

**Regulatorische Funktion der Phosphorylierung von  
Neprilysin in der Lokalisation an der Plasmamembran und  
der Interaktion mit dem Tumorsuppressor PTEN**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von**

**Martin Siepmann**

**aus**

**Münster**

**Bonn, 2009**

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Walter
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 23.03.2010  
Erscheinungsjahr: 2010

An Eides statt versichere ich, dass ich die Dissertation "Regulatorische Funktion der Phosphorylierung von Nephilysin in der Lokalisation an der Plasmamembran und der Interaktion mit dem Tumorsuppressor PTEN" selbst und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch an keiner anderen Stelle als Dissertation eingereicht worden ist.

---

Promotionsordnung 7. Januar 2004

Martin Siepmann

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	Phosphorisotop
<sup>35</sup> S	Schwefelisotop
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
AICD	<i>APP Intracellular Domain</i>
AK	Antikörper
Akt (phos. 473)	an Serin 473 phosphoryliertes Akt
APH-1	<i>Anterior Pharynx Defective-1</i>
APLP	<i>Amyloid Precursor Like Protein</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (falls nicht anders angegeben APP 695)
APP <sup>sw</sup>	APP 695 schwedisch (APP 695 mit Doppelmutation: K595N/M596L)
ARE	<i>Androgen Response Element</i>
ARR	<i>Androgen Response Region</i>
AS	Aminosäure
AS160	Akt Substrat von 160 kDa
ASK1	Apoptose signalregulierende Kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
Aβ	Amyloid β Peptid
Aβ <sub>x</sub>	Amyloid β Peptid bestehend aus 1-x Aminosäuren der Amyloid β-Sequenz
BACE	<i>Beta-Site APP Cleaving Enzyme</i>
BAD	<i>Bcl-2 Associate Death Promoter</i>
C- / N- c	Carboxyl- / Amino- Konzentration
C` / N`	Carboxyl-Terminus / Amino-Terminus
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdk5	<i>Cyclin dependent kinase 5</i>
Chk1	<i>Checkpoint homolog kinase 1</i>
Ci	Curie
CK2	Casein Kinase 2
CT / NT	Carboxyl-terminale Domäne / Amino-terminale Domäne
CTF	C-Terminales APP Fragment nach α-Sekretase (CTFα) oder β-Sekretase (CTFβ) Spaltung
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (CK2 Inhibitor)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECE	<i>Endothelin Converting Enzyme</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>

eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin, Radexin, Moesin Proteinfamilie
FERM	4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	<i>full length</i> (Volllängen; bezogen auf Proteine)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM1	Gangliosid GM <sub>1</sub>
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
HeLa	Zervixkarzinom Epithelzellen (Henrietta Lacks)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDE	Insulin degradierendes Enzym
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	Insulin <i>like Growth Factor-1</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
LRP	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1</i>
m / im	matur / immatur
M	Molar (mol/l)
MAPK	Mitogen aktivierte <i>Protein Kinase</i>
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MDM2	<i>Murine Double Minute-2</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
mRNS	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEP	Neprilysin (auch CD10, CALLA, Neutrale Endopeptidase 24.11, Enkephalinase)
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
OA	Okadasäure
p21CIP1	Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor 1A
p27KIP1	Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor 1B
p3	extrazelluläres APP Spaltprodukt nach $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase Spaltung
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDK1	<i>3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1</i>
PDZ	PSD95/SAP90, <i>Discs large</i> , <i>Zonula occludentes-1</i>
PEN-2	Presenilin <i>Enhancer-2</i>
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphat
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKB	<i>Protein Kinase B</i> (entspricht Akt)
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
pNEP / phosphoNEP	an Serin 6 phosphoryliertes NEP

PRAS40	Prolin-reiches Akt Substrat von 40 kDa
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
RU	Biacore: <i>Response Units</i> ; sonst: <i>Relative Units</i>
SA	Streptavidin
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
t	Zeit
Thior.	Thiorphan
TM	Transmembrandomäne
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western-(Immun)blot
wt	Wildtyp
$\alpha$ -	anti-

### **Aminosäuren (Abkürzung und Einbuchstabencode)**

Bezeichnung	Abkürzung	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminosäure		X

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Physiologische und pathologische Bedeutung von Neprilysin.....	8
1.2	Die Alzheimersche Erkrankung.....	9
1.2.1	Neuropathologische Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung.....	10
1.2.2	Das Amyloid Vorläuferprotein und dessen proteolytische Prozessierung .....	11
1.2.3	Struktur und Funktion der APP prozessierenden Proteasen .....	14
1.2.3.1	Die $\alpha$ -Sekretase .....	14
1.2.3.2	Die $\beta$ -Sekretase .....	14
1.2.3.3	Die $\gamma$ -Sekretase .....	15
1.2.4	Genetische Grundlagen der Alzheimerschen Erkrankung.....	17
1.2.5	Beseitigung von A $\beta$ aus dem Gehirn .....	18
1.2.6	Funktion und Eigenschaften von A $\beta$ -abbauenden Proteasen und Peptidasen .	19
1.2.6.1	Plasmin.....	20
1.2.6.2	A $\beta$ -abbauende Zink-Metalloproteasen/peptidasen .....	20
1.3	Zytosolische Interaktionspartner von Neprilysin und deren Funktion .....	23
1.4	Die Akt Kinase und ihre Funktion in der intrazellulären Signalweiterleitung	28
1.5	Beeinträchtigung zellulärer Signalwege durch die Alzheimersche Erkrankung .....	29
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	31
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.1	Zellbiologische Techniken.....	34
2.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	34
2.1.2	Bestimmung der Zellvitalität (MTT Test) .....	35
2.1.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsvektoren.....	35
2.1.4	Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten .....	35
2.1.5	Nachweis von NEP Enzymaktivität.....	36
2.2	Molekularbiologische Techniken .....	37
2.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	37
2.2.2	Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen.....	38
2.2.3	Dephosphorylierung von DNS.....	38

2.2.4	Visualisierung und Größentrennung von DNS Fragmenten mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese.....	39
2.2.5	Isolation von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
2.2.6	DNS Ligation .....	40
2.2.7	Herstellung kompetenter DH5 $\alpha$ <i>E.coli</i> Zellen .....	40
2.2.8	Transformation kompetenter DH5 $\alpha$ <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNS.....	40
2.2.9	Herstellung von <i>E.coli</i> -Kryokulturen .....	41
2.2.10	Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> .....	41
2.2.11	Isopropanolfällung der DNS .....	42
2.2.12	DNS Sequenzierung.....	42
2.2.13	DNS Konzentrationsbestimmung (photometrisch).....	42
2.3	Proteinbiochemische Techniken .....	43
2.3.1	Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen.....	43
2.3.2	Membranproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen.....	43
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
2.3.4	Immunpräzipitation von Proteinen .....	44
2.3.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	45
2.3.6	Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	46
2.3.7	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembran (Western Blotting) und immunchemischer Nachweis .....	46
2.3.8	Affinitätsreinigung von monoklonalem c-Myc Antikörper.....	47
2.3.9	Expression, Reinigung und Isolation von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen.....	48
2.3.10	Expression, Reinigung und Isolation von Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteinen.....	48
2.3.11	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen .....	49
2.3.12	Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie.....	49
2.3.13	Peptid – Protein Kopräzipitationsversuche.....	50
2.3.14	Inhibition der Proteinbiosynthese in Säugerzellen durch Cycloheximid.....	50
2.3.15	Metabolische Markierung von Proteinen mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin/Cystein ( <i>Pulse Chase</i> ) .....	50
2.3.16	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	51
2.3.17	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen.....	51

2.3.18	[ <sup>32</sup> P]-Markierung von HEK293 Zellen ( <i>in vivo</i> Phosphorylierung) .....	52
2.3.19	Statistische Auswertung der Versuche .....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
3.1	Expression und katalytische Aktivität von endogenem NEP .....	56
3.2	Expression und katalytische Aktivität von exogen exprimiertem NEP.....	57
3.3	Subzelluläre Lokalisation von NEP-GFP .....	58
3.4	Analyse der Phosphorylierung von NEP .....	59
3.4.1	[ <sup>32</sup> P]-Markierung von NEP in HEK293 Zellen ( <i>in vivo</i> Phosphorylierung)....	59
3.4.2	Identifizierung theoretischer Phosphorylierungsstelle von NEP .....	60
3.4.3	Bestimmung der Phosphorylierungsstelle von NEP .....	61
3.4.4	Identifizierung der NEP phosphorylierenden Kinase .....	62
3.4.5	Interaktion von CK2 mit der zytoplasmatischen Domäne von NEP .....	63
3.5	Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf das Migrationsverhalten im SDS- Polyacrylamidgel .....	65
3.6	Vergleich der Maturierung von NEP wt und NEP S6D .....	66
3.7	Untersuchung der Stabilität von NEP wt und NEP S6D .....	67
3.8	Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf seine subzelluläre Lokalisation.	68
3.9	CK2 abhängige Zelloberflächenaktivität von NEP in MEF Zellen.....	72
3.10	Effekt der Phosphorylierung von NEP auf die Interaktion mit Ezrin.....	74
3.11	Effekt der Phosphorylierung von NEP auf die Interaktion mit PTEN .....	77
3.12	Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf die Aktivierung von Akt.....	81
3.13	Untersuchung der simultanen Bindung von Ezrin und PTEN an die zytoplasmatische Domäne von NEP.....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>87</b>
4.1	Expression von NEP in verschiedenen Zelltypen und Geweben.....	88
4.2	Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle von NEP.....	89
4.3	Auswirkung der Phosphorylierung von NEP auf die Maturierung, Stabilität und subzelluläre Lokalisation .....	91
4.4	Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf den Abbau von A $\beta$ .....	93
4.5	Selektive Regulation der Ezrin und PTEN Bindung durch die Phosphorylierung von NEP .....	95
4.6	Mögliche Auswirkung der selektiven Inhibition der PTEN Bindung auf die Zelloberflächenlokalisation von NEP.....	98

4.7	Mögliche Rolle der Phosphorylierung von NEP bei intrazellulären Signalwegen und der Alzheimerschen Erkrankung.....	100
4.8	Ausblick .....	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologische und pathologische Bedeutung von Neprilysin

Das Typ 2 Membranprotein Neprilysin (NEP) wird an der Zelloberfläche von verschiedenen Zelltypen exprimiert und wurde ursprünglich als *Cluster of Differentiation 10* und als tumorassoziiertes Antigen *common acute lymphoblastic leukemia antigen* (CD10, CALLA) beschrieben (1). Daneben wird NEP unter anderem als Marker leukophiler Vorläuferzellen und neutrophiler Granulozyten verwendet (2, 3).

1988 durchgeführte cDNS Sequenzvergleiche zeigten, dass es sich bei CD10/CALLA und der 1980 entdeckten Neutrale Endopeptidase 24.11 (Neprilysin / Enkephalinase) um dasselbe Protein handelt (4, 5).

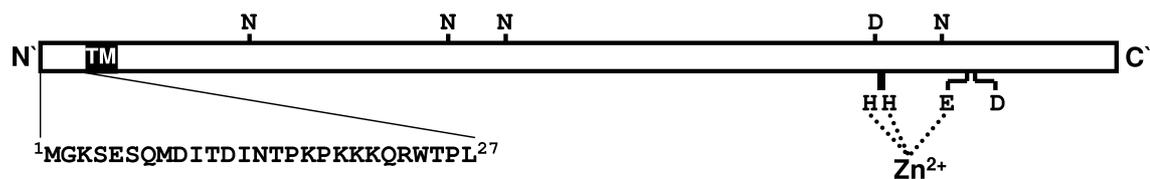
Dabei kodiert die NEP cDNS für ein 90-110 kDa großes Glykoprotein aus der Familie der M13 Zink-Metalloendopeptidasen mit einer etwa 700 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne, die das typische HEXXH Zink Bindemotiv beinhaltet, welches für die Proteolyse der NEP Substrate essenziell ist (6, 7) (Abb. 1.1). Durch Strukturanalysen der extrazellulären NEP Domäne konnte nachgewiesen werden, dass nur kurze Oligopeptide unter 5 kDa in das aktive Zentrum gelangen können um dort endoproteolytisch gespalten zu werden (8). Auf Grund der darüber hinaus eher unspezifischen Peptidaseaktivität spielt Neprilysin eine wichtige Rolle bei der Degradation einer Vielzahl regulatorischer Signalpeptide des Nerven-, Herz-Kreislauf- und Immunsystems (6, 7, 9).

NEP wird vor allem in den Nieren exprimiert, wo es etwa vier Prozent der Membranproteine im Bürstensaum ausmacht und für den Abbau des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) verantwortlich ist (10). Neben den Nieren ist NEP in wesentlich geringeren Mengen in zahlreichen anderen Organen und Geweben, wie z.B. in verschiedenen Schichten der Blutgefäße, der Lunge und dem Gehirn exprimiert (10-14). Im Gehirn ist NEP unter anderem für die Hydrolyse der Neuropeptide Substanz P und Enkephalinen essenziell (6, 15, 16).

In Bezug auf die intrazelluläre Domäne von NEP wurden in letzter Zeit mehrere zytosolische Proteine identifiziert, die diese Domäne als plasmamembranständigen Interaktionspartner nutzen (17-19). Wie im späteren Verlauf dieser Arbeit näher erläutert, handelt es sich dabei um zytosolische Proteine, die entweder wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion oder der Formation des Aktinzytoskeletts erfüllen.

Auf Grund neuerer Befunde, die auf eine bedeutende Rolle von NEP sowohl bei der Alzheimerschen Erkrankung, als auch bei der Krebsentstehung hinweisen, rückt NEP

zunehmend in den Fokus zahlreicher Forschungsgruppen. Dabei konzentriert sich die die Alzheimersche Erkrankung betreffende NEP Forschung bislang vornehmlich auf die Peptidaseaktivität der extrazellulären Domäne, die in der Lage ist das Alzheimer assoziierte Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) Peptid abzubauen (20-28). Im Gegensatz dazu liegt der Fokus der Krebsforschung vor allem auf der Funktion der zytosolischen Domäne, die über Interaktionspartner Einfluss auf die Zellmigration und die Akt vermittelte Signaltransduktion nimmt (17, 19, 29-31). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Inhibition Akt vermittelter Signalwege, wie zum Beispiel des Insulin Signalweges in Verbindung mit der Alzheimerschen Erkrankung stehen (32). Somit könnte neben der extrazellulären Peptidasedomäne auch die zytoplasmatische Domäne von NEP die Entstehung bzw. den Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung entscheidend beeinflussen. Im Folgenden sollen hier zunächst die molekularen Grundlagen der Alzheimerschen Erkrankung und der mögliche Einfluss von NEP auf die Pathogenese beschrieben werden.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Neprilysin**

Neprilysin ist ein Typ 2 Membranprotein mit einer 28 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Domäne, die mit verschiedenen zytosolischen Proteinen interagiert (siehe Text). Auf die Transmembrandomäne (TM) folgt die 698 Aminosäuren lange extrazelluläre Peptidasedomäne, mit dem aktiven Zentrum, welches die Zink bindenden Aminosäurereste (H, H, E) und die katalytisch aktiven Asparaginsäurereste (D; D) beinhaltet. Die extrazelluläre Domäne wird an vier verschiedenen Stellen N-glykosyliert (N) (33, 34).

## 1.2 Die Alzheimersche Erkrankung

Die Alzheimersche Erkrankung ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung die zum Verlust kognitiver Fähigkeiten führt. Dabei ist die Krankheit zu Beginn durch Ausfälle bezüglich des Erinnerungsvermögens, der Sprache und der Problemlösung charakterisiert. Im späteren Verlauf der Krankheit werden auch psychotische Symptome wie etwa Halluzinationen und Wahnvorstellungen beschrieben (35). Bei etwa 3/4 der altersbedingten Demenzen handelt es sich um die Alzheimersche Erkrankung (36).

Die demographische Entwicklung der westlichen Industrieländer, in denen eine schwache Geburtenrate einer steigenden Lebenserwartung gegenübersteht, wird dazu führen, dass der prozentuale Anteil der Alzheimerpatienten mittel- bis langfristig stark ansteigen wird. Neuere Berechnungen gehen davon aus, dass bis 2050 etwas über ein Prozent der Weltbevölkerung von der Alzheimerschen Krankheit betroffen sein werden (37).

Auch wenn eine Vielzahl von molekularen Mechanismen bekannt sind, die bei der Krankheitsentstehung beteiligt sind, ist noch unklar, welcher dieser Mechanismen der auslösende und / oder krankheitsbestimmende ist und ob nicht eventuell noch unbekannte Prozesse und Faktoren entscheidend sein könnten.

### ***1.2.1 Neuropathologische Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung***

Die oben beschriebenen Symptome der Alzheimerschen Erkrankung gehen auf Veränderungen und funktionelle Störungen von Neuronen vor allem im Neokortex und in der Hippokampusformation zurück.

Neuropathologische Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung sind vor allem die schon 1907 von Alois Alzheimer beschriebenen extrazellulären amyloiden Ablagerungen und die neurofibrillären Bündel im Gehirn betroffener Patienten (38). Noch heutzutage lassen diese beiden Merkmale *post mortem* erst eine abschließende und verlässliche Diagnose zu (39). Die intrazellulären neurofibrillären Bündel bestehen überwiegend aus dem hyperphosphorylierten Tau Protein, welches unter physiologischen Bedingungen im Zytosol mit axonalen Mikrotubuli assoziiert ist und deren Bildung und Stabilisierung dient (40, 41). Über die Phosphorylierung des Tau Proteins kann dessen Assoziation mit Mikrotubuli reguliert werden (42). Wichtige Kinasen, die direkt an der Tau Phosphorylierung beteiligt sind, sind unter anderem die zunächst als Tau Kinase 1 bezeichnete Glykogen Synthase Kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), die *Cyclin dependent kinase 5* (Cdk5) und die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) (43, 44). *In vitro* führt die Hyperphosphorylierung des Tau Proteins zur Bildung der so genannten gepaarten helikalen Filamente aus Tau und deren Aggregation (45). Die im Laufe der Alzheimerschen Erkrankung verstärkte Bildung von Tau Aggregaten führt letztendlich zum Absterben der betroffenen Neurone (44, 46, 47), sodass im Folgenden die zunächst intrazellulär gebildeten Tau Aggregate auch extrazellulär gefunden werden (48) (Abb. 1.2). Auch wenn Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität der für die Tau Dephosphorylierung zuständigen Protein Phosphatase 2A im Gehirn von Alzheimerpatienten reduziert ist (43, 49, 50), ist bis heute unklar, ob die Hyperphosphorylierung des Tau Proteins auf eine verringerte Dephosphorylierung durch Phosphatasen, auf eine verstärkte Phosphorylierung durch Kinasen oder auf eine Kombination beider Faktoren zurückzuführen ist (51).

Bei den extrazellulär gebildeten amyloiden Plaques handelt es sich überwiegend um globuläre Strukturen, die im Mittel etwa 50  $\mu\text{m}$  groß sind und zumeist von aktivierten Mikroglia, Astrozyten sowie von dystrophen Axonen und Dendriten umgeben sind (Abb.

1.2). Je nach Struktur der Plaques unterscheidet man verschiedene Subtypen. So handelt es sich zum Beispiel bei den so genannten diffusen Plaques um weniger kompakte Aggregate, die auch im Gehirn von gesunden älteren Menschen gefunden werden (52).

Wesentliche Komponenten der amyloiden Plaques sind das 40 Aminosäuren lange A $\beta$ 40 und das 42 Aminosäuren lange A $\beta$ 42. Des Weiteren sind Proteine der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts, aber auch Lipide und das Apolipoprotein E Bestandteile der amyloiden Plaques.

Auch wenn bisher unklar ist, wie die beiden oben genannten Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung miteinander in Verbindung stehen, so gibt es doch Hinweise, dass A $\beta$  bzw. A $\beta$  Multimere unter anderem durch Beeinflussung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden die Aktivität von Tau phosphorylierenden Kinasen verändert und somit dessen Aggregationsverhalten in der Zelle beeinflussen könnte (53-56).

Im Gegensatz zu der Alzheimerschen Erkrankung ist die Aggregation des Tau Proteins bei einer Reihe weitere Demenzen der initiale und ausschlaggebende Faktor. Zu dieser Gruppe der Tauopathien gehört unter anderem die Frontotemporale Demenz (57).

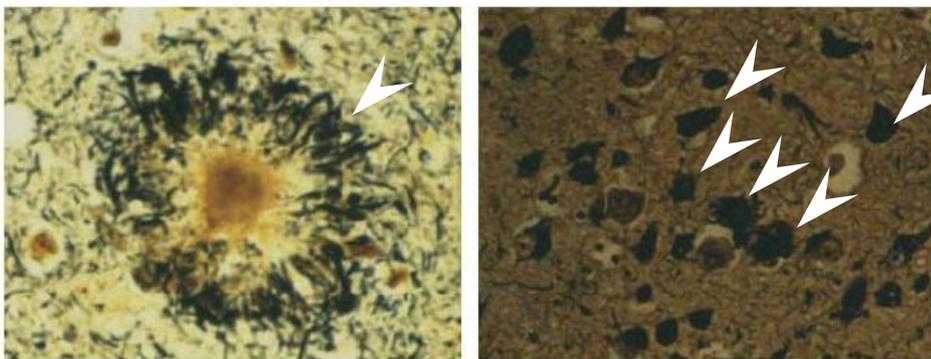
### ***1.2.2 Das Amyloid Vorläuferprotein und dessen proteolytische Prozessierung***

A $\beta$  entsteht durch posttranslationale Prozessierung aus dem Amyloid Vorläuferprotein (APP). Bei APP handelt es sich um ein Typ 1 Membranprotein, das in verschiedenen Geweben exprimiert wird. APP Homologe gibt es in allen Säugetieren, sowie in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* (58-62). Durch alternatives Spleißen der APP mRNA entstehen APP Isoformen, die sich in der Größe der extrazellulären Domäne unterscheiden und 395-770 Aminosäuren lang sind. Die im zentralen Nervensystem am häufigsten vorkommenden Isoformen sind APP695, APP751 und APP770 (63). APP besteht aus einer 47 Aminosäuren langen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer 24 Aminosäuren langen Transmembrandomäne und einer je nach Spleißvariante unterschiedlich langen extrazellulären N-terminalen Domäne, die sowohl N- als auch O- glykosyliert wird. Die extrazelluläre Domäne weist Bindestellen für Heparin, Zink und Kupfer auf und ist in der Lage, mittels der so genannten E1 Domäne Homodimere und Heterodimere mit den Proteinen APLP1 und APLP2 (Amyloid Precursor Like Protein) zu bilden (64). Diese Homo- und Heterodimere können gegenüberliegend auf zwei verschiedenen Zellen gebildet werden und somit der Zell-Zell Interaktion dienen. Daneben können auch auf einer Zelle befindliche APP und APLPs Dimere bilden, wobei

hier sowohl die E1 Domänen, als auch die Transmembrandomänen zur Interaktion beitragen (64).

Mäuse, die für eines der drei Proteine APP, APLP1 oder APLP2 defizient sind, sind lebensfähig und zeigen nur einen sehr milden Phänotyp (65-67). Dahingegen ist die kombinierte Defizienz für APP/APLP2 und APLP1/APLP2 früh postnatal letal. Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass die Proteine der APP Familie zwar physiologisch essenziell, aber auch untereinander zumindest teilweise redundant sind (66, 67).

Die A $\beta$  Domäne innerhalb des APP Proteins ist weder in APLP1, noch in APLP2 konserviert. Da APP jedoch funktional durch die APLP Proteine ersetzt werden kann, ist eine physiologisch wichtige Rolle für A $\beta$  eher unwahrscheinlich.



**Abbildung 1.2: Histopathologische Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung**

Abbildung links: Extrazellulärer amyloider Plaque (Pfeil) im Kortex eines Alzheimer-Patienten. Abbildung rechts: Aggregationen des hyperphosphorylierten Tau Proteins (Pfeile). Nach Kennedy *et al.* 2003 (68).

Um A $\beta$  aus dem Amyloid Vorläuferprotein freizusetzen, muss APP im Lumen zellulärer Organellen (Endoplasmatisches Retikulum [ER], Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen) bzw. an der Zelloberfläche nacheinander von zwei verschiedenen Sekretasen geschnitten werden. Zunächst schneidet die  $\beta$ -Sekretase APP vornehmlich in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten der Zelle vor Asp1 der A $\beta$  Sequenz. Dabei entsteht zum einen ein lösliches N-terminales Fragment (APPs $\beta$ ; s = *soluble*;  $\beta$  = durch die  $\beta$ -Sekretase generiert). Zum anderen verbleibt ein 99 Aminosäure langes C-terminales Fragment (APP CTF $\beta$ ; APP C-terminales Fragment) in der Membran, welches anschließend als Substrat der  $\gamma$ -Sekretase dient (Abb. 1.3).

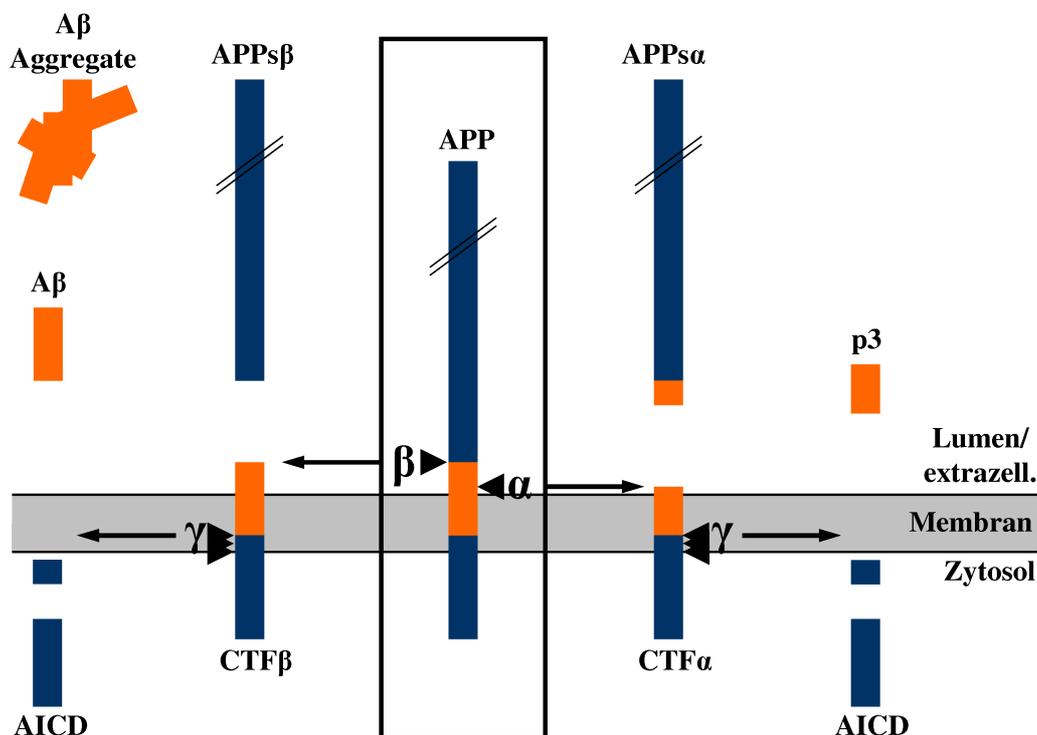
Bei der  $\gamma$ -Sekretase handelt es sich um einen multimeren Proteinkomplex, der APP-CTF $\beta$  an verschiedenen Stellen innerhalb der Transmembrandomäne schneidet und somit verschiedene A $\beta$  Spezies aus der Membran entlässt. Neben A $\beta$ 37, A $\beta$ 38 und A $\beta$ 39 werden am weitaus häufigsten A $\beta$ 40 (~90%) und A $\beta$ 42 (~10%) generiert und von der Membran freigesetzt (69-71). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass A $\beta$ 42 die mit Abstand stärkste

Tendenz zur Aggregation aufweist und somit zu der Bildung der amyloiden Plaques in besonderem Maße beiträgt (72, 73).

