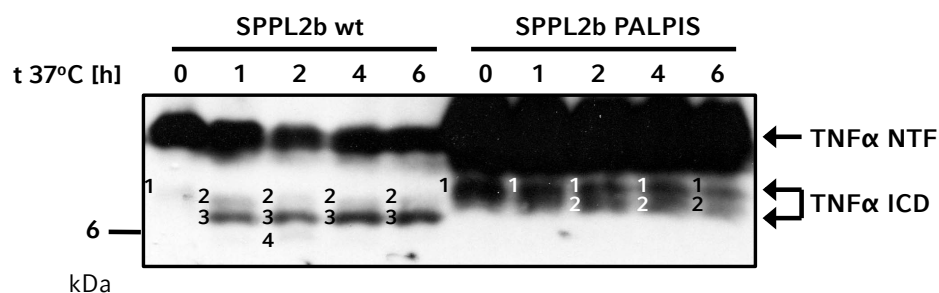
HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt oder SPPL2b  $\Delta$ PAL (A) bzw. SPPL2b D421A (B) wurden transient mit TNF $\alpha$  FL kotransfiziert. Isolierte Membranfraktionen wurden *in vitro* für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert, im Falle von (B) mit oder ohne (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton (30 $\mu$ M). TNF $\alpha$  Fragmente wurden mittels anti-Flag WB dargestellt. Über die Zeit kommt es bei SPPL2b wt (A) zur Konversion von längeren (1) hin zu kürzeren (2,3,4) TNF $\alpha$  ICDs.

katalytische Aktivität widerspiegeln könnte (Fluhrer et al., unpubliziert) (Abb. 4.6). Vereinbar hiermit wird auch bei Expression der katalytisch inaktiven Mutante SPPL2b D421A (Fluhrer et al., 2006) im *in vitro* Assay ein Peptid 0 nachgewiesen (Abb. 4.7-B), dessen Produktion durch Behandlung mit (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton inhibiert werden kann. Folglich wird SPPL2b ΔPAL, analog zu SPPL2b D421A, gegenüber TNFα NTF im Folgenden als katalytisch inaktiv eingestuft.

#### 4.2.2 Austausch des erweiterten PAL-Motivs stört die ICD-Konversion

Wie SPPL2b ΔPAL zeigte auch die SPPL2b PALPIS-Mutante in der time-course Analyse eine deutliche Akkumulation des TNFα NTF ohne nachweisbare Abnahme des Substratspiegels über die Zeit (Abb. 4.8), was für eine deutlich reduzierte katalytische Aktivität von SPPL2b PALPIS spricht. Der Vergleich der Produkte dieser Intramembranproteolyse zeigte, dass SPPL2b PALPIS zum Zeitpunkt 0 h qualitativ vergleichbare ICD-Spezies produziert (Peptid 1) wie SPPL2b wt. Diese konnten aber deutlich schlechter zu kleineren Spezies umgesetzt werden (Peptid 2 erst ab Zeitpunkt 2 h), was zu einer Akkumulation der längeren ICD-Spezies führt.

Zusammenfassend scheint die Sequenzregion sowohl des konservierten als auch des erweiterten PAL-Motivs sehr wichtig für die katalytische Aktivität gegenüber TNFα bzw. für die sequentielle Konversion der TNFα ICDs zu sein.



**Abb. 4.8** SPPL2b PALPIS *in vitro* time-course Analyse

HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt oder SPPL2b PALPIS wurden transient mit TNFα FL kotransfiziert. Isolierte Membranfraktionen wurden *in vitro* für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. TNFα Fragmente wurden mittels anti-Flag WB dargestellt. Über die Zeit kommt es zur Konversion von längeren (1) hin zu kürzeren (SPPL2b wt: 2,3,4 | SPPL2b PALPIS: 2) TNFα ICDs.

### 4.3 Prolin 472 ist die sensitivste Position des PAL-Motivs hinsichtlich der katalytischen Aktivität von SPPL2b

Nachdem die grundlegende funktionelle Bedeutung des PAL-Motivs für die proteolytische Aktivität von SPPL2b gezeigt worden war, sollte im Folgenden die genaue Anforderung an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs für die katalytische Aktivität von SPPL2b untersucht werden.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die charakterisierten Mutationen für Prolin 472, die erste Position des PAL-Motivs in SPPL2b. Innerhalb von Proteinen kann Prolin aufgrund seiner heterozyklischen Struktur die Sekundärstruktur erheblich beeinflussen und ist als Helixdestabilisator beschrieben (Altmann et al., 1990). Für PS1 konnte bereits gezeigt werden, dass das Prolin des PAL-Motivs die restriktivste Position bezüglich der katalytischen Aktivität ist (Wang et al., 2006a), lediglich die Mutation zu Alanin erlaubte eine annähernd normale katalytische Restaktivität. In Analogie hierzu wurden daher für SPPL2b nur Mutationen von Prolin 472 hin zu kleinen aliphatischen Seitenketten analysiert, um einen direkten Vergleich der entsprechenden Mutationen in PS1 (Wang et al., 2006a) und SPPL2b zu ermöglichen.

SPPL2b Variante:	Position:	Mutation zu:
SPPL2b P472A	} Prolin 472	Alanin
SPPL2b P472G		Glycin
SPPL2b P472L		Leucin

**Tab. 4.1 Charakterisierte Mutationen von SPPL2b Prolin 472**

Übersicht aller drei analysierten Mutationen der ersten Position des PAL-Motivs in SPPL2b.

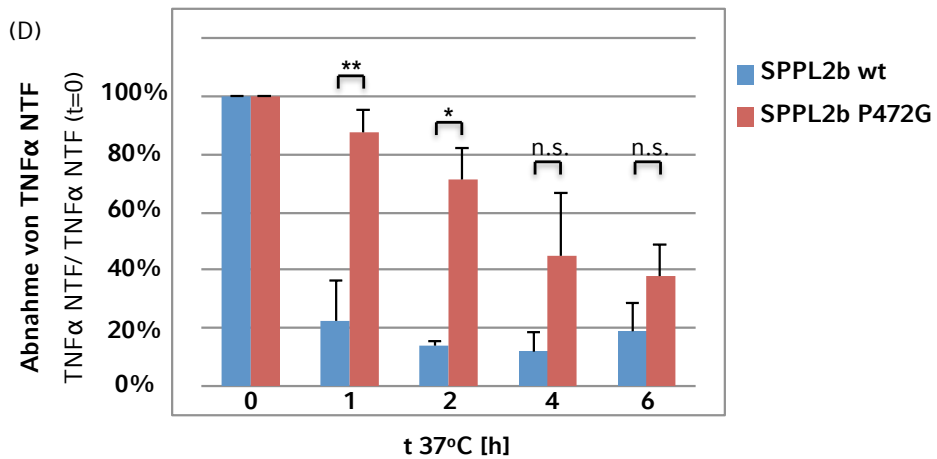
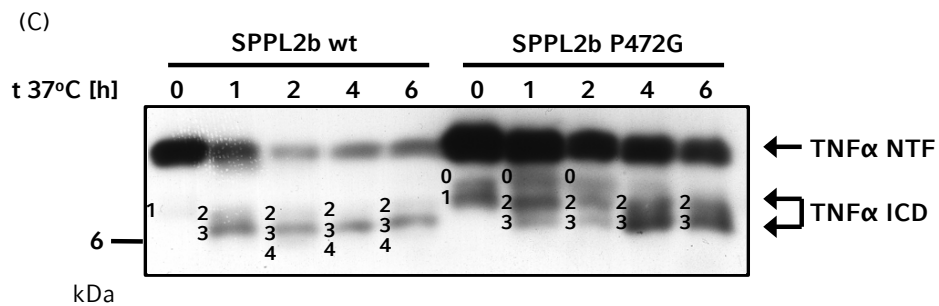
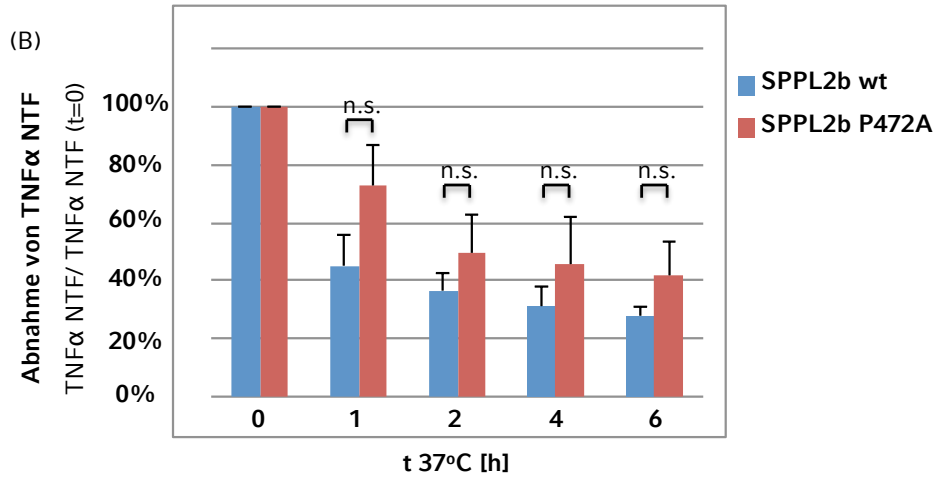
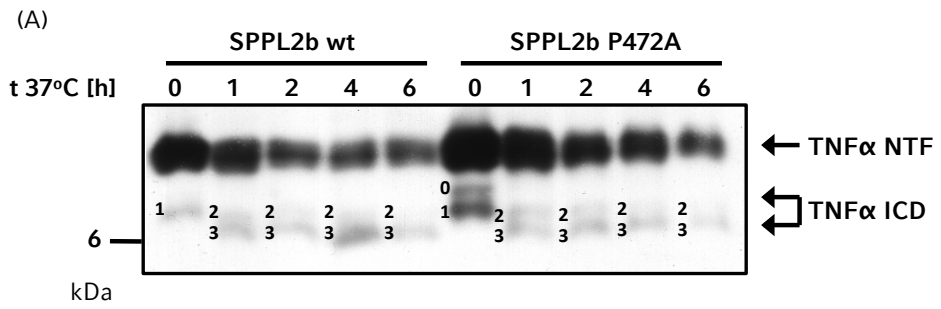
### 4.3.1 *In vitro* time-course Analysen für SPPL2b Prolin 472

Zunächst wurde das heterozyklische Prolin 472 des PAL-Motivs durch ein nicht-zyklisches, aliphatisches Alanin ersetzt (SPPL2b P472A). Zur genauen Bestimmung der katalytischen Aktivität in Bezug auf das Substrat TNF $\alpha$  wurde SPPL2b P472A mittels der *in vitro* time-course Analyse mit SPPL2b wt hinsichtlich Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF verglichen (Abb. 4.9-A). Im Zeitverlauf wurde hier sowohl bei Expression des Wildtyps als auch der Mutante SPPL2b P472A eine Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF beobachtet (Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt (siehe 3.7) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p$  (1 h) = 0.058,  $p$  (2 h) = 0.228,  $p$  (4 h) = 0.260,  $p$  (6 h) = 0.167) zwischen SPPL2b wt und SPPL2b P472A (Abb. 4.9-B). Allerdings war die Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF im Falle der Mutante tendenziell leicht reduziert. Bei Expression von SPPL2b wt waren zum Zeitpunkt 1 h etwa 40% des ursprünglichen TNF $\alpha$  NTF-Spiegels nachweisbar, im Falle von SPPL2b P472A hingegen noch etwa 70%. Folglich ist die Aktivität von SPPL2b P472A bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF eventuell tendenziell leicht reduziert. Auch die genaue Betrachtung der Produkt-Spezies zeigte eine annähernd gleichartige Konversion der TNF $\alpha$  ICDs im Vergleich von SPPL2b wt und SPPL2b P472A. In beiden Fällen war zunächst eine größere TNF $\alpha$  ICD (Abb. 4.9-A, Peptid 1 zu Zeitpunkt 0 h) nachweisbar und wurde über die Zeit prozessiert hin zu kleineren Peptiden (Abb. 4.9-A, Peptide 2 & 3 ab Zeitpunkt 1 h). Als möglicher Hinweis auf eine geringe Verschiebung des initialen Schnittmusters (siehe 5.2.2) der Mutante SPPL2b P472A fand sich eine zusätzliche, größere TNF $\alpha$  ICD zu Beginn der Inkubation (Peptid 0 bei Zeitpunkt 0 h), die leicht höher migriert als Peptid 1.

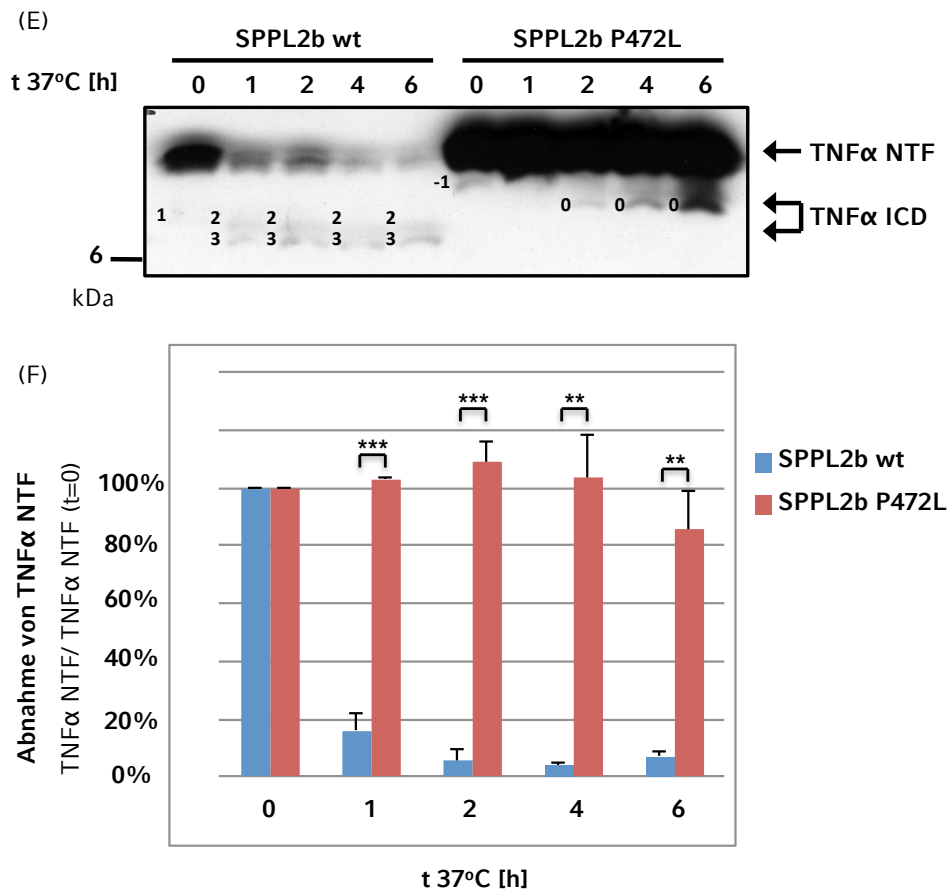
Bei der folgenden Untersuchung wurde das heterozyklische Prolin 472 des PAL-Motivs durch die nicht-zyklische Aminosäure Glycin ersetzt (SPPL2b P472G) und auch mittels der *in vitro* time-course Analyse untersucht (Abb. 4.9-C). SPPL2b P472G zeigte hier verglichen zu SPPL2b wt eine leichte Akkumulation des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF, was auf eine verlangsamte Umsetzung des Substrates im Zeitverlauf hindeutet.

# ERGEBNISSE





## ERGEBNISSE



**Abb. 4.9 SPPL2b Prolin 472 *in vitro* time-course Analysen**

(A, C, E) Stabil SPPL2b wt oder Mutante exprimierende HEK293 Zelllinien wurden transient mit TNFα FL kotransfiziert. Isolierte Membranfraktionen wurden *in vitro* für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. TNFα Fragmente wurden mittels anti-Flag WB detektiert.

(B, D, F) TNFα NTF Spiegel wurden je Zeitpunkt quantifiziert und in Relation gesetzt zum Ausgangsspiegel zu Zeitpunkt 0 h (n = 3, Mittelwerte ± SD). Die Intensität von TNFα NTF zu Zeitpunkt 0 h wurde auf 100% festgelegt. n.s. = nicht signifikant

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNFα NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte hier statistisch signifikante Unterschiede für die Zeitpunkte 1 h & 2 h ( $p(1\text{ h}) \leq 0.01$ ,  $p(2\text{ h}) \leq 0.05$ ,  $p(4\text{ h}) = 0.114$ ,  $p(6\text{ h}) = 0.095$ ) zwischen SPPL2b wt und SPPL2b P472G (Abb. 4.9-D). So waren für SPPL2b wt zum Zeitpunkt 1 h etwa 20% des ursprünglichen TNFα NTF-Spiegels nachweisbar, im Falle von SPPL2b P472G hingegen noch über 80%. Die katalytische Aktivität von SPPL2b P472G bezüglich der Umsetzung von TNFα NTF ist folglich zu Beginn der Inkubation deutlich reduziert, gegen Ende allerdings scheint SPPL2b P472G aufholen zu können.

Bei genauer Betrachtung der Produkt-Spezies zeigte sich darüber hinaus eine verlangsamte Konversion der TNF $\alpha$  ICDs hin zu kleineren Spezies im Vergleich von SPPL2b P472G zu SPPL2b wt (Abb. 4.9-C). Als möglichen Hinweis auf eine Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes von TNF $\alpha$  NTF durch SPPL2b P472G fand sich wiederum eine zusätzliche, größere TNF $\alpha$  ICD im Western Blot (Peptid 0 bei Zeitpunkt 0 h bis 2 h).

Schlussendlich wurde das Prolin 472 des PAL-Motivs durch ein aliphatisches Leucin ersetzt (SPPL2b P472L). In der *in vitro* time-course Analyse zeigte SPPL2b P472L verglichen zu SPPL2b wt eine starke Akkumulation von TNF $\alpha$  NTF, eine Umsetzung des direkten Substrates im Zeitverlauf war in dieser Analyse zunächst nicht nachweisbar (Abb. 4.9-E).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte durchweg statistisch hoch signifikante Unterschiede ( $p$  (1 h)  $\leq$  0.001,  $p$  (2 h)  $\leq$  0.001,  $p$  (4 h)  $\leq$  0.01,  $p$  (6 h)  $\leq$  0.01) zwischen SPPL2b wt und SPPL2b P472L (Abb. 4.9-F, alle Zeitpunkte). Für SPPL2b wt waren bereits zum Zeitpunkt 1 h nur noch etwa 20% des ursprünglichen TNF $\alpha$  NTF-Spiegels detektierbar, im Falle von SPPL2b P472L hingegen selbst nach 6 h noch über 80%. Folglich ist die katalytische Aktivität von SPPL2b P472L bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF unter diesen Versuchsbedingungen mit Überexpression von Protease und Substrat hoch signifikant reduziert und unter physiologischen Bedingungen mutmaßlich inaktiv.

Lediglich die genaue Betrachtung der Produkt-Spezies zeigte eine minimale Restkonversion von TNF $\alpha$  ICDs hin zu kleineren Peptiden (Peptid -1 bei Zeitpunkt 0 h wird konvertiert zu Peptid 0 ab Zeitpunkt 2 h). Die Entstehung dieser verglichen zum Wildtyp größeren TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.9-E, Peptide -1 & 0 bei Zeitpunkt 0 h bzw. 2 h) lassen möglicherweise auf eine geringe Restaktivität der Mutante SPPL2b P472L schließen, wobei die größeren ICD-Spezies auf eine Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes von TNF $\alpha$  NTF hindeuten.

### 4.3.2 Analyse der TNF $\alpha$ ICDs für SPPL2b Prolin 472

Zum Nachweis potentiell veränderter Produkt-Spezies aufgrund der Mutationen von SPPL2b Prolin 472 wurden im Folgenden die TNF $\alpha$  ICDs und C-Peptide mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (siehe 3.8).

Im direkten Vergleich zu SPPL2b wt (Abb. 4.10-A) produzierte SPPL2b P472A identische TNF $\alpha$  ICDs, ohne feststellbare qualitative Unterschiede (Abb. 4.10-B). Die TNF $\alpha$  ICDs mit höchster Intensität lassen sich auf die Palmitoylierung an Cystein 30 zurückführen (Abb. 4.10-B, blau).

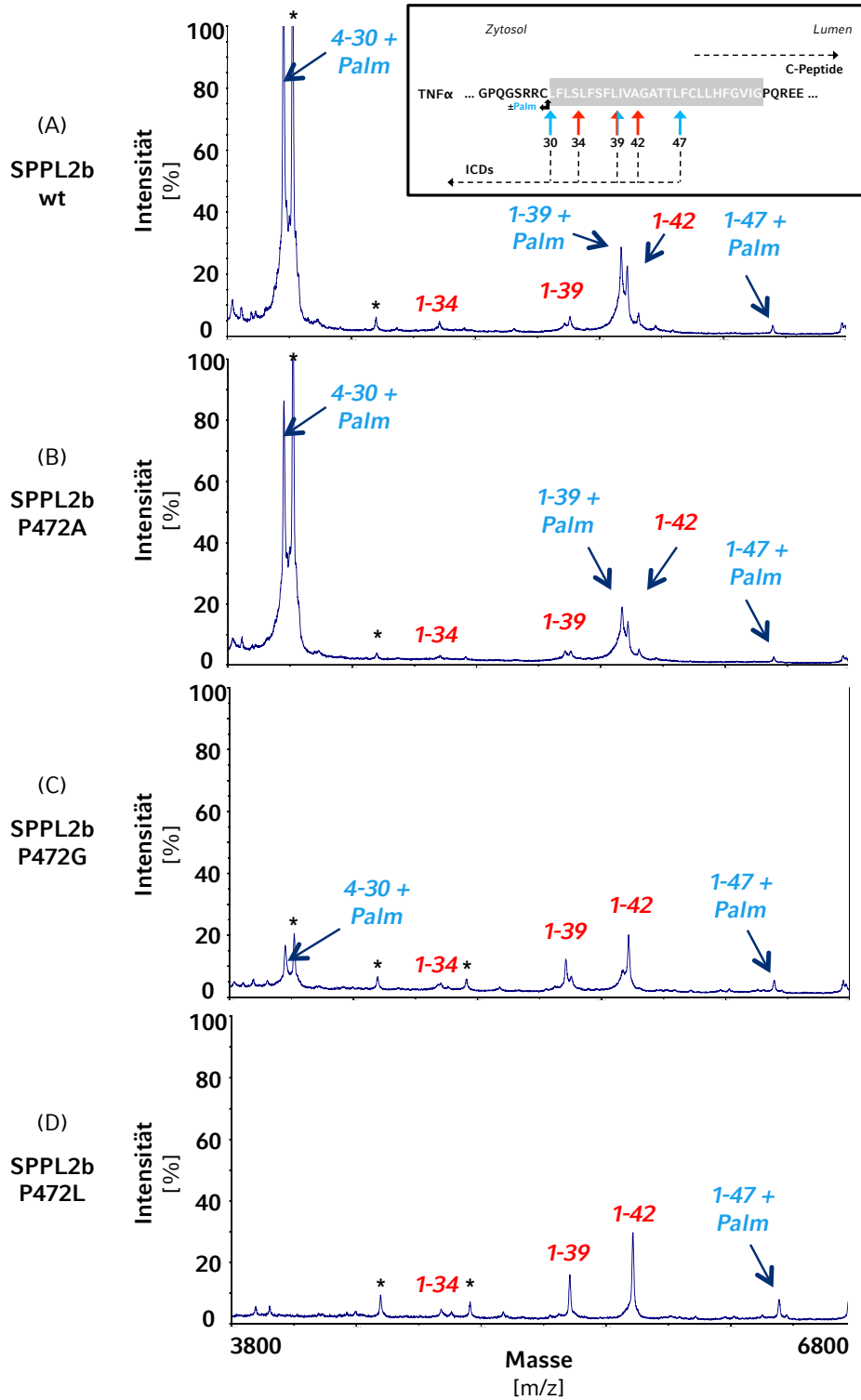
Für SPPL2b P472G konnten zwar ebenfalls keine qualitativ veränderten TNF $\alpha$  ICDs detektiert werden (Abb. 4.10-C), dafür aber deutliche quantitative Unterschiede hinsichtlich der Relation der Produkt-Spezies zueinander: die durch SPPL2b P472G vornehmlich produzierten TNF $\alpha$  ICDs scheinen in dieser Analyse 1 - 39 sowie 1 - 42 zu umfassen (Abb. 4.10-C, rot). Die bei SPPL2b wt dominierenden, palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.10-A, blau) konnten hingegen kaum identifiziert werden.

Ähnliches gilt für die Analyse von SPPL2b P472L (Abb. 4.10-D): die hier produzierten TNF $\alpha$  ICDs umfassten die Peptide 1 - 39 sowie 1 - 42 (Abb. 4.10-D, rot). Die palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs von SPPL2b wt (Abb. 4.10-A) wurden mit Ausnahme des Peptids 1 - 47 gar nicht identifiziert.

Sowohl für SPPL2b P472G als auch P472L sind die Befunde zum einen konsistent mit einer stark reduzierten proteolytischen Aktivität der jeweiligen Mutante, wobei die sukzessive Abnahme der palmitoylierten ICD-Spezies (Abb. 4.10-B,C,D) in sehr guter Korrelation zur sukzessiven Verlangsamung im Rahmen der entsprechenden time-course Analyse (Abb. 4.9-A bis F) steht.

Zum anderen scheinen die Prolin-Mutanten ebenso zu einer schrittweisen, selektiven Reduktion der Proteolyse von palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs zu führen (siehe 5.2.1.4). Verglichen zu SPPL2b P472G (Abb. 4.10-C) ist das Überwiegen der nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs für SPPL2b P472L (Abb. 4.10-D) noch ausgeprägter. Auch diese zunehmende Verschiebung hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs korreliert wiederum gut mit der Störung der TNF $\alpha$  ICD-Konversion der Mutanten innerhalb der entsprechenden time-course Analyse (Abb. 4.9-A,C,F).

## ERGEBNISSE



**Abb. 4.10** MALDI-TOF Analyse der TNF $\alpha$  ICDs für SPPL2b Prolin 472

Nach Kotsransfektion von TNF $\alpha$  FL in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder SPPL2b Prolin 472 Mutanten (B-D) wurden mittels anti-Flag Immunopräzipitation TNF $\alpha$  ICDs isoliert und per MALDI-TOF MS analysiert. Identifizierte TNF $\alpha$  ICDs sind palmitoyliert (blau) oder nicht palmitoyliert (rot). Das Schema zeigt die nachweisbaren TNF $\alpha$  ICDs (vgl. Abb. 4.2). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1 & 8.2).  
\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNF $\alpha$  ICD-Spezies zuzuordnen.

### 4.3.3 Analyse der TNF $\alpha$ C-Peptide für SPPL2b Prolin 472

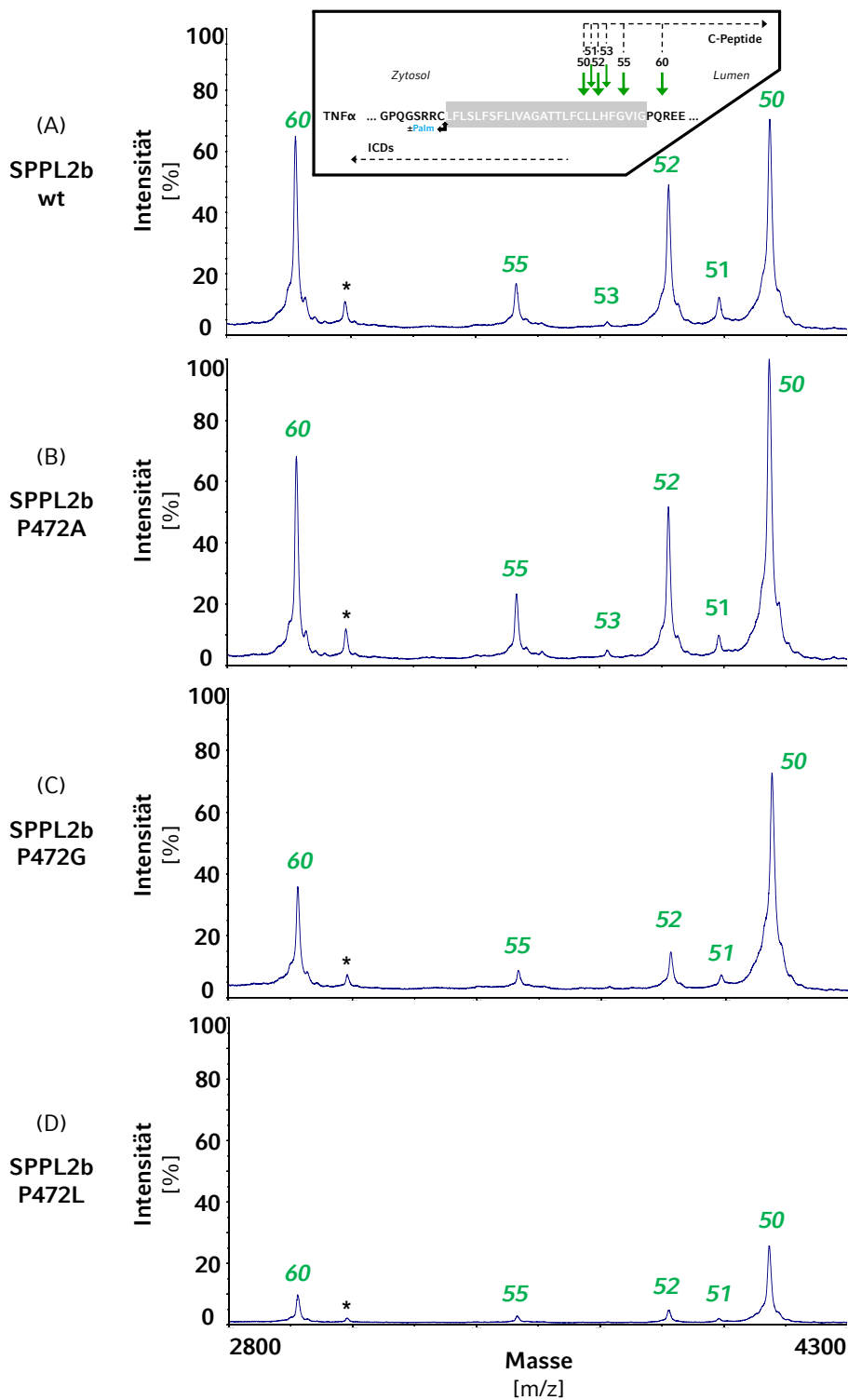
Die massenspektrometrische Analyse der TNF $\alpha$  C-Peptide ergab für SPPL2b P472A (Abb. 4.11-B), wie im Falle der TNF $\alpha$  ICDs, keinen Unterschied im Vergleich zu SPPL2b wt (Abb. 4.11-A).

Auch im Falle von SPPL2b P472G (Abb. 4.11-C) besteht kein qualitativer Unterschied der TNF $\alpha$  C-Peptide verglichen zu SPPL2b wt. Allerdings zeigten sich hier für die Mutante geringere Intensitäten an TNF $\alpha$  C-Peptiden sowie eine quantitative Verschiebung des Verhältnisses von kleineren hin zu größeren C-Peptiden (Abb. 4.11-A&C, Verhältnis C-Peptid 50 zu 52 sowie 50 zu 60 erhöht für SPPL2b P472G).

Die Analyse von SPPL2b P472L ergab insgesamt noch stärker verringerte Intensitäten aller C-Peptide (Abb. 4.11-D) als SPPL2b P472G. Darüber hinaus zeigte sich ein ähnlicher Befund zur P472G Mutante, nämlich die quantitative Verschiebung des Verhältnisses von kleineren hin zu größeren TNF $\alpha$  C-Peptiden (Abb. 4.11-A&D, Verhältnis C-Peptid 50 zu 52 sowie 50 zu 60 erhöht für SPPL2b P472L). Möglicherweise sind diese Verschiebungen mit einer reduzierten katalytischen Aktivität von SPPL2b P472G und P472L unter der Annahme vereinbar, dass TNF $\alpha$  C-Peptide gleichsam den ICDs mehrmals sequentiell durch SPPL2b geschnitten werden können (siehe 5.2.1).

Sowohl für SPPL2b P472G als auch P472L sind die massenspektrometrischen Befunde der TNF $\alpha$  C-Peptide konsistent mit einer reduzierten proteolytischen Aktivität der jeweiligen Mutante. Die schrittweise Abnahme der Gesamtintensitäten an TNF $\alpha$  C-Peptiden (Abb. 4.11-B,C,D) spricht dabei für eine entsprechende Reduktion der Menge an sezerniertem C-Peptid und korreliert gut mit der sukzessiven Verlangsamung im Rahmen der jeweiligen time-course Analyse (Abb. 4.9-A bis F).

## ERGEBNISSE



**Abb. 4.11** MALDI-TOF Analyse der TNF $\alpha$  C-Peptide für SPPL2b Prolin 472

Zur Detektion der TNF $\alpha$  C-Peptide wurde ein C-terminal Flag AP-markiertes TNF $\alpha$  NTF in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder SPPL2b Prolin 472 Mutanten (B-D) kotransfiziert, anti-Flag immunopräzipitiert und per MALDI-TOF MS analysiert. Das Schema zeigt die nachweisbaren TNF $\alpha$  C-Peptide (vgl. Abb. 4.2). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1 & 8.2).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNF $\alpha$  C-Peptid-Spezies zuzuordnen.

#### 4.3.4 Zusammenfassung für SPPL2b Prolin 472

Vorstehend wurde die erste Position des PAL-Motivs, Prolin 472, hinsichtlich der Anforderungen an die Aminosäure-Seitenkette für die katalytische Aktivität von SPPL2b gegenüber TNF $\alpha$  NTF untersucht. Schlussendlich zeigte sich diese Position des PAL-Motivs in SPPL2b als sehr sensitiv gegenüber eingebrachten Mutationen, lediglich der Austausch des heterozyklischen Prolins zu einem kleinen, aliphatischen Alanin (SPPL2b P472A) ermöglichte eine nur tendenziell leicht geminderte proteolytische Aktivität gegenüber dem direkten Substrat TNF $\alpha$  NTF im Vergleich zu SPPL2b wt.

Die Mutante SPPL2b P472G führt bereits zu einer signifikant reduzierten proteolytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF zu Beginn der time-course Analyse sowie zu einer massenspektrometrisch nachweisbaren Reduktion an palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs und geringeren Mengen an C-Peptiden.

SPPL2b P472L schließlich weist eine hoch signifikant reduzierte proteolytische Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF auf, wobei die massenspektrometrischen Befunde bezüglich der Produkt-Spezies noch ausgeprägter sind als für P472G. Unter nativen Bedingungen, ohne Überexpression von Protease und Substrat, ist SPPL2b P472L daher mutmaßlich katalytisch inaktiv.