Durch den  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt wird die APP intrazelluläre Domäne AICD (APP *Intracellular Domain*) in das Zytosol entlassen (74) (Abb. 1.3).

Alternativ zu dem hier beschriebenen amyloidogenen Prozessierungsweg kann APP auch bei dem nicht-amyloidogenen Weg initial von der  $\alpha$ -Sekretase geschnitten werden. Diese schneidet APP innerhalb der A $\beta$  Sequenz, was zur Sekretion eines – im Vergleich zu APPs $\beta$  – um 16 Aminosäuren verlängerten APPs $\alpha$  Fragments führt. Das in diesem Fall in der Membran zurückbleibende 83 Aminosäuren lange CTF $\alpha$  kann in gleicher Weise, wie CTF $\beta$  von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden. Dies führt extrazellulär zur Freisetzung eines N-terminal verkürzten A $\beta$  Homologs p3, welches im Gegensatz zu A $\beta$  nicht zur Aggregation neigt. Wie bei dem amyloidogenen Weg, wird auch bei dem nicht-amyloidogenen Weg durch den  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt AICD in das Zytosol entlassen.

Da bei dem nicht-amyloidogenen Weg die  $\alpha$ -Sekretase APP innerhalb der A $\beta$  Sequenz schneidet, schließt dieser Weg eine A $\beta$  Generierung aus.



**Abbildung 1.3: Proteolytische Prozessierung von APP**

APP wird im amyloidogenen Weg durch die  $\beta$ -Sekretase ( $\beta$ ) geschnitten, was in der Generierung der APP Fragmente APPs $\beta$  und CTF $\beta$  resultiert. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase ( $\alpha$ ) geschnitten, was in der Generierung der APP Fragmente APPs $\alpha$  und CTF $\alpha$  resultiert. Die folgende Prozessierung der C-terminalen Fragmente (CTF $\alpha$  / CTF $\beta$ ) durch die  $\gamma$ -Sekretase ( $\gamma$ ) hat im nicht-amyloidogenen Weg die Freisetzung von p3 und im amyloidogenen Weg die Freisetzung von A $\beta$  zur Folge. In beiden Fällen wird AICD in das Zytosol freigesetzt. Nach Haass und Selkoe 1993 (75).

### **1.2.3 Struktur und Funktion der APP prozessierenden Proteasen**

#### **1.2.3.1 Die $\alpha$ -Sekretase**

In nicht-neuronalen Zellen wird APP vornehmlich durch die  $\alpha$ -Sekretase geschnitten. Dies geschieht zwischen Lys16 und Leu17 der A $\beta$  Sequenz innerhalb des APP Proteins. Die  $\alpha$ -Sekretase ist ein Typ 1 Membranprotein und gehört zu der Gruppe der ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) Zink-Metalloproteasen. Mehrere Mitglieder der ADAM Familie besitzen  $\alpha$ -Sekretase Aktivität. Dazu gehören ADAM10, ADAM17 (TNF $\alpha$  konvertierendes Enzym) und ADAM9. Da sowohl ADAM10, als auch ADAM17 defiziente Mäuse embryonal letal sind, konnte bisher nicht verlässlich geklärt werden, welches der ADAM Proteine maßgeblich für die APP Prozessierung verantwortlich ist (76). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression von ADAM10 in Mäusen zu einer verstärkten  $\alpha$ -Sekretase Prozessierung von APP und einer daraus resultierenden Verringerung der A $\beta$  Produktion führt (77).

Des Weiteren kann die Sekretion von APPs $\alpha$  durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) stimuliert werden und zu einer Verringerung der A $\beta$  Produktion beitragen (78).

Neben APP gibt es eine Reihe weiterer ADAM10 und ADAM17 Substrate wie z.B. TNF $\alpha$  und die Notch-Rezeptoren (79), wodurch die  $\alpha$ -Sekretase eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsprozessen übernimmt (80).

#### **1.2.3.2 Die $\beta$ -Sekretase**

Die Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase bildet die Voraussetzung, um aus APP A $\beta$  zu generieren. Die Aspartylprotease BACE1 (*Beta-Site APP Cleaving Enzyme*) wurde 1999 als  $\beta$ -Sekretase identifiziert (81-83). Dabei handelt es sich um ein Typ 1 Membranprotein, bei dem der extrazelluläre Teil des Proteins die Domäne mit den zwei katalytischen Aspartatresten trägt (81, 83). BACE1 wird als Proprotein synthetisiert, dessen Prodomäne während des sekretorischen Transports durch Furin oder eine Furin-ähnliche Protease abgeschnitten wird (84). Zudem wird BACE1 an vier verschiedenen Asparaginresten der katalytischen Domäne N-glykosyliert. Zielgerichtete Mutationen dieser Asparaginreste haben gezeigt, dass jeder einzelne dieser Zuckerreste für das Erreichen der maximalen BACE1 Aktivität notwendig ist (85-87).

Die nur etwa 20 Aminosäuren lange zyttoplasmatische Domäne reguliert den subzellulären Transport von BACE1, wobei insbesondere die Phosphorylierung von Serin 498 und das benachbarte Di-Leucin Motiv dabei eine wesentliche Rolle spielen (86-88).

Neben APP hat BACE1 noch eine Reihe weiterer Substrate. Dabei handelt es sich sowohl um Typ 1 Membranproteine, wie z. B. APLP1 und 2 sowie P-Selektin Glykoprotein Ligand-1, als auch um Typ 2 Membranproteine, wie z. B. Sialyltransferase ST6Gal-I (89-91).

Trotz der Vielzahl von Substraten scheint BACE1 keine vitale Bedeutung zu haben, da auch BACE1 defiziente Mäuse lebensfähig sind (92-94). Allerdings weisen BACE1 *knock out* Mäuse eine signifikant erhöhte postnatale Letalität und eine geringere Körpergröße im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (95). Im übrigen zeigen neuere Studien, dass BACE1 wahrscheinlich durch die Prozessierung von Neuregulin die axonale Myelinisierung unterstützt (96, 97).

Da BACE1 den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der A $\beta$  Generierung katalysiert und zudem in der adulten Maus keine essenzielle physiologische Rolle zu spielen scheint, ist dessen spezifische Inhibition ein hochinteressanter Ansatz zur Prävention und Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung (98).

Als BACE1 Homolog wurde BACE2 identifiziert, welches dieselbe Topologie aufweist und überwiegend in nicht-neuronalen Geweben exprimiert wird. BACE2 schneidet im Gegensatz zu BACE1 APP weniger effektiv an der  $\beta$ -Schnittstelle, sondern bevorzugt innerhalb der A $\beta$  Domäne eine  $\alpha$ -Sekretase-nahe Schnittstelle und verhindert so die A $\beta$  Produktion (99-101).

### ***1.2.3.3 Die $\gamma$ -Sekretase***

Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein multimerer transmembran-Proteinkomplex, der die intramembranöse Proteolyse von APP-CTF $\alpha$  und APP-CTF $\beta$  katalysiert und dabei p3 bzw. A $\beta$  freisetzt (75, 102).

Die bisher bekannten und für die  $\gamma$ -Sekretasefunktion essenziellen Komponenten dieses Proteinkomplexes sind Presenilin-1 bzw. alternativ dessen Homolog Presenilin-2 (103), Nicastrin (104), PEN-2 (105) und APH-1 (106).

Presenilin-1 bzw. 2 sind Membranproteine mit neun Transmembrandomänen, die die zwei katalytisch aktiven Aspartylreste der  $\gamma$ -Sekretase tragen (107). Zwischen der Transmembrandomäne 6 und 7 werden Preseniline – wahrscheinlich autokatalytisch – endoproteolytisch geschnitten, sodass ein N-terminales und ein C-terminales Fragment entstehen, die zu einem Heterodimer assoziieren, wobei jedes der beiden Presenilinfragmente einen der beiden katalytisch aktiven Aspartylreste trägt (108-110).

Das Typ 1 Membranprotein Nicastrin wurde als Bestandteil des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes identifiziert, der für die Substraterkennung zuständig ist. Dabei ist die Proteinsequenz des Substrats weniger entscheidend, als das Vorhandensein einer nur wenige Aminosäuren langen extrazellulären Domäne mit freiem N-Terminus. Dieser wird von Nicastrin erkannt und dem aktiven Zentrum des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes zugeführt (111, 112).

Bei PEN-2 (Presenilin *Enhancer*-2) und APH-1 (Anterior Pharynx *Defective*-1) handelt es sich um polytopische Membranproteine. Nach bisherigen Erkenntnissen unterstützt PEN-2 die endoproteolytische Spaltung von Presenilin, welche essenziell für die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität ist, wohingegen APH-1 die  $\gamma$ -Sekretase Assemblierung, Maturierung und den sekretorischen Transport unterstützt (113-115).

Untersuchungen haben gezeigt, dass nur der teilweise oder vollständig assemblierte  $\gamma$ -Sekretase-Komplex in den sekretorischen Weg eingespeist wird, wohingegen die einzelnen  $\gamma$ -Sekretase Komponenten im ER zurückgehalten werden (115, 116). Bisher ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, wie der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex assembliert und wie die einzelnen Komponenten miteinander interagieren.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die oben beschriebenen Komponenten – Presenilin, Nicastrin, PEN-2 und APH-1 – im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:1:1 im  $\gamma$ -Sekretase-Komplex vorliegen (117). Da die Molekülmasse der isolierten  $\gamma$ -Sekretase weit größer ist, als die Summe der einzelnen Komponenten, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Proteine mit unbekannter Funktion an dem Komplex beteiligt sind (118).

Neben APP CTFs hat die  $\gamma$ -Sekretase eine ganze Reihe weiterer Substrate, mit zum Teil wichtigen physiologischen Funktionen. Alle  $\gamma$ -Sekretase Substrate sind Typ 1 Membranproteine mit kurzer extrazellulärer N-terminaler Domäne. Substrate sind z. B. die C-terminalen Fragmente von APLP1 und 2 (119), von E- und N-Cadherin (120), des LRP-Rezeptors (121) und der Notch Rezeptoren 1-4 (122, 123).

Neben der proteolytischen Generierung signaltransduktionsrelevanter Moleküle, wie der Notch intrazellulären Domäne (NICD) (122, 123), kann Presenilin auch durch die direkte Interaktion mit GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin Einfluss auf den wnt Signalweg nehmen (124, 125). Zudem leistet die  $\gamma$ -Sekretase einen wichtigen Beitrag zur Cholesterinhomöostase, da Presenilin-1 defiziente Zellen eine Reduktion in der Endozytose des LDL-Rezeptors und veränderte Cholesterolmetabolitkonzentrationen aufweisen (126). Des Weiteren kann Presenilin unabhängig von der proteolytischen Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase als Ca<sup>2+</sup> Kanal in der ER Membran fungieren und über diese Funktion möglicherweise auch Einfluss auf apoptotische Prozesse in der Zelle nehmen (127, 128).

#### **1.2.4 Genetische Grundlagen der Alzheimerschen Erkrankung**

Über 90% der Alzheimerschen Erkrankungen beruhen auf der sporadischen Genese, die sich zumeist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres manifestiert. Neben dem Alter, das bei der Entstehung der Krankheit den entscheidenden Risikofaktor darstellt, hat auch der Lebenswandel einen Einfluss auf Entstehung und Progression. In dem Zusammenhang scheinen sich vor allem eine ausgewogene Ernährung und geistige Betätigung positiv auszuwirken (129).

Über die genetischen Hintergründe der sporadischen Alzheimerschen Erkrankung ist bislang wenig bekannt. Statistisch gesehen führt das Vorhandensein des  $\epsilon 4$  Allels des Apolipoprotein E Gens zu einem erhöhten Risiko nach dem 65. Lebensjahr zu erkranken (130-132). Das Apolipoprotein E ist im Gehirn der wichtigste Transporter von Cholesterin und wird dort vornehmlich durch Astrozyten und Mikroglia sezerniert und von Neuronen über Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen (133). Auf Grund welcher Mechanismen die  $\epsilon 4$  Isoform des Apolipoprotein E zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führt, ist nicht eindeutig geklärt. Allerdings deuten Untersuchungen sowohl auf eine Förderung der Aggregation von A $\beta$ , als auch auf eine verringerte Drainage von A $\beta$  aus dem Gehirn hin (132).

Bei etwa 5-10% der Alzheimerschen Erkrankungen handelt es sich um familiäre, vererbare Formen, bei denen bestimmte genetische Ursachen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer frühzeitigen und schnell fortschreitenden Erkrankung vor dem 65. Lebensjahr führen (134). Alle bisher bekannten Mutationen, die zu familiären Formen der Alzheimerschen Erkrankung führen, liegen innerhalb der DNS Sequenzen, die für APP, Presenilin-1 oder Presenilin-2 kodieren und haben meist entweder eine verstärkte Sekretion aller A $\beta$  Peptide oder eine Erhöhung des A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> Verhältnisses zur Folge (134-138). Daneben führen einige Mutationen in der A $\beta$  Domäne von APP zu verändertem Aggregationsverhalten und / oder Abbau von A $\beta$  (139). Vor allem Untersuchungen der genetischen und molekularbiologischen Grundlagen dieser familiären Formen haben zum Verständnis der Alzheimerschen Erkrankung beigetragen und unterstützen die Annahme, dass das A $\beta$  Peptid die entscheidende und initiale Rolle bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung spielt. Darüber hinaus sind bisher auch keine Tau Mutationen bekannt, die zu familiären Formen der Alzheimerschen Erkrankung führen.

### 1.2.5 Beseitigung von A $\beta$ aus dem Gehirn

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen familiären Formen der Alzheimerschen Erkrankung, bei denen sehr wahrscheinlich eine verstärkte oder veränderte Produktion von A $\beta$  zur Pathogenese beitragen, ist dies bei den sporadischen Formen bisher noch völlig unklar. Gründe für die sporadische Genese könnten eine erhöhte bzw. veränderte A $\beta$  Produktion oder ein verringerter bzw. veränderter Abbau des A $\beta$  Peptides sein.

Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Kombination aus erhöhter Produktion und verringertem Abbau des A $\beta$  Proteins zur Entstehung der Krankheit führt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass mit steigendem Alter die BACE1 Aktivität, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der A $\beta$  Produktion darstellt, zunimmt (140-142), wohingegen die Menge bzw. die Aktivität einer ganzen Reihe von A $\beta$  degradierenden Peptidasen im Gehirn mit dem Alter abnimmt (24) (siehe unten).

Prinzipiell kann A $\beta$  auf verschiedenen Wegen aus dem Gehirn entfernt werden. Eine Möglichkeit ist das Ausschleusen von A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke. Dabei kann A $\beta$  z.B. an Apolipoprotein E, LRP-1 (*Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1*) oder RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) binden und über Rezeptor vermittelten Transport durch die Gefäßwände in den Blutkreislauf gebracht werden (143-146). Zudem kann A $\beta$  mit Hilfe des P-Glykoprotein (ABCB1) aktiv über die Plasmamembran aus dem Gehirn geschleust werden (147, 148).

Des Weiteren sind cerebrale Mikroglia in der Lage A $\beta$  Aggregate aufzunehmen und diese in späten Endosomen und Lysosomen durch saure Hydrolasen abzubauen. Allerdings wurde gezeigt, dass A $\beta$ 42 Aggregate, die von kultivierten Mikroglia aufgenommen wurden, in den Lysosomen nur sehr langsam abgebaut werden und eventuell zu intrazellulären Aggregaten führen können (149).

Neben den oben beschriebenen Wegen, A $\beta$  Monomere oder aggregiertes A $\beta$  aus dem Gehirn zu schleusen, kann A $\beta$  auch im Gehirn von verschiedenen Proteasen enzymatisch abgebaut und somit unschädlich gemacht werden (27).

Durch Inhibition der A $\beta$  Produktion im Gehirn von drei Monate alten APP transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass A $\beta$  in der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns eine Halbwertszeit von etwa zwei Stunden hat und durch extrazelluläre Proteolyse und Endozytose entfernt wird (150, 151).

Der proteolytische Abbau von A $\beta$  kann durch verschiedene Proteasen bzw. Peptidasen geschehen, die im Gehirn exprimiert werden und neben ihren physiologischen Substraten auch A $\beta$  hydrolysieren können.

Zwar wird auch über das Auftreten von zytosolischem A $\beta$  berichtet, doch ist der überwiegende Teil des sezernierten A $\beta$  extrazellulär / luminal zu finden (56, 152, 153). Somit ist eine wichtige Voraussetzung für die proteolytische Spaltung von A $\beta$ , dass die abbauenden Enzyme und A $\beta$  in den gleichen Zellkompartimenten bzw. extrazellulär auftreten. Dies ist bei allen im Folgenden beschriebenen Proteasen und Peptidasen der Fall.

**Tabelle 1.1:** A $\beta$ -abbauende Zink-Metalloproteasen/peptidasen. Nach Wang *et al.* 2006 (24).

Protease	Lokalisation	Substrate neben A $\beta$
Nepriylisin (NEP)	Zelluläre Membranen	u.a. Enkephaline, Substanz P, Bombesin
Insulin degradierendes Enzym (IDE)	Zytosol, zelluläre Membranen, extrazellulärer Raum	u.a. Insulin, Glukagon, APP-intrazelluläre Domäne (AICD)
Angiotensin konvertierendes Enzym (ACE)	Plasmamembran	u.a. Angiotensin-1, Enkephaline, Bradykinin
Endothelin konvertierendes Enzym (ECE)	Trans-Golgi Netzwerk, Zelloberfläche	u.a. Endothelin, Substanz P, Bradykinin



**Abbildung 1.4:** Aminosäuresequenz von humanem A $\beta$  mit den Schnittstellen verschiedener Proteasen/Peptidasen. Nach Wang *et al.* 2006 (24).

### 1.2.6 Funktion und Eigenschaften von A $\beta$ -abbauenden Proteasen und Peptidasen

Die größte Gruppe der A $\beta$ -abbauenden Enzyme stellen die Zink-Metalloproteasen dar, die in der Tabelle 1.1 aufgeführt sind. Daneben wurden für die Serinprotease Plasmin und die Aspartylprotease BACE A $\beta$ -abbauende Aktivität nachgewiesen (24, 154). Die Schnittstellen, an denen die im Folgenden beschriebenen Proteasen bzw. Peptidasen A $\beta$  proteolytisch spalten können, sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

### **1.2.6.1 Plasmin**

Plasmin wird unter anderem im Gehirn exprimiert und ist für die Degradation verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten zuständig (155, 156). Es wird als inaktives Plasminogen synthetisiert und durch den Gewebeplasminogenaktivator (tPA) oder den Urokinaseplasminaktivator (uPA) in aktives Plasmin umgewandelt (24). tPA kann durch A $\beta$  Aggregate aktiviert werden und somit vermehrt aktives Plasmin bilden, welches im Folgenden A $\beta$  abbauen könnte (157). Ob Plasmin tatsächlich *in vivo* am A $\beta$  Abbau beteiligt ist, ist jedoch nicht vollständig geklärt. So haben Untersuchungen gezeigt, dass Plasminogen defiziente Mäuse keine erhöhten A $\beta$  Konzentrationen aufweisen und somit Plasmin – zumindest unter nicht-pathologischen Bedingungen – keinen Einfluss auf die A $\beta$  Menge im Gehirn hat (158). Des Weiteren konnte bisher kein enger Zusammenhang zwischen Polymorphismen im Promotor des Plasminogen Aktivator Inhibitors-1 (PAI-1) und dem Risiko an der Alzheimerschen Demenz zu erkranken nachgewiesen werden (159).

### **1.2.6.2 A $\beta$ -abbauende Zink-Metalloproteasen/peptidasen**

Das Typ 2 Membranprotein ECE-1 (Endothelin *Converting Enzyme*-1) weist große Ähnlichkeit zu der einleitend beschriebenen Peptidase NEP auf und ist in Bezug auf die Aminosäuresequenz zu 38% homolog zu NEP (24).

ECE-1 konvertiert Pro-Endothelin in das aktive Endothelin und wird im Gehirn und fast allen anderen Geweben exprimiert (160). Von ECE-1 existieren vier verschiedene Isoformen, die mit a-d bezeichnet werden und sich vor allem in der zytosolischen Aminosäuresequenz unterscheiden. Während ECE-1 a, c und d vor allem an der Plasmamembran zu finden sind, ist ECE-1b im Golgi-Apparat lokalisiert (161, 162). Hieran wird deutlich, dass die kurze zytosolische Domäne von ECE-1 Einfluss auf die Lokalisation bzw. den Transport innerhalb des sekretorischen Transportweges hat.

Obwohl NEP und ECE-1 sich in Struktur und Funktionsweise ähneln, ist die ECE-1 Aktivität im Gegensatz zu der von NEP hoch sensibel gegenüber pH Schwankungen (163). Darüber hinaus wird ECE-1 erst bei etwa 1000-fach höheren Konzentrationen des Metalloprotease Inhibitors Phosphoramidon gehemmt und ist unempfindlich gegenüber dem NEP Inhibitor Thiorphan (164).

ECE-1 kann A $\beta$  an drei nahe beieinander gelegenen Stellen schneiden, was zu den A $\beta$  Fragmenten 1-16, 1-17, 1-19 und 20-40 führt. Die Inhibition von ECE-1 führt zu einer Verdopplung der A $\beta$  Sekretion in H4 Zellen, die auf die verminderte A $\beta$  Degradation durch ECE-1 im sekretorischen Weg zurückzuführen ist (165).

Die Tatsache, dass Mäuse, die für ECE-1 und das eng verwandte ECE-2 defizient sind, signifikant erhöhte A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 Konzentrationen aufweisen, deutet auf einen wichtigen Beitrag der beiden Proteasen zur Degradation von A $\beta$  hin (166). Die Frage, welche Rolle ECE-1 und ECE-2 letztendlich bei der Entstehung der humanen Form der Alzheimerschen Erkrankung spielen, ist jedoch noch offen.

Bei der Zink-Metalloprotease ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) handelt es sich um ein Typ 1 Membranprotein mit zwei katalytischen Untereinheiten, die C- bzw. N-terminal innerhalb der extrazellulären Domäne liegen (167). ACE wird in fast allen Geweben exprimiert (168), wobei es vornehmlich für die Konversion von Angiotensin 1 zu Angiotensin 2 zuständig ist und dadurch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks spielt (169).

Obwohl genetische Studien einen Zusammenhang von ACE und der Alzheimerschen Krankheit nahelegen und ACE *in vitro* A $\beta$  zwischen Asp7 und Ser8 schneiden kann, ist bisher noch unklar, ob ACE auch *in vivo* einen Beitrag zum A $\beta$  Abbau liefert, da hierzu gegensätzliche Ergebnisse veröffentlicht wurden (170, 171).

Im Gegensatz zu NEP und dem im Folgenden beschriebenen Insulin degradierenden Enzym (IDE), deren Aktivität bzw. Expression im Gehirn von Alzheimer-Patienten erniedrigt ist, wurde eine Erhöhung der ACE Proteinmenge und ACE Aktivität im Gehirn von Alzheimer-Patienten festgestellt, die eventuell durch die A $\beta$  Konzentration positiv reguliert wird (172).

Obwohl es sich bei IDE um ein lösliches, zytosolisches Protein handelt und wie oben erwähnt topologisch deshalb nicht mit A $\beta$  in Kontakt kommen sollte, wird IDE auch über bisher unbekannte Wege über zelluläre Membranen transportiert (173). Somit wird IDE sowohl in Peroxisomen und Mitochondrien als auch an der Plasmamembran und als sezerniertes Protein vorgefunden, wo es in der Lage ist, unter neutralen (pH) Bedingungen A $\beta$  abzubauen (174-178).

IDE kann neben A $\beta$  auch AICD abbauen und ist darüber hinaus für die Hydrolyse physiologisch wichtiger Substrate wie Insulin, Glucagon,  $\beta$ -Endorphin und Amylin zuständig (179, 180). In Zellkulturmodellen konnte durch Überexpression von IDE gezeigt werden, dass IDE sowohl endogenes, als auch synthetisches A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 abbauen kann (175, 181, 182). Übereinstimmende Ergebnisse konnten mit transgenen Mäusen erzielt werden. Während die Überexpression von IDE in einer signifikanten A $\beta$  Reduktion resultiert, führt die IDE Defizienz zu erhöhten A $\beta$  Konzentrationen (183, 184). Zudem wurden im Hippocampus von Alzheimer-Patienten verringerte IDE mRNA

Konzentrationen vorgefunden, was mit der Entstehung der Krankheit in Verbindung stehen könnte (185).

Neben IDE und ECE gehört NEP nach heutigem Stand zu den wichtigsten A $\beta$  degradierenden Enzymen (26).

NEP wird in Neuronen an prä- und postsynaptischen Membranen exprimiert, wo es als bisher einzig bekanntes A $\beta$ -abbauendes Enzym neben A $\beta$  Monomeren auch Di-, Tri- und Tetramere abbaut (10, 186-190).

Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass NEP A $\beta$  *in vitro* an verschiedenen Stellen N-terminal von hydrophoben Aminosäuren hydrolysieren kann (191). Im Folgenden konnte Iwata *et al.* nachweisen, dass NEP das geschwindigkeitsbestimmende Enzym beim A $\beta$  Abbau *in vivo* ist, da die Infusion des spezifischen NEP Inhibitors Thiorphan in den Hippocampus von Ratten über einen längeren Zeitraum zu einer deutlichen Erhöhung der A $\beta$  Konzentration führte (21, 192). Mit Hilfe von radioaktiv markiertem A $\beta$ 42, das in den Hippocampus von Mäusen injiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass in NEP defizienten Mäusen der Abbau von A $\beta$ 42 deutlich reduziert ist. Zudem waren die endogenen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 Konzentrationen vor allem im Hippocampus, aber auch im Cortex, Thalamus und Cerebellum von NEP defizienten Mäusen signifikant erhöht (21). Dabei ist interessant, dass dies die Hirnregionen sind, die bei der Alzheimerschen Krankheit besonders betroffen sind (193, 194). Da sowohl die endogene, als auch die exogene A $\beta$  Konzentration direkt mit der NEP Gen dosis korreliert, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch eine geringe Reduktion der NEP Aktivität zu einer erhöhten A $\beta$  Akkumulation führen kann (21). In Übereinstimmung mit diesen Daten, führt die Überexpression von NEP in APP transgenen Mäusen zu einer Verlangsamung der Entstehung oder sogar zu einer Reduktion amyloider Plaques (22, 23, 183, 195). Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch das Einschleusen von Fibroblasten, die eine lösliche Form von NEP sezernieren, in das Gehirn von APP transgenen Mäusen erzielt (25).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl die NEP mRNA Menge, als auch die NEP Expression und Aktivität in bestimmten Hirnregionen von APP transgenen Mäusen mit dem Alter abnimmt (196-198) und dass die NEP mRNA und NEP Proteinmenge im Gehirn von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Gesunden herabgesetzt ist. Diese Reduktion wurde ausschließlich in Hirnregionen beobachtet, die bei der Alzheimerschen Erkrankung besonders betroffen sind (193, 196, 199, 200). Ein weiterer Punkt, der die Relevanz des A $\beta$  Abbaus durch NEP bei der Krankheitsentstehung deutlich macht, ist die Tatsache, dass die A $\beta$  A21G Mutation (*Flemish Mutation*), die keine Unterschiede beim

Abbau durch IDE und Plasmin aufweist, jedoch signifikant langsamer durch NEP abgebaut wird, zu einer familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung führt (139). Weitere bekannte A $\beta$  Mutationen wie E22G (*Arctic*), E22K (*Italian*), E22Q (*Dutch*) und D23N (*Iowa*) dagegen führen auf Grund ihrer veränderten Aggregationseigenschaften zu einem verschlechterten A $\beta$  Abbau durch die entsprechenden Proteasen bzw. Peptidasen (139). NEP kann A $\beta$  sowohl im Lumen von ER und Golgi-Apparat, als auch an der Zelloberfläche abbauen (201), dabei ist bisher unklar, wie der subzelluläre Transport von NEP reguliert wird. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Inhibition der N-Glykosylierung sowohl die Aktivität von NEP, als auch den Transport an die Zelloberfläche negativ beeinflusst (9). 2005 wurde festgestellt, dass die NEP Aktivität an der Zelloberfläche von primären Neuronen mit der Somatostatinkonzentration korreliert (202). Da die Somatostatinkonzentration mit dem Alter abnimmt, könnte sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung spielen (202). Dabei ist die Aktivierung G $_i$ -Protein gekoppelter Somatostatin Rezeptoren für die verstärkte Zelloberflächenlokalisation von NEP essenziell (202). Allerdings ist der darauf folgende intrazelluläre Signalweg, der letztendlich zu einer Veränderung der NEP Lokalisation führt, noch nicht geklärt. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen geringerer Östrogenproduktion und erhöhtem Risiko an Alzheimer zu erkranken gefunden (203). Dies ist eventuell auf die verringerte NEP Aktivität zurückzuführen, wie sie sowohl bei Ratten, als auch bei Menschen mit Östrogenmangel beobachtet wurde (203-206). Ein signifikanter Anstieg der NEP Aktivität bei gleichzeitiger Reduktion der A $\beta$  Menge wurde dagegen in APP transgenen Mäusen nachgewiesen, die in einer abwechslungsreichen Umgebung gehalten wurden (207).

### 1.3 Zytoplasmatische Interaktionspartner von Neprilysin und deren Funktion

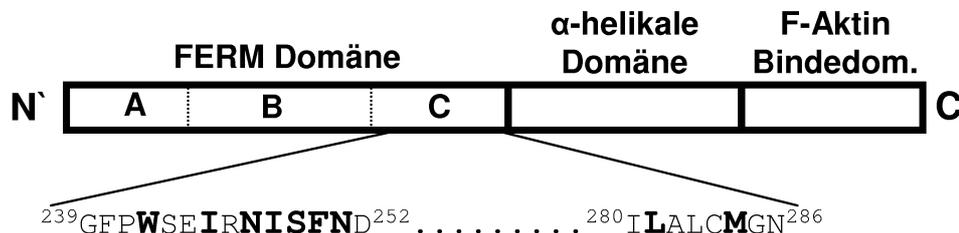
Einige der oben genannten A $\beta$ -abbauenden Proteasen und Peptidasen greifen durch den Abbau ihrer physiologischen Substrate direkt in die Signalweiterleitung ein, indem sie die lokale Konzentration ihrer Substrate und damit die Verfügbarkeit für die jeweiligen Rezeptoren reduzieren.

NEP baut unter anderem die Signalpeptide Bombesin, Endothelin-1 und Neurotensin ab, die an entsprechende G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden und das Zellwachstum unterstützen (208). Neben dieser, auf der katalytischen Aktivität von NEP basierenden Eigenschaft auf Signalwege der Zelle einzuwirken, kann NEP durch die Interaktion der N-

terminalen Domäne mit verschiedenen zytosolischen Proteinen auch katalyseunabhängig Einfluss auf die Signaltransduktion und andere Zellfunktionen nehmen.

Zytosolische Interaktionspartner von NEP sind unter anderem die in ihrem Aufbau und Funktion sehr ähnlichen Strukturproteine Ezrin, Radixin und Moesin (ERM). Diese sind etwa 600 Aminosäuren lang und bestehen aus drei Hauptdomänen: Die unter den ERM Proteinen hochhomologe N-terminale FERM (4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin) Domäne, die für die Interaktion mit den verschiedenen Transmembranproteinen wie z.B. NEP und CD44 zuständig ist, eine zentrale alpha-helikale Domäne und eine C-terminale, filamentäres (F)-Aktin bindende Domäne (Abb. 1.5).

In nicht-phosphoryliertem Zustand interagiert die FERM Domäne mit der F-Aktin bindenden Domäne intramolekular, wodurch sowohl die Bindung an F-Aktin, als auch die Bindung an membranständige Proteine verhindert wird. Durch Phosphorylierung eines bestimmten Tyrosinrestes innerhalb der C-terminalen Domäne (T567 bei Ezrin; T564 bei Radixin; T558 bei Moesin) durch die Rho Kinase oder PKC $\theta$ , wird die intramolekulare Interaktion aufgehoben und die ERM Proteine somit in eine bindungsfähige Konformation überführt (209-211).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Ezrin, Radixin, Moesin (ERM)**

Die ERM Proteine bestehen aus drei Domänen. N-terminal befindet sich die unter den ERM Proteinen hoch homologe FERM Domäne, die aus drei Subdomänen (A,B,C) besteht, wobei die Subdomäne C sowohl das NEP, als auch das CD44, CD43 und ICAM Bindemotiv trägt. Darauf folgend befindet sich eine  $\alpha$ -helikale Domäne und eine F-Aktin bindende C-terminale Domäne, die mit der FERM Domäne intramolekular interagieren kann. Unten: Aminosäuresequenz der Subdomäne C mit den NEP bindenden Aminosäuren (**fett**). Nach Terawaki *et al.* 2007 (210).

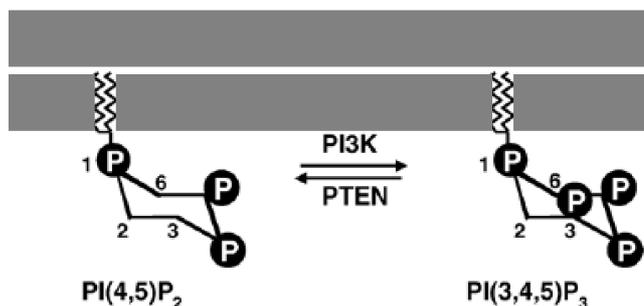
Frühere Untersuchungen haben auf eine Interaktion der ERM Proteine mit den basischen Aminosäureresten <sup>19</sup>KKK<sup>21</sup> der NEP N-terminalen Domäne hingewiesen (17). Allerdings zeigen neuere Strukturanalysen, dass sehr wahrscheinlich die Aminosäurereste <sup>8</sup>MDITDIN<sup>14</sup> der zytosolischen Domäne von NEP verantwortlich für die Interaktion mit den ERM Proteinen ist (210).

Die ERM abhängige zytosolische Verknüpfung von CD44 mit dem Aktinzytoskelett ermöglicht CD44 die extrazelluläre Interaktion mit Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und

Hyaluronsäure und führt zu einer verstärkten Zellmigration und Invasivität (212, 213). Durch direkte Konkurrenz von NEP und CD44 um die ERM Bindung, inhibiert NEP die CD44 – ERM abhängige Zellmigration und Invasivität (17).

Als letzter bisher bekannter zytosolischer NEP Bindepartner wurde 2004 der Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) beschrieben (19). PTEN ist neben p53 einer der am besten untersuchten Tumorsuppressoren und liegt in einer Vielzahl verschiedener Tumore mutiert vor (214-216).

Bei PTEN handelt es sich um eine Phosphatase, die sowohl Phospholipide, als auch Phosphoproteine dephosphorylieren kann. Verschiedene Bereiche des Proteins ermöglichen eine Interaktion mit Lipiden zellulärer Membranen, wodurch die Katalysegeschwindigkeit für Phospholipidsubstrate deutlich erhöht wird (217, 218). Eine äußerst wichtige Funktion kommt PTEN als Gegenspieler der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) zu. PI3K wird durch bestimmte Zelloberflächenrezeptoren aktiviert und katalysiert an der Plasmamembran die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphat ( $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ) zu Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphat ( $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ ) (219). Dieser *Second Messenger* aktiviert unter anderem den Akt Kinase Signalweg und wirkt über diesen anti-apoptotisch und fördert Zellwachstum und -proliferation (siehe unten) (220). Die spezifische Dephosphorylierung von  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  an Position drei zu  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  durch PTEN (Abb. 1.6) wirkt dieser Signalweiterleitung und der daraus resultierenden Effekte entgegen (220).



**Abbildung 1.6: PTEN katalysiert die Dephosphorylierung von  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$**

Nach rezeptorvermittelter Aktivierung der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K), katalysiert diese die Phosphorylierung von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ . Plasmamembranlokalisierendes PTEN dephosphoryliert  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  wieder zu  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  und wirkt somit antagonistisch zu der Aktivität von PI3K. Nach Gericke *et al.* 2006 (221).

N-terminal befindet sich bei PTEN ein  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  bindender Bereich. Die Bindung wird durch basische Aminosäurereste vermittelt und findet vornehmlich an der Plasmamembran statt, die im Gegensatz zur ER- und Kernmembran reich an  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  ist (220, 222). An diesen Bereich schließt sich die Phosphatasedomäne (AS 7-185) an, die das aktive Zentrum

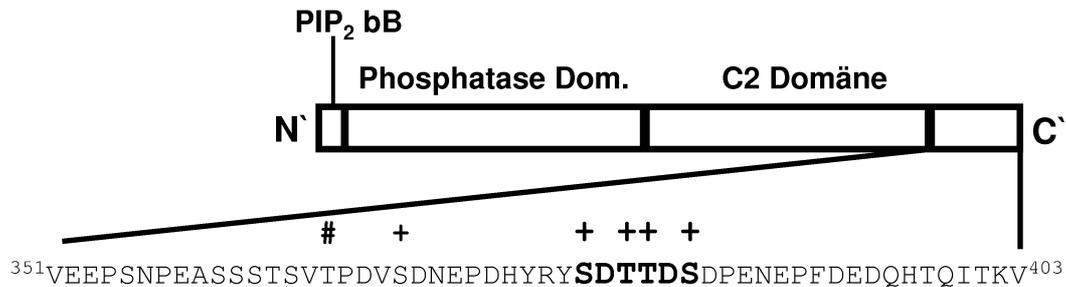
beinhaltet. Dieses Zentrum weist neben den typischen Proteinphosphatasemerkmale auch Besonderheiten auf, die es PTEN ermöglichen Phospholipide zu dephosphorylieren. Hierzu gehören neben den positiv geladenen Lysinresten, auch die vergrößerte Bindetasche, sodass die stark negativ geladene und voluminöse Inositolphosphatgruppe mit dem aktiven Zentrum interagieren kann (221, 223).

Die zweite Hälfte (AS 186-351) des PTEN Proteins bildet C-terminal die so genannte C2 Domäne. An der Oberfläche dieser Domäne befinden sich basische und hydrophobe Aminosäuren, die bevorzugt mit negativ geladenen Membranlipiden, wie Phosphatidylserin und Phosphatidylinositolphosphaten interagieren. Mutationen dieser Reste führen zu einer verminderten PTEN Bindung an Membranen und reduzieren dadurch die tumorsupprimierenden Eigenschaften von PTEN (223, 224).

Ein etwa 50 Aminosäuren langer unstrukturierter Bereich am C-terminalen Ende weist zwei PEST Sequenzen, ein PDZ bindendes Motiv und mehrere Phosphorylierungsstellen auf, die sowohl die Stabilität, als auch die Aktivität von PTEN reguliert (220). Die bisher bekannten Phosphorylierungsstellen lassen sich in zwei räumliche Gruppen einteilen. Dies sind zum einen die vier Aminosäurereste Ser 380, Thr 382, Thr 383 und Ser 385, die alle höchstwahrscheinlich durch CK2 phosphoryliert werden und zum anderen Thr 366 und Ser 370, die von GSK3 $\beta$  (Thr 366) bzw. CK2 (Ser 370) phosphoryliert werden (225-229) (Abb. 1.7). Untersuchungen verschiedener Zelllinien legen nahe, dass der überwiegende Teil der oben genannten Aminosäurereste Ser 380, Thr 382, Thr 383 und Ser 385 phosphoryliert vorliegen (220, 230), sodass diese mit den basischen Aminosäureresten der C2 Domäne interagieren und dadurch die Plasmamembranbindung von PTEN verhindern (231-235). Neben der daraus resultierenden Reduktion der Lipidphosphatasefunktion und damit der tumorsupprimierenden Wirkung, wird auch der proteolytische Abbau von PTEN inhibiert (230, 233).

Der positiv geladenen Proteinsequenz <sup>19</sup>KKK<sup>21</sup> in der zytosolischen Domäne von NEP wurde eine Funktion in der Interaktion mit der oben genannten Hauptphosphorylierungsstelle (Ser 380, Thr 382, Thr 383, Ser 385) von PTEN zugeschrieben (19). Während *in vitro* eine Phosphorylierung von PTEN diese Interaktion verstärkt, ist NEP *in vivo* überwiegend mit unphosphoryliertem PTEN assoziiert (19).

Wie die Phosphorylierung von PTEN – insbesondere durch CK2 – bzw. die Dephosphorylierung reguliert ist, ist zurzeit noch unklar.



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung von PTEN**

N-terminal befindet sich ein PIP<sub>2</sub> bindender Bereich (PIP<sub>2</sub> bB), gefolgt von der Lipid- und Proteinphosphatase Domäne. Die C2 Domäne interagiert über basische Aminosäurereste mit negativ geladenen Lipiden der Plasmamembran. Am C-terminalen Ende befindet sich ein etwa 50 Aminosäuren langer unstrukturierter Bereich, der neben zwei PEST Sequenzen, ein PDZ bindendes Motiv und mehrere Phosphorylierungsstellen aufweist. Unten: Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne; die für die Interaktion mit NEP wichtigen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben; + = CK2 Phosphorylierungsstelle; # = GSK3β Phosphorylierungsstelle. Nach Vazquez und Devreotes 2006; Al-Khoury *et al.* 2005 (226, 235).

Die für die PTEN Inaktivierung maßgeblich verantwortliche Kinase CK2 ist in allen bekannten Tumoren verstärkt exprimiert bzw. aktiviert und stimuliert Zellwachstum und supprimiert apoptotische Prozesse (236, 237). Bei CK2 handelt es sich um eine Serin/Threonin Proteinkinase, die ubiquitär exprimiert wird und eines der am stärksten konservierten Proteine in der Natur darstellt (236). Unter physiologischen Bedingungen bilden zwei katalytische Untereinheiten (CK2α bzw. CK2α') und zwei regulatorische Untereinheiten (CK2β) ein Heterotetramer, wobei die katalytischen Untereinheiten über das CK2β Dimer miteinander verbunden sind (238). Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Kinasen, kann CK2 sowohl ATP als auch GTP als Substrat verwenden und besitzt eine große Anzahl von Proteinsubstraten. Die meisten dieser Proteine sind kernassoziiert und spielen eine Rolle bei der Genexpression und dem Zellwachstum (236, 237, 239-241). Als minimale Konsensussequenz wurde für CK2 S-X-X-D/E definiert (242, 243). Allerdings phosphoryliert CK2 z. B. auch Ser 392 im p53 Tumorsuppressor, obwohl die Sequenz um Ser 392 keine klassische CK2 Konsensussequenz darstellt (244). Andererseits werden viele Proteine, die die CK2 Konsensussequenz beinhalten, nicht oder nur ineffizient von CK2 phosphoryliert, was darauf hindeutet, dass weitere Faktoren bei der Substraterkennung eine Rolle spielen (245).

Das Zusammenfügen von CK2α und β zu einem Heterotetramer erhöht die Kinaseaktivität um das 5-10-fache (246-248). Durch Autophosphorylierung der CK2β Untereinheit wird diese verstärkt durch das Proteasom abgebaut, wodurch die CK2 Aktivität wiederum reduziert wird (249). Daneben sind bisher keine Mechanismen oder Faktoren bekannt, die die CK2 Aktivität im Zytosol und Kern negativ regulieren. Untersuchungen weisen darauf

hin, dass die subzelluläre Verteilung von CK2 einer Kontrolle unterliegt, die Einfluss auf das dynamische Pendeln von CK2 zwischen Kern und Zytoplasma nimmt, wodurch die CK2 Aktivität lokal bestimmt wird (236, 240). So konnte z. B. gezeigt werden, dass in nicht veränderten Zellen CK2 diffus im Zytosol und Nukleus verteilt vorliegt, wohingegen in Krebszellen CK2 vor allem im Nukleus zu finden ist (250, 251).

Obwohl CK2 im Gegensatz zu den meisten anderen zytosolischen Proteinkinasen wie z.B. PKA, PKC oder Akt weit gehend unabhängig von bekannten *Second Messengern* zu sein scheint, gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die eine Stimulation der CK2 Aktivität nachgewiesen haben. So konnte z.B. nach Behandlung mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dem neuronalen Wachstumsfaktor (NGF) oder dem Frizzled Liganden wnt eine massive Erhöhung der CK2 Aktivität beobachtet werden (227, 252, 253). Allerdings ist unklar, über welche intrazellulären Signalwege die CK2 Aktivierung vermittelt wird.

#### **1.4 Die Akt Kinase und ihre Funktion in der intrazellulären Signalweiterleitung**

Durch die Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN nimmt CK2 indirekt auch Einfluss auf den Akt Signalweg. Bei der Akt Kinase handelt es sich um ein hochgradig reguliertes Enzym, dessen Aktivität durch verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle stimuliert wird. Akt spielt wie CK2 auch eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, beim Zellwachstum und bei der Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren (254). So führt die Deregulation des Akt Signalwegs durch Mutationen oder andere Faktoren oft zu einer malignen Transformation von Zellen (214, 255). Bisher sind drei hoch homologe Akt Kinasen bekannt (Akt1, Akt2, Akt3), die sich vor allem durch ihre Expression in verschiedenen Geweben unterscheiden (256).

Die Aktivierung von Akt erfolgt durch den *Second Messenger* PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, der von der oben erwähnten Phosphoinositid 3-Kinase gebildet wird (256).

Die PI3K besteht aus einer katalytischen Untereinheit p110, die im Falle der Klasse 1 PI3Ks PI(4,5)P<sub>2</sub> zu PI(3,4,5)P<sub>3</sub> phosphoryliert und einer regulatorischen Untereinheit p85, die an entsprechende aktivierte Rezeptoren bindet und dadurch p110 aktiviert (256, 257). Die Klasse 1 PI3Ks werden in 1A und 1B unterteilt, wobei 1A PI3Ks durch Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) und 1B PI3Ks durch bestimmte G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (256).

Nach Aktivierung der RTK durch entsprechende RTK Liganden wie z. B. Insulin oder verschiedene Wachstumsfaktoren (z. B. IGF-1 [Insulin like Growth Factor-1], EGF

[*Epidermal Growth Factor*], PDGF [*Platelet-Derived Growth Factor*]) bindet die regulatorische PI3K Untereinheit über seine SH2-Domäne (*Src Homology 2-Domäne*) an Phosphotyrosine der RTK und aktiviert dabei allosterisch die katalytische PI3K Untereinheit, was zu einer vermehrten PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration führt (258, 259). Die N-terminal positionierte PH (*Pleckstrin homology*) Domäne von Akt vermittelt anschließend die Bindung von Akt an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> und die daraus resultierende Translokation von Akt an die Plasmamembran. Daraufhin wird Akt durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK-1) an Threonin 308 innerhalb der Akt Kinasedomäne phosphoryliert und teilweise aktiviert (256, 260). Die maximale Aktivierung von Akt wird durch die zusätzliche Phosphorylierung von Serin 473 in der C-terminalen, regulatorischen Domäne von Akt erreicht (261). Verschiedene Kinasen werden als potenzielle Serin 473 phosphorylierende Enzyme diskutiert. Allerdings ist wahrscheinlich der Komplex aus mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) und RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*) verantwortlich für die Phosphorylierung von Serin 473 (262). Nach der vollständigen Aktivierung wird Akt von der Plasmamembran freigesetzt und phosphoryliert Zielproteine im Zytosol und Nukleus (263) (siehe Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2:** Ausgewählte Substrate von Akt. Nach Manning und Cantley 2007 (264).

Akt Substrat	Inhibition (-)/Aktivierung (+)	Effekt
FOXO1/3A/4	-	anti-apoptotisch/Metabolismus/Proliferation
GSK3 $\alpha/\beta$	-	anti-apoptotisch/Metabolismus/Proliferation
PRAS40	-	anti-apoptotisch/Metabolismus/Proliferation
AS160	-	Glukose Aufnahme
BAD	-	anti-apoptotisch
MDM2	+	anti-apoptotisch/Proliferation
Chk1	-	Proliferation
eNOS	+	Angiogenese
ASK1	-	anti-apoptotisch
p21CIP1	-	Proliferation
p27KIP1	-	Proliferation
Caspase 9	-	anti-apoptotisch

### 1.5 Beeinträchtigung zellulärer Signalwege durch die Alzheimersche Erkrankung

Die Alzheimersche Erkrankung geht mit Störungen diverser intrazellulärer Signalwege einher. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass A $\beta$  die Bindung von wnt an den Frizzled Rezeptor kompetitiv hemmt und somit die wnt/ $\beta$ -Catenin Signaltransduktion beeinträchtigt (53).

Daneben rücken zunehmend Akt vermittelte Signalwege in den Fokus der Alzheimerforschung, wobei vor allem Störungen der Insulin und IGF-1 Signalwege Einfluss auf den

Verlauf der Krankheit zu nehmen scheinen (265). Das gemeinsame Auftreten der klassischen Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung (amyloide Plaques; neurofibrilläre Bündel [siehe oben]) und der Insulin/IGF-1 Defizienz bzw. Resistenz im Gehirn von Alzheimer-Patienten weist darauf hin, dass die Alzheimersche Erkrankung zu einer (auf das Gehirn begrenzten) Art von Diabetes führt (266). In Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Defizienz von Insulin im Gehirn zu einer progressiven Neurodegeneration führt, die Ähnlichkeiten mit der der Alzheimerschen Erkrankung aufweist (266).

Da die Insulin/IGF-1 Signalwege unter anderem für die Glukoseverwertung, den Energiemetabolismus und die Aufrechterhaltung zellulärer Grundfunktionen der Neurone essenziell sind, könnte eine durch die Alzheimersche Erkrankung bedingte Einschränkung dieser Signalwege zum Absterben von Neuronen im Laufe der Krankheit beitragen (32, 267).

Es wurde bereits gezeigt, dass der Insulin Signalweg an verschiedenen Stellen der Signalkaskade durch A $\beta$  beeinträchtigt wird (268). So inhibiert intrazelluläres A $\beta$  die PDK-1 abhängige Aktivierung von Akt nach Insulin Stimulation (56). Darüber hinaus kann extrazelluläres A $\beta$  an den Insulinrezeptor binden und dessen insulininduzierte Autophosphorylierung blockieren, sodass die Signalweiterleitung an dieser Stelle unterbrochen wird (269). Zudem führt die spezifische Bindung von A $\beta$  Oligomeren an Synapsen unter anderem zu oxidativem Stress und zu einer deutlichen Reduktion plasmamembranlokalisierten Insulinrezeptors (55).

Da GSK3 $\beta$  ein Akt Substrat ist (siehe Tabelle 1.2), kann die oben beschriebene negative Beeinflussung der Akt Signalwege in erhöhter Aktivität von GSK3 $\beta$  und folgender verstärkter Tau Phosphorylierung resultieren (54, 270).

Daneben phosphoryliert GSK3 $\beta$  die zytosolische Domäne von Presenilin-1 und inhibiert dadurch die Assoziation eines trimeren Komplexes aus Presenilin-1,  $\beta$ -Catenin und N-Cadherin (124, 271). Dies hat eine Verringerung der Zelloberflächenlokalisation von Presenilin-1 und reduzierte Akt Aktivierung zur Folge (271).

Zusammenfassend weisen die bisher gewonnen Erkenntnisse darauf hin, dass die Insulin vermittelte Stimulation des Akt Signalweges im Gehirn ein Ansatzpunkt für die Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung sein könnte. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass Insulin die kognitiven Leistungen und das Erinnerungsvermögen sowohl in Alzheimer-Tiermodellen, als auch bei Alzheimer-Patienten verbessert (268).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die beiden charakteristischen Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung sind intraneuronale neurofibrilläre Bündel aus hyperphosphoryliertem Tau Protein und extrazelluläre amyloide Plaques, die zum Grossteil aus dem Amyloid  $\beta$  Peptid bestehen (51, 272).

Die Zink-Metallopeptidase Neprilysin wurde als eines der wichtigsten A $\beta$ -abbauenden Enzyme identifiziert, dessen Aktivität und Expression im Gehirn mit der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit korreliert (20, 21, 164).

Über die zytoplasmatische Domäne interagiert NEP mit den F-Aktin bindenden Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin sowie mit dem Tumorsuppressor PTEN (17, 19, 210). Die NEP vermittelte Rekrutierung von PTEN an die Plasmamembran führt zu verstärkter Dephosphorylierung des *Second Messengers* Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphat und somit zu einer Inhibition des Akt Signalweges. Dies resultiert unter anderem in reduziertem Zellwachstum und verringerter Inhibition apoptotischer Faktoren (19).

Frühere Untersuchungen weisen darauf hin, dass NEP phosphoryliert wird und dass die Lokalisation von NEP an der Zelloberfläche wahrscheinlich posttranslational reguliert wird (18, 202).

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war die Funktion der Phosphorylierung von NEP zu untersuchen. Wesentliche Voraussetzung war zunächst die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle(n) von NEP und der an der Phosphorylierung beteiligten Kinase(n). Insbesondere sollte der Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivität und die subzelluläre Lokalisation von NEP untersucht werden und wie sich dies auf den NEP-spezifischen A $\beta$  Abbau auswirkt.

In Bezug auf die subzelluläre Lokalisation von NEP sollte der Einfluss der Phosphorylierung auf die Interaktion mit dem F-Aktin bindenden Ezrin Protein untersucht werden, da hierüber die Lokalisation an der Zelloberfläche beeinflusst werden könnte.

Von besonderem Interesse war die Rolle der Phosphorylierung von NEP auf die PTEN Bindung und die eventuell daraus resultierende Steuerung wichtiger Akt vermittelter Signalwege, wie etwa der Insulin und IGF-1 Signalwege.

Insgesamt sollten die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis darüber beitragen, ob die Phosphorylierung von NEP seine subzelluläre Verteilung und die indirekte Beeinflussung der Akt Signalwege reguliert und wie sich dies auf die Alzheimersche Erkrankung auswirken könnte.

## 2 Material und Methoden

Falls nicht anders angegeben, wurden die eingesetzten Chemikalien von der Firma Roth mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen.

Spezifische Oligonukleotide für die PCR wurden von Sigma-Aldrich hergestellt. Radiochemikalien wurden von Hartmann Analytik, Zellkulturmedien und andere Zellkulturzusätze wurden von Invitrogen bezogen. Zellkulturmaterialien wurden bei der Firma Sarstedt erworben.