Einen Kurzüberblick der Ergebnisse für SPPL2b Prolin 472 liefert Tabelle 4.2.

SPPL2b Variante:	Position:	katalytische Aktivität:
SPPL2b wt	-	+++
SPPL2b P472A	} Prolin 472	++
SPPL2b P472G		+
SPPL2b P472L		-

**Tab. 4.2 Katalytische Aktivität von SPPL2b Prolin 472 Mutanten**

Übersicht aller drei analysierten Mutationen der ersten Position des PAL-Motivs in SPPL2b hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF. Graduierung beruht auf den Quantifizierungsergebnissen der einzelnen Mutanten im Rahmen der *in vitro* time-course Analysen:

- +++ normale katalytische Aktivität
- ++ tendenziell leichte Reduktion der katalytischen Aktivität (p-Werte n.s.)
- + mäßige Reduktion der katalytischen Aktivität (bester p-Wert < 0.05)
- starke Reduktion der katalytischen Aktivität (bester p-Wert < 0.001)

#### 4.4 Alanin 473 – „size does matter“

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die charakterisierten Mutationen für SPPL2b Alanin 473. Besonders hervorzuheben ist hier SPPL2b A473C, da die analoge Mutation, sofern sie im PAL-Motiv von PS1 auftritt, zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führt (Rogaeva et al., 2001).

Darüber hinaus wurden Mutationen an der Position 473 in SPPL2b zu unterschiedlichen aliphatischen Seitenketten analysiert, um den Zusammenhang zwischen der Größe der Aminosäure-Seitenkette an dieser Position und der katalytischen Aktivität von SPPL2b zu untersuchen.

Wie schon im Falle von Prolin 472 wurde bei der Auswahl der Mutationen darauf Wert gelegt, einen direkten Vergleich zur katalytischen Aktivität von PS1 und den dort bekannten Befunden zu ermöglichen (Wang et al., 2006a).

SPPL2b Variante:	Position:	Mutation zu:
SPPL2b A473C *	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div>Alanin 473</div> </div>	Cystein
SPPL2b A473G		Glycin
SPPL2b A473L		Leucin
SPPL2b A473V		Valin

**Tab. 4.3 Charakterisierte Mutationen von SPPL2b Alanin 473**

Übersicht aller 4 analysierten Mutationen für die zweite Position des PAL-Motivs in SPPL2b. \* SPPL2b A473C ist die analoge Variante zu einer aus PS1 bekannten Mutation des PAL-Motivs, welche zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führt.



#### 4.4.1 *In vitro* time-course Analysen für SPPL2b Alanin 473

Zunächst wurde das aliphatische Alanin 473 des PAL-Motivs durch ein polares und größeres Cystein ersetzt (SPPL2b A473C), was einer bekannten FAD-Mutation innerhalb der Preseniline entspricht (Rogaeva et al., 2001). Zur genauen Bestimmung der katalytischen Aktivität und der Prozessierung des Substrates TNF $\alpha$  wurde SPPL2b A473C mittels der *in vitro* time-course Analyse mit SPPL2b wt hinsichtlich Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF verglichen (Abb. 4.12-A). Im Zeitverlauf kam es hier sowohl bei Expression des Wildtyps als auch der Mutante zu einer regulären Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF (Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p$  (1 h) = 0.352,  $p$  (2 h) = 0.320,  $p$  (4 h) = 0.239,  $p$  (6 h) = 0.080) zwischen SPPL2b wt und SPPL2b A473C (Abb. 4.12-B). Die Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF erschien im Rahmen der experimentellen Variabilität identisch, folglich ist die Aktivität von SPPL2b A473C bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF im Vergleich zu SPPL2b wt unverändert.

Die Analyse der Produkt-Spezies zeigte ebenfalls eine annähernd gleichartige Konversion der TNF $\alpha$  ICDs verglichen zwischen SPPL2b wt und SPPL2b A473C. In beiden Fällen war zunächst eine größere TNF $\alpha$  ICD (Abb. 4.12-A, Peptid 1 zu Zeitpunkt 0 h) nachweisbar und wurde über die Zeit zu kleineren Peptiden prozessiert (Abb. 4.12-A, Peptide 2 & 3).

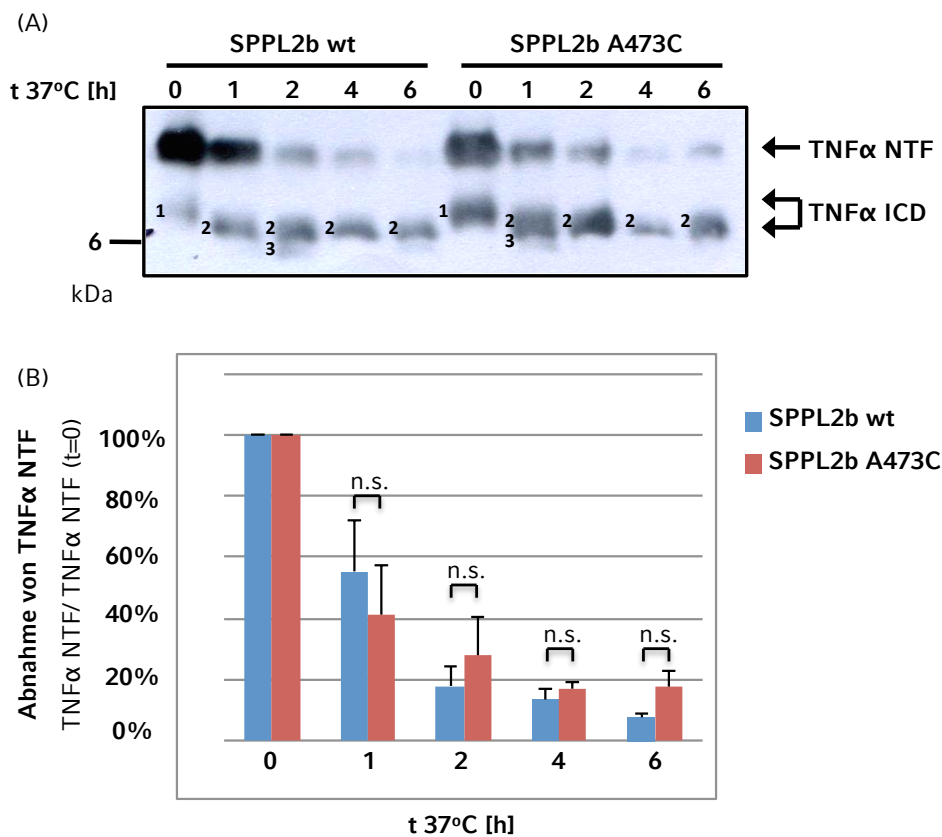
Nach Analyse der FAD-analogen Variante SPPL2b A473C wurde Alanin 473 in SPPL2b in Anlehnung an (Wang et al., 2006a) durch unterschiedlich große aliphatische Seitenketten ausgetauscht, hier zunächst durch Glycin (SPPL2b A473G). Die *in vitro* time-course Analyse zeigte im Vergleich von SPPL2b wt und SPPL2b A473G eine annähernd identische Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF im Zeitverlauf (Abb. 4.12-C, Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p$  (1 h) = 0.120,  $p$  (2 h) = 0.175,  $p$  (4 h) = 0.292,  $p$  (6 h) = 0.356) zwischen SPPL2b wt und SPPL2b A473G (Abb. 4.12-D). Allerdings erschien die Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel im Falle der Mutante tendenziell geringfügig schneller vorstatten

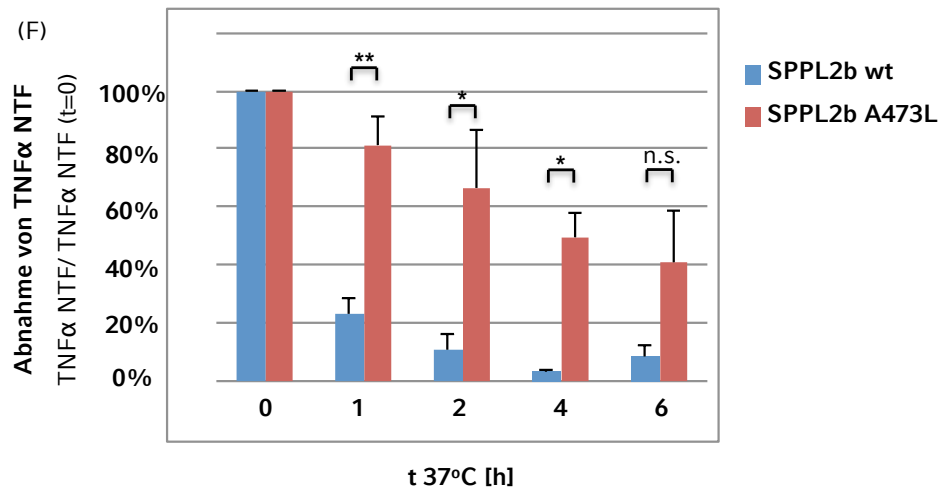
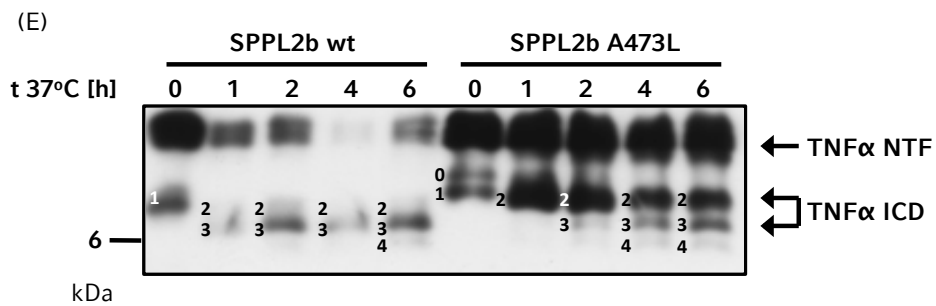
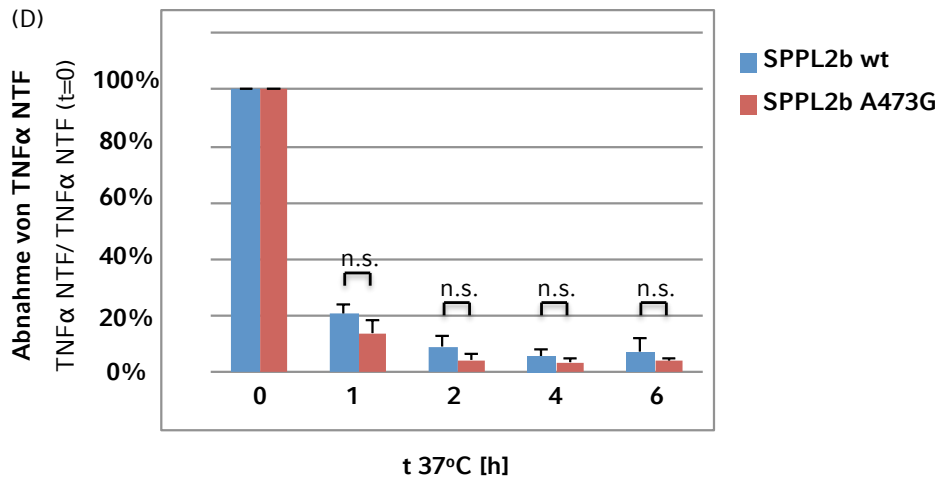
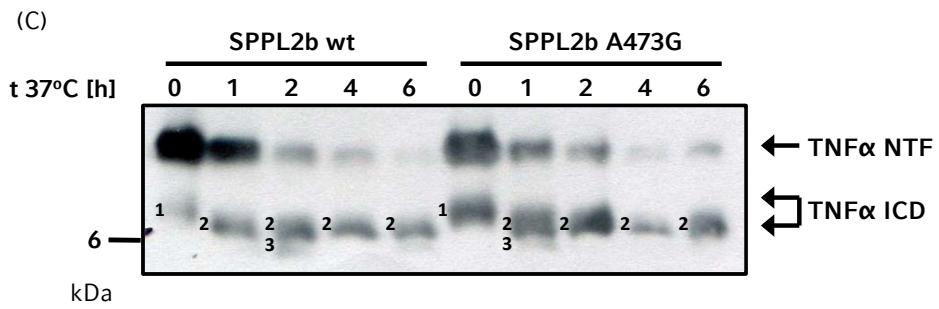
## ERGEBNISSE

zu gehen als im Falle von SPPL2b wt. Möglicherweise ließe sich durch eine Erhöhung der Anzahl an unabhängigen Experimenten (hier  $n = 3$ ) ein signifikanter Unterschied feststellen.

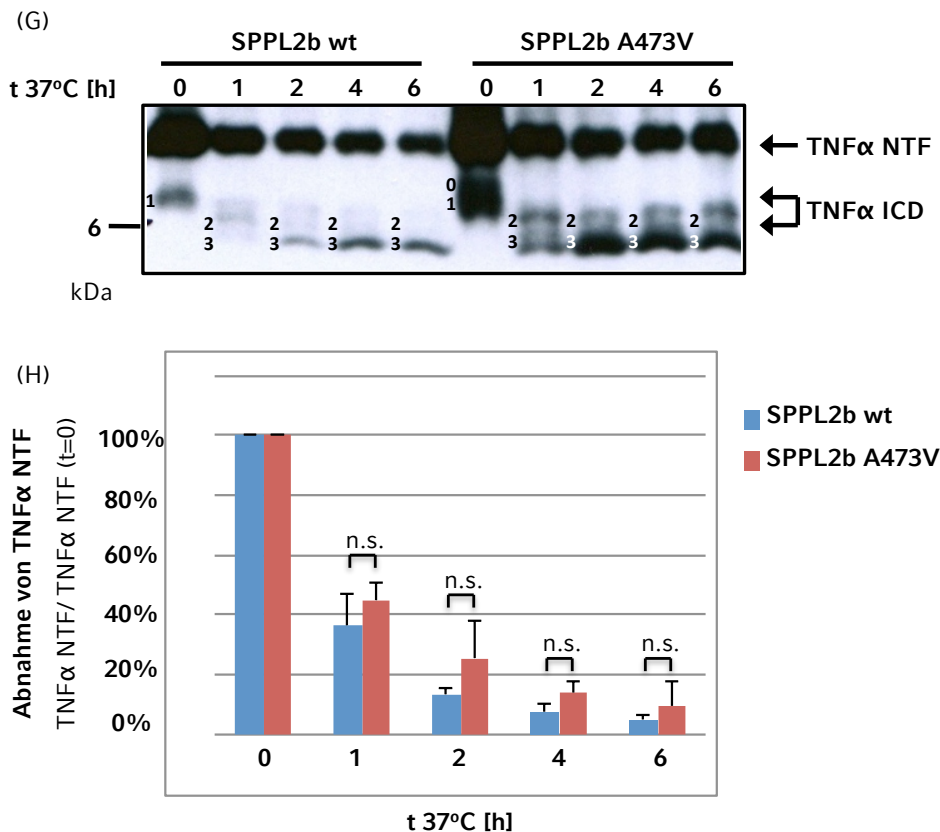
Auch die Analyse der Produkt-Spezies zeigte eine sehr gleichartige Konversion von TNF $\alpha$  ICDs verglichen zwischen SPPL2b wt und SPPL2b A473G. In beiden Fällen war zunächst eine größere TNF $\alpha$  ICD (Peptid 1 zu Zeitpunkt 0 h) nachweisbar und wurde über die Zeit prozessiert hin zu kleineren Peptiden (Abb. 4.12-D, Peptide 2 & 3). Die qualitative Prozessierung von TNF $\alpha$  NTF und ICDs erfolgte im Rahmen der Nachweisbarkeit also nahezu identisch. Hinweisend auf eine leichte Erhöhung der katalytischen Aktivität von SPPL2b A473G wurde Peptid 3 jedoch im Falle der Mutante bereits zum Zeitpunkt 1 h detektiert, also früher als im Wildtyp zu Zeitpunkt 2 h (Abb. 4.12-D).



## ERGEBNISSE



## ERGEBNISSE



**Abb. 4.12 SPPL2b Alanin 473 *in vitro* time-course Analysen**

(A, C, E, G) Stabil SPPL2b wt oder Mutante exprimierende HEK293 Zelllinien wurden transient mit TNF $\alpha$  FL kotransfiziert. Isolierte Membranfraktionen wurden *in vitro* für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. TNF $\alpha$  Fragmente wurden mittels anti-Flag WB detektiert.

(B, D, F, H) TNF $\alpha$  NTF Spiegel wurden je Zeitpunkt quantifiziert und in Relation gesetzt zum Ausgangsspiegel zu Zeitpunkt 0 h (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD). Die Intensität von TNF $\alpha$  NTF zu Zeitpunkt 0 h wurde auf 100% festgelegt.  
n.s. = nicht signifikant

Bei der folgenden Untersuchung wurde das SPPL2b Alanin 473 durch ein größeres, aliphatisches Leucin ausgetauscht (SPPL2b A473L). Hier zeigte die *in vitro* time-course Analyse im Vergleich von SPPL2b wt und SPPL2b A473L eine merkliche Akkumulation des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF im Falle der Mutante (Abb. 4.12-E), ebenso war die Umsetzung des Substrates im Zeitverlauf deutlich langsamer.

Verglichen mit SPPL2b wt zeigte die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt (siehe 3.7) für SPPL2b A473L statistisch signifikante Aktivitätsminderungen ( $p$  (1 h)  $\leq$  0.01,  $p$  (2 h)  $\leq$  0.05,

$p(4\text{ h}) \leq 0.05$ ,  $p(6\text{ h}) = 0.082$ ) (Abb. 4.12-F, Zeitpunkte 1 h - 4 h). So waren für SPPL2b wt zum Zeitpunkt 1 h etwa 20% des ursprünglichen TNF $\alpha$  NTF-Spiegels nachweisbar, im Falle von SPPL2b A473L hingegen noch etwa 80%. Die katalytische Aktivität von SPPL2b A473L bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF ist folglich signifikant reduziert.

Die genaue Betrachtung der Produkt-Spezies zeigte zudem eine verlangsamte Konversion der TNF $\alpha$  ICDs hin zu kleineren Spezies durch die Mutante (Zeitpunkte 0 - 6 h). Als Hinweis auf eine mögliche Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes von TNF $\alpha$  NTF fand sich auch für SPPL2b A473L eine zusätzliche, größere TNF $\alpha$  ICD im Western Blot (Abb. 4.12-E, Peptid 0 bei Zeitpunkt 0 h).

Abschließend wurde das SPPL2b Alanin 473 durch ein größeres, aliphatisches Valin ausgetauscht (SPPL2b A473V). Hier zeigte die *in vitro* time-course Analyse im Vergleich von SPPL2b wt und SPPL2b A473V eine annähernd identische Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF im Zeitverlauf (Abb. 4.12-G, Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p(1\text{ h}) = 0.312$ ,  $p(2\text{ h}) = 0.229$ ,  $p(4\text{ h}) = 0.126$ ,  $p(6\text{ h}) = 0.419$ ) zwischen SPPL2b wt und SPPL2b A473V (Abb. 4.12-H). Allerdings erschien die Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel im Falle der Mutante SPPL2b A473V tendenziell geringfügig verlangsamt zu sein im Vergleich zu SPPL2b wt.

Ebenso zeigte die Analyse der Produkt-Spezies eine nahezu gleichartige Konversion von TNF $\alpha$  ICDs verglichen zwischen SPPL2b wt und SPPL2b A473V. In beiden Fällen war zunächst eine größere TNF $\alpha$  ICD (Abb. 4.12-G, Peptid 1 zu Zeitpunkt 0 h) nachweisbar und wurde über die Zeit zu kleineren Peptiden prozessiert (Abb. 4.12-G, Peptide 2 & 3). Lediglich zu Beginn der Analyse wurde für SPPL2b A473V eine zusätzliche, größere TNF $\alpha$  ICD detektiert (Peptid 0 bei Zeitpunkt 0 h), was auch bei dieser Mutante für einen veränderten Initialschnitt von TNF $\alpha$  NTF sprechen könnte.

#### 4.4.2 Analyse der TNF $\alpha$ ICDs für SPPL2b Alanin 473

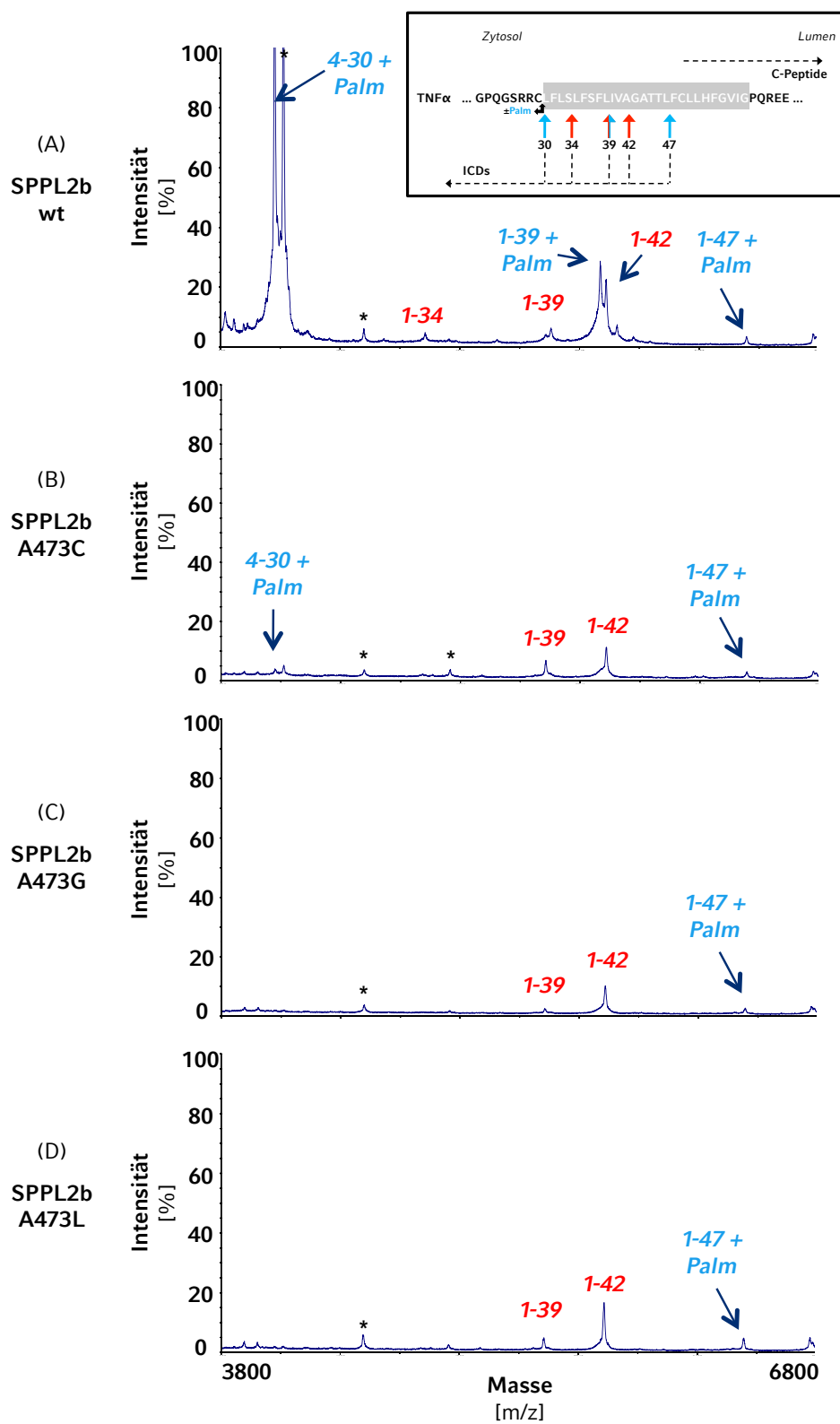
Die massenspektrometrische Analyse der TNF $\alpha$  ICDs ergab für SPPL2b A473C, verglichen zu SPPL2b wt (Abb. 4.13-A), deutliche quantitative Unterschiede hinsichtlich der produzierten TNF $\alpha$  ICD-Spezies, abhängig von deren Palmitoylierungsstatus (Abb. 4.13-B): während die TNF $\alpha$  ICDs 1 - 39 und 1 - 42 gut nachweisbar waren, wurden palmitoylierte TNF $\alpha$  ICDs kaum detektiert. Wie bereits bei Analyse von SPPL2b P472G und P472L (siehe 4.3.2) konnten die bei SPPL2b wt dominierenden, palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.13-A, blau) hingegen kaum identifiziert werden (Abb. 4.13-B, blau).

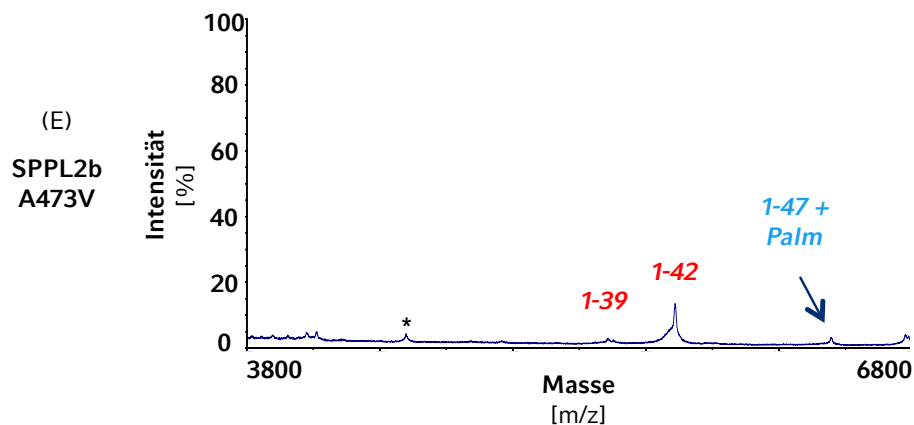
Sehr ähnliche Befunde wurden ebenso für alle weiteren SPPL2b Mutanten der Position 473 erhoben: sowohl SPPL2b A473G (Abb. 4.13-C), SPPL2b A473L (Abb. 4.13-D) als auch SPPL2b A473V (Abb. 4.13-E) produzierten vornehmlich die nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs 1 - 39 sowie 1 - 42 (Abb. 4.13-C bis E, rot). Die palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs von SPPL2b wt (Abb. 4.13-A, blau) wurden mit Ausnahme des Peptids 1 - 47 kaum identifiziert, lediglich im Falle von SPPL2b A473C konnte zusätzlich die palmitoylierte TNF $\alpha$  ICD 4 - 30 detektiert werden (Abb. 4.13-B, blau).

Diese massenspektrometrisch erhobenen Befunde könnten zum einen für eine reduzierte proteolytische Aktivität der jeweiligen Mutanten, zum anderen aber auch für eine selektive Reduktion der Proteolyse von palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs sprechen. Die Verschiebung hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs korreliert hierbei für SPPL2b A473L und A473V (Abb. 4.13-D&E) gut mit der entsprechenden Störung der TNF $\alpha$  ICD-Konversion der Mutanten im Rahmen der time-course Analyse (Abb. 4.12-E&G), im Falle von SPPL2b A473L auch mit der signifikanten Verlangsamung des TNF $\alpha$  NTF-Umsatzes innerhalb der time-course Analyse (Abb. 4.12-E&F).

In Bezug auf SPPL2b A473C und A473G (Abb. 4.13-B&C) hingegen ist die massenspektrometrisch nachgewiesene Verschiebung zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs überraschend. Mittels der vorangegangenen time-course Analysen (Abb. 4.12-A bis D) konnten für diese Mutanten weder ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF noch eine Störung der ICD-Konversion festgestellt werden (siehe 5.3).

## ERGEBNISSE





**Abb. 4.13 MALDI-TOF Analyse der TNF $\alpha$  ICDs für SPPL2b Alanin 473**

Nach Kotransfektion von TNF $\alpha$  FL in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder SPPL2b Alanin 473 Mutanten (B-E) wurden mittels anti-Flag Immunopräzipitation TNF $\alpha$  ICDs isoliert und per MALDI-TOF MS analysiert. Identifizierte TNF $\alpha$  ICDs sind palmitoyliert (blau) oder nicht palmitoyliert (rot). Das Schema zeigt die nachweisbaren TNF $\alpha$  ICDs (vgl. Abb. 4.2). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1 & 8.3).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNF $\alpha$  ICD-Spezies zuzuordnen.

#### 4.4.3 Analyse der TNF $\alpha$ C-Peptide für SPPL2b Alanin 473

Für SPPL2b A473C (Abb. 4.14-B) ergab sich bei der massenspektrometrischen Analyse der TNF $\alpha$  C-Peptide mit Ausnahme des Fehlens von C-Peptid 51 qualitativ kein Unterschied im Vergleich zu SPPL2b wt (Abb. 4.14-A), allerdings waren die Gesamtintensitäten sämtlicher C-Peptide deutlich geringer als im Falle von SPPL2b wt. Hierin besteht eine Diskrepanz zwischen der unauffälligen time-course Analyse (Abb. 4.12-A) einerseits sowie der massenspektrometrisch nachgewiesenen, deutlichen Intensitätsabnahme der Produktlinien (Abb. 4.13-B & Abb. 4.14-B) andererseits. Eine mögliche Erklärung könnte sein, sofern die WB-basierte Detektion des *in vitro* Assays vornehmlich nicht palmitoylierte TNF $\alpha$  Spezies nachweist (siehe 5.1.1).

Im Falle von SPPL2b A473G zeigte die Analyse der TNF $\alpha$  C-Peptide (Abb. 4.14-C) zunächst ein ähnliches Bild mit einer deutlichen Verringerung der Gesamtintensitäten sämtlicher C-Peptide verglichen zu SPPL2b wt (Abb. 4.14-A), hier wurde außerdem kein C-Peptid 53 detektiert.

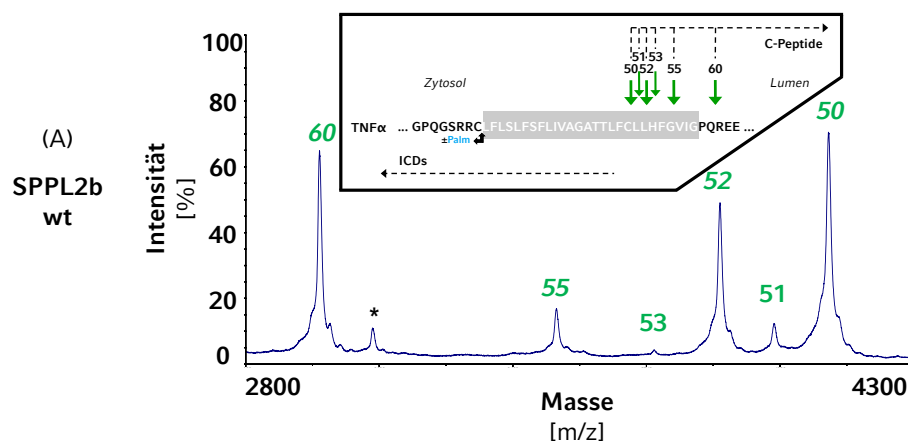


## ERGEBNISSE

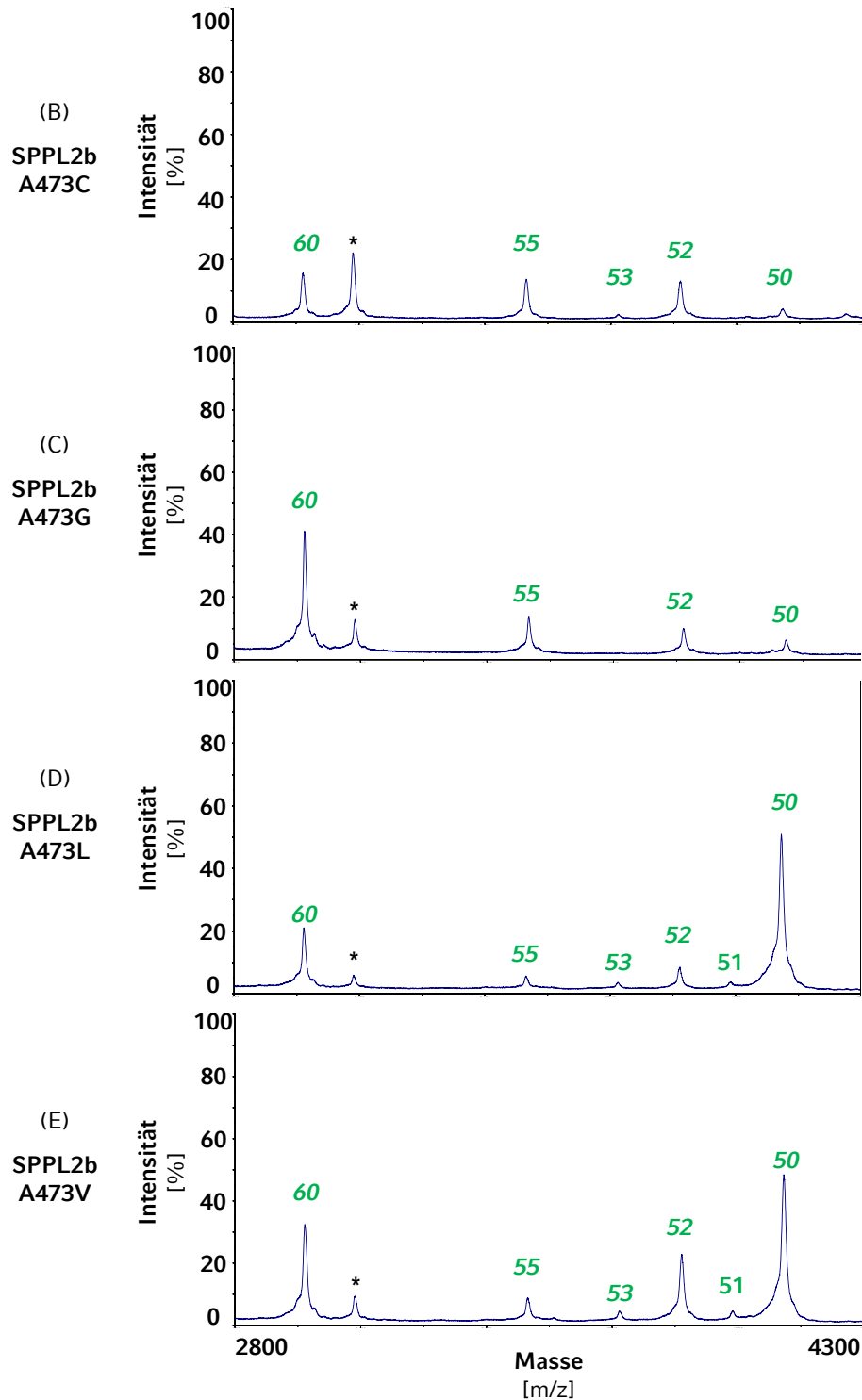
Allerdings führte die Mutante vermehrt zur Produktion von kleineren C-Peptiden, gemessen am erhöhten Verhältnis der massenspektrometrischen Intensitäten von C-Peptid 60 zu C-Peptid 50 (Abb. 4.14-A&C; SPPL2b wt 1 : 1, SPPL2b A473G 4 : 1). Unter der Annahme, dass TNF $\alpha$  C-Peptide gleichsam den ICDs mehrmals sequentiell durch SPPL2b geschnitten werden können (siehe 5.2.1), wäre dies ein weiteres Indiz für eine potentiell leicht erhöhte katalytische Aktivität von SPPL2b A473G. Dies stünde in Einklang zum tendenziell leicht beschleunigten Umsatz von TNF $\alpha$  NTF in der time-course Analyse (Abb. 4.12-C&D).

Sowohl für SPPL2b A473L (Abb. 4.14-D) als auch SPPL2b A473V (Abb. 4.14-E) ergab sich hingegen kein qualitativer Unterschied im Vergleich zu SPPL2b wt (Abb. 4.14-A), es wurden in beiden Fällen sämtliche vom Wildtyp bekannten TNF $\alpha$  C-Peptide detektiert.

Hier zeigten beide Mutanten allerdings eine vermehrte Produktion von größeren C-Peptiden, gemessen am verringerten Verhältnis der massenspektrometrischen Intensitäten von C-Peptid 60 zu C-Peptid 50 (Abb. 4.14-A,D,E; SPPL2b wt 1 : 1, SPPL2b A473L 1 : 2.5, SPPL2b A473V 1 : 1.6). Analog zu den bereits analysierten Mutanten SPPL2b P472G & P472L könnte dies auf eine reduzierte katalytische Aktivität von SPPL2b A473L und A473V zurückzuführen sein (siehe 5.2.1). So gesehen wäre die massenspektrometrisch nachgewiesene Produktion von größeren TNF $\alpha$  C-Peptiden (Abb. 4.14-D,E) konsistent mit der statistisch signifikanten (Abb. 4.12-E&F) bzw. tendenziellen (Abb. 4.12-G&H) Verlangsamung des TNF $\alpha$  NTF-Umsatzes im Rahmen der jeweiligen time-course Analyse.



# ERGEBNISSE



**Abb. 4.14 MALDI-TOF Analyse der TNFα C-Peptide für SPPL2b Alanin 473**

Zur Detektion der TNFα C-Peptide wurde ein C-terminal Flag AP-markiertes TNFα NTF in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder SPPL2b Alanin 473 Mutanten (B-E) kotransfiziert, anti-Flag immunopräzipitiert und per MALDI-TOF MS analysiert. Das Schema zeigt die nachweisbaren TNFα C-Peptide (vgl. Abb. 4.2). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1 & 8.3).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNFα C-Peptid-Spezies zuzuordnen.

#### 4.4.4 Zusammenfassung für SPPL2b Alanin 473

In der Zusammenschau der einzelnen Alanin 473 Mutanten zeigt sich für diese Position des PAL-Motivs in SPPL2b eine negative Korrelation zwischen der Größe der Aminosäure-Seitenkette einerseits sowie der proteolytischen Aktivität von SPPL2b gegenüber dem direkten Substrat TNF $\alpha$  NTF andererseits.

Dies, und die erste bekannte Mutante einer GxGD-Protease, die eventuell eine leicht erhöhte proteolytische Aktivität (SPPL2b A473G) aufweisen könnte, wirft interessante Implikationen für die Lokalisation des lateral substrate gate auf (siehe 5.2.2).

Gleichsam führen sämtliche SPPL2b Alanin 473 Varianten zu einem deutlichen, quantitativen Shift der Produkt-Spezies hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs sowie zu einer vermehrten Produktion von kleineren (SPPL2b A473C & A473G) bzw. größeren (SPPL2b A473L & A473V) TNF $\alpha$  C-Peptiden.

Einen Kurzüberblick der Ergebnisse für SPPL2b Alanin 473 liefert Tabelle 4.4.

SPPL2b Variante:	Position:	katalytische Aktivität:
SPPL2b wt	-	+++
SPPL2b A473C	} Alanin 473	+++
SPPL2b A473G		+++*
SPPL2b A473L		+
SPPL2b A473V		++

**Tab. 4.4 Katalytische Aktivität von SPPL2b Alanin 473 Mutanten**

Übersicht aller 4 analysierten Mutationen der zweiten Position des PAL-Motivs in SPPL2b hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF. Graduierung beruht auf den Quantifizierungsergebnissen der einzelnen Mutanten im Rahmen der *in vitro* time-course Analysen:

- +++ normale katalytische Aktivität
- +++\* tendenziell leichte Erhöhung der katalytischen Aktivität (p-Werte n.s.)
- ++ tendenziell leichte Reduktion der katalytischen Aktivität (p-Werte n.s.)
- + mäßige Reduktion der katalytischen Aktivität (bester p-Wert < 0.05)

#### 4.5 Leucin 474 ist kritisch für die TNF $\alpha$ ICD-Konversion

Abschließend wurde hier die genaue Anforderung an die Aminosäure-Seitenkette für die dritte Position des PAL-Motivs in SPPL2b analysiert, für Leucin 474.

Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die charakterisierten Mutationen für SPPL2b Leucin 474. Besonders hervorzuheben ist hier SPPL2b L474F, da die analoge Mutation, sofern sie im PAL-Motiv von PS1 auftritt, zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führt (Rogaeva et al., 2001).

Darüber hinaus wurden als Variation des konservierten Leucin 474 Mutationen in SPPL2b zu verschiedenen großen aliphatischen Seitenketten analysiert, um den Zusammenhang zwischen der Größe der Aminosäure-Seitenkette und der katalytischen Aktivität von SPPL2b zu untersuchen. Bei der Auswahl der Mutationen wurde wie bereits zuvor darauf Wert gelegt, einen direkten Vergleich zur katalytischen Aktivität von PS1 und den dort bekannten Befunden zu ermöglichen (Wang et al., 2006a).

SPPL2b Variante:	Position:	Mutation zu:
SPPL2b L474V	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div>Leucin 474</div> </div>	Valin
SPPL2b L474I		Isoleucin
SPPL2b L474A		Alanin
SPPL2b L474G		Glycin
SPPL2b L474F *		Phenylalanin

**Tab. 4.5 Charakterisierte Mutationen von SPPL2b Leucin 474**

Übersicht aller 5 analysierten Mutationen für die dritte Position des PAL-Motivs in SPPL2b. \* SPPL2b L474F ist die analoge Variante zu einer aus PS1 bekannten Mutation des PAL-Motivs, welche zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führt.

#### 4.5.1 *In vitro* time-course Analysen für SPPL2b Leucin 474

Zunächst wurde das aliphatische Leucin 474 des PAL-Motivs durch ein nur etwas kleineres Valin ersetzt (SPPL2b L474V). Zur genauen Bestimmung der katalytischen Aktivität und der Prozessierung des Substrates TNF $\alpha$  wurde SPPL2b L474V wiederum mittels der *in vitro* time-course Analyse mit SPPL2b wt hinsichtlich Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF verglichen (Abb. 4.15-A). Im Falle von SPPL2b L474V kam es zu einer starken Akkumulation von TNF $\alpha$  NTF (Abb. 4.15-A), dessen Umsetzung im Zeitverlauf deutlich verlangsamt war (Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte für SPPL2b L474V verglichen mit SPPL2b wt eine statistisch hoch signifikante Aktivitätsminderung der Mutante über die gesamte Messzeit ( $p$  (1 h)  $\leq$  0.001,  $p$  (2 h)  $\leq$  0.001,  $p$  (4 h)  $\leq$  0.01,  $p$  (6 h)  $\leq$  0.01) (Abb. 4.15-B). Beispielsweise waren für den Wildtyp zum Zeitpunkt 1 h etwa 30% des ursprünglichen Substrat-Spiegels nachweisbar, im Falle der Mutante aber noch 100%. Folglich ist die katalytische Aktivität von SPPL2b L474V bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF stark vermindert.

Die Analyse der Produkt-Spezies zeigte bei Expression von SPPL2b wt die bekannte Konversion von TNF $\alpha$  ICDs hin zu kleineren Peptiden im Zeitverlauf (Abb. 4.15-A, Peptide 2 bzw. 2 & 3 ab Zeitpunkt 2 bzw. 4 h). Im Gegensatz dazu konnte die Mutante allerdings das initiale Schnittprodukt (Peptid 0) nur sehr schlecht umsetzen (Abb. 4.15-A, Peptide 0 & 1 ab Zeitpunkt 1 h).

Insgesamt scheint das verglichen zu Leucin nur etwas kleinere Valin an Position 474 von SPPL2b bereits zu einer starken Akkumulation von TNF $\alpha$  NTF sowie zu einer veränderten Konversion der TNF $\alpha$  ICDs zu führen.

In der folgenden Untersuchung wurde das aliphatische Leucin 474 des PAL-Motivs durch eine strukturisomere Isoleucin-Seitenkette ersetzt (SPPL2b L474I). Hier zeigte die *in vitro* time-course Analyse im Zeitverlauf verglichen mit dem Wildtyp ebenso eine merkbliche Akkumulation des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF für die Mutante SPPL2b L474I (Abb. 4.15-C, Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte für SPPL2b L474I eine statistisch signifikant ( $p$  (1 h)  $\leq$  0.05,  $p$  (2 h)  $\leq$  0.001,  $p$  (4 h)  $\leq$  0.05,  $p$  (6 h)  $\leq$  0.01) verminderte Aktivität verglichen

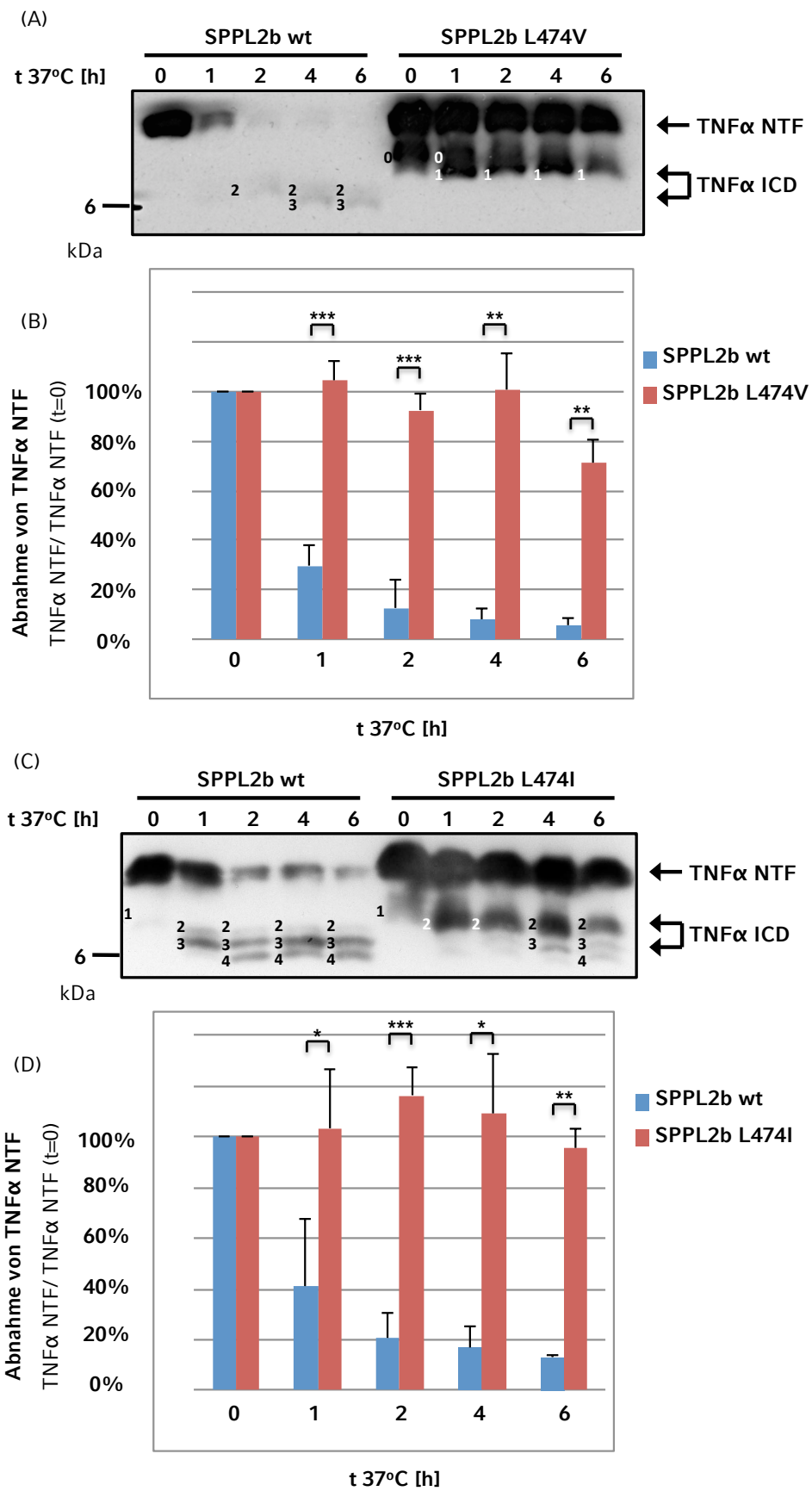
zu SPPL2b wt (Abb. 4.15-D, Zeitpunkte 1 - 6 h). Während für SPPL2b wt zum Zeitpunkt 1 h nur noch 40% des ursprünglichen Substrat-Spiegels detektiert wurden, waren es im Falle der Mutante noch annähernd 100%. Folglich ist die Aktivität von SPPL2b L474I bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF im Vergleich zu SPPL2b wt stark vermindert.

Die Analyse der Produkt-Spezies zeigte ebenso eine Verlangsamung der Mutante hinsichtlich der Konversion von TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.15-C), wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei SPPL2b L474V (Abb. 4.15-A). So kam es im Falle von SPPL2b L474I zu einer merklichen Akkumulation einer größeren TNF $\alpha$  ICD (Peptid 2 ab Zeitpunkt 1 h), welche sukzessive auch langsamer zu kleineren Peptiden prozessiert wurde (Abb. 4.15-C, Peptide 3 & 4 erst ab Zeitpunkt 4 h bzw. 6 h). Hinweise auf eine Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes finden sich für SPPL2b L474I, im Gegensatz zu SPPL2b L474V, hingegen nicht.

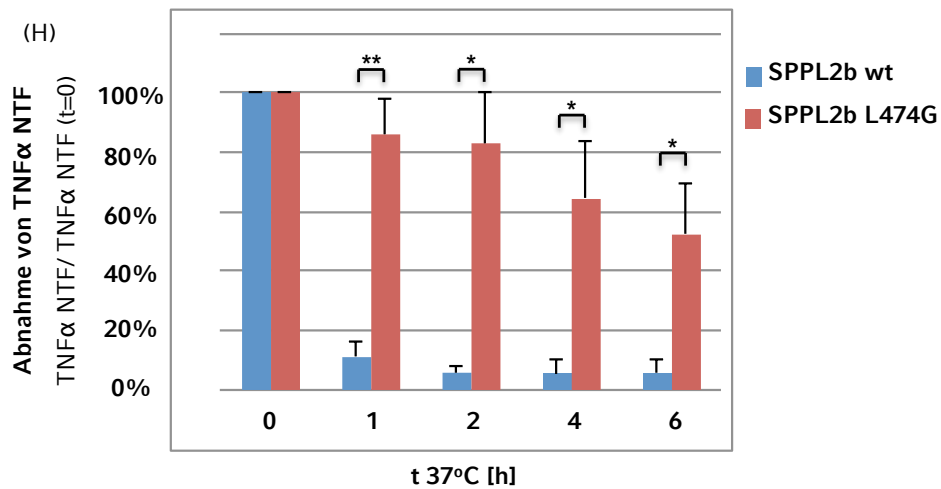
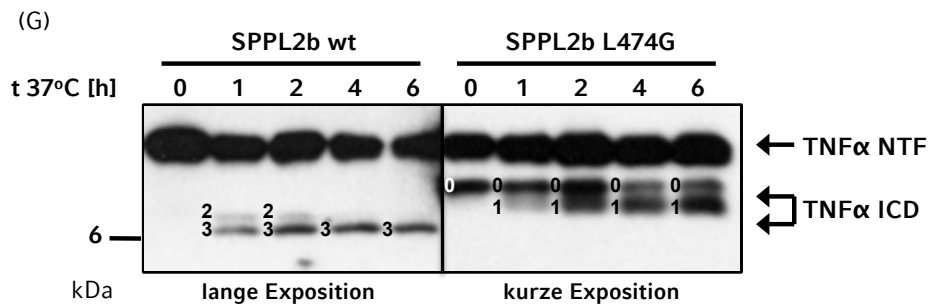
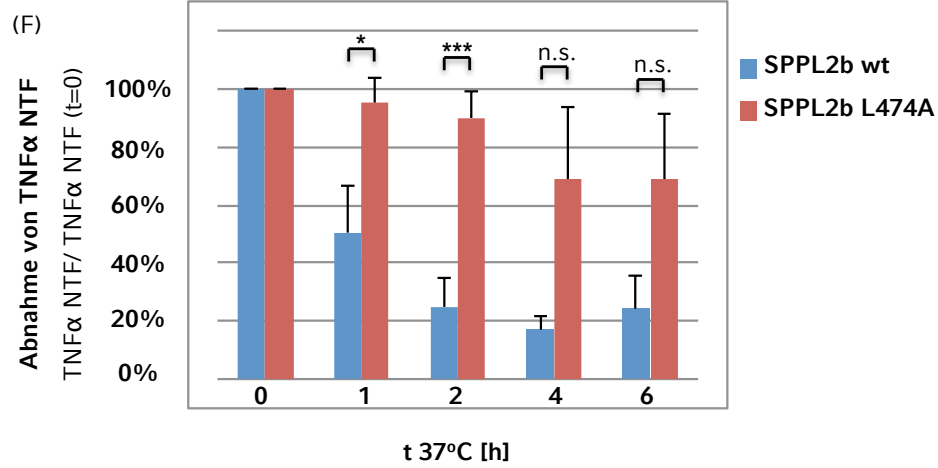
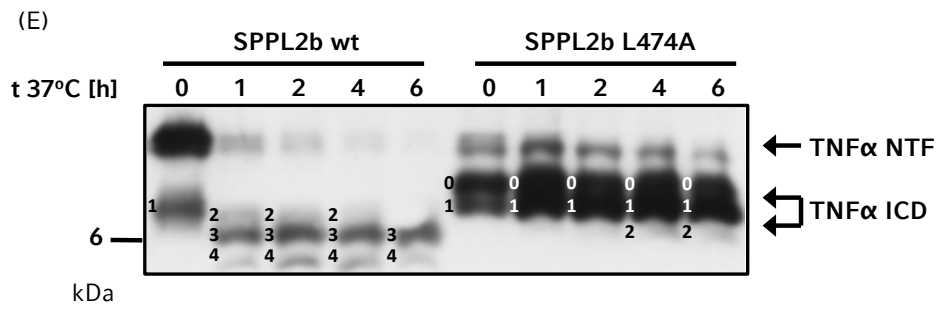
Im Falle von SPPL2b L474A hingegen zeigte sich bemerkenswerterweise ein gänzlich anderes Bild als bei allen übrigen untersuchten SPPL2b Mutanten: bereits zu Beginn des *in vitro* Assays (Zeitpunkt 0 h) war die detektierte Menge an direktem Substrat TNF $\alpha$  NTF sehr gering, vergleichbar zur Substratmenge des SPPL2b wt zum Zeitpunkt 1 h. Andererseits vermochte SPPL2b L474A die Substratmenge im Zeitverlauf nur noch geringfügig zu reduzieren (Abb. 4.15-E, Zeitpunkte 1 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte daher eine statistisch signifikante Verlangsamung ( $p(1\text{ h}) \leq 0.05$ ,  $p(2\text{ h}) \leq 0.001$ ,  $p(4\text{ h}) = 0.065$ ,  $p(6\text{ h}) = 0.056$ ) des Umsatzes in der SPPL2b L474A *in vitro* Analyse (Abb. 4.15-F). Allerdings kann diese Form der Quantifizierung hier nicht die deutliche Zunahme des initialen Substratschnittes abbilden. Dieser drückt sich durch eine starke Verminderung der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel von Beginn an (ab Zeitpunkt 0 h) aus. Da im Rahmen der Quantifizierung jedoch auf die Substratspiegel zum Zeitpunkt 0 h normalisiert wird, kann lediglich die signifikante Verlangsamung der weiteren Umsetzung des direkten Substrates im Zeitverlauf erfasst werden. Diese wiederum könnte möglicherweise mit der gestörten TNF $\alpha$  ICD-Konversion

## ERGEBNISSE

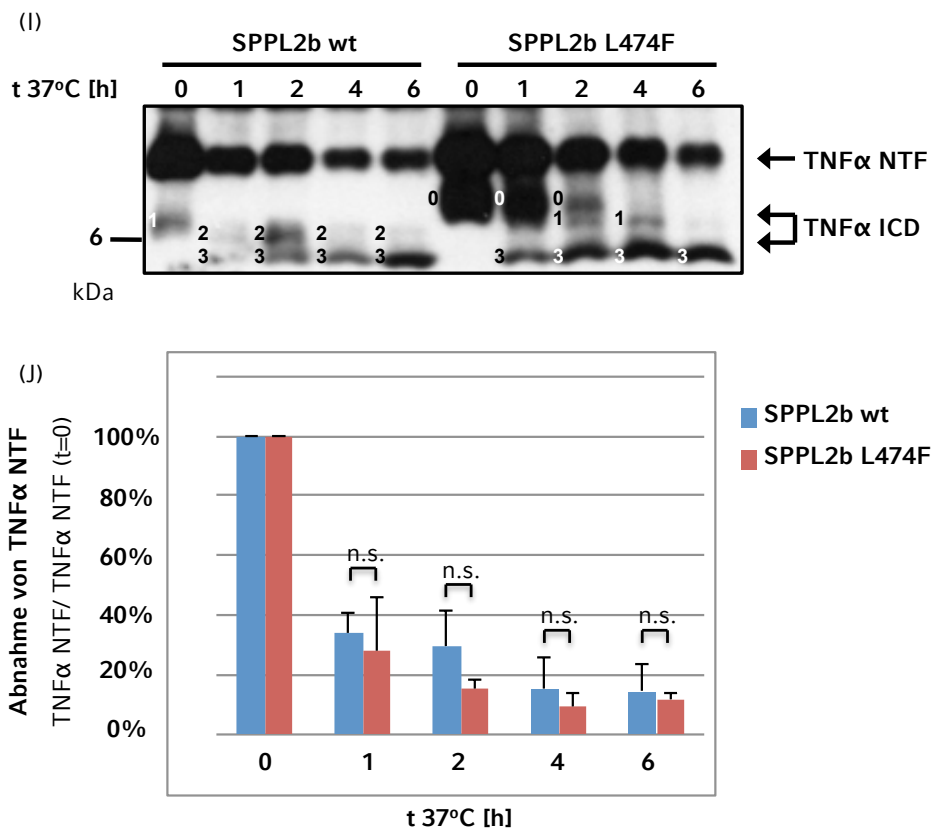


# ERGEBNISSE





## ERGEBNISSE



**Abb. 4.15 SPPL2b Leucin 474 *in vitro* time-course Analysen**

(A, C, E, G, I) Stabil SPPL2b wt oder Mutante exprimierende HEK293 Zelllinien wurden transient mit TNFα FL kotransfiziert. Isolierte Membranfraktionen wurden *in vitro* für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. TNFα Fragmente wurden mittels anti-Flag WB detektiert. (G) Für den SPPL2b L474G time-course wurden eine kürzere (Mutante) sowie eine längere (Wildtyp) Exposition des WB gewählt, um vergleichbare Intensitäten zu erzielen.

(B, D, F, H, J) TNFα NTF Spiegel wurden je Zeitpunkt quantifiziert und in Relation gesetzt zum Ausgangsspiegel zu Zeitpunkt 0 h (n = 3, Mittelwerte ± SD). Die Intensität von TNFα NTF zu Zeitpunkt 0 h wurde auf 100% festgelegt.

n.s. = nicht signifikant

zusammenhängen, im Sinne einer kompetitiven Produkthemmung bei gestörter, sequentieller Prozessivität (siehe 5.3.1).

Während die Analyse der Produkt-Spezies bei Expression von SPPL2b wt die bekannte Konversion von TNFα ICDs hin zu kleineren Peptiden zeigte (Abb. 4.15-E, Peptide 2, 3 & 4 ab Zeitpunkt 1 h), konnten im Falle der Mutante die initialen Schnittprodukte (Peptide 0 & 1) fast nicht umgesetzt werden (zu Zeitpunkt 6 h Peptide 0 & 1 noch dominant, nur geringe detektierbare Mengen an Peptid 2). In der Zusammenschau scheint SPPL2b L474A eine Entkopplung

der enzymatischen Prozessivität zu bewirken, mit Verstärkung des initialen Substratschnittes und gleichzeitig massiver Beeinträchtigung der sequentiellen ICD-Konversion. Dies ist im Rahmen der Lokalisation des lateral substrate gate sowie des molekularen Proteolysemechanismus von GxGD-Proteasen zu diskutieren (siehe 5.2.1f). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass hier ein klonaler Effekt nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund des Entkopplungsbefundes von SPPL2b L474A wurde hier das aliphatische Leucin 474 des PAL-Motivs durch ein noch kleineres Glycin ersetzt (SPPL2b L474G). Für SPPL2b L474G wurden verhältnismäßig hohe Mengen an TNF $\alpha$  NTF detektiert, welche auch nur geringfügig über die Zeit umgesetzt wurden (Abb. 4.15-G, kurze Exposition, Zeitpunkte 0 - 6 h).

Die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte eine statistisch signifikante Verlangsamung ( $p$  (1 h)  $\leq 0.01$ ,  $p$  (2 h)  $\leq 0.05$ ,  $p$  (4 h)  $\leq 0.05$ ,  $p$  (6 h)  $\leq 0.05$ ) von SPPL2b L474G verglichen mit SPPL2b wt (Abb. 4.15-H).

Passend zu dieser deutlichen Reduktion der proteolytischen Aktivität von SPPL2b L474G bezüglich der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF zeigte auch die Analyse der Produkt-Spezies, dass die Mutante das initiale Schnittprodukt (Abb. 4.15-G, Peptid 0) fast nicht umsetzen konnte (Peptide 0 & 1 ab Zeitpunkt 1 h). Verglichen mit SPPL2b L474A (siehe oben) scheint SPPL2b L474G zwar keine drastische Verstärkung des initialen Substratschnittes zu bewirken, gleichwohl ist aber die sequentielle TNF $\alpha$  ICD-Konversion stark beeinträchtigt. Zudem spricht die größere TNF $\alpha$  ICD (Peptid 0) zu Beginn der Inkubation möglicherweise auch im Falle von SPPL2b L474G für einen verschobenen Initialschnitt des Substrates TNF $\alpha$  NTF.

Abschließend wurde für die Position Leucin 474 die aromatische Aminosäure Phenylalanin getestet (SPPL2b L474F), auch dies ist eine bekannte FAD-Mutation innerhalb der Preseniline (Rogaeva et al., 2001). Hier zeigte die *in vitro* time-course Analyse im Vergleich von SPPL2b wt und SPPL2b L474F zunächst eine annähernd identische Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF im Zeitverlauf (Abb. 4.15-I, Zeitpunkte 0 - 6 h).

Auch die Quantifizierung der prozentualen Abnahme der TNF $\alpha$  NTF-Spiegel pro Zeitpunkt zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p$  (1 h) = 0.616,  $p$  (2 h) = 0.165,  $p$  (4 h) = 0.441,  $p$  (6 h) = 0.678) in der proteolytischen Aktivität von SPPL2b wt und SPPL2b L474F, gemessen an der Umsetzung von TNF $\alpha$  NTF (Abb. 4.15-J).

Die Analyse der Produkt-Spezies zeigte gleichsam in beiden Fällen eine ähnliche Konversion von größeren TNF $\alpha$  ICDs hin zu kürzeren Peptiden (Abb. 4.15-I, Peptid 0 bzw. 1 zu Zeitpunkt 0 h umgesetzt zu Peptid 3 zu Zeitpunkt 6 h). Allerdings war die TNF $\alpha$  ICD-Konversion im Falle der Mutante verzögert, insbesondere zu Beginn der Inkubation waren verglichen zum Wildtyp längere TNF $\alpha$  ICDs nachweisbar (Peptide 0 & 1 zu den Zeitpunkten 0 - 4 h). Dies spricht möglicherweise für eine Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes von TNF $\alpha$  NTF hin zu längeren TNF $\alpha$  ICDs, wobei auch deren Konversion über die Zeit deutlich verlangsamt ist (Peptid 0 noch nachweisbar bis Zeitpunkt 2 h).

Weiterhin auffällig an der ICD-Konversion der Mutante ist die Tatsache, dass anstelle eines Peptids 2 schon früh ein kleineres Peptid 3 nachweisbar ist (Abb. 4.15-I, ab Zeitpunkt 1 h). Solch eine deutliche Störung der sequentiellen Proteolyse könnte entsprechend einen plausiblen Pathomechanismus der FAD darstellen (siehe 5.3.2). Im Falle eines Presenilins mit analoger FAD-Mutation wäre die sequentielle, Carboxypeptidase-artige Trimmung (siehe 1.3.1) längerer A $\beta$ -Peptide verlangsamt, wodurch es zu einer Erhöhung des Verhältnisses von A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 käme (siehe 1.2.3.2).

#### 4.5.2 Analyse der TNF $\alpha$ ICDs für SPPL2b Leucin 474

Für SPPL2b L474V ergab die massenspektrometrische Analyse der TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.16-B), verglichen zu SPPL2b wt (Abb. 4.16-A), wiederum deutliche quantitative Unterschiede hinsichtlich der produzierten TNF $\alpha$  ICD-Spezies: während die TNF $\alpha$  ICDs 1 - 39 und 1 - 42 gut nachweisbar waren, wurde die TNF $\alpha$  ICDs 1 - 34 nicht detektiert. Außerdem konnten die bei SPPL2b wt dominierenden, palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.16-A, blau) kaum identifiziert werden (Abb. 4.16-B, blau).

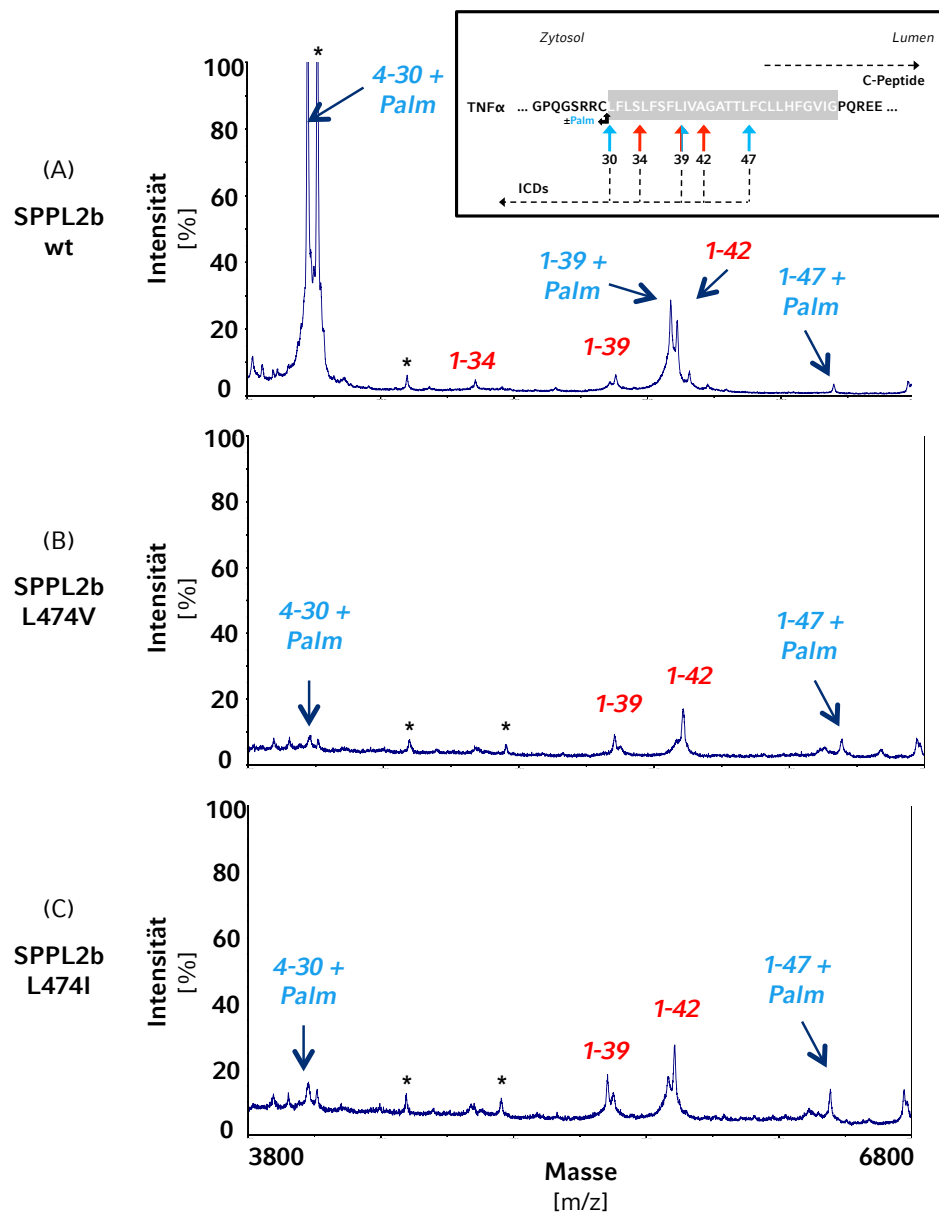
Auch die weiteren Mutanten SPPL2b L474I (Abb. 4.16-C), SPPL2b L474A (Abb. 4.16-D) sowie SPPL2b L474G (Abb. 4.16-E) produzierten vornehmlich die nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs 1 - 39 sowie 1 - 42 (Abb. 4.16-C,D,E, rot). Die palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs von SPPL2b wt (Abb. 4.16-A, blau) wurden mit Ausnahme des Peptids 1 - 47 kaum identifiziert, nur bei Expression von SPPL2b L474V und L474I konnte zusätzlich die palmitoylierte TNF $\alpha$  ICD 4 - 30 detektiert werden (Abb. 4.16-B&C, blau).