### Geräte

#### *Zellkultur*

37°C CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder
Sterilwerkbank	Thermo
Pipettierhelfer	Brand
-80°C Gefrierschrank	Thermo
Wasserbad	Medingen

#### *Elektrophorese; Gel- und Blotanalyse*

Bandenquantifizierungssoftware	Quantity One (Bio-Rad)
DNS-Elektrophoresekammern (GN200)	Amersham
<i>ECL Imager</i> (ChimiDoc XRS)	Bio-Rad
Protein-Elektrophoresekammern	Höfer
UV-Tisch (Transilluminator GVM20)	Syngene
Western-Blot Transferkammern	Höfer
Kühlsystem (E100)	Lauda
Filmentwicklungsautomat	Agfa
Orbitalschüttler (TH30)	EB

#### *Allgemeine Geräte*

Kühltischzentrifuge (5415R)	Eppendorf
Tischzentrifuge (5415D)	Eppendorf
Zentrifuge (5804)	Eppendorf
Kühlzentrifuge (5804R)	Eppendorf
PCR-Maschine	Eppendorf
Microliter-Pipetten	Gilson/Eppendorf

37°C Inkubator	Binder
Autoklav	HP
Heizblock	Steward Scientific
Magnetrührer	VWR
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer (Genesis)	Thermo
Sonifizierstab (Sonopuls, UW 2070)	Bandelin
Thermomixer	Eppendorf
Überkopfschüttler	Scientific Industries
Vortex	IKA
Waage/Feinwaage	Mettler Toledo
Photometrischer Plattenleser	Thermo
Peristaltikpumpe (Pump P-1)	Pharmacia Biotech
 <i>Spezialgeräte</i>	
Spectramax Gemini	Molecular Devices
Biacore3000	GE Healthcare
Mikroskop (Axiovert 200M)	Zeiss

## 2.1 Zellbiologische Techniken

### 2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

**Zellkultur Grundmedium:** *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) High Glucose mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (PAA), 50 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen)  
**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4  
**Trypsin-EDTA Lösung:** 0,05%(w/v) Trypsin (Invitrogen), 0,53 mM EDTA, dH<sub>2</sub>O  
**Selektionsmedium:** Zellkultur Grundmedium versetzt mit Gentizin (G418) 200 µg/ml  
**Einfriermedium für Säugerzellen:** 90% (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (PAA), 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

Die verschiedenen Zelllinien wurden in Kulturschalen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die hier verwendeten Zelllinien wurde als Grundmedium DMEM versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und Penizillin/Streptomycin verwendet.

Die Zellen wurden so kultiviert, dass sie nach Möglichkeit nicht Konfluenz erreichten. 70-90% konfluent kultivierte Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit Trypsin/EDTA Lösung von der Kulturschale abgelöst und 1:10-1:2 in frischem Grundmedium ausplattiert. Die genaue Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauerzählkammer.

Für Versuche wurden 70-90% konfluent kultivierte Zellen verwendet.

Zum Anlegen einer Kryokultur wurden die Zellen einer 90% konfluent bewachsenen 6 cm bzw. 10 cm Kulturschale mittels Trypsin/EDTA abgelöst und sedimentiert (200 g; 2 min; RT). Das Zellpellet wurde in 1-2 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zum Reaktivieren der Zellen, wurden diese bei 37°C aufgetaut, einmal mit Grundmedium gewaschen (200 g; 3 min; RT) und wie oben angegeben kultiviert. Dem Kulturmedium von stabil transfizierten Zellen wurde 24-48 h später Selektionsantibiotika zugesetzt.

**Tabelle 2.1.1:** Verwendete Säugerzelllinien

Name	Spezies	Zelltyp
BV2	Maus	mikrogliale Zellen
HEK293	human	embryonale Nierenzellen
HeLa	human	Zervixcarcinomzellen
LNCaP	human	Prostatacarcinomzellen
MEF	Maus	embryonale Fibroblasten
SH-SY5Y	human	Neuroblastoma

### 2.1.2 Bestimmung der Zellvitalität (MTT Test)

**MTT Lösung:** 5,5 mg/ml MTT, dH<sub>2</sub>O (sterilfiltriert)

**SDS Lösung:** 10% (w/v) SDS, 1 mM HCl, dH<sub>2</sub>O

Der Test beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffs MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blau-violetten Formazan durch Reduktionsäquivalente der Zelle (NADH/NADPH). Die Menge des reduzierten Farbstoffs kann photometrisch bestimmt werden.

Zellen wurden in einer 96 Loch Kulturschale kultiviert (35000 Zellen pro ml). Der MTT Test wurde durchgeführt bevor die Zellen Konfluenz erreichten.

Zu 100 µl Medium wurden 10 µl MTT Lösung hinzupipettiert und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 2 h wurden 100 µl der SDS Lösung hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm im photometrischen Plattenleser (Thermo) gemessen.

### 2.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsvektoren

**Selektionsmedium:** Zellkultur Grundmedium versetzt mit Gentizin (G418) 200 µg/ml

**Zellkultur Grundmedium:** *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) High Glucose mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (PAA), 50 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen)

**Optimem** (Invitrogen)

Die Zellen wurden in einer 6 cm Kulturschale bis zu einer Konfluenz von etwa 50-70% kultiviert und anschließend mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transfiziert. Dabei wurde gemäß Herstellerangaben vorgegangen (4 µg DNS, 10µl Lipofectamine 2000 für 6 cm Kulturschale).

Bei transienter Transfektion wurden die Zellen nach 36-48 h für die entsprechenden Versuche verwendet.

Zur Selektion stabil exprimierender Zellen wurden die Zellen 24 h nach Transfektion passagiert und in verschiedenen Verdünnungen in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert.

### 2.1.4 Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**Poly-L-Lysin Lösung:** 100 µg/ml steriles Poly-L-Lysin in PBS

**Paraformaldehyd-Lösung (4% -ig):** 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

**Triton X-100 Lösung (0,1% -ig):** 0,1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS

**Blockierlösung:** 5% (w/v) BSA in PBS

**Erstantikörperlösung:** Erstantikörper (Verdünnung 1:50-1:1000) in 1% (w/v) BSA in PBS

**Zweitantikörperlösung:** Zweitantikörper (Fluoreszenzfarbstoff konjugiert; Verdünnung 1:500-1:1000) in 1% (w/v) BSA in PBS

Zur Herstellung von MEF-Immunfluoreszenzpräparaten wurden unbehandelte Deckgläser verwendet. Für die übrigen Zelllinien wurden die Deckgläser 1 h in Poly-L-Lysin bei 37°C inkubiert und anschließend ein Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden auf den Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von 50-70% kultiviert, drei Mal mit PBS gewaschen und 20 min in Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Zum Permeabilisieren der zellulären Membranen wurden die Zellen 10 min in 0,1%-iger Triton X-100 Lösung inkubiert. Falls exklusiv Zelloberflächenproteine immunzytochemisch gefärbt werden sollten, wurden die Zellen nicht mit Triton X-100 Lösung behandelt.

Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei RT in Blockierlösung und darauf folgend 1 h bei RT in Erstantikörperlösung inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS folgte eine einstündige Inkubation mit der Zweitantikörperlösung, wiederum gefolgt von fünfmaligem Waschen mit PBS. PBS-Reste wurden mit dH<sub>2</sub>O entfernt und die Deckgläser mit Immu-Mount (Thermo) auf Objektträgern fixiert. Die erhaltenen Immunfluoreszenzpräparate wurden dunkel bei 4°C gelagert und konnten nach Aushärten des Immu-Mount unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M; Zeiss) analysiert werden.

### 2.1.5 Nachweis von NEP Enzymaktivität

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**Hypoton-Puffer:** 10 mM Tris, dH<sub>2</sub>O, pH 7,6

**NEP-spezifische Fluoreszenzsubstratlösung:** 100 mM N-Succinyl-Alanin-Alanin-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin in PBS

**Thiorphan (2000-fach):** 20 mM Thiorphan in Ethanol

Zum Nachweis der Oberflächen-Enzymaktivität von NEP wurden die Zellen in einer 96-Loch Kulturschale bis zu einer maximalen Konfluenz von 90% kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 50 µl der NEP-spezifischen Fluoreszenzsubstratlösung auf die Zellen gegeben und der Ansatz für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Menge des gespaltenen NEP-spezifischen Fluoreszenzsubstrats wurde mit Hilfe des Fluoreszenzphotometers (Spectramax Gemini) bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm nach 10, 20, 30 und 40 min bestimmt. Zur spezifischen Inhibition von NEP wurden die Zellen mit 10 µM Thiorphan behandelt. Zum Nachweis der Gesamtaktivität wurden die Zellen mit 50 µl Hypoton-Puffer pro Loch einer 96-Loch Kulturschale 10 min auf Eis inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Nach Zugabe von 50 µl der NEP-spezifischen Fluoreszenzsubstratlösung wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

## 2.2 Molekularbiologische Techniken

### 2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Für die Amplifikation von spezifischen DNS Sequenzen mittels PCR, wurden 1-20 ng Plasmid-DNS als Matrize, je (5' und 3') 0,2 µM sequenzspezifische Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.2.1), je 0,2 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Fermentas) und 1,25 U Pfu-Polymerase (Fermentas) inklusive dem entsprechenden Magnesiumionen-haltigen Puffer (Fermentas) auf Eis zusammen pipettiert. Das PCR Programm wurde stets mit einer 2-minütigen Denaturierung der doppelsträngigen DNS bei 95°C in der PCR-Maschine gestartet. Zur Amplifikation der gewünschten DNS-Sequenz folgten 30 Zyklen, die jeweils die nachstehenden Schritte beinhalteten:

1. Denaturierung: 30 s, 95°C
2. Oligonukleotid Anlagerung an die DNS-Matrize: 30 s, 55-75°C
3. DNS-Synthese: 30-180 s, 72°C

Die Bestimmung der Temperatur im zweiten Schritt ergab sich aus der Oligonukleotidlänge und -sequenz. Die Dauer der DNS-Synthese wurde anhand der Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragments bestimmt (500 bp pro Minute).

Anschließend folgte ein finaler DNS-Synthese Schritt für 240 s bei 72°C.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde nach Vollendung des PCR-Programms je nach Fragmentlänge in einem 1-2%-igen Agarosegel analysiert (siehe Punkt 2.2.4). Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben aufgereinigt.

**Tabelle 2.2.1:** Für die PCR verwendete spezifische Oligonukleotide

<b>cDNS Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotide (Sequenz)</b>	<b>Gen Matrize</b>	<b>(bp)</b>
GST NEP-NT	vw: cccgaattcatgggcaagtcag rw: cccgtcgacctactccaagtcgagtc	hNEP	84
GST NEP-NT S6A	vw: ttggaattcatgggcaagtcagaagtcagatg rw: cccgtcgacctactccaagtcgagtc	hNEP	84
fl NEP	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaaaag rw: cccgcgccgcccacaaaccggcac	hNEP	2250
NEP-GFP	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaaaag rw: cccggatccaatgcatagagtgcgac	hNEP	150
NEP-GFP S6D	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaagatcagatg rw: cccggatccaatgcatagagtgcgac	hNEP	150
fl NEP S4A	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaaaag rw: cccgcgccgcccacaaaccggcac	hNEP	2250
fl NEP S6A	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaagctcagatg rw: cccgcgccgcccacaaaccggcac	hNEP	2250
fl NEP S6D	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaagatcagatg rw: cccgcgccgcccacaaaccggcac	hNEP	2250
fl NEP T11A	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaagtcagatggatatactgatc rw: cccgcgccgcccacaaaccggcac	hNEP	2250
fl NEP T15A	vw: ttgggtaccatgggcaagtcagaagtcagatggatataactgat caacgctccaaag rw: cccgcgccgcccacaaaccggcac	hNEP	2250
MBP Ezrin-NT	vw: cccgaattcatgccgaaaccaatcaat rw: ttgtcgtactaccggcctggccttc	hEzrin	930
GST PTEN-CT	vw: cccgaattcagatgtagtacaatg rw: ccctctagatcagactttgtaattg	hPTEN	108

### 2.2.2 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Die enzymatische Spaltung von doppelsträngiger DNS wurde an spezifischen Stellen durch Typ 2 Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden in einem Verhältnis von 4 U pro µg DNS zugesetzt. Der Restriktionsansatz wurde in einem Volumen von 50-100 µl angesetzt. Bei Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen in einem Ansatz wurde der Restriktionsverdau in einem für beide Enzyme passenden Puffersystem durchgeführt (Fermentas Restriktionspuffer). Die Ansätze wurden für 4-16 h bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3 Dephosphorylierung von DNS

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Um das Religieren des Vektors ohne Passagier-DNS zu verhindern, wurde die Vektor-DNS mit der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP; Fermentas) inkubiert, welche die endständigen 5'-Phosphatreste der DNS entfernt.

Nach dem präparativen Restriktionsverdau der Vektor-DNS wurden 1 U SAP pro µg Vektor-DNS und die entsprechende Menge des SAP Puffers (entsprechend Herstellerangaben) direkt zu dem Restriktionsansatz hinzupipettiert und der Ansatz für 1 h

bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der SAP (65°C; 15 min) gestoppt.

#### **2.2.4 Visualisierung und Größentrennung von DNS Fragmenten mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese**

**TBE Puffer:** 9 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA; dH<sub>2</sub>O, pH 8,0

**6-fach Ladepuffer:** 30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, dH<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromid (gesättigte Lösung):** 5 mg/ml, dH<sub>2</sub>O

Auf Grund des negativ geladenen Phosphatrückgrats der DNS wandert die DNS im elektrischen Feld in Richtung Pluspol. Durch Verwendung von Agarosegelen können die DNS Fragmente im elektrischen Feld der Länge nach aufgetrennt werden. Die hier verwendeten 1-2%-igen (w/v) Gele erlauben eine Auftrennung von Fragmenten zwischen 100 bp und 10000 bp.

Zur Visualisierung der DNS wurden 4 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Agarosegel nach dem Aufkochen in die noch warme Lösung gegeben. Nach Erstarren des Gels wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde je nach Gelgröße bei 60-120V durchgeführt. Als Laufpuffer diente hier TBE Puffer.

Als Größenreferenz wurde ein DNS Standard verwendet (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*; Fermentas).

#### **2.2.5 Isolation von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Fragmente im Agarosegel wurde die Bande mit der gewünschten Vektor-DNS oder cDNS aus dem Gel ausgeschnitten und die DNS mit Hilfe des *Gel Elution Kit* (Promega) aus dem Gel isoliert. Dabei wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen.

Die erhaltene DNS Lösung wurde nach der Konzentrationsbestimmung direkt für die anschließende Ligation verwendet.

### 2.2.6 DNS Ligation

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Die Insertion der mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Passagier-DNS in den zuvor linearisierten und dephosphorylierten Vektor erfolgte mit Hilfe der DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase; Fermentas).

Das molare Mengenverhältnis von Vektor-DNS zu Passagier-DNS betrug dabei 1:3. Es wurden mindestens 100 ng Vektor-DNS eingesetzt. Die Enzym- und Puffer-Menge wurde entsprechend der Herstellerempfehlung gewählt (1 U pro 100 ng Vektor-DNS). Das Endvolumen des Ansatzes betrug 20 µl. Dieser wurde vollständig für die folgende Transformation kompetenter *E.coli* Zellen verwendet.

**Tabelle 2.2.2:** Verwendete Vektoren

Name	Firma	Zelltyp
pcDNA4mychis A/B/C	Invitrogen	Säugerzellen
pEGFP-N1	Clontech	Säugerzellen
pGEX-5X-1	GE Healthcare	<i>E.coli</i>
pMalC2	NEB	<i>E.coli</i>

### 2.2.7 Herstellung kompetenter DH5α *E.coli* Zellen

**Low salt Lauria-Bertani (LB)-Medium:** 1% (w/v) Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, dH<sub>2</sub>O, pH 7,0 (autoklaviert)

**Einfriermedium (*E.coli*):** 50% (v/v) Glycerin, dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung 1:** 100 mM MgCl<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung 2:** 50 mM MgCl<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer DH5α *E.coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 250 U/min und 37°C bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert (1500 g; 10 min; 4°C). Das Pellet wurde in 25 ml kalter MgCl<sub>2</sub>-Lösung 1 resuspendiert und anschließend wieder pelletiert (1500 g; 10 min; 4°C). Der Vorgang wurde mit der MgCl<sub>2</sub>-Lösung 2 wiederholt. Das Bakterienpellet wurde dann in 3 ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung 2 resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Einfriermedium wurde der Ansatz gemischt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 Transformation kompetenter DH5α *E.coli* mit Plasmid-DNS

**Low salt Lauria-Bertani (LB)-Medium:** 1% (w/v) Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, dH<sub>2</sub>O, pH 7,0 (autoklaviert); ggf. wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika nach dem Abkühlen zugesetzt

**LB-Agarplatten:** 1% (w/v) Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 15 g/l Agar, dH<sub>2</sub>O, pH 7,0 (autoklaviert); zu der noch warmen (ca. 40-50°C) Lösung wurden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt und das Gemisch in Platten gegossen

***E.coli* Selektionsantibiotika für LB-Agarplatten und LB-Medium:** Kanamycin : 30 µg/ml (Stock: 30 mg/ml, dH<sub>2</sub>O); Ampicillin: 100 µg/ml (Stock: 100 mg/ml, dH<sub>2</sub>O)

50 µl kompetente DH5α *E.coli* Zellen wurden mit dem kompletten Ligationsansatz (20 µl; siehe Punkt 2.2.6) bzw. mit 0,5 µg Plasmid-DNS (Retransformation) für 20 min auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurde der Ansatz für 2 min bei 42°C und im direkten Anschluss für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Um eine ausreichend große und stabile Population von *E.coli* Zellen zu erhalten, wurde vor der Antibiotikaselektion zu dem Ansatz 1 ml LB Medium pipettiert. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und 750 U/min im Thermoschüttler inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (600 g; 3 min; RT), in 100 µl LB Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte (plus Selektionsantibiotika) ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten fand über Nacht bei 37°C statt. Die erhaltenen Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt um LB-Flüssigkulturen anzuzüchten.

### 2.2.9 Herstellung von *E.coli*-Kryokulturen

**Einfriermedium (*E.coli*):** 50% (v/v) Glycerin, dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

0,5 ml der Bakteriensuspension wurden in ein 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Einfriermedium hinzupipettiert. Der Ansatz wurde gemischt und bei -80°C gelagert.

Um die Zellen zu rekultivieren, wurde mit einem sterilen Zahnstocher in die gefrorene Glycerinkultur gestochen und der Zahnstocher in das entsprechende LB-Selektionsmedium gegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C und 250 U/min auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.

### 2.2.10 Präparation von Plasmid-DNS aus *E.coli*

**P1 Resuspendierungspuffer:** 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0

**P2 Alkalische Lyse Puffer:** 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

**P3 Neutralisationspuffer:** 3 M Kalium Acetat, pH 5,5

Das hier angewandte Protokoll zur Isolation von Plasmid-DNS folgt im Prinzip dem Protokoll der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (273).

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNS zu erhalten, wurde 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli* Klons 1 min bei 12000 g (RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 250 µl P1 resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 250 µl P2 zugesetzt und der Ansatz durch leichtes Schütteln gemischt. Zur Neutralisation und gleichzeitiger Präzipitation sämtlicher Proteine und

assoziierter genomischer DNS wurde nach 3-5 min 350 µl P3 hinzupipettiert. Der Ansatz wurde anschließend zentrifugiert (12000 g; 10 min; RT) und die im Überstand gelöste Plasmid-DNS wie unter Punkt 2.3.11 beschrieben gefällt. Das trockene DNS Pellet wurde im Folgenden in 50-100 µl autoklaviertem dH<sub>2</sub>O resuspendiert. 10-20 µl der Plasmidlösung wurden für einen anschließenden analytischen Restriktionsverdau (Punkt 2.2.2) eingesetzt. Die präparative Isolation von Plasmid-DNS aus DH5α *E.coli* Zellen erfolgte mit Hilfe des *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega). Dabei wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen. Die DNS wurde stets in autoklaviertem dH<sub>2</sub>O eluiert und anschließend für die transiente oder stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet.

### **2.2.11 Isopropanolfällung der DNS**

**Isopropanol:** 100%(v/v) Isopropanol  
**Ethanol (70%-ig):** 70% (v/v) Ethanol, dH<sub>2</sub>O  
**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Um Vektor-DNS oder cDNS umzupuffern oder zu konzentrieren, wurde die DNS Lösung mit 0,8 Volumen Isopropanol versetzt, gut gemischt und bei 12000 g 10 min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Pellet enthaltene DNS mit 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen (12000 g; 10 min; RT). Das erhaltene DNS-Pellet wurde bei 37°C 10 min getrocknet und in 50-100 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.12 DNS Sequenzierung**

Die Sequenzierung der cDNS-Konstrukte wurde mit dem *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.2.13 DNS Konzentrationsbestimmung (photometrisch)**

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

5 µl der zu bestimmenden DNS-Lösung wurden in 95 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt und in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der Nullabgleich wurde mit 100 µl dH<sub>2</sub>O unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Über die ermittelte A<sub>260</sub> wurde mit Hilfe folgender Formel die DNS Konzentration bestimmt:

$$c[\mu\text{g/ml}] = A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor (V)} * \text{Multiplikationsfaktor (F)}$$

(F = 50)

## 2.3 Proteinbiochemische Techniken

### 2.3.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**RIPA-Puffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (w/v) Natriumdeoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7,4

**STEN-Lysepuffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) NP40 (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich), dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-90% kultiviert. Das Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 ml (6 cm Kulturschale) bis 1 ml (10 cm Kulturschale) RIPA-Puffer bzw. STEN-Lysepuffer 15 min auf Eis lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (12000 g; 10 min; 4°C) vom Überstand getrennt.

Die so erhaltenen Zelllysate wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese oder die Immunpräzipitation verwendet.

### 2.3.2 Membranproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**Hypoton-Puffer:** 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, dH<sub>2</sub>O, pH 7,6

**STEN-Lysepuffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) NP40 (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich), dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-90% kultiviert. Das Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 ml (6 cm Kulturschale) bis 1 ml (10 cm Kulturschale) Hypoton-Puffer 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe einer 1 ml Spritze zehn Mal durch eine 0,6 mm Kanüle (Braun) gepresst. Die größeren Bestandteile (Mitochondrien, Zellkerne) des hier erhaltenen Zellhomogenats wurden durch Zentrifugation (300 g; 5 min; 4°C) entfernt. Die neben den löslichen zytosolischen Bestandteilen im Überstand befindlichen Membranvesikel wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (12000 g; 30 min; 4°C) sedimentiert.

Dieses Membranpellet wurde für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese in 2-fach SDS Probenpuffer gelöst und 5 min bei 95°C inkubiert. Alternativ wurde das Membranpellet in 50-200 µl STEN-Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die detergentunlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (12000 g; 30 min; 4°C) entfernt. Die Membranproteinextrakte wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendet.

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt.

A) Bradford-Methode: Hierbei reagiert das im Bradfordreagenz (Bio-Rad) enthaltene Coomassie-Brillantblau mit den Seitenketten von kationischen, nichtpolaren und hydrophoben AS. Dabei wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschoben (274).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden verschiedene Verdünnungen der Proteinlösung 1:5 mit dem Bradfordreagenz vermischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Mit Hilfe der ermittelten A<sub>595</sub> wurde die Proteinkonzentration anhand einer parallel erstellten Eichkurve bestimmt.

B) BCA-Methode: Hierbei reagieren zweiwertige Kupferionen (Cu<sup>2+</sup>) quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen (Cu<sup>+</sup>). Diese bilden im Komplex mit der Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA; 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) einen wasserlöslichen violetten Farbstoff, der eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm aufweist (275).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden verschiedene Verdünnungen der Proteinlösung 1:10 mit dem BCA-Reagenz (Thermo) vermischt, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Mit Hilfe der ermittelten A<sub>562</sub> wurde die Proteinkonzentration anhand einer parallel erstellten Eichkurve bestimmt.

Je nach Pufferzusammensetzung der zu bestimmenden Proteinlösung wurde entweder die Bradford- oder die BCA-Methode gewählt.

### 2.3.4 Immunpräzipitation von Proteinen

**STEN-Puffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% (v/v) NP40 (Sigma-Aldrich), pH 7,6

**STEN-NaCl:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% (v/v) NP40 (Sigma-Aldrich), dH<sub>2</sub>O, pH 7,6

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**SDS-Probenpuffer (5-fach):** 50% (v/v) Glycerin, 7,5% (w/v) SDS, 0,1 M DTT, 0,025 mg/ml Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

Um Proteine, die unspezifisch an Agarose binden, aus dem Zelllysate (siehe Punkt 2.3.1) zu entfernen, wurde das Zelllysate mit 30 µl Protein-A Agarose (Zymed) für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler vorinkubiert. Die Protein-A Agarose wurde sedimentiert (600 g;

3 min; 4°C) und verworfen. Das geklärte Zelllysat wurde mit 1-5 µg spezifischen Antikörper und 30 µl Protein-A Agarose (Kaninchen IgG) bzw. Protein-G Agarose (Maus IgG; Amersham) inkubiert (2-16 h, 4°C, Überkopfschüttler). Anschließend wurde die Protein-A bzw. -G Agarose sedimentiert (600 g; 3 min; 4°C) und ein Mal mit STEN-NaCl, drei Mal mit STEN Puffer und ein Mal mit PBS gewaschen. Die Agarosepellets wurden für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mit 25 µl 2-fach SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

### 2.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

**Sammelgelpuffer (4-fach):** 500 mM Tris, 0,4% (w/v) SDS, dH<sub>2</sub>O, pH 6,8

**Trenngelpuffer (4-fach):** 1,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, dH<sub>2</sub>O, pH 8,8

**SDS-Probenpuffer (5-fach):** 50% (v/v) Glycerin, 7,5% (w/v) SDS, 0,1 M DTT, 0,025 mg/ml Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

**APS-Lösung:** 10% (w/v) Ammoniumpersulfat, dH<sub>2</sub>O

**TEMED:** N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (Sigma)

**SDS-Elektrophoresepuffer:** 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, dH<sub>2</sub>O

**Acrylamid/Bisacrylamid:** 30% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1

Bei dieser Art der Proteinauftrennung erhält man nach der Elektrophorese eine nahezu lineare Beziehung zwischen dem Molekulargewicht der Proteine und deren Wanderungstrecke im SDS-Polyacrylamidgel (276).

Die zu analysierende Proteinlösung wurde mit 1/4 Volumen 5-fach SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten 10%-igen SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe des Minigelsystems der Firma Höfer hergestellt. Als Proteinstandard dienten der *PageRuler Unstained Protein Ladder* und der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Pro Geltasche wurden 20-40 µg Protein aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 30 mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 180 V durchgeführt.

Nach Auslaufen der Bromphenolblau-Lauffront wurde die Elektrophorese gestoppt und die Proteine im Gel entweder direkt Coomassie gefärbt (siehe Punkt 2.3.6) oder auf Nitrocellulose transferiert und im Folgenden immunchemisch nachgewiesen (siehe Punkt 2.3.7).

Benötigte Mengen der oben angegebenen Puffer und Lösungen für zwei SDS-Polyacrylamidgele

	<b>Trenngel (10% -ig)</b>	<b>Sammelgel (4% -ig)</b>
Acrylamid/Bisacrylamid	6,7 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer (4-fach)	5 ml	-
Sammelgelpuffer (4-fach)	-	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	8,3 ml	6,2 ml
APS-Lösung	50 µl	25 µl
TEMED	50 µl	25 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 ml</b>	<b>10 ml</b>

Alternativ wurden 4-12%-ige Bis-Tris Polyacrylamidgele mit den vom Hersteller empfohlenen Proben- und Elektrophoresepuffer verwendet (NuPAGE, Invitrogen).

### 2.3.6 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

**Coomassie-Färbelösung:** 50% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) Coomassie-Brillant-Blau-R, dH<sub>2</sub>O

**Entfärbelösung:** 20% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, dH<sub>2</sub>O

Um Proteine direkt im SDS-Polyacrylamidgel Coomassie zu färben, wurden die SDS-Polyacrylamidgele im Anschluss an die Elektrophorese für 30 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Um überschüssig gebundenes Coomassie zu entfernen, wurden die Gele anschließend für 2-4 h in Entfärbelösung inkubiert.

### 2.3.7 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembran (Western Blotting) und immunchemischer Nachweis

**Blot-Transferpuffer:** 5 mM Tris, 200 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol, dH<sub>2</sub>O

**Ponceau-Lösung:** 3% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure, dH<sub>2</sub>O

**TBS-T:** 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20, dH<sub>2</sub>O, pH 7,5

**PBS-T:** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% (v/v) Tween20, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**TBS-T Blockierlösung:** TBS-T, 3% (w/v) BSA (Roth)

**PBS-T Blockierlösung:** PBS-T, 5% (w/v) Milchpulver (Roth)

**Antikörperlösung:** TBS-T/PBS-T, spezifischer Antikörper (Verdünnung: 1:5000-1:200 Tabelle 2.3.1)

Bei diesem Vorgang werden die Proteine, die im SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach getrennt wurden (siehe Punkt 2.3.5), mit Hilfe des Elektroblobverfahrens horizontal auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman) transferiert.

Der Proteintransfer findet hier, wie auch bei der SDS-PAGE, auf Grund der negativen Ladung des SDS in Richtung Pluspol statt. Der Proteintransfer erfolgte bei 4°C, einer Stromstärke von 400 mA und einer maximalen Spannung von 100 V für 2 h.

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran reversibel mit Ponceau-Lösung gefärbt, um die Vollständigkeit des Proteintransfers zu überprüfen.

Im Folgenden wurde für den immunchemischen Nachweis von Phosphoproteinen TBS-T, TBS-T Blockierlösung und TBS-T Antikörperlösung verwendet. Ansonsten wurde für den immunchemischen Nachweis von Proteinen PBS-T, PBS-T Blockierlösung und PBS-T Antikörperlösung verwendet.

Die Membran wurde 1 h in Blockierlösung, 1 h bei RT (über Nacht 4°C) mit dem Erstantikörper und 1 h bei RT mit dem HRP (*Horseradish Peroxidase*) konjugierten Zweitantikörper auf dem Orbitalschüttler (50 U/min) inkubiert. Sowohl zwischen der Erst- und der Zweitantikörperinkubation, als auch nach der Zweitantikörperinkubation wurde die Membran sechs Mal 5 min mit PBS-T auf dem Orbitalschüttler (100 U/min) gewaschen. Die Detektion der antikörpergebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe der ECL-Methode (*Enhanced Chemiluminescence*). Dazu wurde das *ECL Western Blotting Detection Reagent* (Amersham) verwendet, wobei nach Angaben des Herstellers vorgegangen wurde. Die Detektion der erzeugten Chemilumineszenz erfolgte durch Röntgenfilme (Kodak) oder durch den *ECL Imager* (ChimiDoc™ XRS; Bio-Rad) und der dazugehörigen Software *Quantity One* (Bio-Rad). Die Quantifizierung spezifischer Signale wurde mit Hilfe der *Quantity One* Software durchgeführt.

### 2.3.8 Affinitätsreinigung von monoklonalem c-Myc Antikörper

**Äquilibrierungspuffer/Waschpuffer:** 20 mM Tris, dH<sub>2</sub>O, pH 7,0

**Neutralisationspuffer:** 1 M Tris, dH<sub>2</sub>O, pH 8,0

**Elutionspuffer:** 100 mM Glycin/HCl, dH<sub>2</sub>O, pH 2,7

Die monoklonalen AK wurden aus dem Überstand des IgG produzierenden Hybridomzellklons (9E10) gewonnen. Da die F<sub>c</sub>-Region von Maus IgG eine hohe Affinität zu Protein-G aufweist, wurden hier High Trap Protein-G Säulen (Amersham) verwendet. Etwa 300 ml Hybridomzellen-Überstand wurde bei 3500 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer aus dem Überstand zu entfernen. Vor dem Auftragen des Überstandes auf die Säule wurde diese mit 10 ml Äquilibrierungspuffer/Waschpuffer äquilibriert. Der Hybridomzellen-Überstand wurde mit 1/10 Volumen Neutralisationspuffer versetzt und dann mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit einer Laufgeschwindigkeit von 3-5 ml pro Stunde auf die Säule gegeben. Nach dem vollständigen Durchlauf des Überstandes durch die Säule wurde diese mit 10 ml Äquilibrierungspuffer/Waschpuffer gewaschen. Die AK wurden mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und in 300 µl Fraktionen gesammelt. Zu jeder Fraktion wurden 100 µl Neutralisationspuffer hinzupipettiert um einen physiologischen pH-Wert zu gewährleisten. Die AK wurden bei -20°C gelagert.

### **2.3.9 Expression, Reinigung und Isolation von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen**

**IPTG-Lösung (1000-fach):** 100 mM IPTG, dH<sub>2</sub>O

**Lysozym-Lösung (Stock):** 100 mg/ml, dH<sub>2</sub>O

**Elutionspuffer (GST-Fusionsproteine):** 50 mM Tris, 10 mM Glutathion (reduziert), dH<sub>2</sub>O, pH 8,0

**Äquilibrierungspuffer (GST-Fusionsproteine):** 50 mM Tris, dH<sub>2</sub>O, pH 8,0

400 ml LB-Selektionsmedium wurden mit 10 ml einer *E.coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 250 U/min und 37°C bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 kultiviert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von 0,1 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Die Kultur wurde für weitere 5 h unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3500 g, 30 min, 4°C) und bei -20°C eingefroren. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml PBS (mit 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und auf Eis 30 min inkubiert. Die Zellsuspension wurden im Folgenden sechs Mal 1 min auf Eis sonifiziert (100% Leistung) und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (3500 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde 1:5 mit PBS verdünnt und mit 2 ml GSH-Agarose (Amersham) 2 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die GSH-Agarose wurde fünf Mal mit PBS gewaschen (2000 g, 5 min, 4°C). Nach dem letzten Waschschrift wurde die GSH-Agarose in 10 ml PBS resuspendiert, auf eine Poly-Prep-Chromatographiesäule (Bio-Rad) gegeben und zwei Mal auf der Säule mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit 10 ml Elutionspuffer eluiert und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden bestimmt (Bradford-Methode, siehe Punkt 2.3.3) Die Reinheit des gereinigten Proteins wurde durch Coomassie Färbung im SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

### **2.3.10 Expression, Reinigung und Isolation von Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteinen**

**IPTG-Lösung (1000-fach):** 100 mM IPTG, dH<sub>2</sub>O

**Lysozym-Lösung (Stock):** 100 mg/ml, dH<sub>2</sub>O

**Äquilibrierungspuffer (MBP-Fusionsproteine):** PBS

**Elutionspuffer (MBP-Fusionsproteine):** PBS, 10 mM Maltose

Dabei wurde bis auf folgende Änderungen wie unter Punkt 2.3.9 beschrieben vorgegangen: Zur Präzipitation der MBP-Fusionsproteine wurden hier 2 ml Amylose-Granulat (Amersham) verwendet. Die Waschschriffe des Amylose-Granulats und die Äquilibrierung auf der Säule geschahen mit MBP-Äquilibrierungspuffer. Die Elution der MBP Fusionsproteine erfolgte mit MBP-Elutionspuffer.

### 2.3.11 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Mit Hilfe von Entsalzungssäulen (NAP5, PD-10; Amersham) wurden Proteinlösungen entsalzt bzw. umpuffert.

Dazu wurde die Säule zuvor mit dem dreifachen Säulenvolumen des gewünschten Puffers äquilibriert. Nach Durchlauf des Puffers wurden maximal 0,5 ml (NAP5) bzw. 2,5 ml (PD-10) Proteinlösung auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf verworfen.

Anschließend wurden die Proteine mit 2,5 ml (NAP5) bzw. 5 ml (PD-10) des Äquilibrierungspuffers eluiert und das Eluat in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit hoher Proteinkonzentration wurden vereinigt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.12 Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie

**Laufpuffer (HBS-P Puffer):** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Surfactant P20, pH 7,4 (GE Healthcare)

Die Bestimmung von Protein-Protein Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) geschah mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) im Biacore 3000 (GE Healthcare). C-terminal biotinylierte Peptide (hier: NEP-NT, pNEP-NT; PSL) wurden auf der Oberfläche eines mit Streptavidin beschichteten Biacore Sensor Chip SA (GE Healthcare) immobilisiert. Dazu wurden 100 nM des biotinylierten Peptides in Laufpuffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}$  pro Minute auf die entsprechende Flusszelle des Chips appliziert. Nach Erreichen von etwa 1000 RU (hier: *Response Units*) wurde die Applikation gestoppt und der Chip für 5 min mit einer Flussgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}$  pro Minute mit Laufpuffer gewaschen.

Anschließend wurden nacheinander verschiedene Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins in Laufpuffer mit der oben angegebenen Flussgeschwindigkeit für 1 min auf den Chip appliziert. Nach Applikation des Proteins wurde der Chip für 5 min mit Laufpuffer und 1 min mit 3 M NaCl in Laufpuffer gewaschen, um an die Peptide gebundenes Protein zu entfernen.

Um unspezifische Bindungen der Proteine an den Sensor Chip SA auszuschließen, wurden die ermittelten Werte einer Referenzflusszelle (ohne gebundenes Peptid) von den Werten der Messflusszellen abgezogen.

Die Ermittlung der  $K_D$ -Werte wurde anschließend nach dem „*steady-state*“-Modell unter Verwendung der Biacore-Evaluierungssoftware ermittelt.

### 2.3.13 Peptid – Protein Kopräzipitationsversuche

**CoIP-Puffer:** 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,4% (v/v) Igepal

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**SDS-Probenpuffer (5-fach):** 50% (v/v) Glycerin, 7,5% (w/v) SDS, 0,1 M DTT, 0,025 mg/ml Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

C-terminal biotinylierte Peptide (PSL) wurden an SA-Agarose (Invitrogen) gebunden und mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins für 2 h in CoIP-Puffer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die SA-Agarose sedimentiert (600 g; 3 min; 4°C), drei Mal mit CoIP-Puffer und ein Mal mit PBS gewaschen. Die Agarosepellets wurden für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mit 25 µl 2-fach SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

### 2.3.14 Inhibition der Proteinbiosynthese in Säugerzellen durch Cycloheximid

**Poly-L-Lysin Lösung:** 100 µg/ml steriles Poly-L-Lysin in PBS

**Cycloheximid (1000-fach):** Cycloheximid 20 mg/ml (w/v), dH<sub>2</sub>O

**Zellkultur Grundmedium:** DMEM, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (PAA), 50 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen)

HEK293 Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 3,5 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und für die angegebenen Zeiträume in Zellkulturgrundmedium mit 20 µg/ml Cycloheximid inkubiert (CO<sub>2</sub>-Inkubator, 37°C). Anschließend wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und Gesamtproteinlysate hergestellt (Punkt 2.3.1).

### 2.3.15 Metabolische Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (Pulse Chase)

**Poly-L-Lysin Lösung:** 100 µg/ml steriles Poly-L-Lysin in PBS

**Methionin/Cystein-freies Zellkultur Grundmedium:** Methionin/Cystein-freies DMEM (Sigma-Aldrich)

**[<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein-haltiges Zellkultur Grundmedium (Pulse Medium):** Methionin/Cystein-freies DMEM (Sigma-Aldrich), 0,1 mCi/ml [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein

**Zellkultur Grundmedium (Chase Medium):** DMEM, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (PAA), 50 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen), 2 mM Methionin

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

HEK293 Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 6 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und für 45 min in Methionin/Cystein-freiem Zellkultur Grundmedium inkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein-haltiges Zellkultur Grundmedium ersetzt (CO<sub>2</sub>-Inkubator, 37°C;

*Pulse*). Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Zellen einmal mit Zellkultur Grundmedium gewaschen und für 0,5-6 h, wie im Ergebnisteil angegeben, inkubiert (*Chase*). Anschließend wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und mit STEN-Lysepuffer auf Eis lysiert und das entsprechende Protein mittels Immunpräzipitation isoliert (siehe Punkt 2.3.4).

### 2.3.16 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

**Poly-L-Lysin Lösung:** 100 µg/ml steriles Poly-L-Lysin in PBS

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**Biotin-Lösung:** 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) in PBS

**Glycin-Lösung:** 20 mM Glycin in PBS

**SDS-Probenpuffer (5-fach):** 50% (v/v) Glycerin, 7,5% (w/v) SDS, 0,1 M DTT, 0,025 mg/ml Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

HEK293 Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 6 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis für 30 min in 2 ml Biotin-Lösung inkubiert. Die Biotin-Lösung wurde verworfen und restliches, nicht gebundenes Sulfo-NHS-Biotin durch einmaliges Waschen der Zellen mit Glycin-Lösung abgesättigt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und in STEN-Lysepuffer lysiert (siehe Punkt 2.3.1). Die geklärten Lysate (12000 g; 10 min; 4°C) wurden mit 50 µl SA-Agarose (Invitrogen) pro Milliliter Zelllysate versetzt und 2 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die SA-Agarose vier Mal mit STEN-Puffer gewaschen (600 g; 3 min; 4°C) und schließlich in 2-fach SDS-Probenpuffer gekocht. Die Proteinanalyse geschah mittels SDS-PAGE (siehe Punkt 2.3.5) und anschließendem Western-Immunblotting (siehe Punkt 2.3.7).

### 2.3.17 In vitro Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen

**PCR Wasser:** dH<sub>2</sub>O (autoklaviert)

**SDS-Probenpuffer (5-fach):** 50% (v/v) Glycerin, 7,5% (w/v) SDS, 0,1 M DTT, 0,025 mg/ml Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

Für die *in vitro* Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen wurde rekombinante Casein Kinase 2 (CK2; alpha und beta Untereinheit; 500 U/µl; New England Biolabs) verwendet. 2 µg des jeweiligen GST Proteins wurde pro 30 µl Ansatz mit der entsprechenden Menge CK2-Puffer (New England Biolabs), 50 U CK2 und 10 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP gemischt und bei 30°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,75 ml PBS plus 2 mM EDTA gestoppt und die GST-Fusionsproteine mittels GSH-Agarose (Amersham)

präzipitiert und drei Mal mit PBS gewaschen (siehe Punkt 2.3.9). Anschließend wurden 30 µl 2-fach SDS Probenpuffer pro Ansatz pipettiert und die Proteine nach Aufkochen in einem SDS-Polyacrylamid Gel elektrophoretisch getrennt (siehe Punkt 2.3.5) und auf eine Nitrocellulosemembran elektrogeblottet (siehe Punkt 2.3.7).

### **2.3.18 [<sup>32</sup>P]-Markierung von HEK293 Zellen (in vivo Phosphorylierung)**

**Poly-L-Lysin Lösung:** 100 µg/ml steriles Poly-L-Lysin in PBS

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**Phosphatfreies Zellkultur Grundmedium:** Phosphatfreies DMEM (Sigma-Aldrich)

HEK293 Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 6 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Anschließend wurden das Kulturmedium durch phosphatfreies Zellkultur Grundmedium (Sigma-Aldrich) ausgetauscht. Nach 1 h wurde dem Medium 0,5 mCi [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat pro 6 cm Kulturschale zugesetzt und die Zellen weitere 3 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen, mit STEN-Lysepuffer auf Eis lysiert und das entsprechende Protein mittels Immunpräzipitation isoliert (siehe Punkt 2.3.4).

### **2.3.19 Statistische Auswertung der Versuche**

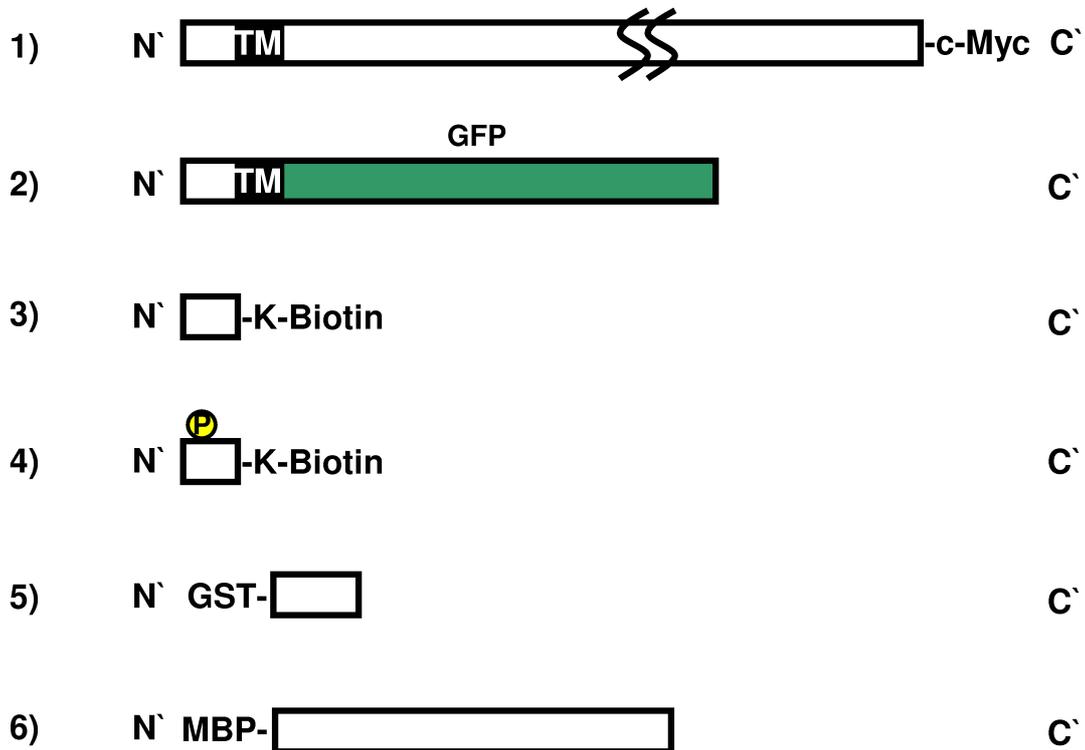
Falls nicht anderes angegeben, sind die Quantifizierungen von drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Standardabweichung und Mittelwert wurden berechnet und die Signifikanz mit Hilfe des *Student's t-test* bestimmt.

**Tabelle 2.3.1: Verwendete Primärantikörper.** Zur Detektion von GM1 (Gangliosid GM<sub>1</sub>) wurde FITC-konjugiertes Cholera Toxin verwendet (IF: 1:500; Sigma-Aldrich); zur Detektion von NEP-NT und pNEP-NT (Biotin markiert) wurde HRP-konjugiertes Streptavidin verwendet (WB: 1:1000; Abcam).

Bezeichnung	Zielprotein	IP	WB	IF	Spezies	Herkunft
Akt	Akt/PKB	-	1:3000	-	Kaninchen (monokl.)	Upstate
Akt (pSer473)	Akt/PKB Phosphoserin 473	-	1:1000	-	Kaninchen (polykl.)	Cell Signaling
Aktin	Aktin	-	1:5000	-	Maus (monokl.)	Sigma-Aldrich
Calnexin H-70	Calnexin	-	1:1000	1:300	Kaninchen (polykl.)	Santa Cruz
CK2 $\alpha$	CK2 $\alpha$	-	1:200	1:50	Maus (monokl.)	Santa Cruz
anti-GFP	GFP	1:1000	1:5000	1:1000	Maus (monokl.)	Roche
c-Myc	c-Myc	1:200	1:1000	1:500	Maus (monokl.)	LGC Promochem
Ezrin	Ezrin	-	-	1:1000	Maus (monokl.)	Abcam
NEP	Nepilysin	-	1:1000	-	Maus (monokl.)	Abcam
NEP	Nepilysin	-	1:500	1:50	Maus (monokl.)	Santa Cruz
PTEN	PTEN	-	1:200	1:50	Kaninchen (polykl.)	Santa Cruz
82E1	A $\beta$		1:100		Maus (monokl.)	IBL
2964	A $\beta$	1:50	-	-	Kaninchen (polykl.)	Labor Prof. Walter
2972	GST	-	1:500	-	Kaninchen (polykl.)	Labor Prof. Walter
2953 IV 3711 III	MBP	-	1:400	-	Kaninchen (polykl.)	Labor Prof. Walter

Tabelle 2.3.2: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Zielprotein	WB	IF	-konjugiert	Herkunft
anti-Maus HRP	Maus IgG	1:50000	-	HRP	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen HRP	Kaninchen IgG	1:50000	-	HRP	Sigma-Aldrich
anti-Maus Alexa594	Maus IgG	-	1:500	Alexa594	Sigma-Aldrich
anti-Maus Alexa488	Maus IgG	-	1:500	Alexa488	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen Alexa594	Kaninchen IgG	-	1:500	Alexa594	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen Alexa488	Kaninchen IgG	-	1:500	Alexa488	Sigma-Aldrich



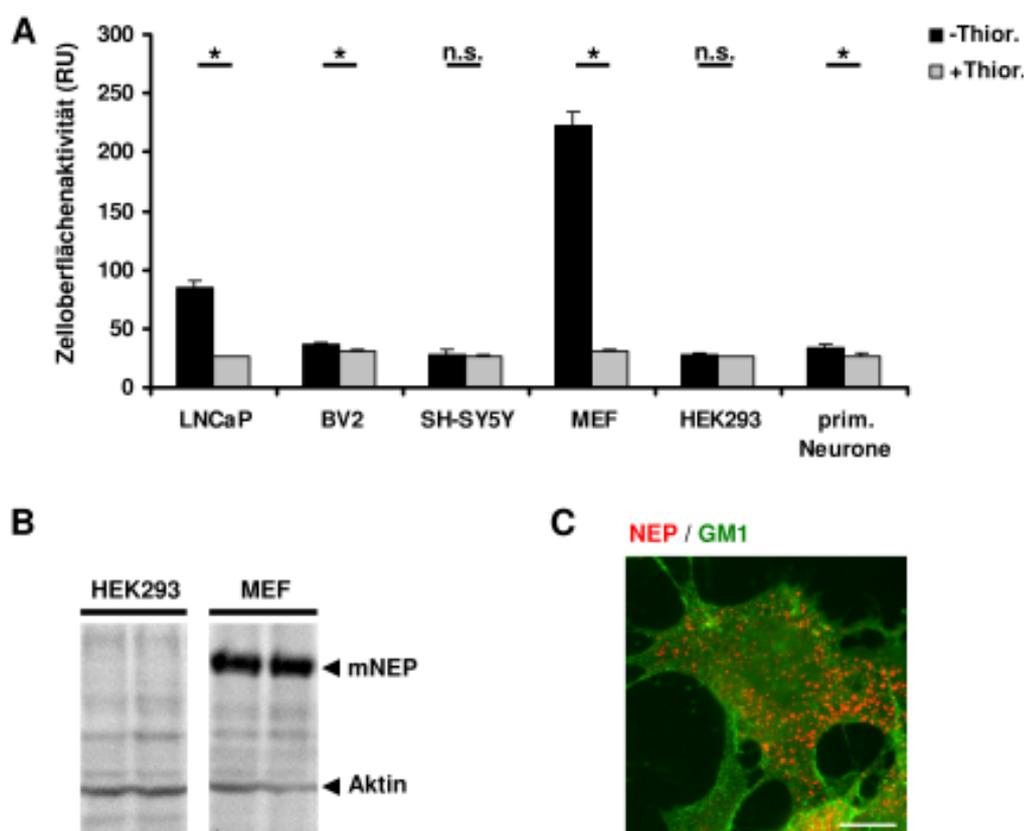
**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung exprimierter Proteine und synthetisch hergestellter Peptide**  
 1) NEP; Volllängen NEP mit C-terminalem c-Myc Epitop 2) NEP-GFP; NEP mit durch GFP ausgetauschter extrazellulärer Domäne 3) NEP-NT; Aminosäuren 1-23 von NEP mit C-terminalem, biotinyliertem Lysin 4) pNEP-NT; Aminosäuren 1-23 von NEP mit phosphoryliertem Serin 6 und C-terminalem, biotinyliertem Lysin 5) GST PTEN-CT; GST Fusionsprotein mit der C-terminalen Domäne von PTEN (AS 364-403) 6) MBP Ezrin-NT; MBP Fusionsprotein mit der N-terminalen Domäne von Ezrin (AS 1-310)



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression und katalytische Aktivität von endogenem NEP

Die physiologischen Funktionen von NEP werden überwiegend an der Plasmamembran ausgeführt. Dazu gehören neben dem Abbau extrazellulärer Substrate auch die Interaktion mit dem Tumorsuppressor PTEN und den F-Aktin bindenden ERM Proteinen (10, 13, 17, 19, 210). Zwar wird NEP in fast allen Geweben exprimiert, jedoch variiert die jeweilige Expressionsmenge sehr stark (10, 13). Um ein geeignetes Zellkulturmodell für weitere funktionelle Untersuchungen zu identifizieren, wurde zunächst die Enzymaktivität von NEP in verschiedenen kultivierten Zellen untersucht.



**Abbildung 3.1: Aktivität, Expression und subzelluläre Verteilung von endogenem NEP**

A) Die Enzymaktivität von NEP wurde in den oben angegebenen Zelllinien bzw. in primären kortikalen Mausneuronen (prim. Neurone) mit Hilfe des spezifischen NEP Substrats Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin nachgewiesen. Zur spezifischen NEP Inhibition wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M Thiorphan behandelt (+Thior.; graue Balken). Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.  $n = 6$ ; \* entspricht einem  $p$ -Wert  $< 0,05$ ; n.s. = nicht signifikant; RU = Relative Einheiten. B) 25  $\mu$ g Membranprotein von HEK293 und MEF Zellen wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und NEP und Aktin mit spezifischen Antikörper im Western-Immunblot nachgewiesen. C) Die Zelloberflächenlokalisation von NEP in MEF Zellen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurden nicht-permeabilisierte MEF Zellen fixiert und mit monoklonalem anti-NEP Antikörper und Alexa 594-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper immunzytochemisch gefärbt (rot). Die Plasmamembran wurde durch FITC-konjugiertes Cholera Toxin markiert (grün). Der Skalierungsbalken entspricht 20  $\mu$ m.

Dabei zeigten LNCaP Zellen, BV2 Zellen, MEF Zellen und primäre kortikale Mausneurone eine signifikante, Thiorphan sensitive NEP Zelloberflächenaktivität. Die stärkste NEP Aktivität wiesen dabei die MEF Zellen auf (Abb. 3.1A).

In Übereinstimmung mit den Enzymaktivitätsmessungen, konnte NEP in MEF Zellen im Western-Immunblot (WB) detektiert werden, während in HEK293 Zellen kein NEP-spezifisches Signal nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.1B).

Die immunzytochemische Untersuchung von nicht-permeabilisierten MEF Zellen zeigte, dass endogenes NEP an der Zelloberfläche in punktförmigen Strukturen organisiert ist, wie es zuvor schon für primäre Neurone beschrieben wurde (Abb. 3.1C) (202).