Diese massenspektrometrisch nachgewiesene, vornehmliche Produktion von nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs könnte einerseits für eine reduzierte proteolytische Aktivität der jeweiligen Mutanten sprechen, andererseits wäre es aber auch mit einer selektiven Reduktion der Proteolyse von palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs vereinbar. Die Verschiebung hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs korreliert hierbei für SPPL2b L474V, L474I, L474A und L474G (Abb. 4.16-B bis E) sehr gut mit der signifikanten Verlangsamung des TNF $\alpha$  NTF-Umsatzes in den time-course Analysen aller Mutanten (Abb. 4.15-A bis H).

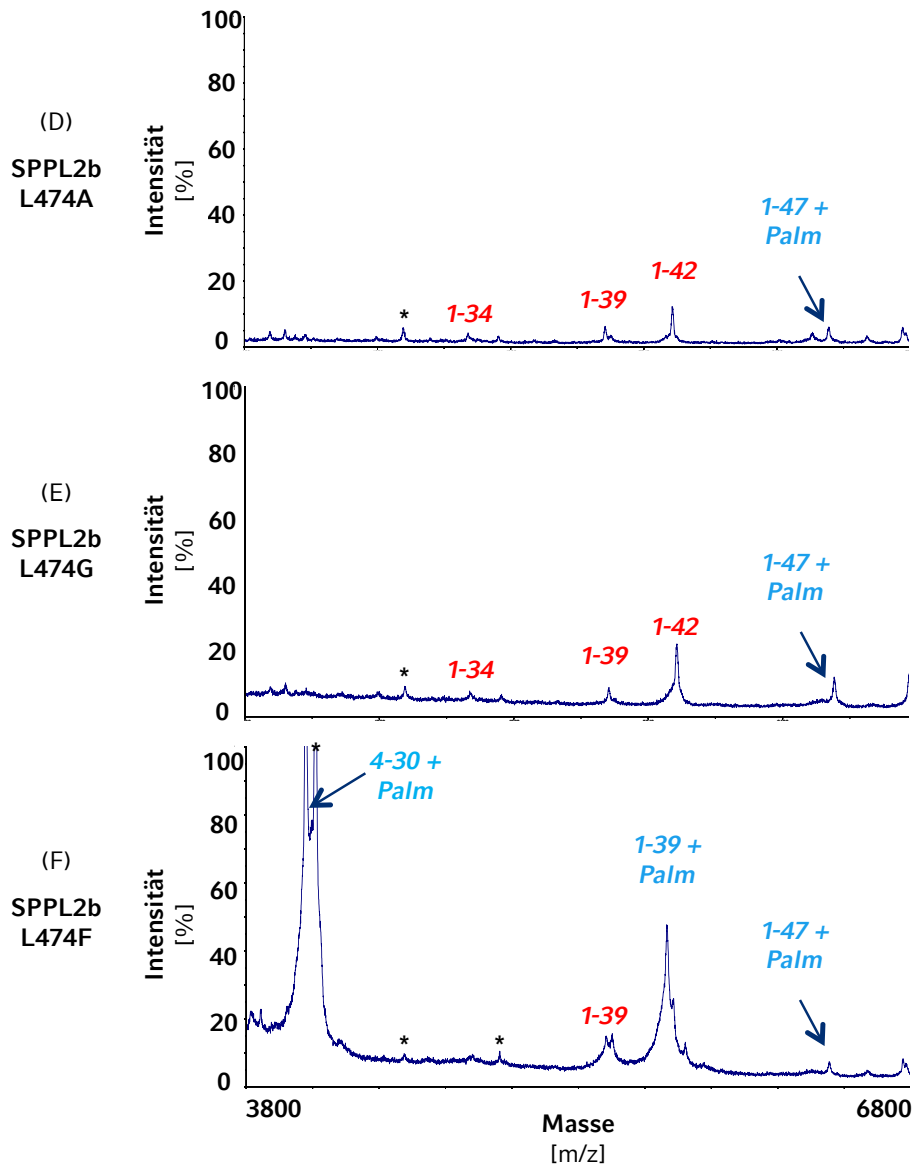
Abschließend produzierte SPPL2b L474F auf den ersten Blick ähnliche TNF $\alpha$  ICDs (Abb. 4.16-F), lediglich die ICDs 1 - 34 und 1 - 42 fehlten verglichen zum Wildtyp (Abb. 4.16-A). Sowohl für SPPL2b wt als auch für die Mutante lassen sich die TNF $\alpha$  ICDs mit höchster Intensität hier auf die Palmitoylierung an Cystein 30 zurückführen (Abb. 4.16-A&F, blau), allerdings überwiegen im Falle der Mutante sogar die palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs. Vereinbar mit einem verschobenen initialen Substratschnitt war zudem die relative Intensität der palmitoylierten TNF $\alpha$  ICD 1 - 39 deutlich höher als bei SPPL2b wt. Das Überwiegen der palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs sowie der Hinweis auf einen

## ERGEBNISSE

veränderten Initialschnitt des Substrates TNF $\alpha$  NTF erscheint sehr stimmig in Bezug auf die gestörte sequentielle ICD-Konversion im Rahmen der time-course Analyse von SPPL2b L474F (Abb. 4.15-I). Auch das Fehlen der nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs 1 - 34 und 1 - 42 ist mit einer gestörten ICD-Konversion oder einer selektiven Erkennung des palmitoylierten Substrates vereinbar und könnte so zu der Tatsache passen, dass es sich bei SPPL2b L474F um eine FAD-analoge Mutation handelt (Rogaeva et al., 2001).



# ERGEBNISSE



**Abb. 4.16 MALDI-TOF Analyse der TNF $\alpha$  ICDs für SPPL2b Leucin 474**

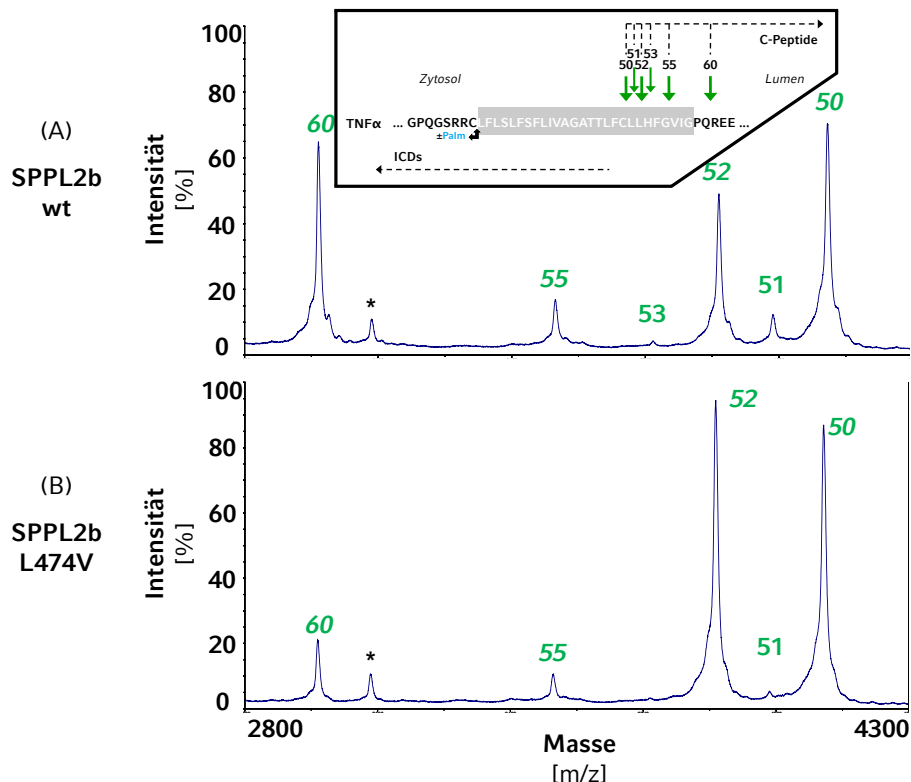
Nach Kotretransfektion von TNF $\alpha$  FL in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder SPPL2b Leucin 474 Mutanten (B-F) wurden mittels anti-Flag Immunopräzipitation TNF $\alpha$  ICDs isoliert und per MALDI-TOF MS analysiert. Identifizierte TNF $\alpha$  ICDs sind palmitoyliert (blau) oder nicht palmitoyliert (rot). Das Schema zeigt die nachweisbaren TNF $\alpha$  ICDs (vgl. Abb. 4.2). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1 & 8.4).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNF $\alpha$  ICD-Spezies zuzuordnen.

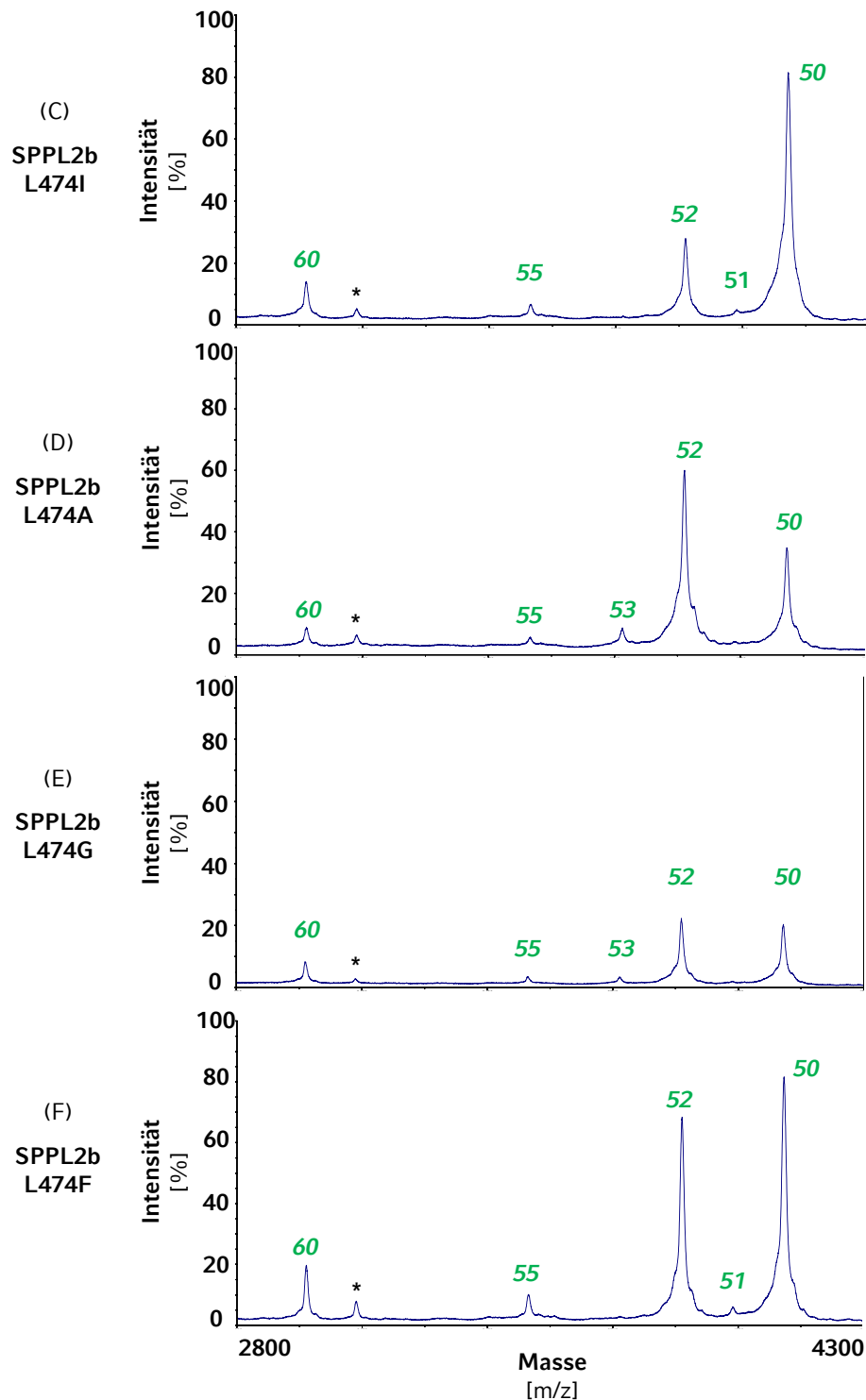
### 4.5.3 Analyse der TNF $\alpha$ C-Peptide für SPPL2b Leucin 474

Für sämtliche Mutanten der Position 474 (Abb. 4.17-B bis F) ergab die massenspektrometrische Analyse der TNF $\alpha$  C-Peptide qualitativ keinen größeren Unterschied im Vergleich zu SPPL2b wt (Abb. 4.17-A), abgesehen vom Fehlen des C-Peptids 53 (Abb. 4.17-B,C,F) oder des C-Peptids 51 (Abb. 4.17-D&E). Allerdings kam es im Falle der Mutanten stattdessen stets zu einer vermehrten Produktion von größeren C-Peptiden, gemessen am verringerten Verhältnis der massenspektrometrischen Intensitäten von C-Peptid 60 zu C-Peptid 50 (Abb. 4.17-A bis F; SPPL2b wt 1 : 1, SPPL2b L474V 1 : 4.4, SPPL2b L474I 1 : 5.3, SPPL2b L474A 1 : 3.5, SPPL2b L474G 1 : 2.3, SPPL2b L474F 1 : 4). Zum einen könnte dies wiederum auf eine Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes von TNF $\alpha$  NTF deuten, andererseits könnte die Verschiebung hin zu größeren C-Peptiden analog zu bereits zuvor analysierten Mutanten auf eine reduzierte katalytische Aktivität aller Leucin 474 Mutanten zurückzuführen sein (siehe 5.2.1f).

Damit wäre die massenspektrometrisch nachgewiesene Produktion von größeren TNF $\alpha$  C-Peptiden (Abb. 4.17-B bis E) konsistent mit der signifikanten Verlangsamung des Umsatzes von TNF $\alpha$  NTF (Abb. 4.15-A bis H) bzw. der gestörten ICD-Konversion (Abb. 4.15-I) im Rahmen der time-course Analysen.



# ERGEBNISSE



**Abb. 4.17 MALDI-TOF Analyse der TNFα C-Peptide für SPPL2b Leucin 474**

Zur Detektion der TNFα C-Peptide wurde ein C-terminal Flag AP-markiertes TNFα NTF in HEK293 Zellen mit stabiler Expression von SPPL2b wt (A) oder SPPL2b Leucin 474 Mutanten (B-F) kotransfiziert, anti-Flag immunopräzipitiert und per MALDI-TOF MS analysiert. Das Schema zeigt die nachweisbaren TNFα C-Peptide (vgl. Abb. 4.2). Die zur Identifizierung gemessenen und berechneten Massen finden sich im Anhang (Tab. 8.1 & 8.4).

\* markierte Peaks sind keiner bekannten TNFα C-Peptid-Spezies zuzuordnen.



#### 4.5.4 Zusammenfassung für SPPL2b Leucin 474

Hier wurde abschließend die dritte Position des PAL-Motivs, Leucin 474, hinsichtlich der Anforderungen an die Aminosäure-Seitenkette für die katalytische Aktivität von SPPL2b gegenüber TNF $\alpha$  NTF untersucht.

In der Zusammenschau der einzelnen Mutanten demonstriert diese Position des PAL-Motivs in SPPL2b eine kritische Rolle für die korrekte, sequentielle TNF $\alpha$  ICD-Konversion. Zudem zeigt SPPL2b L474A, teilweise auch SPPL2b L474G, den drastischen Befund der Entkopplung, wobei es zur Verstärkung des initialen Substratschnittes und gleichzeitig zur massiven Beeinträchtigung der sequentiellen TNF $\alpha$  ICD-Konversion kommt. Dies hat möglicherweise weitreichende Implikationen für die Lokalisation des lateral substrate gate sowie für den molekularen Proteolysemechanismus von GxGD-Proteasen (siehe 5.2.1f). Die gestörte ICD-Konversion bei SPPL2b L474F als FAD-analoger Mutation könnte darüber hinaus einen plausiblen Pathomechanismus für die Preseniline darstellen (siehe 5.3.2).

Tabelle 4.6 liefert einen Kurzüberblick der Ergebnisse für SPPL2b Leucin 474.

SPPL2b Variante:	Position:	katalytische Aktivität:
SPPL2b wt	-	+++
SPPL2b L474V	} Leucin 474	-
SPPL2b L474I		-
SPPL2b L474A		- (Entkopplung)
SPPL2b L474G		+
SPPL2b L474F		+++

**Tab. 4.6 Katalytische Aktivität von SPPL2b Leucin 474 Mutanten**

Übersicht aller 5 analysierten Mutationen der dritten Position des PAL-Motivs in SPPL2b hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF. Graduierung beruht auf den Quantifizierungsergebnissen der einzelnen Mutanten im Rahmen der *in vitro* time-course Analysen:

- +++ normale katalytische Aktivität
- ++ tendenziell leichte Reduktion der katalytischen Aktivität (p-Werte n.s.)
- + mäßige Reduktion der katalytischen Aktivität (bester p-Wert < 0.05)
- starke Reduktion der katalytischen Aktivität (bester p-Wert < 0.001)

**Entkopplung** → massiver Initialschnitt des Substrates TNF $\alpha$  NTF bei gestörter, sequentieller TNF $\alpha$  ICD-Konversion

## 5 DISKUSSION

Die regulierte Intramembranproteolyse ist ein von Bakterien bis hin zum Menschen konservierter, biochemischer Mechanismus (Brown et al., 2000), der durch die drei Klassen der S2P-, der Rhomboid- und der GxGD-Intramembranproteasen katalysiert wird. Allen voran die  $\gamma$ -Sekretase als Vertreter der GxGD-Proteasen ist Gegenstand intensiver medizinischer Forschung, da ihre Prozessierung von APP ein mögliches drug target zur Reduktion von neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden in der Prävention und Behandlung des Morbus Alzheimer darstellt (Haass und Selkoe, 2007). Aufgrund sehr ähnlicher subzellulärer Lokalisation (Krawitz et al., 2005) verspricht insbesondere die Untersuchung von SPPL2b einen Vergleich der Proteolysemechanismen der  $\gamma$ -Sekretase einerseits und der homologen SPP/SPPL-Proteasen andererseits.

In der vorliegenden Arbeit wird die funktionelle Bedeutung des konservierten PAL-Motivs für den proteolytischen Mechanismus von SPPL2b charakterisiert: Die Weiterentwicklung der *in vitro* time-course Analyse (Fluhrer et al., 2008) sowie der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie (Fluhrer et al., 2006) ermöglicht hier eine quantitative sowie qualitative Untersuchung der SPPL2b-abhängigen Prozessierung von TNF $\alpha$ .

Es wird gezeigt, dass das PAL-Motiv in SPPL2b essentiell für die Proteolyse von TNF $\alpha$  ist; gleichzeitig sind die Anforderungen an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase weitgehend identisch.

Die experimentellen Befunde zeigen außerdem eine direkte Beteiligung des PAL-Motivs am Mechanismus der Intramembranproteolyse auf und sprechen für eine Konservierung des Proteolysemechanismus beider Proteasen.

## 5.1 Funktionalität des PAL-Motivs in GxGD-Proteasen

### 5.1.1 Analysemethoden der SPPL2b-abhängigen RIP von TNF $\alpha$

Analog zur Produktion verschiedener A $\beta$ -Peptide durch die  $\gamma$ -Sekretase (Funamoto et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005), wurden im Falle der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  mehrere Produkte mit unterschiedlicher Länge gefunden (Fluhrer et al., 2006). Aufgrund der im Vergleich zur  $\gamma$ -Sekretase invertierten Membrantopologie von SPPL2b betrifft dies hier jedoch nicht die extrazellulären A $\beta$ -Peptide, sondern die intrazelluläre TNF $\alpha$  ICD, welche von luminal hin zur zytoplasmatischen Seite der Membran getrimmt wird. Zur Analyse der katalytischen Aktivität von SPPL2b-Mutanten wurde in diesem Rahmen für das GxGD-Motiv bereits erfolgreich die *in vitro* time-course Analyse angewendet (Fluhrer et al., 2008).

#### 5.1.1.1 Bewertung der *in vitro* time-course Analyse

Mittels dieses *in vitro* Assays gelingt sowohl die Quantifizierung des zeitabhängigen Umsatzes des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF als auch die qualitative Untersuchung der zeitabhängigen TNF $\alpha$  ICD-Konversion. Auch für die Untersuchung einzelner Mutationen des PAL-Motivs ist diese sensitive Analyse gut geeignet (siehe 4.2ff). Die Weiterentwicklung dieses Assays hinsichtlich Reduktion auf die wesentlichen Messzeitpunkte (siehe 4.1.1) erlaubt die standardisierte Beobachtung der Umsetzung des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF durch verschiedene Mutanten im Vergleich.

Aufgrund einer Erhöhung der Acrylamid-Konzentration des Trenngels im Vergleich zu Fluhrer et al., 2008 konnten darüber hinaus im Rahmen der TNF $\alpha$  ICD-Konversion erstmalig zusätzliche, kleinere ICD-Spezies im Western Blot nachgewiesen werden (siehe 4.1.1). Positiv an diesem Setup der *in vitro* time-course Analyse ist also zu sehen, dass es sich für den zeitabhängigen Nachweis der TNF $\alpha$  ICD-Konversion hin zu kleineren Spezies gut eignet und im Gegensatz zur  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen A $\beta$ -Prozessierung diese Konversion überhaupt erstmalig verfolgt werden kann.

Andererseits muss aber auch auf entsprechende Limitierungen dieses Assays hingewiesen werden: Zum einen beruht die *in vitro* time-course Analyse auf

der Isolierung zellulärer Membranpräparationen, wobei in Ermangelung guter nativer Antikörper zur robusten Detektion sämtliche SPPL2b-Konstrukte HA- und sämtliche TNF $\alpha$ -Konstrukte Flag/V5-markiert und in HEK-Zellen überexprimiert wurden. Daher reflektiert dieser Assay nicht die physiologischen Bedingungen der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$ .

Ebenso exprimieren die verwendeten HEK-Zellen nach wie vor endogenes SPPL2b wt. Daher bleibt trotz Überexpression der jeweils zu untersuchenden SPPL2b Mutanten stets ein gewisser endogener Hintergrund an aktivem SPPL2b bestehen. Eine wenn auch aufwendigere, so doch elegante Möglichkeit beide Probleme zukünftig zu umgehen wäre, anstelle der Überexpression der SPPL2b Mutanten entsprechende Zelllinien mit einem Knockin der jeweiligen Mutation zu generieren, beispielsweise mittels des CRISPR/Cas-Systems (Wang et al., 2013).

Zum anderen führen die transiente Transfektion von TNF $\alpha$  sowie das manuelle Handling der Proben zu einer deutlichen experimentellen Variabilität der *in vitro* time-course Analyse (siehe 4.1.1). Aus diesem Grund wird zur Quantifizierung der katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  stets der paarweise Vergleich von SPPL2b wt zu Mutanten herangezogen (siehe 4.2.1ff) und nur die relative Abnahme des TNF $\alpha$  NTF erfasst. Hierbei werden sowohl vergleichbare Expressionsniveaus von SPPL2b wt und Mutante als auch eine ähnliche Transfektionseffizienz des Substrates vorausgesetzt. Daraus folgt, dass die Quantifizierungsergebnisse der SPPL2b Mutanten sorgsam interpretiert werden müssen und nur indirekt über den Umweg des SPPL2b wt miteinander verglichen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu eine Klassifizierung der katalytischen Aktivität von SPPL2b Mutanten anhand der Signifikanzniveaus des *in vitro* Assays gewählt (siehe 3.7 & 5.3.1).

Schlussendlich bietet sich die hier verwendete *in vitro* time-course Analyse zwar durchaus für den zeitabhängigen Nachweis der TNF $\alpha$  ICD-Konversion hin zu kleineren Spezies an. Dabei sollte aber stets eine relative Quantifizierung der katalytischen Aktivität von SPPL2b Mutanten erfolgen, nämlich in Relation zu SPPL2b wt.

### 5.1.1.2 Bewertung der MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur qualitativen Charakterisierung der TNF $\alpha$  Produkte, die durch SPPL2b-abhängige Proteolyse entstehen, wurde zudem die MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt und die hierzugehörige Probenvorbereitung weiterentwickelt (siehe 4.1.2). In der Vergangenheit wurde für TNF $\alpha$  bereits eine Palmitoylierung innerhalb der ICD-Sequenz an Position Cystein 30 beschrieben (Utsumi et al., 2001) (siehe 5.2.1.4). Die bis heute massenspektrometrisch nachgewiesenen Hauptprodukte der SPPL2b-abhängigen Proteolyse von TNF $\alpha$  umfassen jedoch nur ICDs mit einem C-terminalen Serin 34 (TNF $\alpha$  ICD 1 - 34) oder Leucin 39 (TNF $\alpha$  ICD 1 - 39) (Fluhrer et al., 2006), ein Nachweis von eventuell palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs gelang dagegen noch nicht. Vermutlich liegt dies an der Zugabe von Ameisensäure im Matrix-Puffer (Fluhrer et al., 2006) und einer durch den geringen pH bedingten, sauren Hydrolyse der Thioester-Bindung zwischen Palmitinsäure und Cystein 30 von TNF $\alpha$ . Der Verzicht auf Ameisensäure im Matrix-Puffer erlaubt nun mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie die Detektion sowohl der bekannten TNF $\alpha$  ICDs (Fluhrer et al., 2006) als auch erstmalig von mehreren palmitoylierten TNF $\alpha$  ICD-Spezies (siehe 4.1.2 & 5.2.1).

In diesem Kontext fällt auf, dass bei Expression des SPPL2b wt die palmitoylierten TNF $\alpha$  ICD-Spezies sogar hinsichtlich ihrer Intensität dominieren, allen voran eine die Aminosäuren 4 - 30 umfassende Spezies. Diese palmitoylierte TNF $\alpha$  ICD 4 - 30 stellt bei weitem die Produkt-Spezies mit höchster Intensität dar, ihre Identität wurde mittels Tandem-massenspektrometrie (MS/MS) bestätigt (Fluhrer et al., unpubliziert). Inwiefern diese N-terminal prozessierte TNF $\alpha$  ICD ein physiologisches Produkt der SPPL2b-abhängigen Proteolyse darstellt ist gegenwärtig noch nicht geklärt. Vorstellbar wäre, dass es sich bei einer bislang nicht nachgewiesenen TNF $\alpha$  ICD 1 - 30 um das abundanteste Endprodukt der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse handelt und exklusiv diese ICD 1 - 30 erst sekundär N-terminal prozessiert wird. Möglicherweise akkumuliert vorzugsweise diese TNF $\alpha$  ICD 1 - 30, da sie über die Palmitoylierung an Cystein 30 gerade noch membranverankert ist, aber nur schlecht durch SPPL2b weiter prozessiert

werden kann. Im Zuge dieser Akkumulation könnte dann die TNF $\alpha$  ICD 1 - 30 durch andere Proteasen N-terminal prozessiert werden.

Alternativ könnte es auch primär zu einer N-terminalen Prozessierung von TNF $\alpha$  kommen, welches eine effizientere SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse ermöglichen und daher das abundanteste Endprodukt darstellen könnte. Möglicherweise handelt es sich bei der TNF $\alpha$  ICD 4 - 30 aber lediglich um ein Artefakt der Überexpression oder der Probenvorbereitung, was eventuell mit einem Modellsystem unter endogenen Expressionsniveaus und modernen proteomischen Verfahren wie der hochauflösenden LC-MS/MS Massenspektrometrie geklärt werden könnte.

Gleichsam wird nun mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ein Peak nachgewiesen, der wahrscheinlich einer palmitoylierten TNF $\alpha$  ICD 1 - 47 entsprechen könnte (siehe 4.1.2). Sollte sich dieser Nachweis, beispielsweise auch via LC-MS/MS, bestätigen lassen, so handelt es sich bei der TNF $\alpha$  ICD 1 - 47 um das größte bekannte intrazelluläre Produkt der SPPL2b-abhängigen Proteolyse von TNF $\alpha$ . Da die größten bekannten TNF $\alpha$  C-Peptide mit Aminosäure 50 beginnen, würde dies unter den Bedingungen der Überexpression von Protease und Substrat die Position des initialen  $\varepsilon$ -Schnittes auf die Aminosäuren 47 - 50 in TNF $\alpha$  einschränken. Aufgrund dieses noch immer bestehenden Versatzes erscheint es gegenwärtig wahrscheinlich, dass noch größere, eventuell auch palmitoylierte TNF $\alpha$  ICDs existieren. Mutmaßlich ist hier der Nachweis von langen TNF $\alpha$  ICDs mittels MALDI-TOF limitierend, da insbesondere solch große, hydrophobe Peptide nur schlecht ionisiert und dementsprechend detektiert werden (Gerl et al., 2014). Auch zur Klärung dieser Frage könnte die hochauflösende LC-MS/MS Massenspektrometrie potentiell beitragen.

Als extrazelluläre Endprodukte der SPPL2b-abhängigen Proteolyse von TNF $\alpha$  konnten mittels Radiosequenzierung bislang lediglich zwei definierte TNF $\alpha$  C-Peptide nachgewiesen werden, N-terminal beginnend entweder mit Leucin 50 oder Histidin 52 (Fluhrer et al., 2006; 2008). Unter Verwendung eines C-terminal Flag AP-markierten TNF $\alpha$  NTF können nun mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ebenfalls TNF $\alpha$  C-Peptide in hoher Auflösung

detektiert werden (siehe 4.1.2). Die hinzugefügten Aminosäuren Alanin und Prolin am C-Terminus des Konstruktes verhindern eine Degradation der ins Medium freigesetzten TNF $\alpha$  C-Peptide durch Carboxypeptidasen (Fluhrer et al., unpubliziert). Neben den bereits bekannten TNF $\alpha$  C-Peptiden 50 und 52 (Fluhrer et al., 2006; 2008) werden so erstmalig auch neuartige C-Peptide beginnend mit den Aminosäuren 51, 53, 55 und 60 detektiert. Dabei handelt es sich bei dem letztgenannten TNF $\alpha$  C-Peptid 60 um ein vergleichsweise abundantes, kurzes Endprodukt (siehe 4.1.2). Sehr positiv an der Anwendung der MALDI TOF-Massenspektrometrie gegenüber der Radiosequenzierung ist die deutlich erhöhte Auflösung von distinkten TNF $\alpha$  C-Peptiden (Fluhrer et al., 2006; 2008). Allerdings ist verglichen zur Radiosequenzierung auch mehr Ausgangsmaterial vonnöten, so dass diese höhere Auflösung durch eine geringere Sensitivität im Produktnachweis erkauft werden muss. Offen bleibt die Frage der Genese dieser unterschiedlichen TNF $\alpha$  C-Peptide, denkbar sind sowohl eine SPPL2b-abhängige Aktivität als auch unspezifische Aminopeptidasen aus dem konditionierten Medium (siehe 5.2.1).

Zusammenfassend eignen sich beide MALDI-TOF Massenspektrometrie-Methoden zum hoch auflösenden Nachweis der Schnittprodukte der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$ . Gleichwohl sollte es möglich sein, mittels methodischen und technischen Optimierungen die Detektion von TNF $\alpha$  Produktspezies weiter zu verbessern.

### 5.1.2 Konservierung des PAL-Motivs in GxGD-Proteasen

Innerhalb der Familie der GxGD-Intramembranproteasen existieren drei hoch konservierte Motive (Weihofen et al., 2002). Die beiden katalytischen Aspartyl-Reste werden dabei sowohl im YD- (TMD 6) als auch im namensgebenden GxGD-Motiv (TMD 7) beherbergt (Steiner et al., 1999; Wolfe et al., 1999). Das PAL-Motiv, lokalisiert in TMD 9, stellt das dritte hoch konservierte Motiv innerhalb der GxGD-Proteasen dar (Weihofen et al., 2002). Eine funktionelle Bedeutung des PAL-Motivs hinsichtlich der katalytischen Aktivität konnte bereits für PS1 als auch für SPP gezeigt werden (Wang et al., 2004; 2006a). Die Deletion des PAL-Motivs in SPPL2b demonstriert nun erstmals die

funktionelle Relevanz dieses Sequenzmotivs hinsichtlich der katalytischen Aktivität von SPPL-Proteasen (siehe 4.2 & 4.2.1). So kommt es bei Überexpression von TNF $\alpha$  und SPPL2b  $\Delta$ PAL, analog zur inaktiven SPPL2b D421A-Mutante (Fluhrer et al., 2006), zur Akkumulation des direkten Substrates TNF $\alpha$  NTF (siehe 4.2). Auch die *in vitro* time-course Analyse zeigt selbst nach 6 h Inkubation keinerlei Umsatz des Substrates durch SPPL2b  $\Delta$ PAL, ebenso werden keine TNF $\alpha$  ICDs produziert (siehe 4.2.1). Gemessen an der SPPL2b-abhängigen Umsetzung von TNF $\alpha$  resultiert die Deletion des PAL-Motivs in einem katalytisch inaktiven SPPL2b. Zwar wurden bisher weder für PS1 noch für SPP vollständige Deletionen des PAL-Motivs untersucht, allerdings resultiert in diesen Proteasen bereits die isolierte Mutation des Prolin zu einem Leucin in einer katalytisch inaktiven Mutante (Tomita et al., 2001; Wang et al., 2004; 2006a).

Über die mechanistische Beteiligung des PAL-Motivs an der Intramembranproteolyse der GxGD-Familie konnte mangels atomarer Strukturanalysen (siehe 5.2.2) lange Zeit nur spekuliert werden. Allerdings weisen im Falle von PS1 Untersuchungen mittels Scanning Cysteine Mutagenesis (SCAM) darauf hin, dass sich das PAL-Motiv in enger räumlicher Nähe zum YD-Motiv und damit zum aktiven Zentrum befindet (Tolia et al., 2008; Sato et al., 2008). Initial wurde darüber hinaus berichtet, dass das PAL-Motiv in PS1 für die korrekte Komplexassemblierung der  $\gamma$ -Sekretase relevant ist (Tomita et al., 2001). Allerdings erklärt dies nicht die Konservierung des PAL-Motivs in der SPP/SPPL-Familie, da diese Proteasen bekanntermaßen ohne Kofaktoren proteolytisch aktiv sind. Zudem führt eine neuere Studie den Phänotyp der gestörten Komplexassemblierung bei Mutationen des PAL-Motivs wieder auf die proteolytische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase zurück (Wang et al., 2004). Interessanterweise wird aber für SPP bzw. SPPL2b diskutiert, ob sich diese Proteasen *in vivo* zu Homooligomeren assemblieren und ob dies für die Ausübung ihrer proteolytischen Aktivität zwingend erforderlich ist (Miyashita et al., 2011; Nyborg et al., 2004b; Schrul et al., 2010). Denkbar wäre bei solch einem Szenario die kritische Beteiligung des PAL-Motivs an dem Prozess der Homooligomerisierung, dessen Störung so zu katalytisch inaktiven Monomeren der Protease führen könnte.