### **3.2 Expression und katalytische Aktivität von exogen exprimiertem NEP**

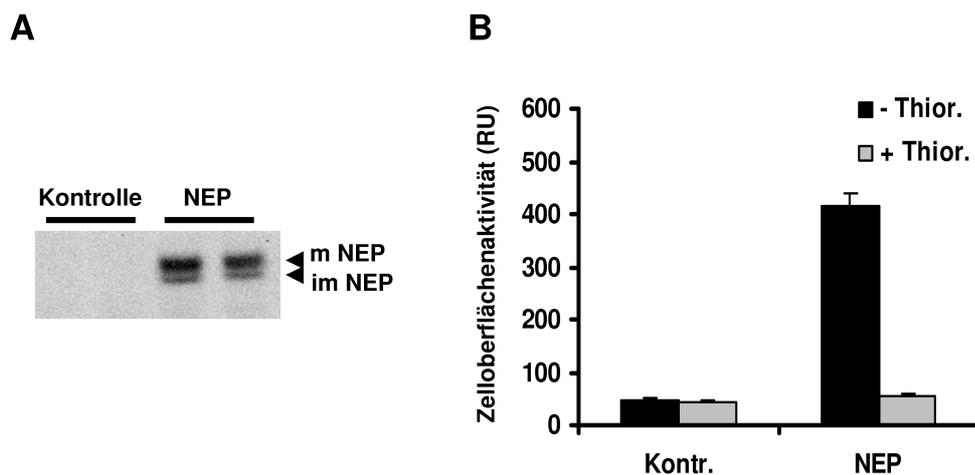
HEK293 Zellen exprimieren, wie in Abbildung 3.1A und B gezeigt, nur sehr geringe Mengen an NEP und eignen sich besonders gut, um ektopisch exprimiertes NEP zu untersuchen, da die spezifischen Eigenschaften und Funktionen des ektopisch exprimierten NEP nicht mit endogenem NEP interferieren.

Zunächst wurde untersucht, ob überexprimiertes NEP in HEK293 Zellen maturiert und aktiv ist. Dazu wurden HEK293 Zellen mit der cDNS von humanem NEP transfiziert, das C-terminal ein c-Myc Epitop trägt. Dabei konnten im WB zwei spezifische Banden detektiert werden, wobei die untere Bande die nicht-maturierte Form und die obere Bande die maturierte, N-glykosylierte Form von NEP repräsentiert (Abb. 3.2A) (9, 277).

Transfizierte HEK293 Zellen zeigten eine deutlich erhöhte NEP Aktivität an der Zelloberfläche, wohingegen nicht-transfizierte Zellen nur schwache NEP-spezifische Aktivität aufwiesen, die kaum von der Thiorphan behandelten Zellen zu unterscheiden ist (Abb. 3.2B).

Die Ergebnisse zeigen, dass exogen exprimiertes NEP in HEK293 Zellen im sekretorischen Weg maturiert und als aktive Peptidase an die Zelloberfläche gelangt.

Stabil NEP exprimierende HEK293 Zellen konnten nicht generiert werden, da die Überexpression über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen zum Absterben der Zellen führte.



**Abbildung 3.2: Expression und Aktivität von exogen exprimiertem NEP in HEK293 Zellen**

A) 25 µg Protein aus Gesamtlysat von untransfizierten (Kontrolle) bzw. NEP transfizierten HEK293 Zellen wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und NEP mit einem spezifischen anti-c-Myc Antikörper im WB nachgewiesen. Matures (m) und immatures (im) NEP sind durch Pfeile markiert. B) Die NEP Aktivität wurde mit Hilfe des spezifischen NEP Substrats Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin nachgewiesen. Zur spezifischen Inhibition von NEP wurden die Zellen mit 10 µM Thiorphan (+Thior.; graue Balken) behandelt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet. n = 6; RU = Relative Einheiten.

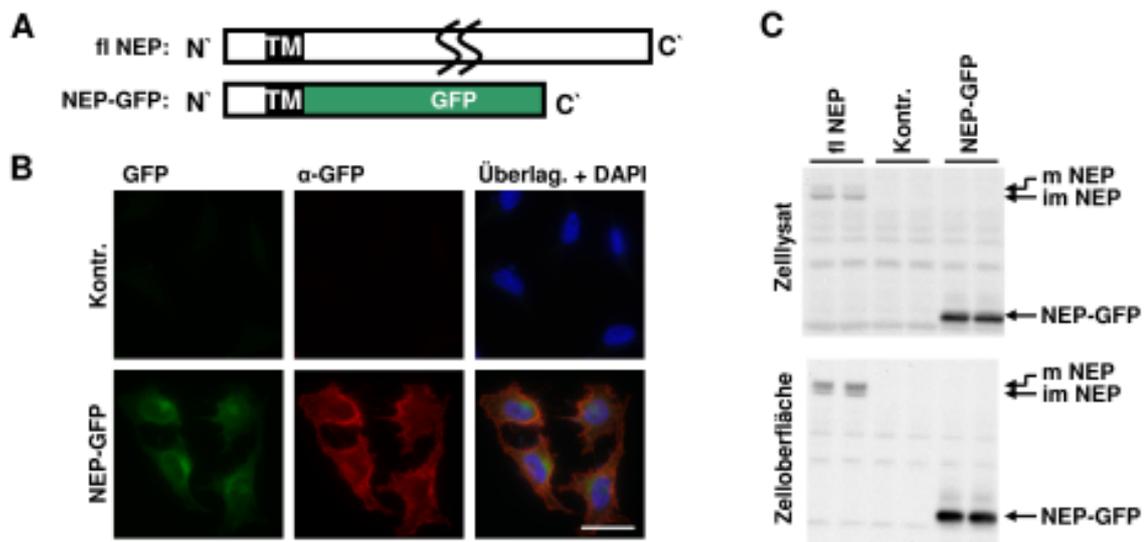
### 3.3 Subzelluläre Lokalisation von NEP-GFP

Da es nicht möglich war NEP wt stabil in HEK293 Zellen zu exprimieren und um die Funktion der NEP intrazellulären Domäne unabhängig von der extrazellulären, katalytischen Domäne zu untersuchen, wurde ein NEP-GFP Konstrukt generiert, bei dem die extrazelluläre Domäne durch GFP ausgetauscht wurde (Abb. 3.3A). Mit diesem NEP-GFP Konstrukt war es möglich stabile Klone zu generieren.

Um zu testen, ob das NEP-GFP Fusionsprotein, wie NEP wt, an die Zelloberfläche transportiert wird, wurde spezifisch NEP-GFP an der Zelloberfläche von HEK293 Zellen, die NEP-GFP stabil exprimieren, immunzytochemisch nachgewiesen. Dazu wurde plasmamembranständiges NEP-GFP in nicht-permeabilisierten HEK293 Zellen mit einem GFP-spezifischen Primärantikörper und einem 594-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper markiert (Abb. 3.3B, rot). Zusätzlich wurden Zelloberflächenbiotinylierungsversuche durchgeführt (278). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl matures (m) NEP wt, als auch NEP-GFP an die Zelloberfläche transportiert werden (Abb. 3.3C unteres Bild).

NEP-GFP ist innerhalb der Zelle vornehmlich in retikulären und juxt nukleären Strukturen konzentriert, was auf eine Lokalisation im sekretorischen Transportweg (ER; Golgi-Apparat) hinweist (Abb. 3.3B, grün).

Insgesamt konnte hier nachgewiesen werden, dass der Austausch der NEP extrazellulären Domäne durch GFP den sekretorischen Transport an die Zelloberfläche nicht behindert.



### Abbildung 3.3: Subzelluläre Lokalisierung von NEP-GFP

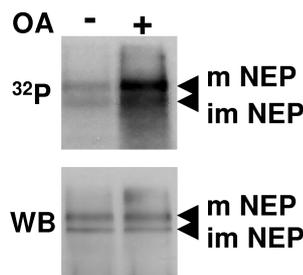
A) Schematische Darstellung von Vollängen-NEP (fl NEP) und NEP-GFP. Bei NEP-GFP wurde die extrazelluläre, katalytische Domäne gegen GFP ausgetauscht. TM = Transmembrandomäne. B) Die subzelluläre Lokalisierung von NEP-GFP wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Nicht-permeabilisierte HEK293 Zellen, die stabil NEP-GFP exprimieren bzw. untransfizierte Zellen (Kontrolle) wurden fixiert und Zelloberflächenlokalisierendes NEP-GFP wurde mit einem monoklonalen anti-GFP Antikörper und Alexa 594-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper immunzytochemisch gefärbt (rot). Der Skalierungsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . C) Zelloberflächenproteine von untransfizierten (Kontr.), NEP exprimierenden und NEP-GFP exprimierenden HEK293 Zellen wurden mit Sulfo-NHS-Biotin inkubiert, mit SA-Agarose präzipitiert und in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. NEP bzw. NEP-GFP wurden anschließend im WB durch spezifische Antikörper (anti-NEP bzw. anti-GFP) nachgewiesen. Bild oben: Gesamtlysat; Bild unten: SA-Agarose präzipitierte, Biotin markierte Zelloberflächenproteine.

## 3.4 Analyse der Phosphorylierung von NEP

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass NEP *in vitro* durch die Casein Kinase 2 phosphoryliert werden kann (18). Daher sollte im Folgenden die Phosphorylierung von NEP in kultivierten Zellen analysiert werden, um die *in vivo* beteiligten Enzyme und Faktoren zu identifizieren.

### 3.4.1 [ $^{32}\text{P}$ ]-Markierung von NEP in HEK293 Zellen (*in vivo* Phosphorylierung)

Die Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von NEP überexprimierenden HEK293 Zellen zeigt, dass sowohl immatures, als auch matures NEP in HEK293 Zellen phosphoryliert wird (Abb. 3.4, Spur 1). Die während der *in vivo* Phosphorylierung durchgeführte Behandlung der Zellen mit Okadasäure (OA) führt zu einer deutlich erhöhten Inkorporation von [ $^{32}\text{P}$ ] (Abb. 3.4, Spur 2). Da OA die Protein Phosphatasen 1 und 2A hemmt, scheint die Dephosphorylierung von NEP unter anderem durch die Protein Phosphatase 1 und / oder Phosphatase 2A zu erfolgen.



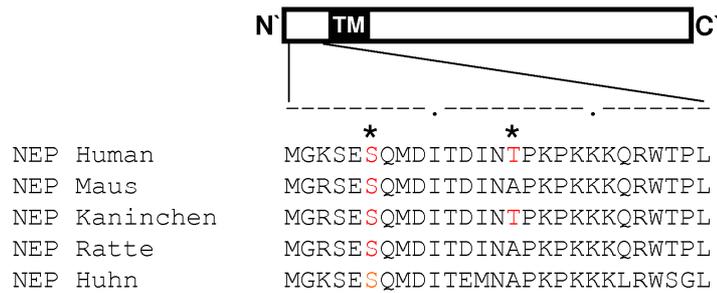
#### Abbildung 3.4: Phosphorylierung von exogen exprimiertem NEP in HEK293 Zellen

Um die Phosphorylierung von NEP *in vivo* zu untersuchen, wurde NEP transient in HEK293 Zellen überexprimiert und die Zellen für 3 h in Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat inkubiert. Um die Phosphatasen 1 und 2A zu inhibieren, wurden die Zellen für die letzten 2 h mit 0,5 μM Okadasäure (OA) behandelt (+; Spur 2). Anschließend wurden die Zellen lysiert, NEP-c-Myc mit einem spezifischen anti-c-Myc Antikörper immunpräzipitiert, im 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Die radioaktiven Signale wurden autoradiographisch detektiert (Bild oben; <sup>32</sup>P). NEP wurde anschließend durch einen spezifischen anti-NEP Antikörper nachgewiesen (Bild unten; WB).

#### 3.4.2 Identifizierung theoretischer Phosphorylierungsstelle von NEP

Zunächst wurde *in silico* nach potenziellen Phosphorylierungsstellen innerhalb der zytosolischen Domäne von NEP mit Hilfe des NetPhos 2.0 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)) gesucht. Dabei werden den möglichen Phosphorylierungsstellen Phosphorylierungswahrscheinlichkeitswerte zwischen 0 (unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) zugeordnet.

Als wahrscheinlichste Phosphorylierungsstellen wurden hierbei die Aminosäuren Serin 6 und Threonin 15 der zytoplasmatischen Domäne von NEP mit Werten von 0,976 bzw. 0,949 ermittelt. Im Gegensatz dazu wiesen die ermittelten Werte für Serin 4 (0,035), Threonin 11 (0,023) und Threonin 25 (0,141) darauf hin, dass diese Aminosäurereste wahrscheinlich nicht phosphoryliert werden. Ein Aminosäuresequenzvergleich der N-terminalen Domänen zeigt, dass Serin 6 in den Spezies Mensch, Maus, Kaninchen Ratte und Huhn konserviert ist, wohingegen Threonin 15 in Maus, Ratte und Huhn durch Alanin substituiert ist (Abb. 3.5).



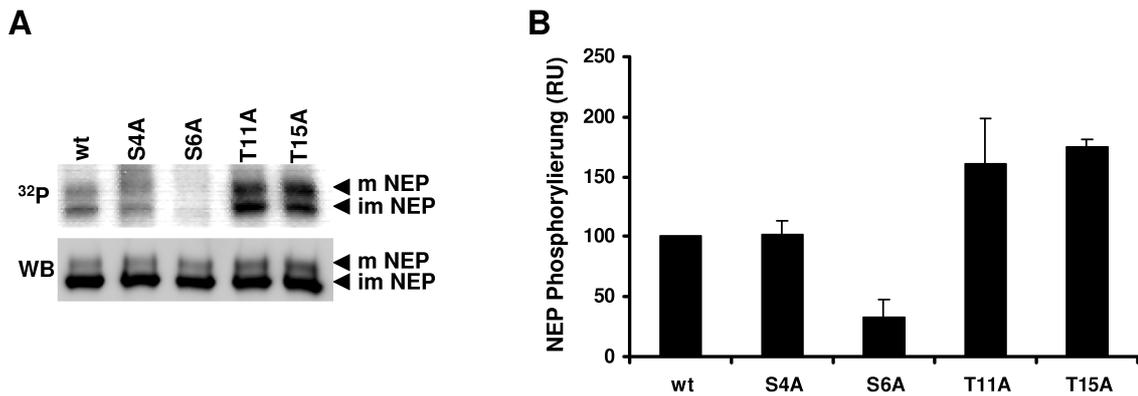
**Abbildung 3.5: Theoretisch bestimmte Phosphorylierungsstellen der zytosolischen Domäne von NEP**  
Die Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domäne von verschiedenen Spezies ist im Einbuchstaben-Code angegeben. Die mit dem NetPhos Server theoretisch bestimmten Phosphorylierungsstellen sind rot markiert.

### 3.4.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstelle von NEP

Um die Phosphorylierungsstelle in kultivierten Zellen zu bestimmen, wurden verschiedene Phosphorylierungsmutanten der zytoplasmatischen Domäne von NEP hergestellt. Die Phosphorylierung dieser Mutanten wurde anschließend in HEK293 Zellen analysiert.

Dazu wurden NEP wt und die NEP Phosphorylierungsmutanten S4A, S6A, T11A und T15A jeweils transient in HEK293 Zellen überexprimiert und *in vivo* phosphoryliert. Die Analyse der Ergebnisse zeigt, dass alle NEP Varianten *in vivo* phosphoryliert werden, wobei einzig die Phosphorylierung der S6A Mutante stark reduziert ist (Abb. 3.6). Die NEP Mutanten T11A und T15A zeigten eine, im Vergleich zu NEP wt, erhöhte Phosphat-Inkorporation.

Da die Substitution von Serin 6 zu Alanin eine 70%-ige Reduktion der NEP Phosphorylierung zur Folge hat, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei Serin 6 um die Hauptphosphorylierungsstelle handelt. Die Tatsache, dass Serin 6, im Gegensatz zu Threonin 15, in allen Spezies konserviert ist, könnte darauf hinweisen, dass dieser Aminosäurerest auch in anderen Spezies phosphoryliert wird.



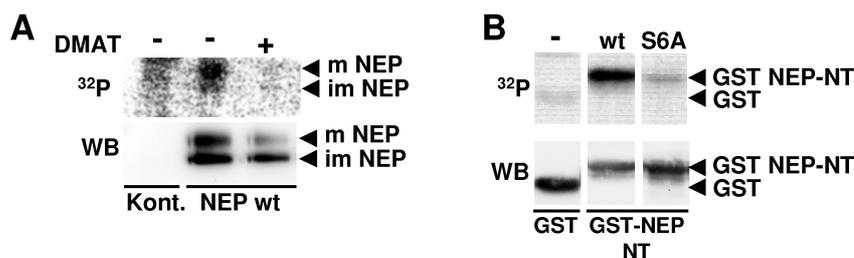
### Abbildung 3.6: Bestimmung der Phosphorylierungsstelle von NEP

Die NEP Phosphorylierungsmutanten wurden jeweils transient in HEK293 Zellen überexprimiert und die Zellen für 3 h in [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, NEP-c-Myc mit einem spezifischen anti-c-Myc Antikörper immunpräzipitiert, im 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Die radioaktiven Signale wurden autoradiographisch detektiert (Bild oben; <sup>32</sup>P). NEP wurde anschließend im WB durch einen spezifischen anti-NEP Antikörper nachgewiesen (Bild unten; WB). B) Densitometrische Quantifizierung (Mittelwert; Standardabweichung). n = 2; RU = Relative Einheiten.

#### 3.4.4 Identifizierung der NEP phosphorylierenden Kinase

Die Serin 6 umgebende Aminosäuresequenz entspricht der Konsensussequenz SXXE/D von CK2 (279). Um festzustellen, ob NEP von CK2 phosphoryliert wird, wurden NEP exprimierende HEK293 Zellen mit dem spezifischen CK2 Inhibitor 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT) behandelt und *in vivo* phosphoryliert. Die DMAT Behandlung führte zu einer deutlichen Reduktion der NEP Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.7A). Dies deutet auf eine Beteiligung von CK2 an der Phosphorylierung von NEP hin.

In folgenden *in vitro* Phosphorylierungsversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass CK2 die zytoplasmatische Domäne von NEP phosphoryliert. Durch die Substitution von Serin 6 durch Alanin, wird die Phosphorylierung fast vollständig unterdrückt (Abb. 3.7B). Diese Ergebnisse zeigen, dass CK2 *in vitro* spezifisch Serin 6 innerhalb der N-terminalen Domäne phosphoryliert.



**Abbildung 3.7: NEP Phosphorylierung durch CK2**

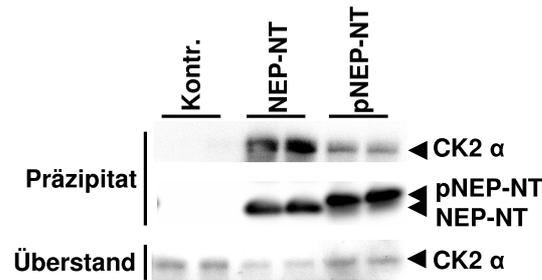
A) *In vivo* Phosphorylierung von exogen exprimiertem NEP. HEK293 Zellen, die NEP transient überexprimieren wurden *in vivo* phosphoryliert. Die Zellen wurden 1 h vor und während der *in vivo* Phosphorylierung in An- oder Abwesenheit von 30 µM DMAT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, NEP-c-Myc mit einem spezifischen anti-c-Myc Antikörper immunpräzipitiert, im 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. [<sup>32</sup>P] Inkorporation wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (Bild oben; <sup>32</sup>P). NEP wurde anschließend im WB durch einen spezifischen anti-NEP Antikörper nachgewiesen (Bild unten; WB). B) *In vitro* Phosphorylierung von GST-NEP N-terminaler Domäne Fusionsproteinen (GST-NEP-NT) durch CK2. GST, GST-NEP-NT wt und GST-NEP-NT S6A wurden jeweils mit [<sup>32</sup>P] ATP und CK2 bei 32°C inkubiert. Die GST Fusionsproteine wurden mittels GSH-Agarose isoliert und in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Ansonsten wurde wie unter A beschrieben verfahren, wobei die GST Fusionsproteine im WB durch einen spezifischen anti-GST Antikörper nachgewiesen wurden (Bild unten; WB).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Serin 6 innerhalb der N-terminalen Domäne wahrscheinlich die Hauptphosphorylierungsstelle von NEP darstellt und effektiv durch CK2 phosphoryliert wird. Die deutliche Verstärkung der Phosphatinkorporation nach Behandlung der Zellen mit Okadasäure deutet auf die Dephosphorylierung von NEP durch die Protein Phosphatasen 1 und / oder 2A hin.

### 3.4.5 Interaktion von CK2 mit der zytoplasmatischen Domäne von NEP

Nachdem eine selektive Phosphorylierung von NEP an Serin 6 durch CK2 gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob CK2 an die zytoplasmatische Domäne von NEP binden kann. Dafür wurde gereinigte CK2 mit der unphosphorylierten NEP N-terminalen Domäne (NEP-NT; synthetisches Peptid; AS 1-23 mit C-terminalem Lysin-Biotin) bzw. mit der Serin 6 phosphorylierten NEP N-terminalen Domäne (pNEP-NT; synthetisches Peptid; AS 1-23 mit C-terminalem Lysin-Biotin) inkubiert und die jeweiligen Biotin-konjugierten NEP N-terminalen Domänen anschließend mit SA-Agarose präzipitiert. Die Ergebnisse in Abbildung 3.8 zeigen eine ausgeprägte Kopräzipitation von CK2α mit der unphosphorylierten zytoplasmatischen Domäne von NEP aus dem Überstand, wohingegen die Interaktion von CK2α mit der an Serin 6 phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne deutlich reduziert ist.

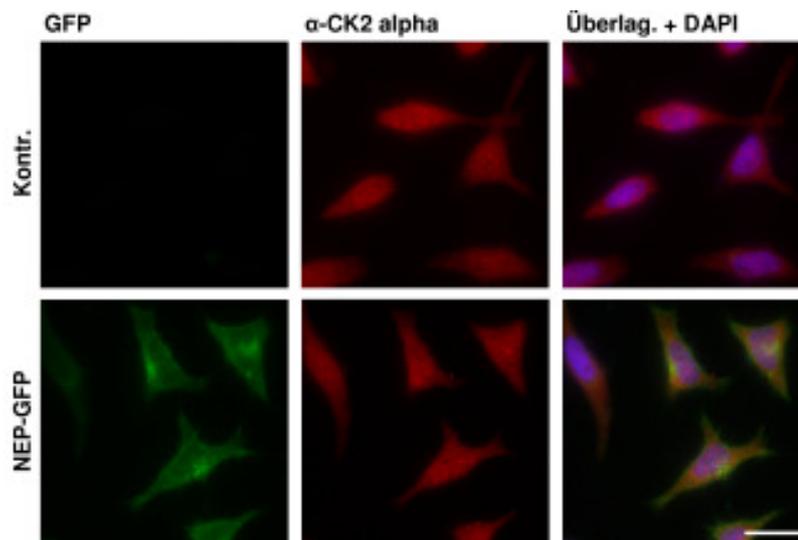
Des Weiteren wiesen NEP-NT und pNEP-NT Migrationsunterschiede im SDS-Polyacrylamidgel auf (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8: Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von NEP mit CK2 $\alpha$**

Unphosphorylierter (NEP-NT) bzw. phosphorylierter (pNEP-NT) C-Terminal biotinylierter NEP NT wurde zunächst mit SA-Agarose inkubiert und für 2 h mit CK2 (30 nM) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. CK2 wurde anschließend im WB durch einen spezifischen anti-CK2 $\alpha$  Antikörper nachgewiesen.

Um eine eventuelle Kolo-kalisation von CK2 $\alpha$  mit der zytoplasmatischen Domäne von NEP zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit dem NEP-GFP cDNS Konstrukt transfiziert (Abb. 3.3A) und endogenes CK2 $\alpha$  mit einem spezifischen Primärantikörper Immunfluoreszenz gefärbt.



**Abbildung 3.9: Kolo-kalisation von NEP-GFP und CK2 in HeLa Zellen**

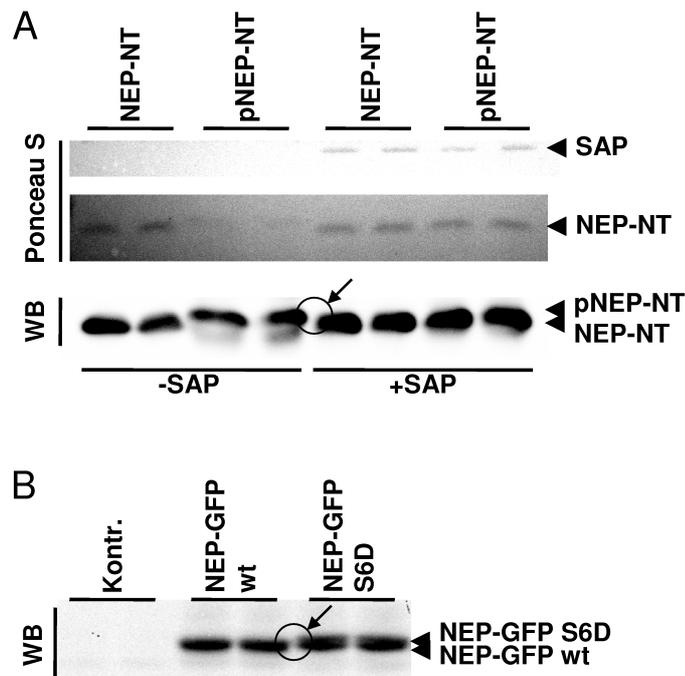
NEP-GFP transient exprimierende HeLa Zellen bzw. untransfizierte Zellen (Kontrolle) wurden fixiert und endogenes CK2 $\alpha$  wurde mit einem monoklonalen anti-CK2 $\alpha$  Antikörper und einem Alexa 594-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper immunzytochemisch gefärbt (rot). Der Skalierungsbalken entspricht 20  $\mu$ m.

Abbildung 3.9 zeigt, ebenso wie Abbildung 3.3B, NEP-GFP in retikulären und juxt nukleären Strukturen und an der Zelloberfläche, was auf eine Lokalisation im sekretorischen Transportweg (ER; Golgi-Apparat; Plasmamembran) hinweist, wohingegen CK2 $\alpha$ , wie in früheren Untersuchungen bereits beschrieben, diffus im Zytosol und innerhalb des Zellkerns verteilt ist (280). Es konnten somit keine spezifischen Strukturen

oder Zellorganellen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden, die eine deutliche NEP-GFP und CK2 $\alpha$  Kolokalisation aufweisen (Abb. 3.9).

### 3.5 Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf das Migrationsverhalten im SDS-Polyacrylamidgel

Die in Abbildung 3.8 beobachteten Migrationsunterschiede der unphosphorylierten und phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne von NEP im SDS-Polyacrylamidgel weisen auf eine Konformationsänderung der N-terminalen Domäne nach Phosphorylierung hin. Zudem wird das phosphorylierte NEP Peptid vergleichsweise schlecht durch Ponceau S angefärbt (Abb. 3.10A). Da Ponceau S an positiv geladene Aminosäureseitenketten bindet, könnte die 2-fach negativ geladene Phosphatgruppe des pNEP-NT die Ponceau S Bindung reduzieren.



**Abbildung 3.10: Verändertes Migrationsverhalten von pNEP-NT und NEP-GFP S6D im SDS-Polyacrylamidgel**

A) C-Terminal biotinylierte Varianten des unphosphorylierten und phosphorylierten NEP-NT (NEP-NT; pNEP-NT) wurden für 3 h in An- (-) und Abwesenheit (+) von SAP inkubiert und anschließend in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Die Proteine wurden anschließend auf der Membran mit Ponceau S angefärbt. NEP-NT und pNEP-NT wurden durch Streptavidin-HRP nachgewiesen. B) HEK293 Zellen, die stabil NEP-GFP wt bzw. NEP-GFP S6D exprimieren, wurden lysiert, die Proteine in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D wurden anschließend im WB durch einen spezifischen anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Migrationsunterschiede sind durch Pfeile/Kreise markiert.

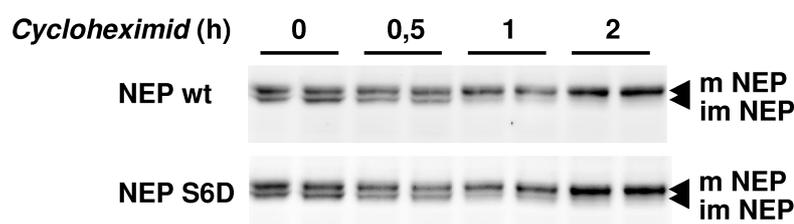
Nach Inkubation der phosphorylierten NEP N-terminalen Domäne mit SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) glich sich das Migrationsverhalten, sowie die Anfärbbarkeit mit Ponceau S wieder der nicht-phosphorylierten NEP N-terminalen Domäne an (Abb. 3.10A). Das veränderte Migrationsverhalten im SDS-Polyacrylamidgel konnte auch bei der pseudo-phosphorylierten NEP-GFP S6D Mutante im Vergleich zu NEP-GFP wt beobachtet werden (Abb. 3.10B). Auf Grund der Masse von etwa 35 kDa der Fusionsproteine, kann das veränderte Migrationsverhalten im Gel nicht durch den Masseunterschied von Serin und Aspartat erklärt werden.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die NEP Phosphorylierung zu einer SDS-resistenten Strukturveränderung der zytoplasmatischen Domäne von NEP führt.

### 3.6 Vergleich der Maturierung von NEP wt und NEP S6D

Die *in vivo* Phosphorylierung von NEP hat gezeigt, dass sowohl immatures NEP, als auch matures NEP phosphoryliert wird (Abb. 3.4A). Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob die N-Glykosylierung (Maturierung) von NEP durch die Phosphorylierung beeinflusst wird. Dazu wurden transient mit NEP wt bzw. NEP S6D transfizierte HEK293 Zellen mit Cycloheximid behandelt, um die Proteinbiosynthese zu hemmen.

Die Maturierung konnte im Folgenden anhand der Konversion der immaturen Bande (im NEP) in die mature Bande (m NEP) über die Zeit verfolgt werden. Nach Hemmung der Proteinbiosynthese benötigt NEP, wie in früheren Untersuchungen schon gezeigt (277), etwa zwei Stunden um vollständig zu maturieren. Die NEP S6D Mutante weist in Bezug auf die Maturierung keine erkennbaren Unterschiede zu NEP wt auf (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11: Maturierung von NEP wt und der NEP S6D Mutante in HEK293 Zellen**

A) Transient NEP wt bzw. NEP S6D exprimierende HEK293 Zellen wurden wie angegeben für unterschiedliche Zeiträume mit Cycloheximid behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. NEP wt und NEP S6D wurden anschließend im WB durch einen spezifischen anti-NEP Antikörper nachgewiesen.

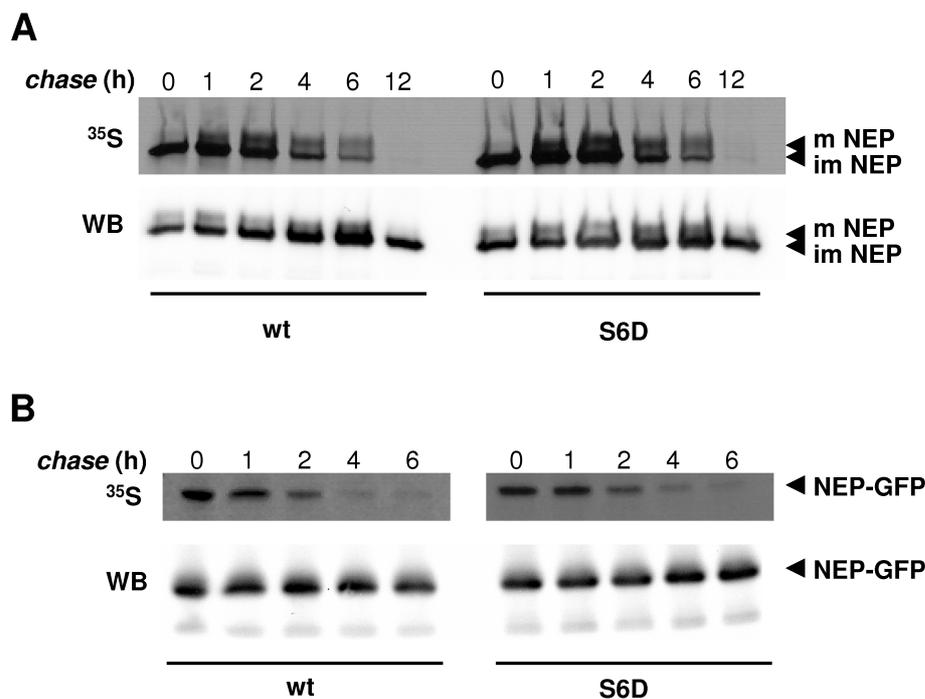
### 3.7 Untersuchung der Stabilität von NEP wt und NEP S6D

Da die Proteinphosphorylierung die Stabilität der jeweiligen Proteine beeinflussen kann (281, 282), wurde im Folgenden die Stabilität von NEP wt und der NEP S6D Mutante untersucht. Dazu wurden *Pulse Chase* Experimente mit transient NEP wt bzw. NEP S6D transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Nach 20-minütiger metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein, wurde der Abbau der NEP Varianten über die Zeit verfolgt. Dabei konnte kein Unterschied in der NEP S6D Proteinstabilität im Vergleich zu NEP wt beobachtet werden (Abb. 3.12A oben). Unmittelbar nach der Inkubation mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein-haltigem Medium ist ausschließlich immatures [<sup>35</sup>S]-markiertes NEP detektierbar (Abb. 3.12A; 0 h). Nach etwa zwei Stunden stellt sich ein Gleichgewicht zwischen immatorem und maturem [<sup>35</sup>S]-markiertem NEP ein. Dieses Verhältnis (mNEP / imNEP) verändert sich im Folgenden nicht wesentlich (Abb. 3.12A; 2 h; 4 h; 6 h), wobei die Gesamtmenge an [<sup>35</sup>S]-markiertem NEP abnimmt und nach 12 h kein markiertes NEP mehr detektierbar ist.

Da die Gesamtproteinexpression der transient exprimierten NEP Varianten über die *chase* Periode von 12 Stunden stark variierte (Abb. 3.12A; WB), wurde der Versuch zusätzlich mit stabil NEP-GFP wt bzw. NEP-GFP S6D exprimierenden HEK293 Zellen durchgeführt, die eine gleichbleibende Expression der NEP-GFP Varianten aufweisen (Abb. 3.12B; WB). Da NEP-GFP nicht glykosyliert wird, konnte keine Maturierung dieser NEP Varianten beobachtet werden. Des Weiteren konnten hier ebenfalls keine Unterschiede in der Proteinstabilität zwischen NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D festgestellt werden (Abb. 3.12B oben).

Die Maturierung von NEP in Cycloheximid behandelten Zellen (Abb. 3.11) weist Unterschiede zu der Maturierung von NEP in [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein markierten Zellen auf (Abb. 3.12A). Während NEP 2 h nach Beginn der Cycloheximid Behandlung vollständig maturiert ist, ist in [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein markierten Zellen die immature Bande bis zum vollständigen Abbau von NEP präsent (Abb. 3.12A; <sup>35</sup>S; 6 h). Ein Grund dafür könnte die Immunpräzipitation von NEP mit dem c-Myc Antikörper im *Pulse Chase* Experiment sein, da dieser präferenziell die immature Bande von NEP immunpräzipitiert und somit immatures NEP stärker anreichert als matures NEP.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung von NEP weder einen Einfluss auf die Maturierung noch auf die Stabilität von NEP hat.



**Abbildung 3.12: Stabilität von NEP, NEP-GFP und den jeweiligen S6D Mutanten**

A) *Pulse Chase* Experiment mit HEK293 Zellen, die transient NEP wt bzw. NEP S6D exprimieren. B) *Pulse Chase* Experiment mit HEK293 Zellen, die stabil NEP-GFP wt bzw. NEP-GFP S6D exprimieren.

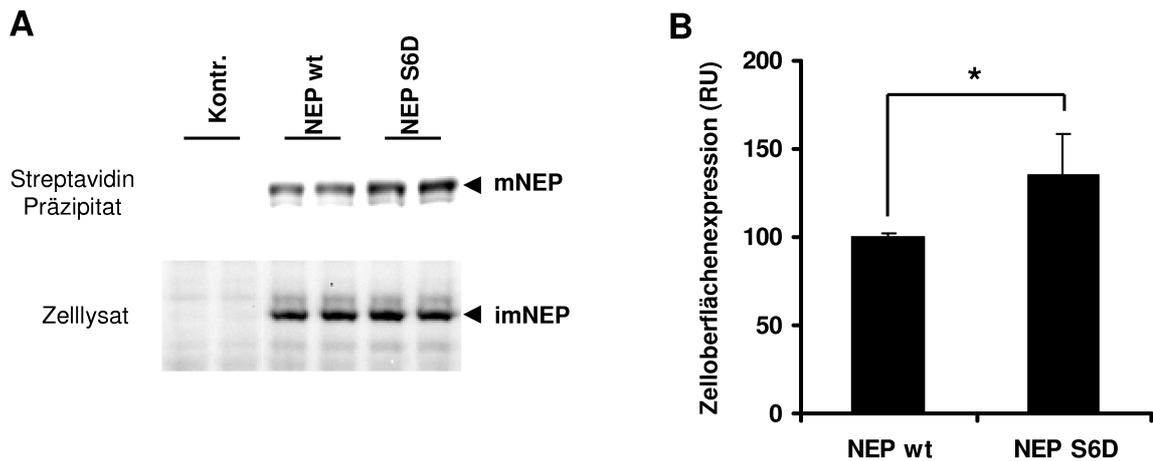
Die Zellen wurden in [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein-haltigem Medium für 20 min inkubiert (*pulse*) und anschließend mit nicht-markiertem Methionin/Cystein-haltigem Medium für die angegebenen Zeiträume inkubiert (*chase*). Die Zellen wurden anschließend lysiert und die jeweiligen Proteine immunpräzipitiert (NEP: anti-c-Myc Antikörper; NEP-GFP: anti-GFP Antikörper). Die immunpräzipitierten Proteine wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Die radioaktiven Signale wurden autoradiographisch detektiert (Bild oben; <sup>35</sup>S). NEP und NEP-GFP wurden anschließend im WB durch spezifische Antikörper nachgewiesen (NEP: anti-NEP Antikörper; NEP-GFP: anti-GFP Antikörper).

### 3.8 Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf seine subzelluläre Lokalisation

Die Regulation der Zelloberflächenexpression von NEP ist bisher weit gehend unbekannt. Allerdings konnte in primären Mausneuronen gezeigt werden, dass Somatostatin zu einer erhöhten NEP Zelloberflächenexpression führt (202). Dabei wurde postuliert, dass dies über posttranslationale Modifikation(en) von NEP geschehen könnte (202).

Um einen Einfluss der NEP Phosphorylierung auf die Zelloberflächenlokalisierung zu untersuchen, wurde NEP wt und die NEP S6D Mutante in HEK293 Zellen überexprimiert und Zelloberflächenproteine mit nicht-membrangängigem Sulfo-NHS-Biotin markiert (278). Nach SA-Präzipitation wurde das Verhältnis von Zelloberflächen exponiertem zu nicht-exponiertem NEP gebildet und die NEP Varianten miteinander verglichen.

Die Quantifizierung der Versuche in Abbildung 3.13B zeigt eine signifikante Erhöhung der Zelloberflächenlokalisierung der NEP S6D Mutante im Vergleich zu NEP wt um etwa 30%.



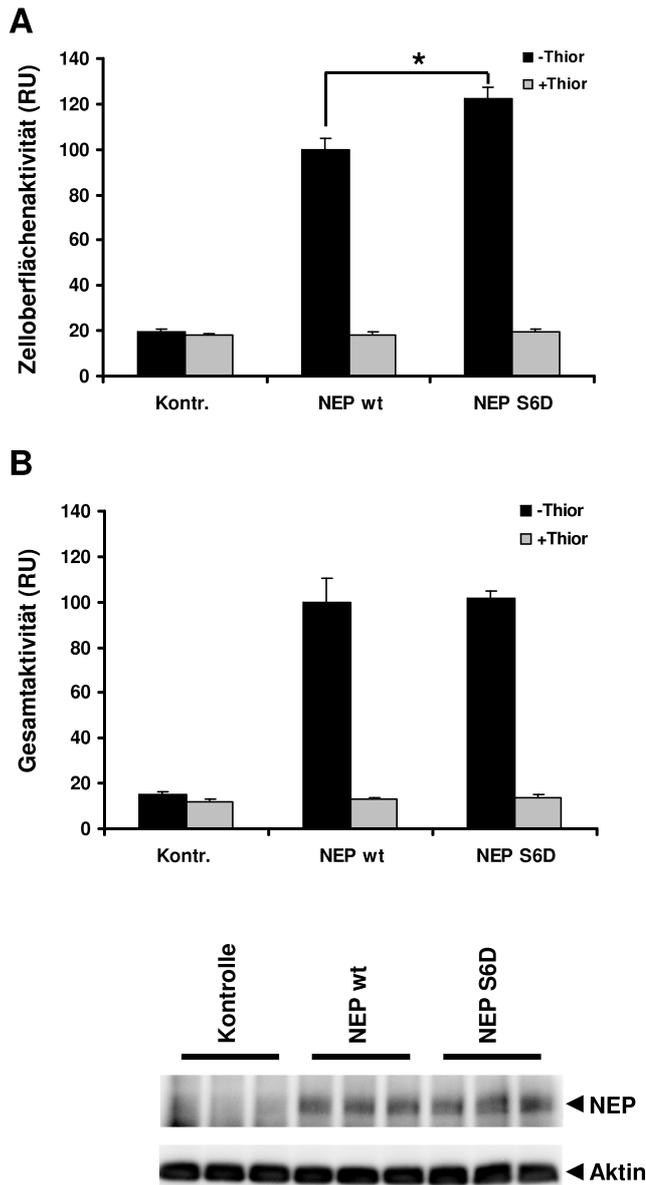
### Abbildung 3.13: Zelloberflächenlokalisierung von NEP in HEK293 Zellen

A) Zelloberflächenproteine von transient NEP wt bzw. NEP S6D exprimierenden HEK293 Zellen wurden mit Sulfo-NHS-Biotin markiert. Die Zellen wurden lysiert und Biotin-markierte Proteine mit SA-Agarose präzipitiert, in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Die Proteine wurden anschließend im WB durch einen spezifischen anti-c-Myc Antikörper nachgewiesen. B) Densitometrische Quantifizierung der WB Signale (Mittelwert; Standardabweichung); \* entspricht einem p-Wert < 0,05; n = 3; RU = relative Einheiten.

Um abzuklären, ob die NEP Phosphorylierung auch zu einer erhöhten Aktivität von NEP an der Zelloberfläche führt, wurde die Gesamtaktivität und die Oberflächenaktivität von ektopisch exprimiertem NEP wt und NEP S6D in HEK293 Zellen bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aspartat Mutante in Übereinstimmung mit den NEP Zelloberflächenlokalisationsversuchen eine um 23% erhöhte Zelloberflächenaktivität aufweist (Abb. 3.14A), wobei Gesamtaktivität und Gesamtexpression der beiden NEP Varianten sich nicht voneinander unterscheiden (Abb. 3.14B).

Die Ergebnisse deuten auf eine Regulation der Zelloberflächenlokalisierung von NEP durch dessen Phosphorylierung hin.



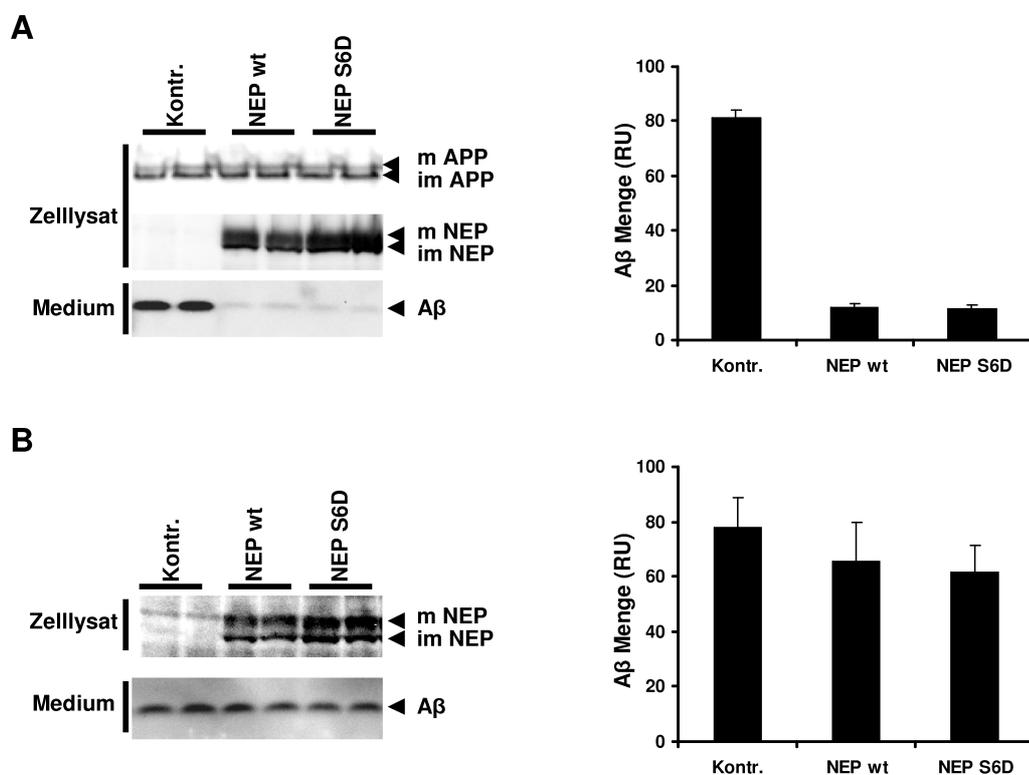
### Abbildung 3.14: Erhöhte Aktivität der NEP S6D Mutante an der Zelloberfläche

A) Die NEP Zelloberflächenaktivität von transient NEP wt bzw. NEP S6D exprimierende HEK293 Zellen wurden mit Hilfe des nicht-zellgängigen spezifischen NEP Substrats Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin gemessen (Mittelwert; Standardabweichung). \* entspricht einem p-Wert < 0,05; n = 6; RU = relative Einheiten. B) Um die NEP Gesamtaktivität zu messen, wurden die Zellen in Hypoton-Puffer lysiert und die NEP Gesamtaktivität mit dem spezifischen NEP Substrat Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin bestimmt (Mittelwert; Standardabweichung; n = 6). Um die Gesamtexpression von NEP wt und NEP S6D zu bestimmen, wurden Proteine aus Gesamtlysat in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. NEP und Aktin wurden anschließend im WB durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Phosphorylierung von NEP zu einer erhöhten Lokalisation von NEP an der Zelloberfläche führt. Dabei scheint die Gesamtaktivität von NEP nicht von der Phosphorylierung beeinflusst zu werden.

Da also weder die Stabilität, noch die Maturierung durch die Phosphorylierung beeinflusst werden, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete verstärkte Zelloberflächenlokalisation von NEP entweder durch einen verstärkten Transport zu der Plasmamembran und / oder einen verlängerten Verbleib an der Plasmamembran hervorgerufen wird.

Um den Abbau des Amyloid  $\beta$  Peptides durch die verschiedenen NEP Varianten zu untersuchen, wurden im Folgenden HEK293 Zellen, die das Amyloid Vorläuferprotein mit der schwedischen Mutation (APP<sup>sw</sup>) stabil überexprimieren mit der cDNS von NEP wt bzw. NEP S6D transfiziert. Die Ergebnisse in Abbildung 3.15A zeigen eine konstante APP<sup>sw</sup> Expression in den stabil transfizierten HEK293 Zellen (Spur 1-6, Bild oben). Im Kulturmedium von nicht transient transfizierten Zellen wird das A $\beta$  Peptid in das Kulturmedium sezerniert (Spur 1 und 2, Kontr.). Die transiente Transfektion der APP<sup>sw</sup> exprimierenden HEK293 Zellen mit NEP wt und NEP S6D cDNS (Spur 3-6) führt zu einer deutlichen Abnahme der A $\beta$  Konzentration im Kulturmedium.



### Abbildung 3.15: Abbau des A $\beta$ Peptides durch ektopisch exprimiertes NEP

A) APP<sup>sw</sup> stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden transient mit NEP wt bzw. NEP S6D cDNS transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h wurde A $\beta$  aus dem konditionierten Medium immunpräzipitiert, die präzipitierten Proteine wurde in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. A $\beta$  wurde mit einem spezifischen anti-A $\beta$  Antikörper nachgewiesen. Die Proteine des Zelllysats wurden ebenfalls getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. APP und NEP wurden anschließend im WB durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Rechts: Densitometrische Quantifizierung des A $\beta$  WB Signals (Mittelwert; Standardabweichung). B) APP<sup>sw</sup> stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit transient NEP wt bzw. NEP S6D exprimierenden HEK293 Zellen kokultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h wurde A $\beta$  aus dem konditionierten Medium immunpräzipitiert. Im Übrigen wurde wie unter A beschrieben verfahren. Rechts: Densitometrische Quantifizierung des A $\beta$  WB Signals (Mittelwert; Standardabweichung). Kontr. = untransfizierte Zellen. RU = relative Einheiten.

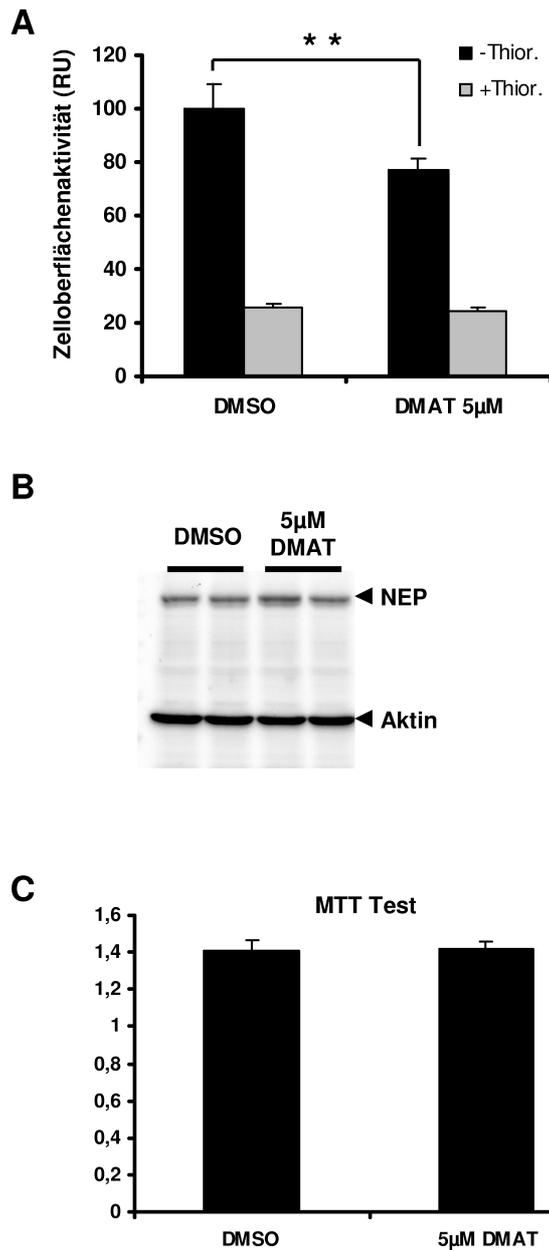
Um zu untersuchen, ob NEP wt und die NEP S6D Mutante sich im Abbau von extrazellulärem A $\beta$  unterscheiden, wurden stabil APP<sup>sw</sup> exprimierende Zellen zusammen mit transient NEP wt bzw. NEP S6D exprimierenden HEK293 Zellen kokultiviert. Hierbei konnte kein deutlicher NEP-spezifischer Abbau von extrazellulärem A $\beta$  beobachtet werden (Abb. 3.15B).

Die gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass in dem hier verwendeten Zellkulturmodell überexprimiertes NEP vornehmlich mit der Zelle assoziiertes A $\beta$  – also in sekretorischen/endozytotischen Vesikeln, in Golgi Kompartimenten und / oder direkt an der Plasmamembran – degradiert, während in das Medium abgegebenes A $\beta$  nicht bzw. nur langsam von NEP abgebaut wird.

### **3.9 CK2 abhängige Zelloberflächenaktivität von NEP in MEF Zellen**

Da NEP durch CK2 phosphoryliert wird, wurde im folgenden Versuch der Einfluss der CK2 Aktivität auf die NEP Zelloberflächenaktivität untersucht.

MEF Zellen, die endogen NEP exprimieren (Abb. 3.1A, B), wurden mit dem hochspezifischen CK2 Inhibitor DMAT behandelt. Wie in Abbildung 3.16A gezeigt ist, resultiert die CK2 Inhibition in einem Rückgang der Zelloberflächenaktivität von NEP um etwa 20%. Die während der Aktivitätsmessung durchgeführte Inkubation der MEF Zellen mit Thiorphan, führt zur Inhibition der Peptidaseaktivität von NEP (3.16A; +Thior.). Um eine mögliche Zytotoxizität des CK2 Inhibitors zu testen, wurde die Zellvitalität der MEF Zellen nach DMAT Behandlung durch Messung der Reduktionsäquivalente NADH/NADPH durch MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bestimmt (Abb. 3.16C). Dabei konnte kein Einfluss der CK2 Inhibition auf die Zellvitalität festgestellt werden. Da auch die Gesamtexpression von NEP nicht verändert war (Abb. 3.16B), kann von einem CK2-spezifischen Einfluss auf die NEP Zelloberflächenaktivität ausgegangen werden.