Die Deletion des PAL-Motivs bewirkt zudem eine gestörte Maturierung der SPPL2b-Protease, erkennbar anhand der deutlichen Verringerung des Verhältnisses von maturem zu immaturem SPPL2b (siehe 4.2). Die korrekte Faltung von Proteinen ist entscheidend für ihre Maturierung bzw. Komplexglykosylierung in sekretorischen Kompartimenten (Dobson, 2003). Daher könnte die fehlerhafte Maturierung von SPPL2b  $\Delta$ PAL darauf hinweisen, dass die Deletion des PAL-Motivs bereits zu umfangreicheren strukturellen Veränderungen von monomerem SPPL2b führt oder aber den Transport in nachfolgende sekretorische Kompartimente stört. Mittels Immunfluoreszenz-Experimenten könnte zumindest die subzelluläre Verteilung von SPPL2b  $\Delta$ PAL visualisiert und eine potentielle Störung des Transportes analysiert werden.

Andererseits könnte möglicherweise gerade eine Homooligomerisierung das inkonsistente Auftreten von Peptid 0 bei Überexpression von TNF $\alpha$  zusammen mit SPPL2b  $\Delta$ PAL oder SPPL2b D421A in HEK293 Zellen erklären (siehe 4.2 & 4.2.1). Unter der Annahme, dass jeweils ein Molekül der katalytisch inaktiven Mutante von SPPL2b mit einem Molekül des endogenen Wildtyps dimerisiert, könnte die Peptid 0-Bande auf eine atypisch große TNF $\alpha$  ICD zurückzuführen sein, die von diesem artifiziellen Homodimer mit veränderter bzw. reduzierter katalytischer Aktivität erzeugt wird. Allerdings wird Peptid 0 in der *in vitro* time-course Analyse selbst nach 6 h Inkubation und Überexpression von Protease und Substrat nicht weiter umgesetzt, so dass solch ein hypothetisches SPPL2b  $\Delta$ PAL/wt-Dimer vermutlich keine physiologisch relevante, proteolytische Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  hätte.

Abgesehen von der fraglichen Homodimerisierung der SPP/SPPL-Proteasen wäre eine weitere Möglichkeit, dass es unter den Bedingungen der Überexpression von Substrat und Protease bzw. einer Fehlfaltung der Protease zu einer proteasomalen Degradation von TNF $\alpha$  NTF oder zu einem Fehlschnitt von TNF $\alpha$  NTF durch eine unbekannte Protease in anderen Kompartimenten kommt. Die Behandlung mit proteasomalen Inhibitoren bzw. die Lokalisierung von Substrat und Protease mittels Immunfluoreszenz-Experimenten könnte hier Aufschluss liefern.

### 5.1.3 Erweitertes PAL-Motiv in GxGD-Proteasen

Während das eigentliche PAL-Motiv innerhalb der Familie der GxGD-Intramembranproteasen hoch konserviert ist, unterscheiden sich die Preseniline sowie die SPP/SPPL-Familie voneinander hinsichtlich der Konservierung des erweiterten PAL-Motivs. Hierbei handelt es sich um diejenige Aminosäuresequenz, welche innerhalb der Preseniline als PALPIS bzw. innerhalb der SPP/SPPL-Familie als PALLYL konserviert ist (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002). Die genauen Gründe für diese differentielle Konservierung bzw. ihre Relation zum molekularen Mechanismus der Intramembranproteolyse sind bislang noch nicht geklärt.

Ein Austausch des erweiterten PAL-Motivs von SPPL2b zu demjenigen der Preseniline (SPPL2b PALPIS) bewirkt eine deutlich reduzierte katalytische Aktivität von SPPL2b sowie die damit einhergehende Akkumulation von TNF $\alpha$  NTF (siehe 4.2). Darüber hinaus spielt das erweiterte PAL-Motiv eine Rolle in der sequentiellen Konversion der TNF $\alpha$  ICDs, da die entstehenden ICD-Spezies kaum mehr zu kleineren Peptiden umgesetzt werden können (siehe 4.2.2).

Analog zu den Begrifflichkeiten der  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP (Funamoto et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005) (siehe 1.3.1) scheint SPPL2b PALPIS sowohl den initialen endoproteolytischen Schnitt des TNF $\alpha$  NTF als auch die sequentielle, Carboxypeptidase-artige TNF $\alpha$  ICD-Konversion zu stören (siehe 5.2.1). Da insbesondere die Reduktion der TNF $\alpha$  ICD-Konversion einer gestörten enzymatischen Prozessivität ähnelt, könnte diese Beobachtung auch durch eine Beteiligung des erweiterten PAL-Motivs am Aufbau des lateral substrate gate zu erklären sein (siehe 5.2.2). Möglicherweise führt die Mutation SPPL2b PALPIS dabei zu einer offenen Konformation der Protease, so dass es nach dem initialen  $\epsilon$ -Schnitt zu einer frühzeitigen Dissoziation von SPPL2b und der naszierenden TNF $\alpha$  ICD kommen kann.

Interessant ist hierbei die Frage, warum das erweiterte PAL-Motiv differentiell konserviert ist zwischen der  $\gamma$ -Sekretase und den Proteasen der SPP/SPPL-Familie. Möglicherweise ist dies auf unterschiedliche Strukturanforderungen der  $\gamma$ -Sekretase hinsichtlich ihrer Komplexassemblierung oder ihrer Autoendoproteolyse zurückzuführen (siehe 1.2.1.1 & 5.4.3). Experimentell könnte

getestet werden, inwieweit die reziproke Mutation eines Presenilins zur PALLYL-Sequenz der SPP/SPPL-Familie (PS PALLYL) die Komplexassemblierung oder die Autoendoproteolyse stört bzw. doch eine ausreichende, katalytische Aktivität z.B. gegenüber APP ermöglicht.

Ein weiterer Grund für die differentielle Konservierung des erweiterten PAL-Motivs könnten unterschiedliche sterisch-energetische Anforderungen an die Intramembranproteolyse der jeweiligen Substrate sein. Sowohl für die  $\gamma$ -Sekretase (Hemming et al., 2008; Ren et al., 2007) als auch für SPPL2b (Martin et al., 2009) sind hinsichtlich einer effizienten Proteolyse ihrer Substrate Strukturdeterminanten sowohl innerhalb der TMDs als auch in den Juxtamembrandomänen beschrieben. Unter der Annahme, dass das PAL-Motiv in der Tat an der Substratbindung bzw. dem Aufbau des lateral substrate gate (siehe 5.2.2) beteiligt ist, könnte das erweiterte PAL-Motiv eine höhere Substratspezifität ermöglichen und zu einer höheren Selektivität hinsichtlich der als Substrate akzeptierten Typ-1- oder Typ-2-Transmembranproteine führen. Durch eine Interaktion des erweiterten PAL-Motivs mit der Substrat-TMD bzw. der Erkennung von Substrat und Nicht-Substrat könnte so in Hinblick auf die GxGD-Intramembranproteasen einerseits sowie auf S2P und Rhomboiden andererseits eine Abgrenzung der jeweiligen Substratspektren vermittelt werden. Experimentell könnte hierauf beispielsweise hinweisen, falls die SPPL2b PALPIS-Mutante zuvor als Nicht-Substrat klassifizierte Typ-2-Transmembranproteine wie Bri3 oder gar Typ-1-Transmembranproteine prozessieren könnte (Martin et al., 2008).

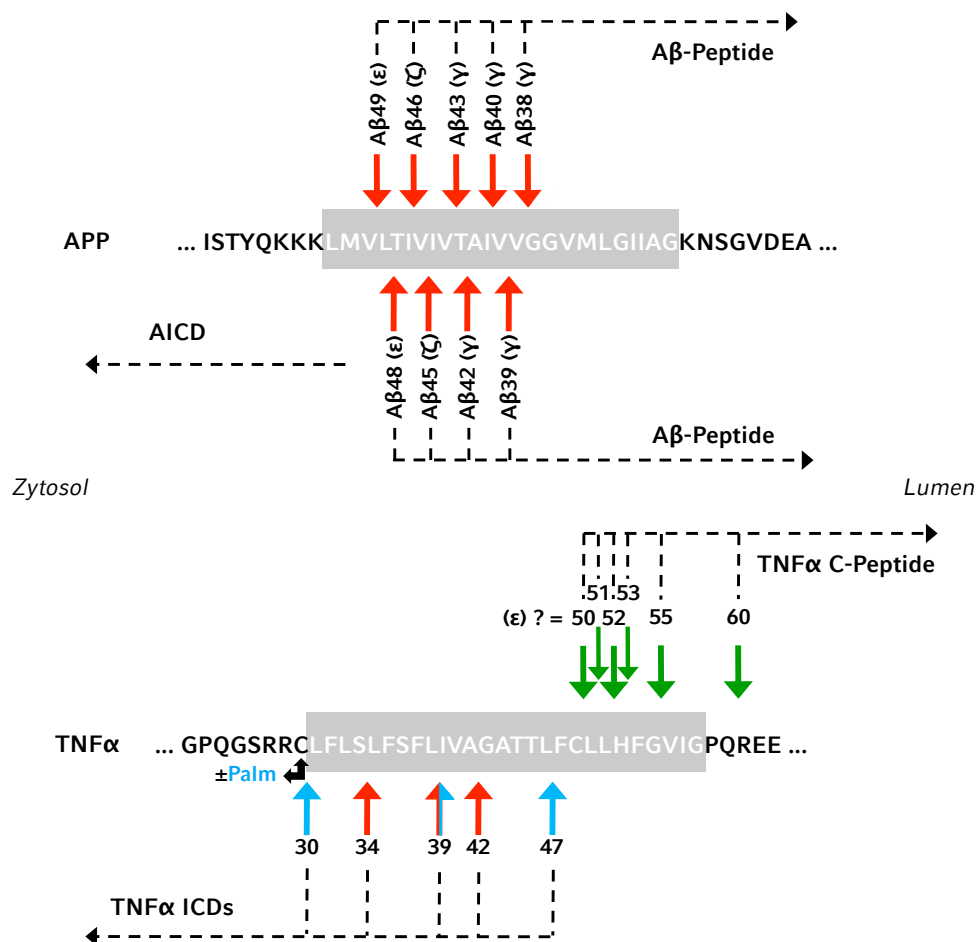
## **5.2 Proteolysemechanismus von SPPL2b**

### **5.2.1 Sequentielle Substratkonversion von TNF $\alpha$ durch SPPL2b**

Für die SPPL2b-abhängige Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  sind mehrere Produkte mit unterschiedlicher Länge beschrieben, wobei TNF $\alpha$  innerhalb der TMD mehrmals geschnitten werden kann (Fluhrer et al., 2006). Analog zur  $\gamma$ -Sekretase wird daher ebenfalls bei SPPL2b von einem sequentiellen Proteolysemechanismus für TNF $\alpha$  ausgegangen.

### 5.2.1.1 Initiale Endoproteolyse von TNF $\alpha$ durch SPPL2b

Hierbei wird postuliert, dass der initiale Schnitt von TNF $\alpha$  vermutlich an der Position 49/50 erfolgt, woraufhin ein TNF $\alpha$  C-Peptid N-terminal beginnend mit Leucin 50 freigesetzt wird (Fluhrer et al., 2006) (Abb. 5.1). Wie bei der Prozessierung von APP handelt es sich hierbei um den initialen, endoproteolytischen  $\epsilon$ -Schnitt (Qi-Takahara et al., 2005). In Einklang hiermit grenzt der massenspektrometrische Nachweis der palmitoylierten TNF $\alpha$  ICD 1 - 47 sowie der TNF $\alpha$  C-Peptide beginnend ab Leucin 50 die Region des primären  $\epsilon$ -Schnittes von TNF $\alpha$  ein auf die Sequenz von Aminosäure 47 bis 50



**Abb. 5.1** Sequentielle Prozessierung von APP und TNF $\alpha$

Die bekannten und die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase in APP (oben) und SPPL2b in TNF $\alpha$  (unten). Sowohl APP als auch TNF $\alpha$  werden sequentiell mehrfach geschnitten, die annotierten TMDs der Substrate sind grau hinterlegt. Im Falle der  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP wurden zwei Produktlinien postuliert, die von der Position des initialen  $\epsilon$ -Schnittes abhängen (Qi-Takahara et al., 2005). TNF $\alpha$  ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert (Utsumi et al., 2001) ( $\pm$ Palm) (blau) oder nicht palmitoyliert (rot) sein. Nach (Fluhrer et al., 2009).

(siehe 4.1.2 & 4.3.1ff) (Abb. 5.1). Allerdings werden mittels Radiosequenzierung auch geringe Mengen eines TNF $\alpha$  C-Peptids identifiziert, welches N-terminal erst mit Histidin 52 beginnt (Fluhrer et al., 2006; 2008). Zusätzlich gelingt massenspektrometrisch erstmals der Nachweis weiterer, definierter C-Peptide beginnend mit den Aminosäuren 51, 53, 55 oder 60 (siehe 4.1.2). Möglicherweise ist die Position des SPPL2b-abhängigen  $\epsilon$ -Schnittes von TNF $\alpha$  also variabel, so dass es neben der hauptsächlich nachgewiesenen Position 49/50 auch zu  $\epsilon$ -Schnitten an den Positionen 50/51, 52/53, 54/55 oder 59/60 kommen könnte (Abb. 5.1). In Einklang mit einer möglichen Variabilität des  $\epsilon$ -Schnittes führen die Mehrzahl der Mutationen des PAL-Motivs in SPPL2b auch zur Freisetzung von längeren TNF $\alpha$  ICDs (siehe 4.3.1ff), was durch eine mutationsbedingte Verschiebung des initialen Schnittes zu erklären wäre. Vermutlich wird dabei durch eine veränderte Konformation des PAL-Motivs die Orientierung des Substrates zu den katalytisch aktiven Aspartyl-Resten verschoben. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass bislang für kein C-Peptid die dazu passende TNF $\alpha$  ICD nachgewiesen werden konnte. Alternativ zu einer Verschiebung des  $\epsilon$ -Schnittes muss also stets auch eine veränderte Trimmung von TNF $\alpha$  ICDs und C-Peptiden in Betracht gezogen werden (siehe 5.1.1.2).

#### 5.2.1.2 Prozessierung der TNF $\alpha$ C-Peptide

Theoretisch könnte der vermehrte Nachweis des großen TNF $\alpha$  C-Peptids 50 beispielsweise im Falle von SPPL2b P472G (siehe 4.3.2) auch mit der reduzierten katalytischen Aktivität der Mutante vereinbar sein. Hierzu müsste man allerdings annehmen, dass SPPL2b neben der Carboxypeptidase-artigen TNF $\alpha$  ICD-Konversion ebenfalls eine Aminopeptidase-artige Trimmung der TNF $\alpha$  C-Peptide durchführen könnte. Experimentell könnte hier untersucht werden, ob sich das SPPL2b-abhängige Profil der TNF $\alpha$  C-Peptide durch Behandlung mit (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton zu größeren C-Peptiden hin verschiebt.

Während die Positionen 50/51, 52/53 oder 54/55 allesamt innerhalb der annotierten TMD von TNF $\alpha$  zu liegen kommen (Abb. 5.1), wird massenspektrometrisch auch das TNF $\alpha$  C-Peptid 60 als vergleichsweise abundantes Endprodukt detektiert (siehe 4.1.2), wobei sich die Position 59/60 von TNF $\alpha$  außerhalb der annotierten TMD befindet (Abb. 5.1). Zwar wurden

für Rhomboid-Substrate auch Schnitte außerhalb der eigentlichen TMD beschrieben (Ha et al., 2013), aber zusätzlich zum hauptsächlichen  $\varepsilon$ -Schnitt an Position 49/50 erscheint ein alternativer  $\varepsilon$ -Schnitt außerhalb der TMD von TNF $\alpha$  energetisch sehr ungünstig. Hierzu müsste sich die extrazelluläre TNF $\alpha$  Juxtamembrandomäne bis in das aktive Zentrum von SPPL2b falten, obgleich die TNF $\alpha$  TMD nachgewiesenermaßen bereits  $\varepsilon$ -Schnittstellen beinhaltet.

Möglicherweise sind daher alternative  $\varepsilon$ -Schnitte an den Positionen 50/51, 52/53 oder 54/55 mit nachfolgender Trimmung des neuen N-Terminus der TNF $\alpha$  C-Peptide durch unspezifische Aminopeptidasen aus dem konditionierten Medium wahrscheinlicher. Bei dieser mutmaßlichen N-terminalen Trimmung der TNF $\alpha$  C-Peptide durch unspezifische Aminopeptidasen dürfte es sich dann allerdings nur um einen anteiligen, wenig effizienten Prozess handeln. Ansonsten wäre bei Expression von SPPL2b mit Mutationen des PAL-Motivs eine Variabilität des  $\varepsilon$ -Schnittes mit Änderung des quantitativen Verhältnisses der TNF $\alpha$  C-Peptide zueinander (siehe oben) nicht mehr nachweisbar, da sämtliche Produkte zu einem kurzen C-Peptid 60 prozessiert würden. Möglicherweise lässt sich in weiterführenden Experimenten unter Anwendung von Protease-Inhibitoren gegen Aminopeptidasen selektiv die Produktion von TNF $\alpha$  C-Peptid 60 unterdrücken.

### 5.2.1.3 Sequentielle Konversion der TNF $\alpha$ ICDs

Unter der Voraussetzung eines primären  $\varepsilon$ -Schnittes an Position 49/50 sollte zunächst eine bislang noch nicht detektierte TNF $\alpha$  ICD 1 - 49 entstehen, welche vermutlich aufgrund ihrer Größe und Hydrophobizität massenspektrometrisch noch nicht nachgewiesen werden konnte. Erst im Anschluss an die Carboxypeptidase-artigen sequentiellen Schnitte durch SPPL2b werden massenspektrometrisch sowohl die bekannten TNF $\alpha$  ICDs 1 - 34 und 1 - 39 (Fluhrer et al., 2006) als auch längere TNF $\alpha$  ICD-Spezies (1 - 47) nachgewiesen (siehe 4.1.2).

Sollte allerdings die Dislokation einer initialen TNF $\alpha$  ICD 1 - 49 aus der Membran möglich sein, so könnten diese sequentiellen Schnitte theoretisch auch durch zytosolische Proteasen erfolgen. Dagegen spricht, dass die Mehrzahl der Mutationen des PAL-Motivs zur Freisetzung von längeren TNF $\alpha$  ICDs führt (siehe 4.3.1ff), es sich also sehr wahrscheinlich um einen SPPL2b-

abhängigen Prozess handelt. Zum endgültigen Beweis der SPPL2b-abhängigen TNF $\alpha$  ICD-Konversion wäre dennoch experimentell der *in vitro* Rekonstitutions-Assay erforderlich (siehe 5.2.3). Hierbei könnte es gleichzeitig gelingen, die bei der sequentiellen Intramembranproteolyse anfallenden Peptidfragmente zu identifizieren; analog zu den Tri- und Tetrapeptiden der  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP (Takami et al., 2009).

#### 5.2.1.4 Bedeutung der Palmitoylierung von TNF $\alpha$

Die für TNF $\alpha$  beschriebene Palmitoylierung innerhalb der ICD an Position Cystein 30 (Utsumi et al., 2001) wird nun auch massenspektrometrisch nachgewiesen. Hinweisend auf die Existenz von palmitoylierten sowie nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  NTFs stellte sich im Rahmen der *in vitro* time-course Analyse das TNF $\alpha$  NTF bei kurzer Exposition des WB bisweilen als Doppelbande dar (Daten nicht gezeigt). Parallel dazu erfolgte der Nachweis der Palmitoylierungen mittels MALDI-TOF Analyse eines an Cystein 30 mutierten TNF $\alpha$  Konstruktes, wodurch die zuvor palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs einen entsprechenden Massenshift aufwiesen (Fluhrer et al., unpubliziert).

Mittels Massenspektrometrie ist nun außerdem die TNF $\alpha$  ICD mit der höchsten, nachgewiesenen Intensität ebenfalls auf eine Palmitoylierung zurückzuführen, die TNF $\alpha$  ICD 4 - 30 (siehe 4.1.2 & 5.1.1.2). Palmitoyliertes TNF $\alpha$  NTF könnte daher ein zusätzliches oder gar das physiologische Substrat für SPPL2b darstellen. Dies stünde in Einklang mit einer Kolo-kalisation von SPPL2b (Nyborg et al., 2006) und palmitoyliertem TNF $\alpha$  in Lipid Rafts (Poggi et al., 2013; Zhang et al., 2009), was eine effiziente Proteolyse von TNF $\alpha$  fördern könnte (Poggi et al., 2013). Worauf die mutmaßliche Lokalisation von SPPL2b in Lipid Rafts beruht ist gegenwärtig allerdings nicht geklärt.

Weiterhin führen nahezu alle Mutationen des PAL-Motivs in SPPL2b auch zu einem deutlichen, quantitativen Shift der Produkt-Spezies hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs (siehe 4.3.2ff). Diese experimentellen Befunde könnten für eine physiologische Bedeutung der Palmitoylierung von TNF $\alpha$  für die Substraterkennung bzw. -bindung durch SPPL2b sprechen. Formal müsste allerdings noch ausgeschlossen werden, dass die PAL-Motiv Mutanten nicht zu einer veränderten Lokalisation von SPPL2b führen, welche theoretisch ebenso den Shift zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs verursachen könnte. Des

Weiteren scheint die Stabilität der palmitoylierten TNF $\alpha$  NTFs und ICDs deutlich höher zu sein als die der nicht palmitoylierten Spezies (Fluhrer et al., unpubliziert; Poggi et al., 2013). Die relativ geringen Intensitäten der nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs könnten daher auch auf vermehrte zelluläre Degradation zurückzuführen sein, wohingegen die palmitoylierten Spezies relativ geschützt wären und so eine höhere Abundanz aufweisen. Möglicherweise kann in weiteren Experimenten durch Stabilisation der nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs, z.B. mittels proteasomalen Inhibitoren, das quantitative Verhältnis dieser Produkte zueinander geklärt werden.

Unklar ist darüber hinaus auch, wie verbreitet eine Palmitoylierung bzw. andere posttranslationale Modifizierungen (PTM) unter den Substraten der GxGD-Proteasen sind und ob dies nur einzelne Substrate betrifft oder von allgemeiner Notwendigkeit für den Proteolysemechanismus ist. Über die IP von inaktivem SPPL2b D421A sowie Analyse mittels hochauflösender LC-MS/MS Massenspektrometrie könnte es beispielsweise gelingen, das globale PTM-Muster der gebundenen Substrate von SPPL2b zu identifizieren.

### **5.2.2 Beteiligung des PAL-Motivs am lateral substrate gate**

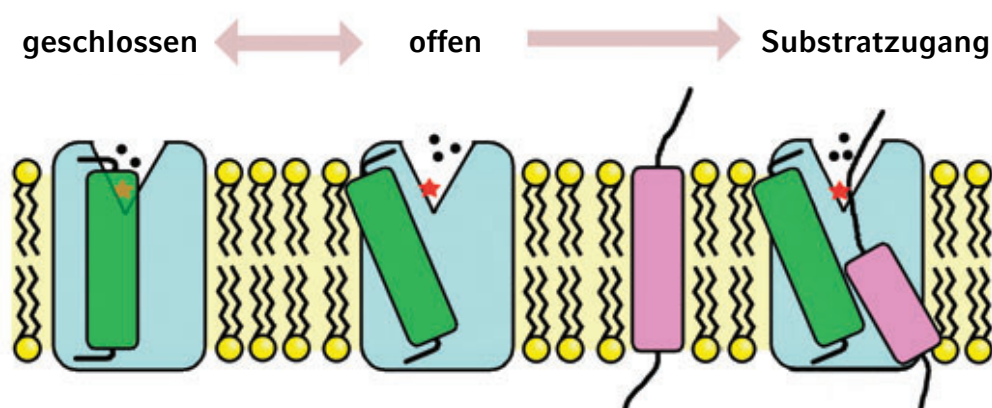
Die ersten Röntgenstrukturanalysen von Rhomboiden (Wang et al., 2006b) sowie von S2P (Feng et al., 2007) wiesen nach, dass sich das aktive Zentrum dieser Intramembranproteasen tatsächlich innerhalb der hydrophoben Membranebene befindet. Außerdem wurde die strukturelle Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für H<sub>2</sub>O-Moleküle, einer zwingenden Voraussetzung für den proteolytischen Mechanismus, geklärt (Urban und Shi, 2008).

Von zentralem Interesse ist nun die Frage, auf welche Art und Weise das Substrat Zugang zum aktiven Zentrum der Intramembranprotease gewinnt. Sowohl bei den polytopen Intramembranproteasen als auch bei den Substraten handelt es sich stets um integrale Membranproteine, die in der Lipiddoppelschicht der zellulären Membranen verankert sind (Ha, 2007). Um der Substrat-TMD Zugang zum aktiven Zentrum zu gewähren, müssen die Intramembranproteasen folglich über eine seitliche Öffnungsmöglichkeit, dem so genannten lateral substrate gate, verfügen (Abb. 5.2). Das Konzept eines solchen lateral gating von TMDs ist nicht nur auf die Intramembranproteasen



beschränkt, sondern wurde bereits im Zusammenhang mit der Translokations-abhängigen, kotranslationalen Insertion von Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht beschrieben (Van den Berg et al., 2004). Im Falle von S2P scheint das lateral gating durch das Auseinanderweichen der TMDs 1 und 6 bewerkstelligt zu werden (Feng et al., 2007); für die Rhomboide werden anhand von GlpG die Abknickung von TMD 5 sowie die Öffnung eines Spaltes zwischen den TMDs 5 und 2 als lateral substrate gate beschrieben (Ben-Shem et al., 2007; Lemieux et al., 2007; Wang et al., 2006b; Wu et al., 2006).

Über die strukturellen Grundlagen des lateral substrate gate von GxGD-Intramembranproteasen konnte mangels atomarer Strukturanalysen (siehe unten) lange Zeit nur mittels indirekten biochemischen Methoden geschlossen werden. Das für die katalytische Aktivität essentielle PAL-Motiv (Tomita et al., 2001; Wang et al., 2004; 2006a) bzw. die TMD 9 von PS1 wurde mittels SCAM untersucht, wobei sich hierbei das PAL-Motiv in enger räumlicher Nähe zum YD-Motiv und damit zum aktiven Zentrum zu befinden scheint (Sato et al., 2008; Tolia et al., 2008). Zudem vermittelt das PAL-Motiv eine flexible Orientierung der TMD 9, deren Dynamik mechanistisch mit dem lateral substrate gate in Verbindung gebracht wird (Tolia et al., 2008).



**Abb. 5.2 Konzept des lateral gating**

Ein generelles Konzept des lateralen Substratzuganges im Rahmen der Intramembranproteolyse. Die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums (roter Stern) der Intramembranproteasen für  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle (schwarze Punkte) wird durch Aussparungen in Richtung Zytosol oder Lumen gewährleistet. Bevor die TMD eines Substrates (rosa) das aktive Zentrum erreichen kann, muss eine Helix der Intramembranprotease (grün) eine strukturelle Konformationsänderung durchlaufen und so den lateralen Substratzugang ermöglichen. Nach (Wu et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wird demonstriert, dass der Austausch des erweiterten PAL-Motivs von SPPL2b zu demjenigen der Preseniline (SPPL2b PALPIS) eine Störung der sequentiellen Konversion der TNF $\alpha$  ICDs bewirkt (siehe 4.2.2), was einer Reduktion der Carboxypeptidase-artigen Funktion von SPPL2b entspricht (Funamoto et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005).

Da für eine ungestörte enzymatische Prozessivität eine stabile Substratbindung unerlässlich ist, wäre diese Beobachtung durch eine Beteiligung des erweiterten PAL-Motivs am Aufbau des lateral substrate gate zu erklären. So könnte eine Kompromittierung des PAL-Motivs über eine gestörte Protease-Substrat-Interaktion zu einer vorzeitigen Dissoziation von längeren TNF $\alpha$  ICDs führen (siehe 4.2.2).

Analog hierzu erscheint die intakte Struktur des PAL-Motivs essentiell für die Erkennung von palmitoyliertem TNF $\alpha$  NTF bzw. für die Auffaltung der TMD-Helix in das aktive Zentrum, da nahezu alle Mutationen des PAL-Motivs in SPPL2b zu einem deutlichen Shift der Produkt-Spezies hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs führen (siehe 4.3.2ff). Palmitoylierte TNF $\alpha$  ICDs werden dagegen kaum mehr als nennenswerte Produkte nachgewiesen, möglicherweise akzeptiert SPPL2b bei mutiertem PAL-Motiv präferenziell nicht palmitoyliertes TNF $\alpha$  NTF als Substrat. Dies weist wiederum auf eine Beteiligung des PAL-Motivs an der Substratbindung bzw. des lateral substrate gate hin. Übereinstimmend hierzu verhindert der kompetitive Einsatz eines Peptid-ähnlichen Inhibitors die Zugänglichkeit des PAL-Motivs bzw. der TMD 9 mittels SCAM-Analyse (Sato et al., 2008).

In Anbetracht seiner wahrscheinlichen Beteiligung am lateral substrate gate beruht die differentielle Konservierung des PAL-Motivs zwischen den Presenilinen und der SPP/SPPL-Familie möglicherweise auf der Komplexassemblierung der  $\gamma$ -Sekretase und ihrer hierdurch bedingt unterschiedlichen Physiologie (siehe 5.4.3).

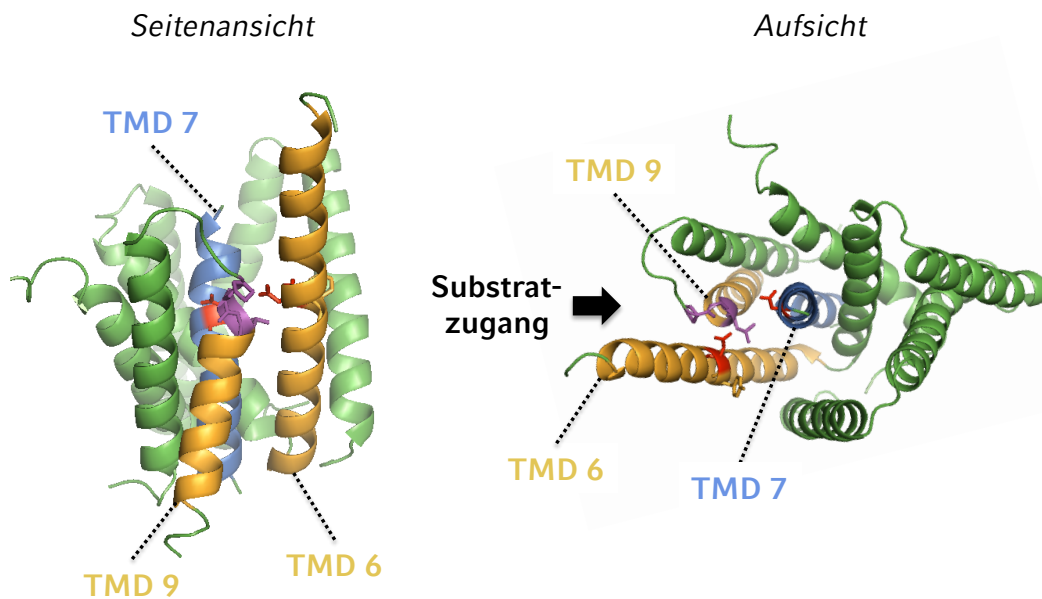
Zahlreiche Mutanten des PAL-Motivs in SPPL2b zeigen in der *in vitro* time-course Analyse eine deutliche Reduktion der Gesamtaktivität, darüber hinaus weisen nahezu alle Mutanten eine Verschiebung des initialen proteolytischen Schnittes auf (siehe 4.2ff). Dieser Shift des Schnittmusters spricht dafür, dass

Mutationen des PAL-Motivs die exakte Orientierung des Substrates hin zu den katalytisch aktiven Aspartyl-Resten des aktiven Zentrums verschieben, wobei es im Sinne des initialen, endoproteolytischen  $\varepsilon$ -Schnittes zur Spaltung einer anderen Peptidbindung kommt (Qi-Takahara et al., 2005). Hierbei handelt es sich allerdings nur um eine anteilige Verschiebung, die weiterhin auch die initiale Spaltung an Position 49/50 von TNF $\alpha$  erlaubt. Anderenfalls wäre das reguläre TNF $\alpha$  C-Peptid 50 entsprechend nicht mehr nachweisbar.

Interessanterweise führt eine Mutation des zweiten Glycins (Fluhrer et al., 2008) sowie Mutationen des x (Fluhrer et al., unpubliziert) im GxGD-Motiv von SPPL2b hingegen nicht zu einer Verschiebung des  $\varepsilon$ -Schnittes, soweit dies mittels *in vitro* time-course Analyse nachgewiesen werden kann. Die Tatsache, dass sowohl das YD-Motiv in TMD 6 als auch das PAL-Motiv in TMD 9 die Präzision des  $\varepsilon$ -Schnittes beeinflussen (Fluhrer et al., unpubliziert & 4.2.2ff), stellt auf diese Weise ein starkes Indiz für die Konstitution des lateral substrate gate durch die TMDs 6 und 9 dar. Gemäß diesen Befunden würde ein Substrat über die TMDs 6 und 9 an SPPL2b binden und zur Proteolyse der Peptidbindungen mit dem zugewandten Aspartyl-Rest des YD-Motivs wechselwirken, wohingegen das GxGD-Motiv mit dem zweiten katalytischen Aspartyl-Rest im Inneren der Protease ohne direkten Substratkontakt zu liegen käme (Abb. 5.3).

In Einklang hiermit bindet ein Peptid-ähnlicher Inhibitor der  $\gamma$ -Sekretase genau an die Schnittstelle von PS1 NTF und CTF (Kornilova et al., 2005), was der entsprechenden Lokalisation des YD-Motivs (NTF) und des PAL-Motivs (CTF) entsprechen würde. Zwar wurde auch das GxGD-Motiv mittels indirekten Befunden mit der Substratbindung in Verbindung gebracht (Yamasaki et al., 2006), allerdings wurde hierbei das gesamte GxGD-Motiv mutiert und durch Sequenzen eines entfernten, homologen Proteins ausgetauscht. Daher können solche Befunde auch lediglich auf eine Störung der lokalen Konformation oder der dichten Packung der TMDs zurückzuführen sein (Li et al., 2012).

Einschränkend sei darauf hingewiesen, dass auch die hier analysierten Mutationen von einzelnen Aminosäuren des PAL-Motivs einen ähnlichen Effekt auslösen könnten, wenngleich dies bei Punktmutationen weniger wahrscheinlich erscheint als bei Mutagenese des kompletten Motivs.



**Abb. 5.3 Modell des lateral substrate gate von GxGD-Proteasen**

Ein farbkodiertes Modell des lateralen Substratzuganges für GxGD-Proteasen. Die TMDs 6 und 9 (orange) beherbergen das YD- bzw. PAL-Motiv und interagieren mit den Substrat-TMDs. Das PAL-Motiv (Iila) sorgt hierbei mutmaßlich für die nötige strukturelle Dynamik, um das lateral gating und den Substratzugang zu bewerkstelligen. Von den katalytisch aktiven Aspartyl-Resten (rot) interagiert vermutlich das YD-Motiv mit der zu spaltenden Peptidbindung, während das GxGD-Motiv in TMD 7 (blau) im Inneren der GxGD-Proteasen zu liegen kommt. Modellierung mittels PyMOL und auf Basis des PDB-Eintrages 4HYG. Nach (Li et al., 2012).

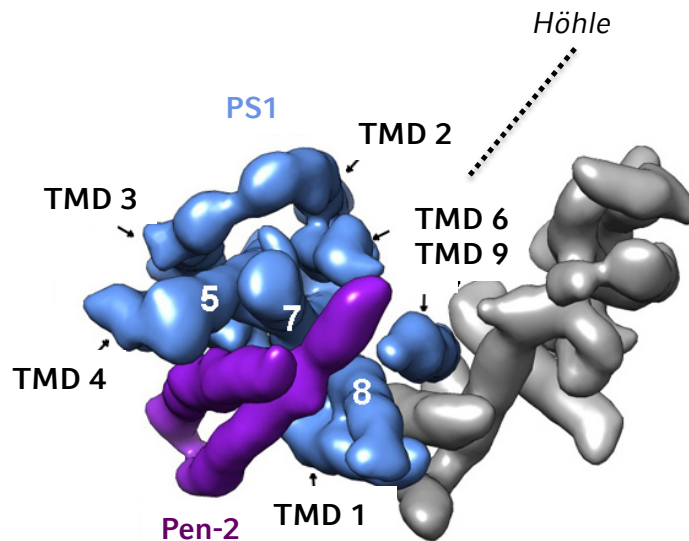
Zwischenzeitlich gelang darüber hinaus auch die Röntgenstrukturanalyse einer GxGD-Intramembranprotease, welche diese Daten erstmals untermauert (Li et al., 2012). Einschränkend muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass es sich hierbei lediglich um das Presenilin- bzw. SPP-Homologe aus dem Archaeon *Methanoculleus marisnigri* (mmPSH) handelt. mmPSH wurde zwar nicht mit einem gebundenen Substrat kokristallisiert, was für den finalen Nachweis des lateral substrate gate notwendig wäre, dennoch deutet die beschriebene Konformation der Protease ebenfalls auf die TMDs 6 und 9 als lateral substrate gate hin (Li et al., 2012). Basierend auf dieser Strukturanalyse gelingt nun ein farbkodiertes 3D-Modell des wahrscheinlichen lateral substrate gate der GxGD-Intramembranproteasen (Abb. 5.3).

Anhand der Röntgenstrukturanalyse wird für den Substratzugang auch ein alternatives lateral substrate gate zwischen den TMDs 2 und 6 diskutiert, allerdings sprechen aufgrund der Konformation der Protease sterische Gründe

gegen dieses Modell (Li et al., 2012). Dennoch wurden mittels ausgedehnter Mutagenese ganzer TMDs initial die TMDs 2 und 6 als Substratbindestelle beschrieben (Watanabe et al., 2010). Grundsätzlich wäre solch eine initiale Substratbindestelle durchaus vereinbar mit den bisherigen Befunden. Denn es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es vor dem lateral substrate gate zwischen den TMDs 6 und 9 noch zu einem vorweggeschalteten Andocken der Substrate an benachbarten TMDs kommt. Allerdings handelt es sich bei der Mutagenese ganzer TMDs auch um einen sehr kruden Ansatz, der größere strukturelle Änderungen hervorrufen kann (Watanabe et al., 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass selbst ein N-terminal stark trunkiertes SPP bestehend aus den TMDs 6 bis 9 *in vitro* noch proteolytisch aktiv ist, wenn auch nur gegenüber kurzen Peptiden (Narayanan et al., 2007). Dies spricht dafür, dass die TMDs 6 bis 9 mit allen konservierten Sequenzmotiven das aktive Kernstück der GxGD-Intramembranproteasen darstellen. Insgesamt betrachtet erscheint eine Beteiligung der TMD 2 am eigentlichen lateral substrate gate gegenwärtig eher unwahrscheinlich.

Prinzipiell sind die bisher diskutierten Befunde auch in Einklang mit der neuesten verfügbaren Strukturanalyse der  $\gamma$ -Sekretase mittels Kryo-Elektronenmikroskopie (Lu et al., 2014). Zwar erlaubt die erreichte Auflösung noch nicht die Identifizierung der individuellen Aminosäuren-Seitenketten und damit nicht die zweifelsfreie Zuordnung der einzelnen Komponenten der  $\gamma$ -Sekretase. Allerdings legt die Modellierung der atomaren mmPSH-Struktur in die Kryo-Elektronenmikroskopie der humanen  $\gamma$ -Sekretase eine entsprechende Ausrichtung nahe, bei der die TMDs 6 und 9 als lateral substrate gate zur inneren Höhle hin geöffnet sind (Lu et al., 2014) (Abb. 5.4).

Im Falle der Rhomboide stellt der Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum, das so genannte lateral gating, den limitierenden Schritt der Intramembranproteolyse dar (Baker et al., 2007; Urban und Baker, 2008). Aus diesem Grund vermögen als einzige Mutationen des lateral substrate gate die katalytische Aktivität der Rhomboide zu steigern (siehe 5.2.3). Diese Optimierung des limitierenden Schrittes der Intramembranproteolyse, dem lateral gating (Baker et al., 2007), beruht dabei auf einem erleichterten Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum der Protease. Dieses anhand der



**Abb. 5.4** Zuordnung von  $\gamma$ -Sekretase TMDs und mmPSH Strukturanalyse

Ein farbkodiertes Modell der  $\gamma$ -Sekretase TMD-Zuordnung. Ausgehend von der kryo-elektronenmikroskopischen Struktur der  $\gamma$ -Sekretase (Lu et al., 2014) wurde die atomare mmPSH Strukturanalyse (Li et al., 2012) in den TMD-Bereich hineinmodelliert, die TMDs 1 bis 9 von PS1 (blau) sind gekennzeichnet. Die TMDs 6 und 9 von PS1 scheinen zur inneren Höhle hin ausgerichtet zu sein. Die zwei TMDs von Pen-2 (lila) wurden in Einklang zu vorherigen, biochemischen Befunden zugeordnet. Die restlichen TMDs (grau) konnten nicht sicher zugeordnet werden. Nach (Lu et al., 2014).

Rhomboid entwickelte, zunächst rein mechanistisch beschriebene Konzept des lateral gating (Baker et al., 2007; Urban und Baker, 2008) konnte kürzlich auf dem Boden eines *in vitro* Rekonstitutions-Assays hinsichtlich seiner Kinetik untersucht und bestätigt werden (Dickey et al., 2013) (siehe 5.2.3).

Die erstmalige Beschreibung von Mutationen, welche die katalytische Aktivität der GxGD-Intramembranproteasen tendenziell leicht steigern bzw. den initialen  $\varepsilon$ -Schnitt bahnen (siehe 5.3.1), könnte mutmaßlich jedoch den bislang stärksten Hinweis auf eine Beteiligung der TMD 9 am Aufbau des lateral substrate gate darstellen. So zeigt SPPL2b A473G (siehe 4.4.1) eine leichte Tendenz zur Steigerung der katalytischen Aktivität, während SPPL2b L474A (siehe 4.5.1) sogar zu einer massiven Erhöhung des initialen  $\varepsilon$ -Schnittes (Qitakahara et al., 2005) führt. Obgleich eine Vermittlung dieser Effekte über eine Störung der fraglichen Homokomplexassemblierung von SPPL2b (siehe

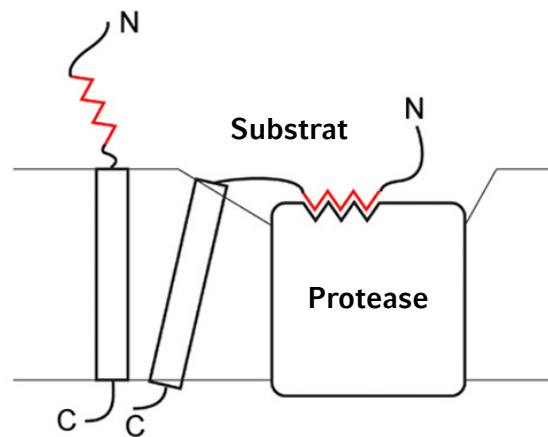
5.4.3) gegenwärtig nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, so können sie doch durch den Mechanismus des lateral gating plausibel erklärt werden. Durch die verringerte Größe der Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs kann ein vereinfachter Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum gewährleistet werden, was eine Optimierung des limitierenden Schrittes der Intramembranproteolyse ermöglichen würde. Daher sind diese Befunde wegweisend für die Beteiligung des PAL-Motivs am lateral substrate gate der GxGD-Intramembranproteasen.

### 5.2.3 Struktur- und Kinetikgrundlagen der Intramembranproteolyse

Bislang wurde für alle Substrate der Intramembranproteasen, mit Ausnahme der Substrate von Rhomboiden und SPPL3, ein initiales Ectodomain Shedding als Substratanforderung beschrieben (Rawson, 2013; Voss et al., 2013; Wolfe, 2013). In Einklang hierzu besteht sowohl für S2P als auch für nahezu alle GxGD-Intramembranproteasen eine negative Korrelation zwischen der Länge der extrazellulären Domäne und der Effizienz der Intramembranproteolyse (Martin et al., 2009; Shen und Prywes, 2004; Struhl und Adachi, 2000).

Im Falle der Rhomboide zeigen neuerliche experimentelle Befunde, dass manche Substrate auch außerhalb der annotierten TMD geschnitten werden können (Adrain et al., 2011; Maegawa et al., 2005; 2007). Hieraus entstand für die Intramembranproteolyse mancher Rhomboid-Substrate das „top-down“-Modell, demzufolge sich deren juxtamembranäre Peptidsequenz von extrazellulär bzw. luminal in das aktive Zentrum der Rhomboide falten könne (Ha et al., 2013) (Abb. 5.5). Von diesen speziellen Ausnahmen innerhalb der Rhomboide abgesehen vereint eine Besonderheit wiederum alle Intramembranproteasen: die zu spaltende Peptidbindung der Substrat-TMD muss über das lateral substrate gate Zugang zum aktiven Zentrum der Proteasen erhalten (siehe 5.2.2).

Problematisch dabei ist, dass die Sekundärstruktur der Substrat-TMDs hauptsächlich durch  $\alpha$ -Helices bestimmt wird (Heijne, 2006; MacKenzie, 2006). Hierbei ragen die Aminosäuren-Seitenketten nach außen, während das Rückgrat mit der zu spaltenden Peptidbindung nach innen gekehrt ist



**Abb. 5.5 top-down-Modell der Rhomboide**

Schematisches top-down-Modell für die Rhomboid-Intramembranproteasen. Bestimmte Substrate enthalten innerhalb ihrer juxtamembranären Peptidsequenz Schnittstellen (rot), die sich von außerhalb der Membranebene in das aktive Zentrum der Rhomboide falten können. Nach (Ha et al., 2013).

(Popot und Engelman, 2000). Zur eigentlichen Intramembranproteolyse ist daher erst eine Auffaltung der  $\alpha$ -Helix notwendig, wobei energetisch ca. 4 kcal/mol pro Aminosäure nötig sind (MacKenzie, 2006).

Eine entsprechende Auffaltung der  $\alpha$ -Helix kann durch bestimmte Aminosäuren innerhalb der TMDs erleichtert werden: hierzu gehören die als Helixdestabilisatoren bekannten Aminosäuren Prolin und Glycin (Altmann et al., 1990; Ramachandran et al., 1963), aber auch die polaren Aminosäuren, z.B. Asparagin und Serin (Li und Deber, 1994). Prolin beispielsweise besitzt eine einzigartige, heterozyklische Struktur und beeinflusst so die Ausbildung der Sekundärstruktur erheblich (Altmann et al., 1990); Glycin kann als kleinste Aminosäure eine deutlich erhöhte Flexibilität der TMD bewirken (Fluhrer et al., 2012; Ramachandran et al., 1963).

Inwiefern solche Helixdestabilisatoren wirklich nötig für eine effiziente Intramembranproteolyse sind, ist noch nicht abschließend geklärt (Brown et al., 2000). Allerdings wird ihr teils erheblicher Einfluss auf die Intramembranproteolyse nahezu aller Protease-Familien diskutiert. So führt die Mutation von helixdestabilisierenden Aminosäuren innerhalb der N-terminalen TMD von SREBP bzw. in ATF6 zu einer deutlichen Reduktion der S2P-abhängigen Intramembranproteolyse (Duncan et al., 1998; Ye et al.,



2000). Ebenso wurden Helixdestabilisatoren in der TMD von Spitz als essentiell für die Rhomboid-abhängige Intramembranproteolyse beschrieben (Urban und Freeman, 2003). Hierbei ist aber noch unklar, ob wirklich der Einfluss der Helixdestabilisatoren auf die Sekundärstruktur oder möglicherweise doch bestimmte Sequenzdeterminanten für die beobachteten Effekte verantwortlich sind (Strisovsky et al., 2009; Urban und Wolfe, 2005). Diesbezüglich konnten kürzlich auch für die Substrate der GxGD-Intramembranproteasen Strukturdeterminanten nachgewiesen werden, die über den  $\alpha$ -helikalen Gehalt der Substrat-TMD einen Einfluss auf die Effizienz der Intramembranproteolyse nehmen (Fluhrer et al., 2012; Lemberg und Martoglio, 2002; 2004; Martin et al., 2009).

In weiterführenden Experimenten sollte getestet werden, inwieweit die aktivitätssteigernden bzw. den initialen  $\varepsilon$ -Schnitt begünstigenden Mutanten SPPL2b A473G und L474A (siehe 5.3.1) die Erfordernis von Helixdestabilisatoren innerhalb der Substrat-TMDs beeinflussen. Hierzu könnte beispielsweise mittels *in vitro* time-course Analyse deren katalytische Aktivität gegenüber TNF $\alpha$ -Konstrukten mit mutierter TMD geprüft werden, unter besonderer Berücksichtigung von mutmaßlich helixdestabilisierenden Aminosäuren der TNF $\alpha$  TMD. Erwartungsgemäß sollten SPPL2b A473G und L474A in der Lage sein, auch Substrate mit einem geringeren Gehalt an Helixdestabilisatoren effizient umzusetzen.

Da sowohl die polytopen Intramembranproteasen als auch deren Substrate als integrale Membranproteine in den zellulären Membranen verankert sind, müsste die zu spaltende Peptidbindung einer TMD hinsichtlich ihrer Lage innerhalb der Membranebene auf die Positionierung des aktiven Zentrums der jeweiligen Protease abgestimmt sein (Wolfe, 2009). Daher könnte, abgesehen vom reinen Gehalt an helixdestabilisierenden Aminosäuren per se, auch die exakte Lokalisation einzelner helix-destabilisierender Aminosäuren innerhalb der Substrat-TMD und deren Orientierung zum aktiven Zentrum der Intramembranproteasen entscheidend für eine effiziente Proteolyse sein. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass im Falle des SPPL2b-abhängigen Umsatzes von Bri2 lediglich eines von vier konservierten Glycinen einen nennenswerten Effekt auf die Effizienz der Intramembranproteolyse ausübt

(Fluhrer et al., 2012). In diesem Kontext könnte ein vorhergehendes Ectodomain Shedding als thermodynamisch begünstigend wirken, indem es die Auffaltung der Substrat-TMD und damit den Zugang der zu spaltenden Peptidbindung zum aktiven Zentrum der Protease erleichtert.

Andererseits sind auch rein sterische Gründe denkbar, denen zufolge S2P und die Intramembranproteasen der GxGD-Familie luminal gekürzte Substrate bevorzugen bzw. mit deutlich höherer Effizienz umsetzen (Martin et al., 2009; Shen und Prywes, 2004; Struhl und Adachi, 2000). So ist beispielsweise in Kenntnis der Struktur der humanen  $\gamma$ -Sekretase (siehe 1.2.1.1, Abb. 1.9) leicht vorstellbar, dass eine große Ektodomäne der Substrate ein sterisches Hindernis für den Zugang zum aktiven Zentrum darstellen kann. Hier resultiert diese Substratanforderung vermutlich aus der globulären Nicastrin-Ektodomäne (siehe 1.2.1.1 & 5.4.2), welche den Zugang von Volllängensubstraten zum lateral substrate gate blockieren könnte (Lu et al., 2014).

Im Falle der SPP/SPPL-Familie stellt eine große Ektodomäne der Substrate möglicherweise insbesondere für die Proteasen SPPL2a, b und c ein sterisches Hindernis dar, beispielsweise vermittelt durch ihre komplexglykosylierten und verhältnismäßig großen, luminalen N-Termini (siehe 1.2.2.3).

Analog hierzu könnte in weiterführenden Experimenten getestet werden, inwieweit in SPPL2b die Größenselektion von Substraten durch die Konstitution des lateral substrate gate beeinflusst wird. Interessant wäre insbesondere, ob die aktivitätssteigernden bzw. den initialen  $\varepsilon$ -Schnitt begünstigenden Mutanten SPPL2b A473G und L474A (siehe 5.3.1) aus sterischen Gründen ebenfalls zu einer Erhöhung der katalytischen Effizienz von Volllängensubstraten führen. Dazu könnte beispielsweise mittels *in vitro* time-course Analyse die katalytische Aktivität dieser SPPL2b-Mutanten gegenüber chimären Substraten geprüft werden, deren Ektodomäne nicht gesheddet werden kann (Martin et al., 2009).

Allerdings sind auf der Basis dieser *in vitro* time-course Analyse keinerlei Aussagen hinsichtlich der Enzymkinetik der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse möglich, weshalb die Etablierung eines reinen *in vitro* Rekonstitutions-Assays aus rekombinanten Proteinen wünschenswert

wäre (Urban und Wolfe, 2005). Für Rhomboide konnte beispielsweise mittels eines solchen Rekonstitutions-Assay das lateral gating als der kinetisch limitierende Schritt der Intramembranproteolyse identifiziert werden (Dickey et al., 2013). Für SPP/SPPL-Proteasen gelang die Etablierung eines solchen Assays bis dato allerdings noch nicht.

Problematisch ist hier vor allem die Aufreinigung suffizienter Proteinmengen der Protease, wofür eine starke Überexpression beispielsweise von SPPL2b unentbehrlich ist. Aufgrund dieser technischen Limitationen ist es daher momentan noch fraglich, ob auch für die GxGD-Intramembranproteasen mit ihrer sequentiellen Substrat-Prozessierung das lateral gating den kinetisch limitierenden Schritt darstellt.

### 5.3 Analyse des konservierten PAL-Motivs in SPPL2b

Neben der funktionellen Bedeutung des PAL-Motivs für die proteolytische Aktivität von SPPL2b gegenüber TNF $\alpha$  wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechend auch die Aminosäuren-Seitenkettenanforderungen des PAL-Motivs hinsichtlich der katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  untersucht (siehe 4.3ff). Der folgende Vergleich mit bereits publizierten Daten zu PS1 (Wang et al., 2006a) zeigt, dass die Anforderungen zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase weitgehend identisch sind. Allerdings bestehen ebenfalls distinkte Unterschiede hinsichtlich der Aminosäuren-Seitenkettenanforderungen des PAL-Motivs, welche im Folgenden besprochen werden.

#### 5.3.1 Aminosäuren-Seitenkettenanforderungen des PAL-Motivs in GxGD-Proteasen

Prolin ist aufgrund seiner heterozyklischen Struktur als Helixdestabilisator der Sekundärstruktur von Proteinen bekannt (Altmann et al., 1990). Für PS1 konnte entsprechend gezeigt werden, dass das Prolin des PAL-Motivs die restriktivste Position hinsichtlich des Umsatzes von APP ist (Wang et al., 2006a). Die Mutation des entsprechenden Prolins in SPPL2b hin zu kleinen aliphatischen Seitenketten zeigt hier nahezu identische Anforderungen hinsichtlich der katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  (siehe 4.3). Auch im Falle von SPPL2b erlaubt lediglich der Austausch von Prolin zu einem Alanin (SPPL2b P472A) eine annähernd normale katalytische Aktivität (Tab. 5).

Zum einen spricht diese Konsistenz der Daten bereits für die Konservierung des proteolytischen Mechanismus zwischen SPPL2b und PS1 (siehe 5.4.1). Andererseits demonstriert die Sensibilität des Prolins die kritische Beteiligung des PAL-Motivs am eigentlichen Vorgang der Intramembranproteolyse. Hierzu müsste das PAL-Motiv nicht notwendigerweise direkt am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt sein, denkbar wäre auch die Aufrechterhaltung einer speziellen, strukturellen Konformation des aktiven Zentrums beispielsweise durch ein Prolin-vermitteltes Abknicken der TMD 9. In Einklang hierzu wurde mittels SCAM-Analyse in PS1 ein dynamisches Arrangement der TMD 9 mitsamt PAL-Motiv nachgewiesen (Tolia et al., 2008). Gleichwohl zeigen die

Untersuchungen mittels SCAM aber auch, dass sich das PAL-Motiv in enger räumlicher Nähe zum YD-Motiv und damit zum aktiven Zentrum befindet (Sato et al., 2008; Tolia et al., 2008). Außerdem stören Mutationen des PAL-Motivs in PS1 die Bindung eines Inhibitors, der bekanntermaßen das aktive Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase bindet (Wang et al., 2006a). So scheint das PAL-Motiv direkt am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt zu sein und darüber hinaus über das heterozyklische Prolin eine spezielle, strukturelle Konformation der TMD 9 zu vermitteln. Solche funktionellen Daten stehen für SPPL2b bislang zwar noch nicht zur Verfügung, allerdings legen die hier vorliegenden Daten eine ähnliche Funktion des PAL-Motivs in SPPL2b und somit einen vergleichbaren Aufbau des aktiven Zentrums nahe. Vor diesem Hintergrund erscheint das dynamische Arrangement der TMD 9 von PS1 (Tolia et al., 2008) sinnvoll, um dem Substrat Zugang zum aktiven Zentrum zu gewähren.

Innerhalb der zweiten Position des PAL-Motivs konnte für PS1 gezeigt werden, dass Mutationen hin zu kleinen Aminosäuren-Seitenketten sowie zu Cystein hinsichtlich des Umsatzes von APP geduldet werden (Wang et al., 2006a). So erlaubt lediglich der Austausch des Alanins zu Glycin oder Cystein eine nachweisbare katalytische Aktivität gegenüber APP. In Einklang hiermit zeigt die Mutation des entsprechenden Alanins in SPPL2b hin zu verschiedenen großen Seitenketten eine negative Korrelation zwischen der Größe der Aminosäure-Seitenkette sowie der katalytischen Aktivität gegenüber  $\text{TNF}\alpha$ , gemessen an der Umsetzung des  $\text{TNF}\alpha$  NTF (siehe 4.4 & Tab. 5). Die Aktivität von SPPL2b bei Mutation des Alanins zu einem Glycin (SPPL2b A473G) erscheint tendenziell leicht gesteigert, wohingegen der Austausch zu Valin oder Leucin (SPPL2b A473V & A473L) in einer deutlich reduzierten katalytischen Aktivität resultiert.

Verglichen mit den Anforderungen des PAL-Motivs in PS1 ist SPPL2b hierbei also permissiver (Wang et al., 2006a) (Tab. 5). Entsprechend führt der Austausch zu Valin oder Leucin in PS1 zu katalytischer Inaktivität in Bezug auf APP, während die gleichen Mutationen in SPPL2b eine zwar deutlich reduzierte, aber immer noch nachweisbare Umsetzung von  $\text{TNF}\alpha$  NTF ermöglichen (siehe 4.4). Mögliche Gründe für diese im Vergleich zu PS1 höhere Permissivität von SPPL2b könnten in der unterschiedlichen Physiologie

# DISKUSSION

SPPL2b Variante:	SPPL2b Aktivität:	PS1 Variante:	PS1 Aktivität:	PS1 $\Phi$ :
SPPL2b wt	+++	PS1 wt	+++	+++
SPPL2b P472A	++	PS1 P433A	++	++
SPPL2b P472G	+	PS1 P433G	+	+
SPPL2b P472L	-	PS1 P433L	-	-
SPPL2b A473C	+++	PS1 A434C	++	++
SPPL2b A473G	+++*	PS1 A434G	++	++
SPPL2b A473L	+	PS1 A434L	-	-
SPPL2b A473V	++	PS1 A434V	-	-
SPPL2b L474V	-	PS1 L435V	++	++
SPPL2b L474I	-	PS1 L435I	++	++
SPPL2b L474A	- (Entkopplung)	PS1 L435A	++	++
SPPL2b L474G	+	PS1 L435G	+	+
SPPL2b L474F	+++	PS1 L435F	-	-

**Tab. 5 Katalytische Aktivität von SPPL2b & PS1 PAL-Motiv Varianten**

Vergleich der katalytischen Aktivitäten aller analysierten Mutationen des PAL-Motivs zwischen SPPL2b und PS1. Die Graduierung für SPPL2b beruht auf den Quantifizierungsergebnissen der einzelnen Mutanten hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  NTF im Rahmen der *in vitro* time-course Analysen (siehe 4.3ff). Für PS1 beruht die Graduierung auf der Umsetzung von APP (Aktivität) bzw. der Autoendoproteolyse ( $\Phi$ ) (Wang et al., 2006a):

- +++ normale katalytische Aktivität / Autoendoproteolyse
- +++\* tendenziell leichte Erhöhung der katalytischen Aktivität, nicht signifikant
- ++ tendenziell leichte Reduktion der katalytischen Aktivität / Autoendoproteolyse
- +
- mäßige Reduktion der katalytischen Aktivität / Autoendoproteolyse
- starke Reduktion der katalytischen Aktivität / Autoendoproteolyse
- Entkopplung  $\rightarrow$  massiver Initialschnitt des Substrates TNF $\alpha$  NTF bei gestörter, sequentieller TNF $\alpha$  ICD-Konversion

von  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b zu finden sein (siehe 5.4.3). Denkbar wäre beispielsweise, dass die Komplexassemblierung der  $\gamma$ -Sekretase (Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003) an das PAL-Motiv eine stringenteren Strukturanforderung hinsichtlich der Aminosäuren-Seitenketten stellt, um eine korrekte Assemblierung der  $\gamma$ -Sekretase und damit deren katalytische Aktivität zu gewährleisten. Andererseits könnte auch die exklusiv bei der  $\gamma$ -Sekretase auftretende Autoendoproteolyse der hydrophoben Domäne zwischen den TMDs 6 und 7 von PS1 (Thinakaran et al., 1996; Wolfe et al., 1999) spezielle

Strukturanforderungen an das PAL-Motiv stellen, um eine entsprechende Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für die hydrophobe Domäne zu ermöglichen (siehe 5.4.3). Interessanterweise korreliert dabei die katalytische Aktivität von PS1 perfekt mit dem Grad der Autoendoproteolyse (Tab. 5).

Für Leucin, der dritten Position des konservierten PAL-Motivs (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002), ist innerhalb von PS1 eine mittelgroße, hydrophobe Aminosäure-Seitenkette erforderlich (Wang et al., 2006a), Mutationen hin zu Alanin, Valin oder Isoleucin erlauben noch eine mäßige katalytische Aktivität gegenüber APP (Tab. 5). In Einklang hierzu zeigen die meisten Mutationen des entsprechenden Leucins in SPPL2b einen ähnlichen Trend hinsichtlich der katalytischen Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  (siehe 4.5 & Tab. 5). Hinsichtlich der Größe dieser hydrophoben Seitenketten werden im Falle von SPPL2b allerdings Isoleucin und Valin (SPPL2b L474I & L474V) deutlich schlechter akzeptiert verglichen zu PS1. Das kleine Glycin (SPPL2b L474G) hingegen ermöglicht sowohl in SPPL2b als auch in PS1 eine geringe katalytische Restaktivität gegenüber TNF $\alpha$  bzw. APP (Wang et al., 2006a) (Tab. 5). Auch für diese distinkten Unterschiede zwischen der  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b sind die möglichen Gründe wiederum am ehesten in der unterschiedlichen Physiologie zu suchen (siehe oben & 5.4.3).

Eine Besonderheit in der Analyse des PAL-Motivs von SPPL2b stellt der Austausch des Alanins zu einem Glycin (SPPL2b A473G) dar, welcher die katalytische Aktivität von SPPL2b gegenüber TNF $\alpha$  tendenziell leicht zu steigern scheint (siehe 4.4.1). Dieser Trend erscheint im Rahmen der *in vitro* time-course Analyse mit drei unabhängigen Experimenten allerdings noch nicht als statistisch signifikant. Insbesondere aufgrund der inhärenten Variabilität der *in vitro* time-course Analyse (siehe 5.1.1.1) ist dieser Befund zurückhaltend zu interpretieren, mittels einer Erhöhung der Fallzahlen könnte dieser Effekt unter Umständen als signifikant herausgearbeitet werden. Gegenwärtig handelt es sich bei SPPL2b A473G also möglicherweise um die erstmalige Beschreibung einer Mutation von GxGD-Proteasen mit gesteigerter katalytischer Aktivität, was eine wichtige Implikation für die Lokalisation des lateral substrate gate der GxGD-Intramembranproteasen hat (siehe 5.2.2).

Eine weitere Besonderheit stellt der Austausch des Leucins zu einem Alanin (SPPL2b L474A) dar (Tab. 5). Während die analoge Mutation in PS1 als einziger Befund eine leichte Reduktion der katalytischen Aktivität zeigt, scheint SPPL2b L474A die Entkopplung der enzymatischen Prozessivität gegenüber TNF $\alpha$  zu bewirken (siehe 4.5.1). Hierbei kommt es zu einer massiven Erhöhung des initialen Substratschnittes, vergleichbar zum initialen  $\epsilon$ -Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase (Qi-Takahara et al., 2005). Stark beeinträchtigt hingegen ist die weitere sequentielle Konversion der TNF $\alpha$  ICDs, was der mehrfachen Prozessierung der A $\beta$ -Peptide entspricht. Gleichzeitig werden massenspektrometrisch vornehmlich die nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs 1 - 34, 1 - 39 und 1 - 42 nachgewiesen, da längere, palmitoylierte ICD-Spezies vermutlich nur sehr schlecht detektiert werden können (siehe 5.1.1.2).

### 5.3.2 FAD-ähnliche Mutationen – SPPL2b A473C & L474F

Die beiden PAL-Motiv Varianten SPPL2b A473C und SPPL2b L474F sollen hier ebenfalls genauer betrachtet werden. In beiden Fällen handelt es sich um eine analoge Mutation die, sofern sie im PAL-Motiv von PS1 auftritt, zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führt (Rogaeva et al., 2001).

Die FAD-Mutation Alanin zu Cystein (PS1 A434C) führt bei PS1 einerseits zu einer Reduktion der gesamten katalytischen Aktivität, gleichzeitig aber auch zu einer deutlichen Erhöhung des Verhältnisses von A $\beta$  42 zu A $\beta$  40 (Wang et al., 2006a). Im Falle von SPPL2b A473C ist die gesamte Aktivität gegenüber TNF $\alpha$  hingegen unverändert, in Einklang mit der erhöhten Permissivität von SPPL2b. In Analogie zum Pathomechanismus bei PS1 wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass SPPL2b A473C aufgrund der invertierten Membrantopologie im Vergleich zu SPPL2b wt längere TNF $\alpha$  ICDs bildet. Dies konnte jedoch weder in der time-course Analyse noch massenspektrometrisch nachgewiesen werden, stattdessen kam es zu einem deutlichen Shift der Produkt-Spezies hin zu nicht palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs (siehe 4.4).

Zwar ist nicht auszuschließen, dass es bei Expression von SPPL2b A473C zur Produktion von längeren, palmitoylierten TNF $\alpha$  ICDs kommt. Allerdings können diese mutmaßlich mit der gegenwärtigen Methodik der MALDI-TOF



Massenspektrometrie nicht nachgewiesen werden (siehe 5.1.1.2), da insbesondere solch große, hydrophobe Peptide nur schlecht ionisiert und dementsprechend detektiert werden (Gerl et al., 2014). Schlussendlich kann mit den vorliegenden Analysemethoden kein analoger Befund zu PS1 erhoben werden, der den Pathomechanismus dieser FAD-Mutation direkt widerspiegeln würde (Wang et al., 2006a). Neben möglichen technischen Limitationen könnte es andererseits sein, dass der Austausch von Alanin zu Cystein in SPPL2b aufgrund der höheren Permissivität tatsächlich besser toleriert wird (siehe 5.3.1). Ursächlich könnten auch hier differentielle Strukturanforderungen zwischen  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b sein (siehe 5.4.3).

Bei PS1 führt die FAD-Mutation Leucin zu Phenylalanin (PS1 L435F) gemessen an der Produktion der AICD zu katalytischer Inaktivität (Wang et al., 2006a). Für eine Vielzahl von FAD-Mutationen innerhalb der Preseniline oder in APP konnte eine Erhöhung des Verhältnisses von produziertem A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 festgestellt werden (Hardy, 1997), allerdings wurde diese Bestimmung für den Austausch von Leucin zu Phenylalanin versäumt (Wang et al., 2006a). Die Analyse von SPPL2b L474F zeigt analog hierzu die Verschiebung des initialen  $\varepsilon$ -Schnittes, woraufhin es im *in vitro* Assay zur Produktion von größeren TNF $\alpha$  ICDs kommt (siehe 4.5.1). Im Falle der  $\gamma$ -Sekretase sollte es analog zur Produktion von längeren A $\beta$ -Peptiden kommen, was durch die Erhöhung des Verhältnisses A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 einen plausiblen Pathomechanismus darstellen könnte.

## 5.4 Gegenüberstellung von SPPL2b und $\gamma$ -Sekretase

Für die Entwicklung einer selektiven pharmakologischen Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b ist es entscheidend, distinkte Unterschiede dieser Proteasen untereinander zu identifizieren und auszunutzen. Da allerdings sowohl SPPL2b als auch die  $\gamma$ -Sekretase der Klasse der GxGD-Intramembranproteasen angehören (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002), sind ihre Sequenzmotive YD und GxGD mit den katalytischen Aspartyl-Resten (Steiner et al., 1999; Wolfe et al., 1999) sowie das PAL-Motiv untereinander hoch konserviert. Aufgrund ihrer zudem sehr ähnlichen subzellulären Verteilungen an der Plasmamembran sowie in Endolysosomen (Kaether et al., 2002; Krawitz et al., 2005; Martin et al., 2008; Pasternak et al., 2003) vermag eventuell der direkte Vergleich von SPPL2b und  $\gamma$ -Sekretase hinsichtlich des Proteolysemechanismus sowie ihrer Substratanforderungen und Physiologie pharmakotherapeutisch nutzbare Unterschiede aufzuzeigen.

### 5.4.1 Proteolysemechanismen der Proteasen im Vergleich

Der vermutete Aufbau des aktiven Zentrums sowie der Proteolysemechanismus ihrer Substrate erscheint für SPPL2b und die  $\gamma$ -Sekretase zunächst sehr ähnlich. Die drei Sequenzmotive des aktiven Zentrums sind hoch konserviert (Li et al., 2012) und ihre jeweiligen Substrate werden innerhalb der TMD mehrmals geschnitten (Fluhrer et al., 2006; Qi-Takahara et al., 2005; Sastre et al., 2001).

Nach Ectodomain Shedding startet die sequentielle Prozessierung der Substrate mit dem  $\epsilon$ -Schnitt, der initialen Endoproteolyse (Fluhrer et al., 2006; Qi-Takahara et al., 2005), gefolgt von sequentiellen, Carboxypeptidase-artigen Schnitten der naszierenden Produkte (Fluhrer et al., 2006; Funamoto et al., 2004) (siehe 5.2.1.1, Abb. 5.1). Wegweisend für einen sowohl bei SPPL2b als auch der  $\gamma$ -Sekretase sehr ähnlichen sequentiellen Schnittmechanismus sind die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde:

Sowohl bei Austausch des erweiterten PAL-Motivs (SPPL2b PALPIS) (siehe 5.1.3) als auch bei SPPL2b L474A (siehe 5.3.1) kommt es im Rahmen der Störung der enzymatischen Prozessivität zu einer Entkopplung zwischen dem

initialen endoproteolytischen Schnitt des TNF $\alpha$  NTF von der sequentiellen, Carboxypeptidase-artigen TNF $\alpha$  ICD-Konversion. Diese distinkten endoproteolytischen und Carboxypeptidase-artigen Schnitte analog zur  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP (Funamoto et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005) sind also hoch konserviert.

Aufgrund der im Vergleich von SPPL2b und  $\gamma$ -Sekretase invertierten Membrantopologie und damit des gesamten aktiven Zentrums, betrifft diese sequentielle Substratkonversion im Falle von SPPL2b die TNF $\alpha$  ICDs und für die  $\gamma$ -Sekretase die A $\beta$ -Peptide (Fluhrer et al., 2006; Funamoto et al., 2004). Hierbei ist wahrscheinlich jeweils die schrittweise Auffaltung der  $\alpha$ -helikalen Substrat-TMD vonnöten, um die Peptidbindungen in räumliche Nähe der katalytischen Aspartate zu bringen (Fluhrer et al., 2009; Qi-Takahara et al., 2005) (siehe 5.2.2 & 5.2.3). Obgleich noch nicht experimentell bewiesen, so wird die invertierte Membrantopologie im Allgemeinen als das Selektionskriterium hinsichtlich der Umsetzung von Typ-1- oder Typ-2-Transmembranproteinen durch die  $\gamma$ -Sekretase respektive durch SPPL2b angesehen (Fluhrer et al., 2006). Mutmaßlich ist dabei die präzise Orientierung der zu spaltenden Peptidbindungen der Substrate zum katalytisch aktiven Aspartat des YD-Motivs der GxGD-Proteasen entscheidend. Hierbei erlaubt die Interaktion von Protease und Substrat eventuell aus sterischen Gründen lediglich im Falle einer kompatiblen Typ-1 oder Typ-2-Transmembrantopologie die Auffaltung der  $\alpha$ -helikalen TMD (siehe 5.2.3).

Anzumerken ist jedoch, dass zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase hauptsächlich die Motive des aktiven Zentrums konserviert sind, nämlich die YD-, GxGD- und PAL-Motive in den TMDs 6, 7 bzw. 9 (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002). Die restliche Primärstruktur dieser GxGD-Proteasen unterscheidet sich hingegen stark. Daher ist gegenwärtig nicht auszuschließen, dass es über evolutionär getrennt voneinander stattfindende Sequenzänderungen sowie die Komplexassemblierung der  $\gamma$ -Sekretase doch zu Unterschieden im Proteolysemechanismus gekommen sein könnte, vor allem hinsichtlich der Substratselektion (siehe 5.2.3). Die unterschiedlichen Tertiär- bzw. Quartärstrukturen beeinflussen so möglicherweise die exakte

Orientierung von aktivem Zentrum zu Substrat, die Prozessivität oder die Relevanz von posttranslationalen Modifizierungen der Substrate wie die Palmitoylierung von TNF $\alpha$  (Poggi et al., 2013) (siehe 5.2.1). In Ermangelung von atomaren Strukturanalysen der Säuger-GxGD-Intramembranproteasen, insbesondere auch mit gebundenem Substrat, ist die experimentelle Adressierung dieser potentiellen Unterschiede allerdings noch unzureichend.

Zudem muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass hauptsächlich die Proteolysemechanismen von APP bzw. TNF $\alpha$  im Detail untersucht worden sind (Fluhrer et al., 2009; Steiner et al., 2008) (siehe 5.2). Im Falle der SPPL2b-abhängigen Intramembranproteolyse von Bri2 ist beispielsweise nur eine distinkte ICD nachweisbar (Martin et al., 2008), weshalb sich der exakte Proteolysemechanismus von SPPL2b und  $\gamma$ -Sekretase in einer Substratspezifischen Art und Weise unterscheiden könnte. Gegenwärtig ist allerdings abgesehen von den sehr bekannten Substraten wie APP oder beispielsweise Notch für die meisten bekannten Substrate der  $\gamma$ -Sekretase noch nicht genau untersucht, ob es stets zur Freisetzung von unterschiedlich langen, A $\beta$ -Peptid-ähnlichen Fragmenten kommt (Haapasalo und Kovacs, 2011).

#### **5.4.2 Substratanforderungen von SPPL2b und $\gamma$ -Sekretase**

Hinsichtlich ihrer Substratanforderungen wurde für die  $\gamma$ -Sekretase der Begriff des „Proteasoms der Membran“ vorgeschlagen (Kopan und Ilagan, 2004), da über 90 bekannte Substrate ohne scheinbare Sequenzhomologie zueinander prozessiert werden (Haapasalo und Kovacs, 2011).

Ähnlich dem zytosolischen Proteasom könnte so der unspezifische Abbau von Typ-1-Transmembranproteinen innerhalb der Plasmamembran sowie der Endolysosomen gewährleistet werden, da ansonsten nach Ectodomain Shedding die membranständigen Fragmente akkumulieren würden. Ebenso weisen die bisher bekannten Substrate der SPP/SPPL-Proteasen keine offensichtlichen Sequenzhomologien zueinander auf (Voss et al., 2013), weshalb sie analog als „Proteasom der Membran“ für Typ-2-Transmembranproteine fungieren könnten. Allerdings muss man die potentielle Rolle der  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b als „Proteasom der Membran“

zunehmend kritisch sehen, da für beide Proteasen entsprechende Transmembranproteine gefunden wurden, die keine Substrate darstellen (Hemming et al., 2008; Martin et al., 2008). Eine reine Kolo-kalisation, wie beispielsweise für die Rhomboide diskutiert (Freeman, 2008; Urban et al., 2001), ist nicht ausreichend (Martin et al., 2008).

Was hingegen bei sämtlichen bekannten Substraten von SPPL2b und  $\gamma$ -Sekretase für eine effiziente Proteolyse notwendig zu sein scheint, ist ein initiales Ectodomain Shedding (Voss et al., 2013; Wolfe, 2013). Für beide Proteasen besteht eine negative Korrelation zwischen der Effizienz ihres Substratumsatzes und der Länge der Substrat-Ektodomäne (Martin et al., 2009; Struhl und Adachi, 2000); im Falle der  $\gamma$ -Sekretase wird darüber hinaus nur die Bindung von Substraten mit kleiner Ektodomäne nachgewiesen (Esler et al., 2002). Prinzipiell können Voll-längenproteine aber auch geschnitten werden, wenngleich mit deutlich herabgesetzter Effizienz. Ectodomain Shedding stellt daher den regulierenden Schritt der Intramembranproteolyse durch SPPL2b und  $\gamma$ -Sekretase dar.

In diesem Kontext fällt bei Betrachtung der besten bisher verfügbaren Strukturanalyse der  $\gamma$ -Sekretase mittels Kryo-Elektronenmikroskopie die insbesondere luminal lokalisierte, globuläre Domäne von Nicastrin auf (Lu et al., 2014) (siehe 1.2.1.1, Abb. 1.9). In Anbetracht der Wichtigkeit des Ectodomain Shedding für eine effiziente,  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Intramembranproteolyse könnte diese globuläre Ektodomäne möglicherweise auslösend sein für die spezifische Bindung von luminal gekürzten Substraten. Allerdings bleiben molekulare Details wie Bindungstaschen sowie die Substruktur der  $\gamma$ -Sekretase hinsichtlich der einzelnen Komplexpartner nach wie vor ungelöst. Die Tatsache, dass SPPL2b ohne Komplexpartner aktiv ist und demnach nicht über eine Nicastrin-artige Domäne verfügt, könnte erklären warum SPPL2b statt dessen die Substrate ohne vorheriges Ectodomain Shedding als Voll-längenproteine bindet (Fluhrer et al., 2006; Martin et al., 2008), allerdings nicht zu spalten vermag.

Gleichsam ist das Ectodomain Shedding per se nicht ausreichend für eine effiziente Intramembranproteolyse durch die  $\gamma$ -Sekretase oder SPPL2b. Statt

dessen bestehen innerhalb der TMDs und den Juxtamembrandomänen der Substrate gewisse Sequenz- oder Strukturdeterminanten, welche die Effizienz der Intramembranproteolyse beeinflussen (Hemming et al., 2008; Martin et al., 2009; Ren et al., 2007). Für das SPPL2b-Substrat Bri2 übt die TMD diesbezüglich den stärksten Effekt aus (Martin et al., 2009), wobei im Wesentlichen ein geringer  $\alpha$ -helikaler Gehalt der TMD oder zumindest die lokale Störung der  $\alpha$ -Helix an einem von 4 konservierten Glycinen begünstigend auf die Effizienz der Intramembranproteolyse wirkt (Fluhrer et al., 2012). Die Substratanforderungen sind bislang noch nicht für andere SPPL2b-Substrate derart stringent untersucht. Da die unterschiedlichen Substrate von SPPL2b bzw.  $\gamma$ -Sekretase allerdings keinerlei Sequenzhomologie zueinander aufweisen, könnte diese Abhängigkeit einer effizienten Intramembranproteolyse am ehesten auf Strukturdeterminanten innerhalb der Substrate von GxGD-Intramembranproteasen hindeuten.

Die  $\gamma$ -Sekretase und SPPL2b scheinen also nebst einem sehr gut konservierten Proteolysemechanismus auch über sehr ähnliche Substratanforderungen zu verfügen. In Hinblick auf die Entwicklung von möglichst spezifischen pharmakotherapeutischen Substanzen lenkt dies den Fokus daher auf Unterschiede in der Physiologie dieser beiden Proteasen (siehe 5.4.3).

### 5.4.3 Physiologie von SPPL2b und $\gamma$ -Sekretase

Zunächst einmal ähneln sich SPPL2b und die  $\gamma$ -Sekretase sehr hinsichtlich ihrer subzellulären Verteilung an der Plasmamembran sowie in Endolysosomen (Kaether et al., 2002; Krawitz et al., 2005; Martin et al., 2008; Pasternak et al., 2003). Da SPPL2b (Fluhrer et al., 2006) und, soweit bekannt, auch alle anderen SPP/SPPL-Proteasen wahrscheinlich ohne weitere Kofaktoren katalytisch aktiv sind (Voss et al., 2013) ist davon auszugehen, dass sämtliche für den eigentlichen proteolytischen Mechanismus notwendigen Merkmale einer Intramembranprotease innerhalb der GxGD-Proteasen selbst zu finden sind.

Für SPP beispielsweise konnte gezeigt werden, dass selbst ein N-terminal stark trunkiertes Molekül bestehend aus den TMDs 6 bis 9 *in vitro* noch proteolytisch aktiv ist (Narayanan et al., 2007). Unklar hingegen ist die

physiologische Relevanz von möglichen Homokomplexassemblierungen der SPP/SPPL-Proteasen: so detektieren Photoaffinitäts-Proben, die bekanntermaßen das aktive Zentrum der GxGD-Proteasen binden, SPP-Dimere (Nyborg et al., 2004a), wohingegen eine elektronenmikroskopische Strukturanalyse mit geringer Auflösung SPP-Tetramere darstellt (Miyashita et al., 2011). Interessanterweise ist dies analog zur gelösten Kristallstruktur von mmPSH, welches ebenfalls als Tetramer kristallisiert (Li et al., 2012).

Sollte entsprechend eine hypothetische Homokomplexassemblierung von SPPL2b funktionelle Bedeutung haben, so könnte dies auch von Relevanz sein für die Interpretation der hier verwendeten *in vitro* time-course Analyse (siehe 5.1.1.1). Schlussendlich ist die Datenlage gegenwärtig aber noch zu ungenau, um die physiologische Relevanz dieser Befunde zu bewerten. Möglicherweise könnte es sich hierbei lediglich um Artefakte der jeweiligen Präparationen handeln. Ultimativ ist daher die Strukturaufklärung der SPP/SPPL-Proteasen mit hoher Auflösung nötig, um diese Fragen zu klären.

Während SPPL2b jedoch vermutlich ohne andere Kofaktoren aktiv ist, benötigt die  $\gamma$ -Sekretase die Komplexbildung mit Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 zur Ausübung ihrer proteolytischen Aktivität (Edbauer et al., 2003; Flührer et al., 2006). Möglicherweise werden die Preseniline bei der Intramembranproteolyse durch ihre Kofaktoren unterstützt oder erst innerhalb des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes in eine proteolytisch aktive, strukturelle Konformation gebracht bzw. gehalten. Kennzeichnend hierfür ist die charakteristische Autoendoproteolyse der Preseniline in ein PS NTF und ein PS CTF (Fukumori et al., 2010; Thinakaran et al., 1996; Wolfe et al., 1999), welche erst nach Komplettierung der  $\gamma$ -Sekretase durch Pen-2 erfolgt (Luo et al., 2003). Unklar hierbei ist allerdings, warum es evolutionär zur Ausprägung dieses komplexen Mechanismus gekommen ist.

Denkbar wäre, dass durch die mehrstufige Komplexassemblierung eine feine Regulation der proteolytischen Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase erfolgen kann. In Anbetracht der Vielzahl ihrer bekannten Substrate (Haapasalo und Kovacs, 2011) könnte eine präzise Regulation der  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Intramembranproteolyse ein wichtiges Selektionskriterium gewesen sein. So gesehen kann das native, isolierte Presenilin als Zymogen betrachtet werden,

welches erst mit Hilfe von Kofaktoren vollständig maturiert (Li et al., 2000). Andererseits könnte die Komplexassemblierung der  $\gamma$ -Sekretase auch auf Protease-unabhängige Funktionen zurückzuführen sein: beispielsweise wurde die  $\gamma$ -Sekretase mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivität in Verbindung gebracht (Tu et al., 2006). Für SPPL2b hingegen sind solch Protease-unabhängige Funktionen bislang nicht beschrieben, sie können gegenwärtig aber noch nicht völlig ausgeschlossen werden (Voss et al., 2013).

Zudem sind auch die molekularen Funktionen der einzelnen Komplexpartner der  $\gamma$ -Sekretase nicht vollständig entschlüsselt. Für Aph-1 sind keine eigenständigen Funktionen bekannt, Pen-2 wird als Stabilisator der  $\gamma$ -Sekretase beschrieben (Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2004). Nicastrin wurde zunächst als Substrat-Akzeptor interpretiert (Shah et al., 2005; Zhang et al., 2012), was allerdings kontrovers diskutiert wird (Chávez-Gutiérrez et al., 2008; Zhao et al., 2010). Interessanterweise stellt Nicastrin aber die einzige komplexglykosylierte Komponente der  $\gamma$ -Sekretase dar. Diesbezüglich könnte man in weiteren Experimenten für SPPL2b, welches im Gegensatz zu den Presenilinen selbst glykosyliert wird (Krawitz et al., 2005), durch Mutagenese seiner Glykosylierungsmotive die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von einer ordentlichen Maturierung bzw. Komplexglykosylierung untersuchen.

Zusammenfassend kann man im Vergleich von SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase festhalten, dass beide Proteasen sehr ähnliche Anforderungen hinsichtlich Substratbindung sowie Strukturdeterminanten von TMDs und Juxtamembrandomänen aufweisen (Martin et al., 2009; Struhl und Adachi, 2000). Dies spricht auf den ersten Blick gegen die Rolle von Nicastrin als Substratakzeptor, da SPPL2b auch ohne Kofaktoren proteolytisch aktiv ist (Fluhrer et al., 2006). Andererseits bindet die  $\gamma$ -Sekretase nur bereits luminal verkürzte Substrate (Esler et al., 2002; Thinakaran et al., 1998), wohingegen SPPL2b die Volllängenproteine TNF $\alpha$  und Bri2 binden kann (Fluhrer et al., 2006; Martin et al., 2008). Vermutlich wird dieser funktionelle Unterschied durch Nicastrin oder andere Komplexpartner vermittelt. Mangels Bindung an die schlecht prozessierbaren Volllängenproteine wäre die  $\gamma$ -Sekretase als die effizientere GxGD-Intramembranprotease anzusehen.



Möglicherweise beruht diese unterschiedliche Physiologie wiederum auf der schieren Anzahl der Typ-1-Transmembranproteine, welche durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert werden müssen (Haapasalo und Kovacs, 2011). Ob im Falle der Größenselektion der Substrate bei SPPL2b luminaler Anteile der Protease selbst eine aktive Rolle spielen oder die Größe der Ektodomäne lediglich passiv die Thermodynamik der Intramembranproteolyse erleichtert (siehe 5.2.3), ist bisher noch unzureichend untersucht. Zudem besteht die Möglichkeit, dass potentielle Interaktionspartner von SPPL2b bisher nicht identifiziert worden sind. Insbesondere transiente Interaktionen mit anderen Membranproteinen sind schwer nachweisbar.

## 5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass das PAL-Motiv in SPPL2b essentiell für die Proteolyse von TNF $\alpha$  ist; gleichzeitig sind die Anforderungen an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase weitgehend identisch. Es verbleiben zahlreiche offene Fragen, insbesondere bezüglich der potentiellen Entwicklung einer selektiven Pharmakotherapie sowie bezüglich der Struktur und Physiologie der Familie der GxGD-Intramembranproteasen.

### 5.5.1 Strukturanalyse und Proteolysemechanismus

Für die vollständige Entschlüsselung der Proteolysemechanismen von SPPL2b und  $\gamma$ -Sekretase benötigen wir entsprechende Strukturanalysen in atomarer Auflösung, nur diese gestatten schlussendlich die strukturelle Bestätigung oder Widerlegung der hier vorliegenden, auf biochemischen Erkenntnissen beruhenden Modelle.

Die atomare Strukturanalyse von GxGD-Intramembranproteasen aus Säugern gestaltet sich bis heute allerdings als äußerst unergiebig (Lazarov et al., 2006; Miyashita et al., 2011; Osenkowski et al., 2009). Problematisch hierbei ist vor allem die Tatsache, dass es sich bei der  $\gamma$ -Sekretase um einen Multiprotein-

Komplex handelt, mit einer Gesamtgröße von etwa 230 kDa sowie insgesamt 19 TMDs (Steiner et al., 2008). Die SPPL2-Proteasen andererseits werden komplex glykosyliert (Fluhrer et al., 2009), was eine Kristallpackung mutmaßlich schwierig macht. Auch die Nutzung von Detergenzien für die Aufreinigung der Intramembranproteasen reduziert die potentielle Auflösung der Röntgenstrukturanalysen.

Möglicherweise gelingt es zukünftig mittels Magnetresonanztomographie (Sobhanifar et al., 2010) oder neuartigen Verfahren wie den Nanodisks (Hagn et al., 2013), einige dieser Limitationen zu umgehen. Für Multiprotein-Komplexe wie die  $\gamma$ -Sekretase könnte es eventuell auch gelingen, die einzelnen Komplexpartner primär individuell mittels Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen und sekundär diese atomaren Strukturen in die neueste und gleichzeitig beste bisher verfügbare Grobstruktur der Kryo-Elektronenmikroskopie (Lu et al., 2014) hinein zu modellieren.

Schlussendlich ist die atomare Strukturanalyse der einzelnen GxGD-Intramembranproteasen, idealerweise sowohl mit als auch ohne Substratbindung, für ein tieferes Verständnis der Proteolysemechanismen unerlässlich. Nur so wird es gelingen die Position des lateralen Substratzuganges, wie hier auf dem Boden von biochemischen Assays postuliert, definitiv nachzuweisen. Darüber hinaus wären die atomaren Strukturanalysen ein hervorragendes Grundgerüst für die Entwicklung von spezifischen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren oder -Modulatoren.

### 5.5.2 $\gamma$ -Sekretase-spezifische Inhibitoren und Modulatoren

Unter den GxGD-Intramembranproteasen ist vor allem die  $\gamma$ -Sekretase Gegenstand intensiver medizinischer Forschung, da ihre Prozessierung von APP ein mögliches drug target zur Reduktion von neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden in der Prävention und Behandlung des Morbus Alzheimer darstellt (Haass und Selkoe, 2007) (siehe 1.2.3.2).

Zur Reduktion der Freisetzung von amyloidogenem A $\beta$ 42 wurden zunächst  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (GSIs) getestet. Problematisch hierbei ist die Kreuzreaktivität der GSIs mit Proteasen der SPP/SPPL-Familie: so inhibieren GSIs, die bekanntermaßen das aktive Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase binden (Li et

al., 2000), ebenfalls die proteolytische Aktivität von SPPL2b (Fluhrer et al., 2006). Da SPP/SPPL-Proteasen wichtige Funktionen in Immunologie und Infektiologie wahrnehmen (siehe 1.2.3.4), muss solch eine Kreuzreaktivität unbedingt vermieden werden.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass auch die Funktionalität des PAL-Motivs zwischen SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase weitgehend identisch ist. Allerdings bestehen durchaus kleine, aber distinkte Unterschiede hinsichtlich der Anforderungen an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs (siehe 5.1.3 & 5.3). Wichtig ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass aufgrund seiner sehr ähnlichen Funktionalität das isolierte PAL-Motiv als solches nicht den besten Angriffspunkt für spezifische GSIs darstellt.

Statt dessen sollte zunächst geklärt werden, ob diese unterschiedlichen Anforderungen an die Aminosäuren-Seitenketten des PAL-Motivs der Komplexassemblierung der  $\gamma$ -Sekretase, ihrer Autoendoproteolyse oder sterisch-energetischen Anforderungen geschuldet sind. Vermutlich bieten diese Besonderheiten der Physiologie der  $\gamma$ -Sekretase verglichen zu SPPL2b bessere Angriffspunkte für die Entwicklung von spezifischen GSIs.

Eine weitere Komplikation in der Anwendung von GSIs stellt allerdings die Vielzahl an weiteren, physiologischen Substraten der  $\gamma$ -Sekretase dar, allen voran NOTCH (Haapasalo und Kovacs, 2011). Außerdem demonstrieren die vorliegenden Daten zur Funktionalität des PAL-Motivs in SPPL2b einmal mehr, wie ähnlich sich die Proteolysemechanismen von SPPL2b und der  $\gamma$ -Sekretase sind. Die Anwendung von nur mäßig spezifischen GSIs könnte also sowohl den NOTCH (siehe 1.2.3.1) als auch den TNF $\alpha$  Signalweg (siehe 1.2.2.4) beeinträchtigen, weshalb eine generelle Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase nicht in Frage kommt. Statt dessen scheint die Entwicklung von hoch spezifischen  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren (GSMs), welche den Proteolysemechanismus lediglich modifizieren, der sicherere Angriffspunkt zu sein.

Hier könnte ein Fokus insbesondere auf der Modulierung des initialen, endoproteolytischen  $\varepsilon$ -Schnittes und seiner Position liegen (Qi-Takahara et al., 2005), ohne aber die sequentielle Carboxypeptidase-artige Aktivität der GxGD-Intramembranproteasen zu verlangsamen (Funamoto et al., 2004). Auf diese

Weise gelänge am ehesten die spezifische Reduktion des Verhältnisses von A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40, die im Rahmen der Pharmakotherapie des Morbus Alzheimer angestrebt wird (siehe 1.2.3.2). Zu beachten ist hierbei in Bezug auf SPPL2b, ob eine mögliche Kreuzaktivität von GSMs auch den Primärschnitt von TNF $\alpha$  oder anderen SPPL2b-Substraten zu kleineren ICDs hin verschieben und welche potentiellen Nebenwirkungen dies verursachen könnte.

### 5.5.3 Physiologie der SPP/SPPL-Proteasen

Die bis dato etablierten Substratanforderungen der GxGD-Intramembranproteasen (siehe 5.4.2) machen ersichtlich, dass die Kollokalisierung eines Typ-2-Transmembranproteins alleine nicht ausreichend ist für die SPP/SPPL-abhängige Intramembranproteolyse. Vielmehr scheinen die unterschiedlichen Vertreter der SPP/SPPL-Proteasen differentielle Substratanforderungen oder physiologische Funktionen entwickelt zu haben (Martin et al., 2008; 2009; Voss et al., 2012; Weihofen et al., 2002), wodurch sich ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und Gewebe-spezifische Expression erklären könnte (Krawitz et al., 2005; Schneppenheim et al., 2014).

Daher kommt der Identifizierung von weiteren physiologischen Substraten der SPP/SPPL-Proteasen eine große Bedeutung zu, auch in Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen einer Pharmakotherapie. Hierbei sollte eine Analyse unter nativen Bedingungen gewählt werden, um Artefakte der Überexpression zu vermeiden (Schneppenheim et al., 2014). Proteomische Verfahren unter Knockdown einzelner Proteasen können helfen, ein differenzierteres Substrat-Profil der SPP/SPPL-Familie zu erstellen (Boname et al., 2014).

Die bisherigen Erkenntnisse über ihre Substratanforderungen (siehe 5.4.2) lassen eine präzise Regulation der SPP/SPPL-abhängigen Intramembranproteolyse sowie möglicherweise potentielle Signaltransduktionsvorgänge ihrer Substrate vermuten, so wie es für die SPPL2a/2b-abhängige Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  postuliert wurde (Friedmann et al., 2006). Interessant wäre hier die Aufarbeitung des Mechanismus einer solchen retrograden Signalkaskade, beispielsweise über welche Adapterproteine die eventuelle nukleäre Translokation der Substrat-ICDs vermittelt wird.

Ultimativ gilt es für die korrekte Interpretation der hier vorliegenden *in vitro* Daten noch zu klären, inwiefern die scheinbare Homooligomerisierung von SPP/SPPL-Proteasen (siehe 5.4.3) eine funktionelle Relevanz besitzt. In Analogie zu den Rhomboiden wäre allerdings auch das funktionelle Gegenteil denkbar, nämlich dass inaktive Vertreter der SPP/SPPL-Familie existieren (Lemberg und Freeman, 2007b). So könnte ein inaktives SPP/SPPL über eine kompetitive Bindung der Substrate diese vor der proteolytischen Aktivität aktiver SPP/SPPLs schützen und auf diese Weise regulativ eingreifen (Adrain und Freeman, 2012).

Zu guter Letzt existieren möglicherweise bisher noch unbekannte Kofaktoren oder transiente Interaktionspartner der SPP/SPPL-Proteasen mit funktioneller Relevanz (Lu et al., 2012). Hier könnten ebenfalls proteomische Verfahren in Kombination mit Interaktionsstudien helfen, die distinkte Physiologie der einzelnen SPP/SPPL-Proteasen zu entschlüsseln.

Da basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit auch eine Beteiligung des PAL-Motivs an solchen Interaktionen in Betracht gezogen werden muss, sind die hier skizzierten, fortführenden Experimente essentiell für eine globale Bewertung des PAL-Motivs hinsichtlich der komplexen Physiologie von SPPL2b.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adrain, C., und Freeman, M. (2012). New lives for old: evolution of pseudoenzyme function illustrated by iRhoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 489–498.
- Adrain, C., Strisovsky, K., Zettl, M., Hu, L., Lemberg, M.K., und Freeman, M. (2011). Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2. *EMBO Rep.* 12, 421–427.
- Akiyama, H., Kondo, H., Arai, T., Ikeda, K., Kato, M., Iseki, E., Schwab, C., und McGeer, P.L. (2004). Expression of BRI, the normal precursor of the amyloid protein of familial British dementia, in human brain. *Acta Neuropathol.* 107, 53–58.
- Altmann, K.H., Wójcik, J., Vásquez, M., und Scheraga, H.A. (1990). Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XXIII. Proline parameters from random poly (hydroxybutylglutamine-co-L-proline). *Biopolymers* 30, 107–120.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zschr. Psychiat., Georg Reimer Verlag, Berlin* 64.
- Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S.-I., und Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 231–235.
- Aster, J.C., Pear, W.S., und Blacklow, S.C. (2008). Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* 3, 587–613.
- Baker, R.P., Young, K., Feng, L., Shi, Y., und Urban, S. (2007). Enzymatic analysis of a rhomboid intramembrane protease implicates transmembrane helix 5 as the lateral substrate gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 104, 8257–8262.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., und Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916–919.
- Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grünberg, J., und Haass, C. (1997). Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct.* 1, 149–159.
- Behnke, J., Schneppenheim, J., Koch-Nolte, F., Haag, F., Saftig, P., und Schröder, B. (2011). Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail. *FEBS Letters* 585, 2951–2957.

- Ben-Shem, A., Fass, D., und Bibi, E. (2007). Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *104*, 462–466.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* *385*, 729–733.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., und Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* *90*, 281–291.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *77*, 1496–1500.
- Boname, J.M., Bloor, S., Wandel, M.P., Nathan, J.A., Antrobus, R., Dingwell, K.S., Thurston, T.L., Smith, D.L., Smith, J.C., Randow, F., et al. (2014). Cleavage by signal peptide peptidase is required for the degradation of selected tail-anchored proteins. *J. Cell Biol.* *205*, 847–862.
- Braak, H., und Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* *82*, 239–259.
- Brady, O. A., Zhou, X., und Hu, F. (2014). Regulated intramembrane proteolysis of the frontotemporal lobar degeneration (FTLD) risk factor, TMEM106B, by Signal Peptide Peptidase-like 2a (SPPL2a). *J. Biol. Chem.* *289*, 19670–19680.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* *391*, 795–799.
- Braud, V., Jones, E.Y., und McMichael, A. (1997). The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1164–1169.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 678–689.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., und Israël, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell* *5*, 207–216.
- Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *96*, 11041–11048.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., und Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* *100*, 391–398.

- Buttgereit, F., und Brand, M.D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem. J.* 312 ( Pt 1), 163–167.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., und Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765–27767.
- Cao, X., und Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120.
- Casso, D.J., Liu, S., Biehs, B., und Kornberg, T.B. (2012). Expression and characterization of *Drosophila* signal peptide peptidase-like (sppL), a gene that encodes an intramembrane protease. *PLoS ONE* 7, e33827.
- Casso, D.J., Tanda, S., Biehs, B., Martoglio, B., und Kornberg, T.B. (2005). *Drosophila* signal peptide peptidase is an essential protease for larval development. *Genetics* 170, 139–148.
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., et al. (2012). The mechanism of  $\gamma$ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *The EMBO Journal* 31, 2261–2274.
- Chávez-Gutiérrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P.C., und De Strooper, B. (2008). Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J. Biol. Chem.* 283, 20096–20105.
- Chen, C.-Y., Malchus, N.S., Hehn, B., Stelzer, W., Avci, D., Langosch, D., und Lemberg, M.K. (2014). Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *The EMBO Journal* 33, 2492–2506.
- Choi, S.-I., Vidal, R., Frangione, B., und Levy, E. (2004). Axonal transport of British and Danish amyloid peptides via secretory vesicles. *Faseb J.* 18, 373–375.
- Christianson, J.C., Olzmann, J.A., Shaler, T.A., Sowa, M.E., Bennett, E.J., Richter, C.M., Tyler, R.E., Greenblatt, E.J., Harper, J.W., und Kopito, R.R. (2012). Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat. Cell Biol.* 14, 93–105.
- Crawshaw, S.G., Martoglio, B., Meacock, S.L., und High, S. (2004). A misassembled transmembrane domain of a polytopic protein associates with signal peptide peptidase. *Biochem. J.* 384, 9–17.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., et al. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518–522.



- Del Campo, M., und Teunissen, C.E. (2014). Role of BRI2 in dementia. *J. Alzheimers Dis.* 40, 481–494.
- Dickey, S.W., Baker, R.P., Cho, S., und Urban, S. (2013). Proteolysis inside the membrane is a rate-governed reaction not driven by substrate affinity. *Cell* 155, 1270–1281.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890.
- Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J., et al. (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of Neurochemistry* 76, 173–181.
- Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., und Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the lumenal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 272, 12778–12785.
- Duncan, E.A., Davé, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. (1998). Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J. Biol. Chem.* 273, 17801–17809.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., und Haass, C. (2002). Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J. Biol. Chem.* 277, 13389–13393.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., und Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486–488.
- Eleveld-Trancikova, D., Sanecka, A., van Hout-Kuijer, M.A., Looman, M.W.G., Hendriks, I.A.M., Jansen, B.J.H., und Adema, G.J. (2010). DC-STAMP interacts with ER-resident transcription factor LUMAN which becomes activated during DC maturation. *Mol. Immunol.* 47, 1963–1973.
- Esler, W.P., Kimberly, W.T., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Diehl, T.S., Selkoe, D.J., und Wolfe, M.S. (2002). Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma-secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2720–2725.
- Feng, L., Yan, H., Wu, Z., Yan, N., Wang, Z., Jeffrey, P.D., und Shi, Y. (2007). Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. *Science* 318, 1608–1612.
- Fleig, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L., und Lemberg, M.K. (2012). Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Molecular Cell* 47, 558–569.
- Fluhrer, R., und Haass, C. (2007). Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family? *Neurodegener Dis* 4, 112–116.

Fluhrer, R., Fukumori, A., Martin, L., Grammer, G., Haug-Kröper, M., Klier, B., Winkler, E., Kremmer, E., Condron, M.M., Teplow, D.B., et al. (2008). Intramembrane proteolysis of GXGD-type aspartyl proteases is slowed by a familial Alzheimer disease-like mutation. *J. Biol. Chem.* 283, 30121–30128.

Fluhrer, R., Grammer, G., Israel, L., Condron, M.M., Haffner, C., Friedmann, E., Böhländ, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplow, D.B., et al. (2006). A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat. Cell Biol.* 8, 894–896.

Fluhrer, R., Martin, L., Klier, B., Haug-Kröper, M., Grammer, G., Nuscher, B., und Haass, C. (2012). The  $\alpha$ -helical content of the transmembrane domain of the British dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b). *J. Biol. Chem.* 287, 5156–5163.

Fluhrer, R., Steiner, H., und Haass, C. (2009). Intramembrane proteolysis by signal peptide peptidases: a comparative discussion of GXGD-type aspartyl proteases. *J. Biol. Chem.* 284, 13975–13979.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* 3, 85–97.

Freeman, M. (2008). Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu. Rev. Genet.* 42, 191–210.

Friedhoff, P., Bergen, von, M., Mandelkow, E.M., Davies, P., und Mandelkow, E. (1998). A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15712–15717.

Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleeger, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S.F., Kuhn, P.-H., Stauffer, D., Rovelli, G., und Martoglio, B. (2006). SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat. Cell Biol.* 8, 843–848.

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

Fukumori, A., Fluhrer, R., Steiner, H., und Haass, C. (2010). Three-Amino Acid Spacing of Presenilin Endoproteolysis Suggests a General Stepwise Cleavage of  $\gamma$ -Secretase-Mediated Intramembrane Proteolysis. *Journal of Neuroscience* 30, 7853–7862.

Funamoto, S., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Hirotsu, N., Saido, T.C., und Ihara, Y. (2004). Truncated carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein are processed to amyloid beta-proteins 40 and 42. *Biochemistry* 43, 13532–13540.

- Gerl, M.J., Sachsenheimer, T., Grzybek, M., Coskun, Ü., Wieland, F.T., and Brügger, B. (2014). Analysis of transmembrane domains and lipid modified peptides with matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **86**, 3722–3726.
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., and Priess, J.R. (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**, 775–779.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74.
- Grigorenko, A.P., Moliaka, Y.K., Korovaitseva, G.I., and Rogaev, E.I. (2002). Novel class of polytopic proteins with domains associated with putative protease activity. *Biochemistry Mosc.* **67**, 826–835.
- Grigorenko, A.P., Moliaka, Y.K., Soto, M.C., Mello, C.C., and Rogaev, E.I. (2004). The *Caenorhabditis elegans* IMPAS gene, *imp-2*, is essential for development and is functionally distinct from related presenilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14955–14960.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4913–4917.
- Ha, Y., Akiyama, Y., and Xue, Y. (2013). Structure and Mechanism of Rhomboid Protease. *J. Biol. Chem.* **288**, 15430–15436.
- Ha, Y. (2007). Structural principles of intramembrane proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 405–411.
- Haapasalo, A., und Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/ $\gamma$ -secretase. *J. Alzheimers Dis.* **25**, 3–28.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., und Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* **268**, 3021–3024.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322–325.
- Haass, C., und Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101–112.
- Haass, C., und Steiner, H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends in Cell Biology* **12**, 556–562.

Hadland, B.K., Manley, N.R., Su, D., Longmore, G.D., Moore, C.L., Wolfe, M.S., Schroeter, E.H., und Kopan, R. (2001). Gamma-secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* **98**, 7487–7491.

Hage, El, F., Stroobant, V., Vergnon, I., Baurain, J.-F., Echchakir, H., Lazar, V., Chouaib, S., Coulie, P.G., und Mami-Chouaib, F. (2008). Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* **105**, 10119–10124.

Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T., und Wagner, G. (2013). Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1919–1925.

Harbut, M.B., Patel, B.A., Yeung, B.K.S., McNamara, C.W., Bright, A.T., Ballard, J., Supek, F., Golde, T.E., Winzeler, E.A., Diagana, T.T., et al. (2012). Targeting the ERAD pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* **109**, 21486–21491.

Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**, 154–159.

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

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

Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., Figura, von, K., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human Molecular Genetics* **11**, 2615–2624.

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

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

Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., und Selkoe, D.J. (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *Plos Biol* **6**, e257.

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

Jarrett, J.T., Berger, E.P., und Lansbury, P.T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693–4697.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99.

Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H., und Haass, C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 158, 551–561.

Kim, S.H., Wang, R., Gordon, D.J., Bass, J., Steiner, D.F., Lynn, D.G., Thinakaran, G., Meredith, S.C., und Sisodia, S.S. (1999). Furin mediates enhanced production of fibrillogenic ABri peptides in familial British dementia. *Nature Neuroscience* 2, 984–988.

Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guénette, S.Y., und Selkoe, D.J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J. Biol. Chem.* 276, 40288–40292.

Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., und Selkoe, D.J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 100, 6382–6387.

Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Lückcrath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W.S., Martoglio, B., Hueber, A.-O., et al. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ.* 14, 1678–1687.

Kondo, S., Saito, A., Hino, S.-I., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., et al. (2007). BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Molecular and Cellular Biology* 27, 1716–1729.

Koonin, E.V., Makarova, K.S., Rogozin, I.B., Davidovic, L., Letellier, M.-C., und Pellegrini, L. (2003). The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol.* 4, R19.

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

Kopan, R., und Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216–233.

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

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

Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Roßner, S., und Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal* 29, 3020–3032.

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

LaPointe, C.F. (2000). The Type 4 Prepilin Peptidases Comprise a Novel Family of Aspartic Acid Proteases. *J. Biol. Chem.* 275, 1502–1510.

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

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

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

Leissring, M.A., Murphy, M.P., Mead, T.R., Akbari, Y., Sugarman, M.C., Jannatipour, M., Anliker, B., Müller, U., Saftig, P., De Strooper, B., et al. (2002). A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4697–4702.

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

Lemberg, M.K., und Freeman, M. (2007a). Cutting proteins within lipid bilayers: rhomboid structure and mechanism. *Molecular Cell* 28, 930–940.

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

- Lemberg, M.K., und Martoglio, B. (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Molecular Cell* 10, 735–744.
- Lemberg, M.K., und Martoglio, B. (2004). On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS Letters* 564, 213–218.
- Lemieux, M.J., Fischer, S.J., Cherney, M.M., Bateman, K.S., und James, M.N.G. (2007). The crystal structure of the rhomboid peptidase from *Haemophilus influenzae* provides insight into intramembrane proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 104, 750–754.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., und Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–357.
- Levitan, D., und Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377, 351–354.
- Li, S.C., und Deber, C.M. (1994). A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments. *Nat Struct Mol Biol* 1, 368–373.
- Li, X., Dang, S., Yan, C., Gong, X., Wang, J., und Shi, Y. (2012). Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature* 493, 56–61.
- Li, Y.M., Xu, M., Lai, M.T., Huang, Q., Castro, J.L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduveilil, J.G., et al. (2000). Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 405, 689–694.
- Lichtenthaler, S.F., Haass, C., und Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of Neurochemistry* 117, 779–796.
- Liu, W., Liu, Z., Cao, X., Cao, Z., Xue, L., Zhu, F., He, X., und Li, W. (2007). Recombinant human foamy virus, a novel vector for neurological disorders gene therapy, drives production of GAD in cultured astrocytes. *Mol. Ther.* 15, 1834–1841.
- Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L.C., Duan, S., Gardner, J., Wise, C., Miner, A., Malloy, M.J., Pullinger, C.R., et al. (2008). A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* 4, e1000041.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., und Israël, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 95, 8108–8112.
- Lu, P., Bai, X.-C., Ma, D., Xie, T., Yan, C., Sun, L., Yang, G., Zhao, Y., Zhou, R., Scheres, S.H.W., et al. (2014). Three-dimensional structure of human  $\gamma$ -secretase. *Nature* 1–15.

- Lu, S.H.-J., Jeon, A.H.W., Schmitt-Ulms, G., Qamar, S., Dodd, R., McDonald, B., Li, Y., Meadows, W., Cox, K., Bohm, C., et al. (2012). Vigilin interacts with signal peptide peptidase. *Proteome Sci* 10, 33.
- Luo, W.-J., Wang, H., Li, H., Kim, B.S., Shah, S., Lee, H.-J., Thinakaran, G., Kim, T.-W., Yu, G., und Xu, H. (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J. Biol. Chem.* 278, 7850–7854.
- MacKenzie, K.R. (2006). Folding and stability of alpha-helical integral membrane proteins. *Chem. Rev.* 106, 1931–1977.
- Maegawa, S., Ito, K., und Akiyama, Y. (2005). Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the Escherichia coli cytoplasmic membrane. *Biochemistry* 44, 13543–13552.
- Maegawa, S., Koide, K., Ito, K., und Akiyama, Y. (2007). The intramembrane active site of GlpG, an E. coli rhomboid protease, is accessible to water and hydrolyses an extramembrane peptide bond of substrates. *Mol. Microbiol.* 64, 435–447.
- Marapana, D.S., Wilson, D.W., Zuccala, E.S., Dekiwadia, C.D., Beeson, J.G., Ralph, S.A., und Baum, J. (2012). Malaria parasite signal peptide peptidase is an ER-resident protease required for growth but not for invasion. *Traffic* 13, 1457–1465.
- Marcora, M.S., Fernández-Gamba, A.C., Avendaño, L.A., Rotondaro, C., Podhajcer, O.L., Vidal, R., Morelli, L., Ceriani, M.F., und Castaño, E.M. (2014). Amyloid peptides ABri and ADan show differential neurotoxicity in transgenic Drosophila models of familial British and Danish dementia. *Mol Neurodegener* 9, 5.
- Martin, L., Fluhrer, R., und Haass, C. (2009). Substrate requirements for SPPL2b-dependent regulated intramembrane proteolysis. *J. Biol. Chem.* 284, 5662–5670.
- Martin, L., Fluhrer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P., und Haass, C. (2008). Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J. Biol. Chem.* 283, 1644–1652.
- Martoglio, B., und Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology* 8, 410–415.
- Mayer, U., und Nusslein-Volhard, C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the Drosophila embryo. *Genes Dev.* 2, 1496–1511.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., und Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO Journal* 21, 3980–3988.



- Mead, S., James-Galton, M., Revesz, T., Doshi, R.B., Harwood, G., Pan, E.L., Ghiso, J., Frangione, B., und Plant, G. (2000). Familial British dementia with amyloid angiopathy: early clinical, neuropsychological and imaging findings. *Brain* 123 ( Pt 5), 975–991.
- Miyashita, H., Maruyama, Y., Isshiki, H., Osawa, S., Ogura, T., Mio, K., Sato, C., Tomita, T., und Iwatsubo, T. (2011). Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase. *J. Biol. Chem.* 286, 26188–26197.
- Murakami, T., Kondo, S., Ogata, M., Kanemoto, S., Saito, A., Wanaka, A., und Imaizumi, K. (2006). Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *Journal of Neurochemistry* 96, 1090–1100.
- Narayanan, S., Sato, T., und Wolfe, M.S. (2007). A C-terminal Region of Signal Peptide Peptidase Defines a Functional Domain for Intramembrane Aspartic Protease Catalysis. *J. Biol. Chem.* 282, 20172–20179.
- Nyborg, A.C., Jansen, K., Ladd, T.B., Fauq, A., und Golde, T.E. (2004a). A signal peptide peptidase (SPP) reporter activity assay based on the cleavage of type II membrane protein substrates provides further evidence for an inverted orientation of the SPP active site relative to presenilin. *J. Biol. Chem.* 279, 43148–43156.
- Nyborg, A.C., Kornilova, A.Y., Jansen, K., Ladd, T.B., Wolfe, M.S., und Golde, T.E. (2004b). Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 279, 15153–15160.
- Nyborg, A.C., Ladd, T.B., Jansen, K., Kukar, T., und Golde, T.E. (2006). Intramembrane proteolytic cleavage by human signal peptide peptidase like 3 and malaria signal peptide peptidase. *Faseb J.* 20, 1671–1679.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K., und Matsuura, Y. (2008). Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82, 8349–8361.
- Osenkowski, P., Li, H., Ye, W., Li, D., Aeschbach, L., Fraering, P.C., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., und Li, H. (2009). Cryoelectron microscopy structure of purified gamma-secretase at 12 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 385, 642–652.
- Page, R.M., Baumann, K., Tomioka, M., Pérez-Revuelta, B.I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., et al. (2008). Generation of Aβ<sub>38</sub> and Aβ<sub>42</sub> is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *J. Biol. Chem.* 283, 677–683.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D’Adamio, L., Shen, J., Müller, U., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Aβ-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541–554.

- Pasternak, S.H., Bagshaw, R.D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C.A., Pak, B.J., Callahan, J.W., und Mahuran, D.J. (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 26687–26694.
- Poggi, M., Kara, I., Brunel, J.-M., Landrier, J.-F., Govers, R., Bonardo, B., Fluhrer, R., Haass, C., Alessi, M.-C., und Peiretti, F. (2013). Palmitoylation of TNF alpha is involved in the regulation of TNF receptor 1 signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 602–612.
- Ponting, C.P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., und Golde, T.E. (2002). Identification of a novel family of presenilin homologues. *Human Molecular Genetics* 11, 1037–1044.
- Popot, J.L., und Engelman, D.M. (2000). Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 881–922.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., und Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J. Biol. Chem.* 279, 23255–23261.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirokuni, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., et al. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Journal of Neuroscience* 25, 436–445.
- Radhakrishnan, A., Goldstein, J.L., McDonald, J.G., und Brown, M.S. (2008). Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab.* 8, 512–521.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., und Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 7, 95–99.
- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Molecular Cell* 1, 47–57.
- Rawson, R.B. (2013). The site-2 protease. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Biomembranes* 1828, 2801–2807.
- Real, P.J., Tosello, V., Palomero, T., Castillo, M., Hernando, E., de Stanchina, E., Sulis, M.L., Barnes, K., Sawai, C., Homminga, I., et al. (2009). Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine* 15, 50–58.
- Ren, Z., Schenk, D., Basi, G.S., und Shapiro, I.P. (2007). Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages. *J. Biol. Chem.* 282, 35350–35360.

- Rogaeva, E.A., Fafel, K.C., Song, Y.Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., Richard, E., Rogaev, E.I., Frommelt, P., Sadovnick, A.D., et al. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology* 57, 621–625.
- Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell* 2, 505–514.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., und Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835–841.
- Sato, C., Takagi, S., Tomita, T., und Iwatsubo, T. (2008). The C-Terminal PAL Motif and Transmembrane Domain 9 of Presenilin 1 Are Involved in the Formation of the Catalytic Pore of the  $\gamma$ -Secretase. *Journal of Neuroscience* 28, 6264–6271.
- Sato, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., und Wolfe, M.S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J. Biol. Chem.* 282, 33985–33993.
- Schägger, H., und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Schlöndorff, J., und Blobel, C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell. Sci.* 112 ( Pt 21), 3603–3617.
- Schneppenheim, J., Huttl, S., Mentrup, T., Lullmann-Rauch, R., Rothaug, M., Engelke, M., Dittmann, K., Dressel, R., Araki, M., Araki, K., et al. (2014). The Intramembrane Proteases Signal Peptide Peptidase-Like 2a and 2b Have Distinct Functions In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* 34, 1398–1411.
- Schrul, B., Kapp, K., Sinning, I., und Dobberstein, B. (2010). Signal peptide peptidase (SPP) assembles with substrates and misfolded membrane proteins into distinct oligomeric complexes. *Biochem. J.* 427, 523–534.
- Selkoe, D.J. (2001a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Selkoe, D.J. (2001b). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11039–11041.
- Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horré, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schäfer, M.K., Berezovska, O., et al. (2009). gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* 324, 639–642.

- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., und Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1, a006189.
- Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., Südhof, T., und Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435–447.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 14, 837–842.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., und Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629–639.
- Shen, J., und Prywes, R. (2004). Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *J. Biol. Chem.* 279, 43046–43051.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., und Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.
- Shen, J., Snapp, E.L., Lippincott-Schwartz, J., und Prywes, R. (2005). Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular and Cellular Biology* 25, 921–932.
- Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C., und Steiner, H. (2004). Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J. Biol. Chem.* 279, 41340–41345.
- Shirotani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., und Steiner, H. (2007). Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes. *Neurobiol. Dis.* 27, 102–107.
- Sobhanifar, S., Schneider, B., Löhr, F., Gottstein, D., Ikeya, T., Mlynarczyk, K., Pulawski, W., Ghoshdastider, U., Kolinski, M., Filipek, S., et al. (2010). Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9644–9649.
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M.G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fechteler, K., et al. (1999). A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 28669–28673.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M.L., Baumeister, R., et al. (2000). Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* 2, 848–851.

- Steiner, H., Fluhner, R., und Haass, C. (2008). Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 283, 29627–29631.
- Stirling, J., und O'hare, P. (2006). CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol. Biol. Cell* 17, 413–426.
- Strisovsky, K., Sharpe, H.J., und Freeman, M. (2009). Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Molecular Cell* 36, 1048–1059.
- Struhl, G., und Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Molecular Cell* 6, 625–636.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., und Ihara, Y. (2009). gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *Journal of Neuroscience* 29, 13042–13052.
- Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., et al. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181–190.
- Thinakaran, G., Regard, J.B., Bouton, C.M., Harris, C.L., Price, D.L., Borchelt, D.R., und Sisodia, S.S. (1998). Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol. Dis.* 4, 438–453.
- Tolia, A., Horré, K., und De Strooper, B. (2008). Transmembrane domain 9 of presenilin determines the dynamic conformation of the catalytic site of gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 283, 19793–19803.
- Tomita, T., Watabiki, T., Takikawa, R., Morohashi, Y., Takasugi, N., Kopan, R., De Strooper, B., und Iwatsubo, T. (2001). The first proline of PALP motif at the C terminus of presenilins is obligatory for stabilization, complex formation, and gamma-secretase activities of presenilins. *J. Biol. Chem.* 276, 33273–33281.
- Tsruya, R., Wojtalla, A., Carmon, S., Yogev, S., Reich, A., Bibi, E., Merdes, G., Schejter, E., und Shilo, B.-Z. (2007). Rhomboid cleaves Star to regulate the levels of secreted Spitz. *The EMBO Journal* 26, 1211–1220.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., und Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981–993.
- Urban, S., Lee, J.R., und Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107, 173–182.

- Urban, S., und Baker, R.P. (2008). In vivo analysis reveals substrate-gating mutants of a rhomboid intramembrane protease display increased activity in living cells. *Biol. Chem.* 389, 1107–1115.
- Urban, S., und Freeman, M. (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Molecular Cell* 11, 1425–1434.
- Urban, S., und Shi, Y. (2008). Core principles of intramembrane proteolysis: comparison of rhomboid and site-2 family proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 432–441.
- Urban, S., Lee, J.R., und Freeman, M. (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all Drosophila membrane-tethered EGF ligands. *The EMBO Journal* 21, 4277–4286.
- Urban, S., und Wolfe, M.S. (2005). Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1883–1888.
- Urny, J., Hermans-Borgmeyer, I., Gercken, G., und Schaller, H.C. (2003). Expression of the presenilin-like signal peptide peptidase (SPP) in mouse adult brain and during development. *Gene Expr. Patterns* 3, 685–691.
- Utsumi, T., Takeshige, T., Tanaka, K., Takami, K., Kira, Y., Klostergaard, J., und Ishisaka, R. (2001). Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Letters* 500, 1–6.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., und Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36–44.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G., und Ghiso, J. (1999). A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* 399, 776–781.
- Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J.L., Bek, T., Bojsen-Møller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J., et al. (2000). A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4920–4925.
- Vidal, R., Barbeito, A.G., Miravalle, L., und Ghetti, B. (2009). Cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid deposition in transgenic mice expressing the Danish mutant form of human BRI2. *Brain Pathol.* 19, 58–68.

Voss, M., Fukumori, A., Kuhn, P.-H., Künzel, U., Klier, B., Grammer, G., Haug-Kröper, M., Kremmer, E., Lichtenthaler, S.F., Steiner, H., et al. (2012). Foamy virus envelope protein is a substrate for signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3). *J. Biol. Chem.* 287, 43401–43409.

Voss, M., Schröder, B., und Fluhner, R. (2013). Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2828–2839.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., und Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918.

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

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

Wang, Y., Zhang, Y., und Ha, Y. (2006b). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444, 179–180.

Watanabe, N., Image Image, I.I., Takagi, S., Image Image, I.I., Tominaga, A., Image Image, I., Tomita, T., Image Image, I.I., Iwatsubo, T., und Image Image, I. (2010). Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate-binding site of gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 285, 19738–19746.

Weihofen, A., Lemberg, M.K., Ploegh, H.L., Bogoy, M., und Martoglio, B. (2000). Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor. *J. Biol. Chem.* 275, 30951–30956.

Weihofen, A., und Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends in Cell Biology* 13, 71–78.

Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K., und Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296, 2215–2218.

Weihofen, A., Lemberg, M.K., Friedmann, E., Rueeger, H., Schmitz, A., Paganetti, P., Rovelli, G., und Martoglio, B. (2003). Targeting presenilin-type aspartic protease signal peptide peptidase with gamma-secretase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278, 16528–16533.

- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., und Aster, J.C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269–271.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., und Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
- Wolfe, M.S. (2009). Intramembrane-cleaving proteases. *J. Biol. Chem.* 284, 13969–13973.
- Wolfe, M.S. (2013). Toward the structure of presenilin/ $\gamma$ -secretase and presenilin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Biomembranes* 1828, 2886–2897.
- Wolfe, M.S., und Kopan, R. (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 305, 1119–1123.
- Wong, P.C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M.W., Sirinathsinghji, D.J., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Price, D.L., Van der Ploeg, L.H., und Sisodia, S.S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288–292.
- Wu, Z., Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R.P., Gu, L., Jeffrey, P.D., Urban, S., und Shi, Y. (2006). Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1084–1091.
- Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., und Steiner, H. (2006). The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase. *Journal of Neuroscience* 26, 3821–3828.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., et al. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537.
- Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., und Eriksson, E. (1998). Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 9, 1939–1950.
- Ye, J., Davé, U.P., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. (2000). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5123–5128.
- Zahn, C., Kaup, M., Fluhrer, R., und Fuchs, H. (2013). The transferrin receptor-1 membrane stub undergoes intramembrane proteolysis by signal peptide peptidase-like 2b. *FEBS J* 280, 1653–1663.



Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H., und Kaufman, R.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124, 587–599.

Zhang, S., Liu, T., Liang, H., Zhang, H., Yan, D., Wang, N., Jiang, X., Feng, W., Wang, J., Li, P., et al. (2009). Lipid rafts uncouple surface expression of transmembrane TNF- $\alpha$  from its cytotoxicity associated with ICAM-1 clustering in Raji cells. *Mol. Immunol.* 46, 1551–1560.

Zhang, X., Hoey, R.J., Lin, G., Koide, A., Leung, B., Ahn, K., Dolios, G., Paduch, M., Ikeuchi, T., Wang, R., et al. (2012). Identification of a tetratricopeptide repeat-like domain in the nicastrin subunit of  $\gamma$ -secretase using synthetic antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8534–8539.

Zhao, G., Liu, Z., Ilagan, M.X.G., und Kopan, R. (2010). Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *Journal of Neuroscience* 30, 1648–1656.

## 7 ANHANG – AMINOSÄURECODE

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

## 8 ANHANG – TABELLEN

### (A) TR

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5673
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6352
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3060
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3553
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3898
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

### (B) SPPL2b wt

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRR -Palm	4047	4046
1 - 34	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLS	4776	4776
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5663
1 - 39 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL -Palm	5622	5632
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6340
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3058
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3553
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3760
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3897
51	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4011
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

**Tab. 8.1 TNF $\alpha$  Massen für TR und SPPL2b wt**

Die Tabelle listet die zur Identifizierung von TNF $\alpha$  Fragmenten mittels MALDI-TOF gemessenen sowie die theoretisch berechneten Massen in Dalton (Da), sowohl für TNF $\alpha$  ICDs (blau + rot) als auch für TNF $\alpha$  C-Peptide (grün). Die gemessenen TNF $\alpha$  Fragmente umfassen die entsprechend annotierten Sequenzen, TNF $\alpha$  ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert (Palm) sein (blau). Zur Berechnung der Massen der mit dem Start-Methionin beginnenden TNF $\alpha$  ICDs wurde eine N-terminale Acetylierung berücksichtigt (Ac).

# ANHANG – TABELLEN

## (A) SPPL2b P472A

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRRC -Palm	4047	4045
1 - 34	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLS	4776	4775
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5664
1 - 39 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL -Palm	5622	5622
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6340
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3058
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3553
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3759
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3897
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4009
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

## (B) SPPL2b P472G

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRRC -Palm	4047	4058
1 - 34	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLS	4776	4779
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5671
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6352
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3057
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3554
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3898
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4012
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

## (C) SPPL2b P472L

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 34	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLS	4776	4776
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5670
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6349
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3059
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3554
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3900
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4010
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

**Tab. 8.2 TNF $\alpha$  Massen für SPPL2b Prolin 472**

Die Tabelle listet die zur Identifizierung von TNF $\alpha$  Fragmenten mittels MALDI-TOF gemessenen sowie die theoretisch berechneten Massen in Dalton (Da), sowohl für TNF $\alpha$  ICDs (blau + rot) als auch für TNF $\alpha$  C-Peptide (grün). Die gemessenen TNF $\alpha$  Fragmente umfassen die entsprechend annotierten Sequenzen, TNF $\alpha$  ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert (Palm) sein (blau). Zur Berechnung der Massen der mit dem Start-Methionin beginnenden TNF $\alpha$  ICDs wurde eine N-terminale Acetylierung berücksichtigt (Ac).

# ANHANG – TABELLEN

## (A) SPPL2b A473C

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL -Palm	4047	4055
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5668
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6351
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3056
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3554
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3759
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3898
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

## (B) SPPL2b A473G

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5670
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6351
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3056
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3554
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3895
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

# ANHANG – TABELLEN

## (C) SPPL2b A473L

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5671
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6352
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3058
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3555
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3761
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3898
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4008
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

## (D) SPPL2b A473V

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5668
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6349
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3059
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3555
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3761
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3897
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4011
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

**Tab. 8.3 TNF $\alpha$  Massen für SPPL2b Alanin 473**

Die Tabelle listet die zur Identifizierung von TNF $\alpha$  Fragmenten mittels MALDI-TOF gemessenen sowie die theoretisch berechneten Massen in Dalton (Da), sowohl für TNF $\alpha$  ICDs (blau + rot) als auch für TNF $\alpha$  C-Peptide (grün). Die gemessenen TNF $\alpha$  Fragmente umfassen die entsprechend annotierten Sequenzen, TNF $\alpha$  ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert (Palm) sein (blau). Zur Berechnung der Massen der mit dem Start-Methionin beginnenden TNF $\alpha$  ICDs wurde eine N-terminale Acetylierung berücksichtigt (Ac).

# ANHANG – TABELLEN

## (A) SPPL2b L474V

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRRC -Palm	4047	4058
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5665
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTL -Palm	6349	6346
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3057
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3553
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3897
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4009
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

## (B) SPPL2b L474I

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRRC -Palm	4047	4055
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5665
1 - 48	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLF	6258	6252
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTL -Palm	6349	6344
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3058
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3556
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3899
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4012
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125



# ANHANG – TABELLEN

## (C) SPPL2b L474A

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 34	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLS	4776	4773
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5663
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6347
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3059
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3553
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3759
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3897
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

## (D) SPPL2b L474G

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
1 - 34	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLS	4776	4775
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 42	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVA	5667	5668
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6347
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3058
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3554
53	FGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3762	3762
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3898
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

(E) **SPPL2b L474F**

Peptide	Sequenz	Masse [M+H] <sup>+</sup> (Da)*	
		Berechnet	Gemessen
4 - 30 + Palm	KDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL -Palm	4047	4055
1 - 39	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL	5384	5384
1 - 39 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL -Palm	5622	5626
1 - 47 + Palm	Ac-MDYKDDDDKSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATT -Palm	6349	6347
60	REESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3063	3057
55	VIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3558	3555
52	HFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	3899	3897
51	LHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4012	4007
50	LLHFGVIGPQREESPRDLSLISPLAQADYKDDDDKAP	4125	4125

**Tab. 8.4 TNF $\alpha$  Massen für SPPL2b Leucin 474**

Die Tabelle listet die zur Identifizierung von TNF $\alpha$  Fragmenten mittels MALDI-TOF gemessenen sowie die theoretisch berechneten Massen in Dalton (Da), sowohl für TNF $\alpha$  ICDs (blau + rot) als auch für TNF $\alpha$  C-Peptide (grün). Die gemessenen TNF $\alpha$  Fragmente umfassen die entsprechend annotierten Sequenzen, TNF $\alpha$  ICDs können an Cystein 30 palmitoyliert (Palm) sein (blau). Zur Berechnung der Massen der mit dem Start-Methionin beginnenden TNF $\alpha$  ICDs wurde eine N-terminale Acetylierung berücksichtigt (Ac).

## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Christian Haass für sein außerordentliches Engagement und Inspirationen, die Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen sowie die fortwährende Unterstützung bei den ersten und weiterführenden Schritten innerhalb der Wissenschaft.

Für die Überlassung des vorliegenden Promotions-Projektes sowie die kontinuierliche Betreuung in allen molekularbiologischen und biochemischen Belangen bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Regina Fluhrer.

Die Einführung in die wissenschaftliche Methodik und die Bewältigung des gelegentlich frustranen Laboralltages erfolgte auf besonders prägende Art und Weise durch Dr. Lucas Martin, hierfür meinen allerbesten Dank.

Ebenso möchte ich Dr. Akio Fukumori danken für die Zusammenarbeit und Hilfe auf dem Gebiet der MALDI-TOF Massenspektrometrie.

Für ausgezeichnete technische Unterstützung sowie die Schaffung einer freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre geht meinen herzlichster Dank an Gudula Grammer, Martina Haug-Kröper und Bärbel Klier.

Dr. Tim Bartels, Dr. Ulf Dettmer, Dr. Bastian Dislich, Dr. Daniel Fleck, Dr. Sebastian Hogl, Dr. Benedikt Kretner, Dr. Peer-Hendrik Kuhn, Dr. Yu Ohki, Dr. Richard Page, Dr. Matthias Voss und dem gesamten Haass-Labor gebührt mein Dank für die tolle Zusammenarbeit, Rat und Tat, endlose wissenschaftliche und nicht wissenschaftliche Diskussionen sowie den intensiven und geselligen Austausch bei Speis und Trank.

Ohne die bedingungslose und intensive Unterstützung meiner Eltern wäre der Spagat aus Studium und Promotion nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich Euch für alles ganz herzlich danken!

Mein größter Dank gilt Moni für all die Entbehrungen an zahlreichen Abenden und Wochenenden sowie die dauerhafte und liebevolle Aufmunterung.

Diese Arbeit wurde durch den Promotionsstudiengang *Molekulare Medizin* des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann gefördert.

## 10 LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

#### Manuel Lehm

Geburtsdatum: 15. Juni 1985  
Geburtsort: Braunschweig, Deutschland

### BERUFSERFAHRUNG

---

seit 09/2012 **Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung & Neurologische Klinik und Poliklinik  
Klinikum der Universität München**  
Assistenzarzt & Wissenschaftlicher Mitarbeiter

**Max-Planck-Institut für Biochemie**  
**Department of Proteomics and Signal Transduction**  
Gastwissenschaftler

**Graduate School of Systemic Neurosciences | LMU**

### PROMOTION

---

09/2007 – 08/2012 **BioMedizinisches Zentrum | LMU**  
**Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie**  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass  
Dissertation: *Regulierte Intramembranproteolyse von TNF $\alpha$  durch SPPL2b*

**Graduate Program in Neurodegenerative Disease Research**

### HOCHSCHULBILDUNG

---

05/2012 **Staatsexamen | Ärztliche Prüfung**  
Note: 1.3  
**Approbation als Arzt**

10/2005 – 05/2012 **Ludwig-Maximilians-Universität München**  
Studium der Humanmedizin

### AUSLANDSPRAKTIKA

---

10 – 12/2011 **Royal Free Hospital | University College London**  
Department of Internal Medicine

05 – 08/2011 **Massachusetts General Hospital | Harvard Medical School**  
Department of Neurology

**Brigham & Women's Hospital | Harvard Medical School**  
Center for Neurologic Diseases (Dennis Selkoe, MD)

12/2010 – 02/2011 **Groote Schuur Hospital | University of Cape Town**  
Department of Trauma

03 – 04/2010 **Concord Repatriation General | University of Sydney**  
Department of Neurology

## WEHRDIENST

---

07/2004 – 03/2005    **GebSanRgt Kempten & StOSanZ München**

## SCHULBILDUNG

---

06/2004                    **Allgemeine Hochschulreife**  
Note: 1.2

09/1997 – 06/2004    **Staatliches Gymnasium München/Moosach**

05/1996 – 07/1997    **Hohenstaufengymnasium Bad Wimpfen**

08/1995 – 04/1996    **Gymnasium Nieder-Olm**

## PUBLIKATIONEN, POSTERPRÄSENTATIONEN & ZITIERFÄHIGE ABSTRACTS

---

11/2014                    Ay H., Arsava E., Andsberg G., (...), **Lehm M.**, et al.  
*Pathogenic Ischemic Stroke Phenotypes in the NINDS-Stroke Genetics Network. Stroke 45, 3589-3596.*

10/2014                    **Lehm M.**, Prestel M., Viturawong T., Dichgans M., Mann M.  
*Proteome-Wide Analysis for Identification of Functional SNPs.*  
13<sup>th</sup> Human Proteome Organization World Congress

09/2014                    **Lehm M.**, Prestel M., Viturawong T., Mann M., Dichgans M.  
*Proteome-Wide Analysis for Identification of Functional SNPs.*  
87<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Neurology

11/2013                    **Lehm M.**, Viturawong T., Mann M., Dichgans M., Prestel M.  
*Proteome-Wide Analysis for Identification of Functional SNPs.*  
Functional Genomics & Systems Biology Conference

10/2012                    Chen A., Shepardson N., Patel S., Guo L., **Lehm M.**, et al.  
*Interaction between the APP secretases: A new cell biological model of regulated intramembrane proteolysis.*  
42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience

## STIPENDIEN & PREISE

---

07/2014                    **Young Scientists' Forum 2014 | LMUexcellent**

10/2012                    **Alzheimer Forschung Initiative e.V.**

07/2012                    **Deutsche Gesellschaft für Neurologie | Stiftung Felgenhauer**

05/2009 – 05/2012    **Studienstiftung des deutschen Volkes**  
Stipendiat

10/2008 – 05/2012    **Max Weber-Programm | Elitenetzwerk Bayern**  
Stipendiat

01/2008 – 06/2009    **Molekulare Medizin | Förderprogramm für Forschung und Lehre**  
Promotionsstipendiat