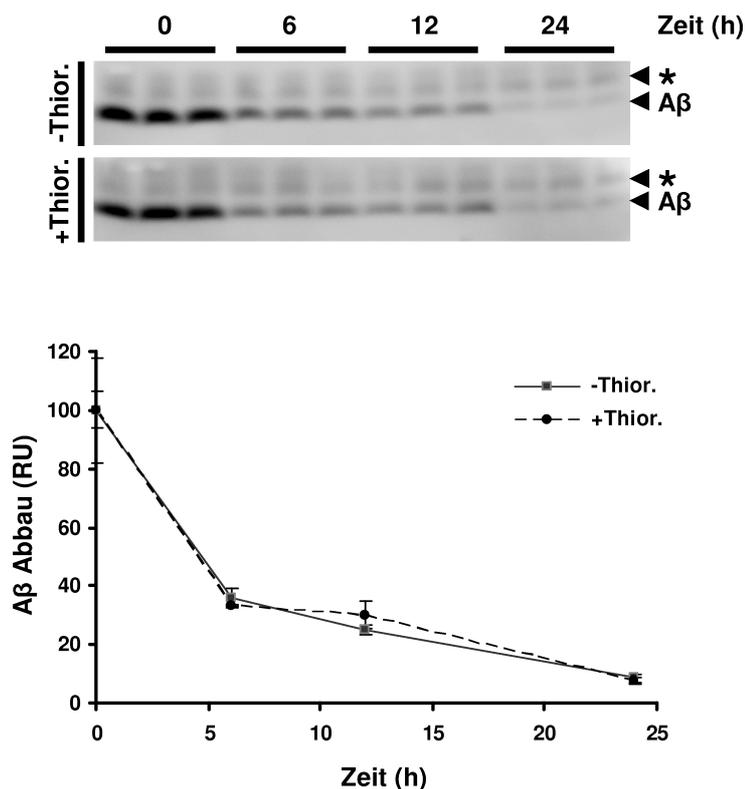


**Abbildung 3.16: Endogene Zelloberflächenaktivität von NEP in MEF Zellen**

A) Die Zelloberflächenaktivität von NEP in Anwesenheit und Abwesenheit von DMAT (5 µM; 24 h) wurde in MEF Zellen mit Hilfe des nicht zellgängigen spezifischen NEP Substrats Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin gemessen. Mittelwert; Standardabweichung; \*\* entspricht einem p-Wert < 0,01; n = 6; RU = relative Einheiten. B) Um die gesamt Expression von NEP in unbehandelten (DMSO) und DMAT behandelten MEF Zellen abzuschätzen, wurden die Membranproteine in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. NEP und Aktin wurden anschließend im WB durch spezifische Antikörper nachgewiesen. C) Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des MTT Tests (siehe Material und Methoden). (Mittelwert; Standardabweichung; n = 6)

Im Folgenden sollte ein eventueller Einfluss der CK2 Aktivität auf den extrazellulären A $\beta$  Abbau durch endogenes NEP in MEF Zellen untersucht werden.

Dazu wurde zunächst der Beitrag von endogenem NEP am Abbau von extrazellulärem A $\beta$  bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 3.17 zeigen, dass durch die spezifische Inhibition von NEP durch Thiorphan der extrazelluläre A $\beta$  Abbau nicht signifikant beeinflusst wird. Somit scheint endogenes NEP in MEF Zellen in dem hier verwendeten Zellkulturmodell nicht wesentlich zum Abbau von extrazellulärem A $\beta$  beizutragen. Dies ist in Übereinstimmung mit den in Abbildung 3.15B gezeigten Daten, die keinen NEP wt bzw. NEP S6D spezifischen Abbau von extrazellulärem A $\beta$  im Kulturmedium zeigen.



### Abbildung 3.17: Abbau von extrazellulärem A $\beta$ durch MEF Zellen

MEF Zellen wurden in Grundmedium mit A $\beta$ 40 (125 nM) in An- und Abwesenheit von Thiorphan (-/+Thior.) inkubiert. Nach 0, 6, 12 und 24 h wurde jeweils eine 20  $\mu$ l Probe des Mediums genommen. Die Proteine wurden in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. A $\beta$  wurde mit einem spezifischen anti-A $\beta$  Antikörper nachgewiesen. Unten: Densitometrische Quantifizierung des A $\beta$  WB Signals (Mittelwert; Standardabweichung). \* = A $\beta$  Dimer; n = 3; RU = relative Einheiten.

Die Beobachtung, dass Thiorphan keinen signifikanten Effekt auf den Abbau von A $\beta$  hat, weist auf einen NEP unabhängigen extrazellulären A $\beta$  Abbau in dem hier verwendeten Zellkulturmodell hin. Deshalb konnte hier der NEP-spezifische Abbau von extrazellulärem A $\beta$  nicht in Abhängigkeit von der CK2 Aktivität untersucht werden.

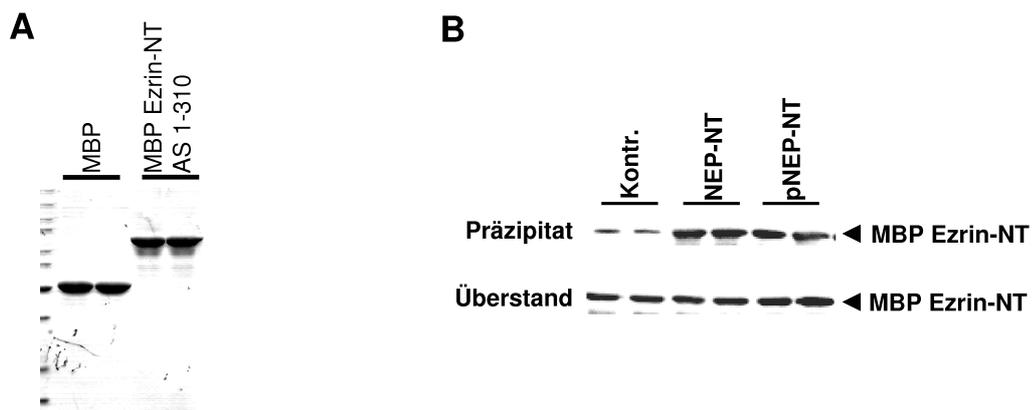
### 3.10 Effekt der Phosphorylierung von NEP auf die Interaktion mit Ezrin

Die zytoplasmatische N-terminale Domäne von NEP interagiert mit den F-Aktin bindenden Strukturproteinen Ezrin, Radixin und Moesin. Die ERM Proteine besitzen zueinander hochhomologe N-terminale Regionen, welche die Interaktion mit NEP vermitteln (17, 210, 283).

Zwei Bereiche innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von NEP wurden als mögliche ERM Bindestellen vorgeschlagen, wobei die Aminosäuresequenz <sup>8</sup>MDITDIN<sup>14</sup> in der Nähe der NEP Phosphorylierungsstelle als wahrscheinliche ERM Bindestelle nachgewiesen wurde (17, 210).

Zunächst wurde der Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf die Interaktion mit Ezrin analysiert.

Dazu wurde ein Maltose-Bindungsprotein (MBP) Fusionsprotein der NEP bindenden N-terminalen Domäne von Ezrin (MBP Ezrin-NT) hergestellt (Abb. 3.18A). MBP Ezrin-NT wurde anschließend mit dem unphosphorylierten (NEP-NT) bzw. phosphorylierten (pNEP-NT) zytosolischen Teil von NEP inkubiert. In Abbildung 3.18B ist zu erkennen, dass das MBP Ezrin-NT Fusionsprotein sowohl mit NEP-NT, als auch mit pNEP-NT kopräzipitiert.



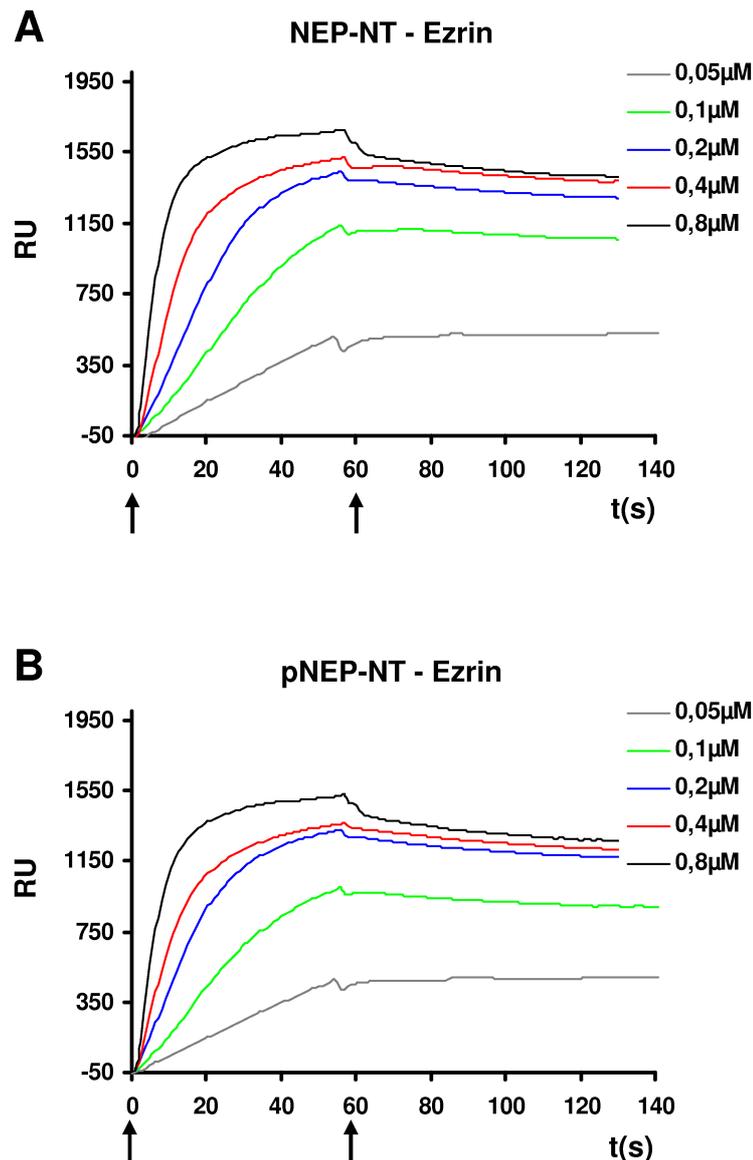
**Abbildung 3.18: Direkte Interaktion der N-terminalen Domäne von NEP mit Ezrin**

A) MBP bzw. MBP Ezrin N-terminale Domäne (MBP Ezrin-NT) Fusionsprotein wurde in *E.coli* DH5 $\alpha$  exprimiert und über Amylose-Agarose gereinigt. Je 2  $\mu$ g des gereinigten Proteins wurde auf einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend Coomassie gefärbt. B) C-Terminal biotinylierte Varianten der unphosphorylierten und phosphorylierten NEP N-terminalen Domäne (NEP-NT; pNEP-NT) wurden an SA-Agarose gebunden und für 2 h mit 100 nM MBP Ezrin-NT inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. MBP Ezrin-NT wurde anschließend im WB durch einen anti-MBP Antikörper nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) von Ezrin und der phosphorylierten bzw. unphosphorylierten NEP N-terminalen Domäne wurden Oberflächen-Plasmon-Resonanz Messungen durchgeführt. Dazu wurden biotinyliertes NEP N-terminales Peptid (NEP-NT) und biotinyliertes NEP N-terminales Phosphopeptid (pNEP-NT) an separate Flusszellen eines Streptavidin Chips (SA-Chip; Biacore) gekoppelt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen des MBP Ezrin-NT Fusionsproteins auf den SA-Chip appliziert (Abb. 3.19A, B).

Die Auswertung der Bindungskurven ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_D \sim 5,8$  nM für NEP-NT und  $K_D \sim 5,9$  nM für pNEP-NT (Abb. 3.19A, B).

Bei der zur Kontrolle durchgeführten Applikation von 0,8  $\mu$ M MBP auf den Peptid gekoppelten SA-Chip wurde keine MBP – NEP-NT bzw. MBP – pNEP-NT Interaktion festgestellt.



**Abbildung 3.19: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der NEP – Ezrin Interaktion**

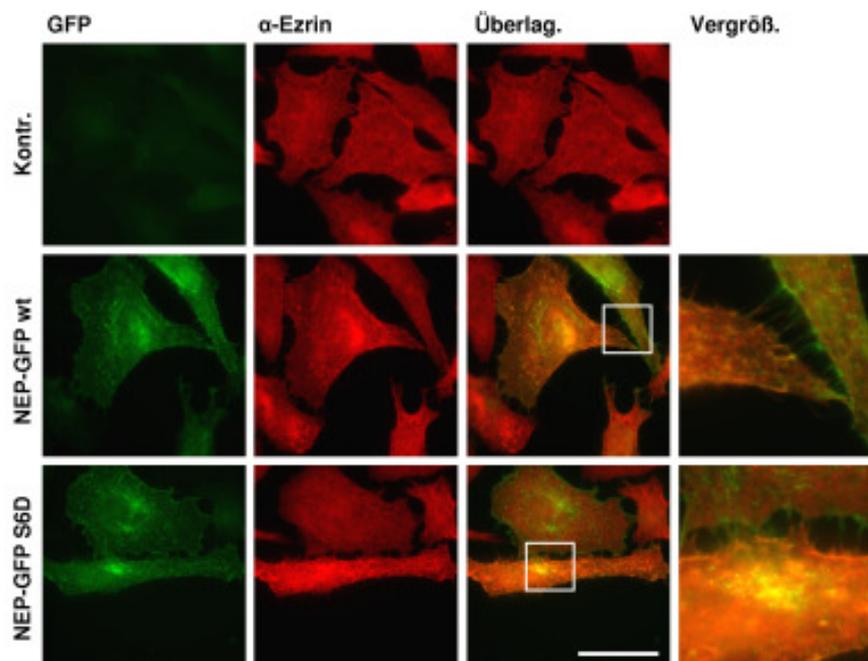
C-Terminal biotinylierte Varianten (nicht-phosphoryliert; phosphoryliert) der NEP N-terminalen Domäne (NEP-NT; pNEP-NT) wurden auf einem SA-Chip (Biacore) gekoppelt. Verschiedene Konzentrationen (0,05  $\mu\text{M}$  – 0,8  $\mu\text{M}$ ) des MBP Ezrin-NT Fusionsproteins wurden über einen Zeitraum von 60 s und einer Flussgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf den Chip appliziert. A) Bindungskurven der NEP-NT – MBP Ezrin-NT Interaktion. B) Bindungskurven der pNEP-NT – MBP Ezrin-NT Interaktion (RU = Resonanz Einheiten; t(s) = Zeit in Sekunden;  $\uparrow$  = Start bzw. Stopp der MBP Ezrin-NT Fusionsprotein Applikation).

Im Folgenden wurde der Einfluss der NEP Phosphorylierung auf die Bindung von Ezrin in kultivierten Zellen untersucht.

Dazu wurden HeLa Zellen mit NEP-GFP wt bzw. mit der NEP-GFP S6D Mutante transfiziert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde endogenes Ezrin immunzytochemisch gefärbt.

Die Auswertung zeigt eine gleichmäßige Verteilung von Ezrin in der gesamten Zelle mit vereinzelt Verdichtungen an der Plasmamembran und an Plasmamembranausläufern

(Abb. 3.20; roter Kanal). Sowohl NEP-GFP wt, als auch NEP-GFP S6D exprimierende Zellen weisen Plasmamembranbereiche auf, in denen GFP-Fusionsproteine mit Ezrin kolokalisieren (Abb. 3.20; Überlagerung). Es konnte demnach kein deutlicher Unterschied in der Verteilung von Ezrin in NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D exprimierenden Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 3.20: Kolokalisation von NEP-GFP Varianten mit Ezrin**

NEP-GFP wt bzw. NEP-GFP S6D transient exprimierende HeLa Zellen bzw. untransfizierte Zellen (Kontr.) wurden fixiert und endogenes Ezrin wurde mit monoklonalem anti-Ezrin Antikörper und Alexa 594-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper (rot) immunzytochemisch gefärbt. Der Skalierungsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass die NEP Phosphorylierung trotz der unmittelbaren Nähe der Phosphorylierungsstelle (Serin 6) zu der wahrscheinlichen Ezrin Bindestelle ( $^8\text{MDITDIN}^{14}$ ) *in vitro* keinen Effekt auf die NEP – Ezrin Interaktion hat. Des Weiteren weisen die Immunfluoreszenzdaten darauf hin, dass die NEP Phosphorylierung auch *in vivo* keinen erkennbaren Einfluss auf die Ezrin Bindung hat.

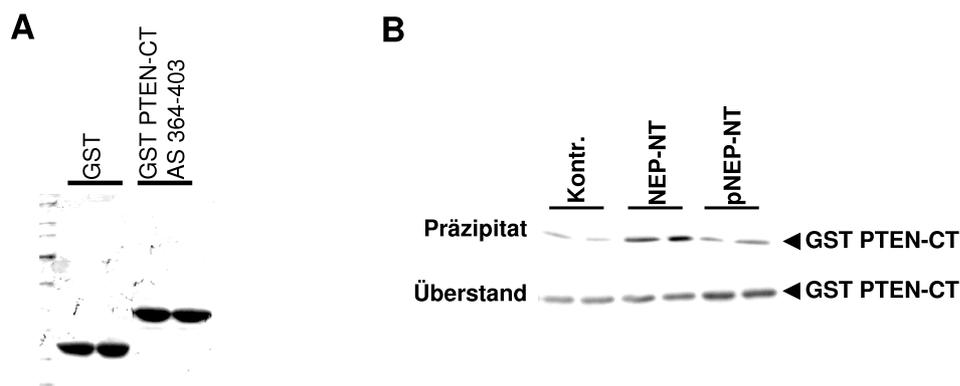
### 3.11 Effekt der Phosphorylierung von NEP auf die Interaktion mit PTEN

Ein weiterer zytosolischer Interaktionspartner von NEP ist der Tumorsuppressor PTEN, dessen C-terminale Domäne mit dem basischen Bereich ( $^{19}\text{KKK}^{21}$ ) der NEP N-terminalen Domäne interagiert (19).

Um einen eventuellen Einfluss der NEP Phosphorylierung auf diese Bindung zu untersuchen, wurden zunächst Kopräzipitationsversuche durchgeführt.

Dazu wurde ein Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein der C-terminalen Domäne von PTEN (GST PTEN-CT; Abb. 3.21A) hergestellt und mit den biotinylierten Peptiden NEP-NT bzw. pNEP-NT inkubiert und mit SA-Agarose präzipitiert.

Die Ergebnisse der NEP – PTEN Kopräzipitation in Abbildung 3.21B zeigen, dass im Vergleich zu NEP-NT deutlich weniger GST PTEN-CT an das phosphorylierte NEP-NT Peptid bindet.



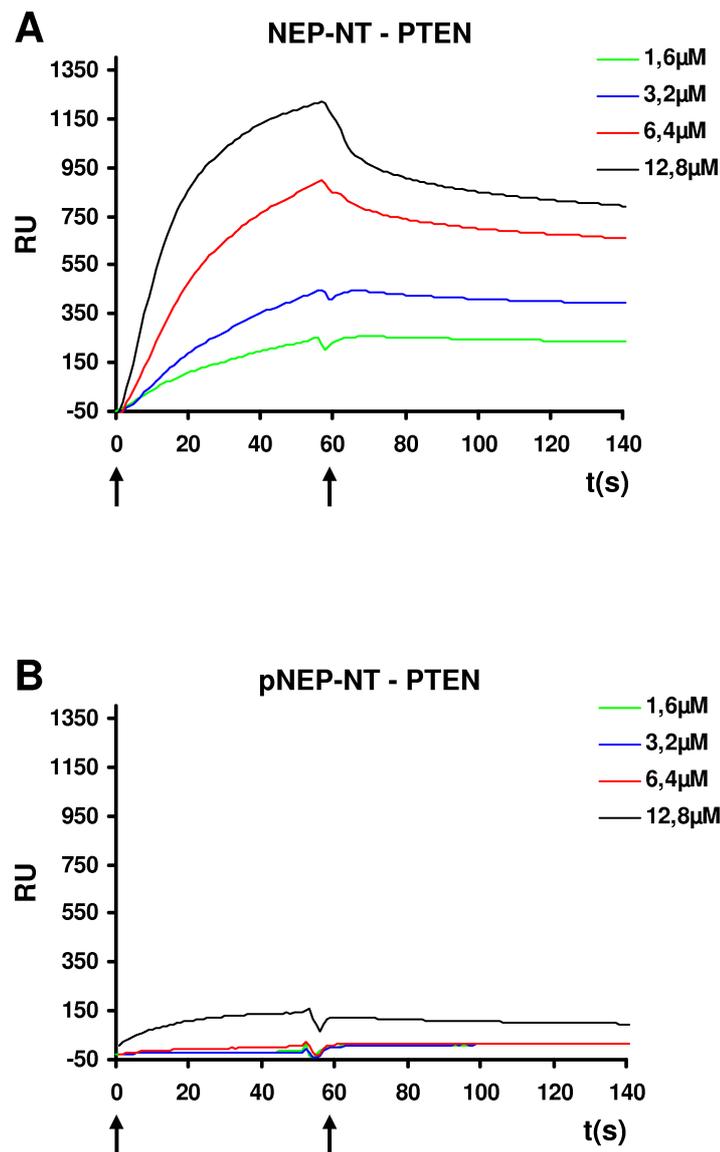
**Abbildung 3.21: Direkte Interaktion der NEP N-terminalen Domäne mit PTEN**

A) GST bzw. GST PTEN C-terminale Domäne (GST PTEN-CT) Fusionsprotein wurde in *E.coli* DH5 $\alpha$  exprimiert und über Glutathion-Agarose gereinigt. Je 2  $\mu$ g des gereinigten Proteins wurde in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend Coomassie gefärbt. B) C-Terminal biotinylierte Varianten der unphosphorylierten und phosphorylierten N-terminalen Domäne von NEP (NEP-NT; pNEP-NT) wurden an SA-Agarose gebunden und für 2 h mit 2  $\mu$ M GST PTEN-CT inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. GST PTEN-CT wurde anschließend im WB durch einen anti-PTEN Antikörper nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) von PTEN und phosphorylierter bzw. unphosphorylierter zytoplasmatischer Domäne von NEP wurden erneut SPR-Messungen durchgeführt. Dazu wurden biotinyliertes NEP N-terminales Peptid (NEP-NT) und biotinyliertes NEP N-terminales Phosphopeptid (pNEP-NT) an separate Flusszellen eines Streptavidin Chips (SA-Chip; Biacore) gekoppelt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen des GST PTEN-CT Fusionsproteins auf den SA-Chip appliziert (Abb. 3.22A, B).

Die Auswertung der Bindungskurven ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_D \sim 0,71 \mu$ M für NEP-NT, wohingegen der  $K_D$ -Wert für die GST PTEN-CT – pNEP-NT Bindung auf Grund der schwachen Interaktion nicht ermittelt werden konnte.

Bei der zur Kontrolle durchgeführten Applikation von 12,8  $\mu$ M GST wurde keine GST – NEP-NT bzw. GST – pNEP-NT Interaktion festgestellt.



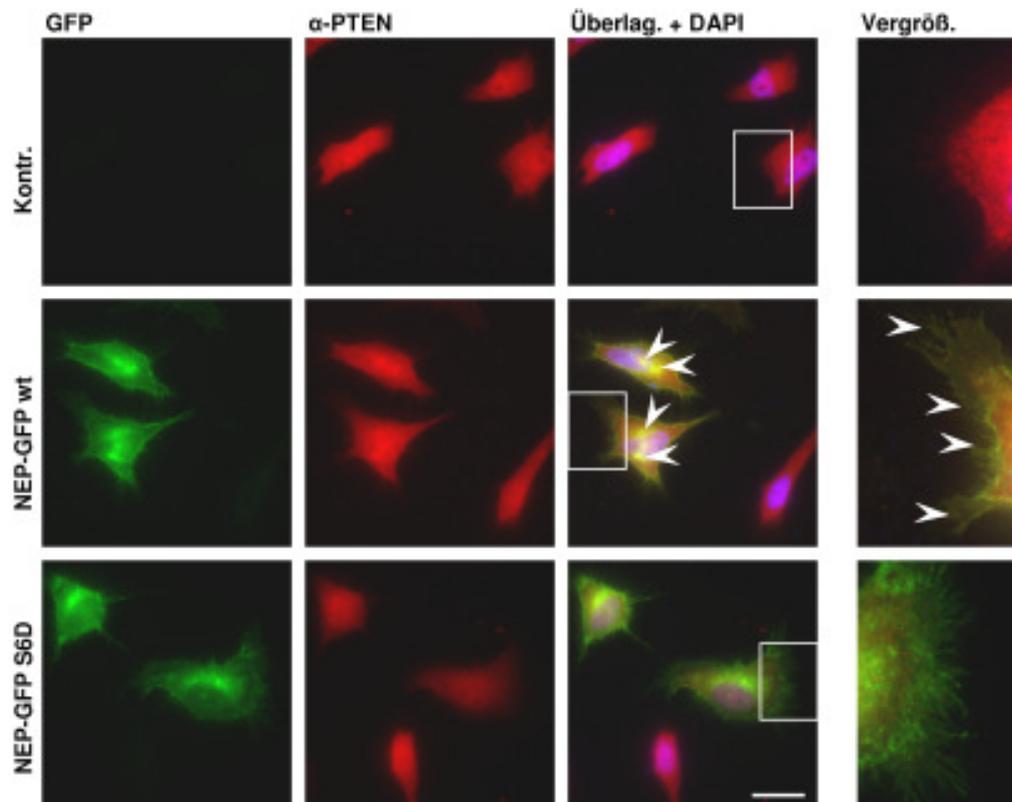
**Abbildung 3.22: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der NEP – PTEN Interaktion**

C-Terminal biotinylierte Varianten (nicht-phosphoryliert; phosphoryliert) der NEP N-terminalen Domäne (NEP-NT; pNEP-NT) wurden auf einem SA-Chip (Biacore) gekoppelt. Verschiedene Konzentrationen (1,6  $\mu\text{M}$  – 12,8  $\mu\text{M}$ ) des GST PTEN-CT Fusionsproteins wurden über einen Zeitraum von 60 s und einer Flussgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf den Chip appliziert. A) Bindungskurven der NEP-NT – GST PTEN-CT Interaktion. B) Bindungskurven der pNEP-NT – GST PTEN-CT Interaktion (RU = Resonanz Einheiten; t(s) = Zeit in Sekunden;  $\uparrow$  = Start bzw. Stopp der GST PTEN-CT Fusionsprotein Applikation).

Nachfolgend wurde der Einfluss der NEP Phosphorylierung auf die PTEN Bindung in der Zelle analysiert.

Dazu wurde NEP-GFP wt bzw. NEP-GFP S6D in HeLa Zellen transient exprimiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde endogenes PTEN immunzytochemisch gefärbt. In nicht-transfizierten Zellen ist PTEN wie bereits beschrieben, sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus lokalisiert (284, 285) (Abb. 3.23; obere Bildreihe). Die Überexpression von NEP-GFP S6D bewirkt im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen keine Veränderung der PTEN Lokalisation (Abb. 3.23; untere Bildreihe). Im Gegensatz dazu

führt die Überexpression von NEP-GFP wt zu einer Umverteilung von PTEN in der Zelle. Es ist eine deutliche Kolokalisation von PTEN mit NEP-GFP wt in juxtannukleären Strukturen zu erkennen. Des Weiteren kolokalisiert NEP-GFP wt mit PTEN an der Plasmamembran (Abb. 3.23; Pfeile mittlere Bildreihe).



**Abbildung 3.23: Kolokalisation von NEP-GFP wt mit PTEN**

NEP-GFP wt bzw. NEP-GFP S6D transient exprimierende HeLa Zellen bzw. untransfizierte Zellen (Kontr.) wurden fixiert und endogenes PTEN wurde mit ployklonalem anti-PTEN Antikörper und Alexa 594-konjugiertem anti-Kaninchen Sekundärantikörper (rot) immunzytochemisch gefärbt. Der Skalierungsbalken entspricht 20 µm.

Bereits durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass die ektopische Expression von NEP zu einer Stabilisierung und damit einhergehender Erhöhung der PTEN Konzentration führt (19). Zwar scheint auch bei den hier gezeigten Immunfluoreszenzen die PTEN Konzentration in NEP-GFP wt exprimierenden Zellen erhöht zu sein (Abb. 3.23; mittlere Bildreihe), jedoch konnte dies in WB Analysen nicht bestätigt werden (nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte hier durch biochemische und zellbiologische Techniken gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von NEP zu einer fast vollständigen Inhibition der NEP – PTEN Bindung führt.

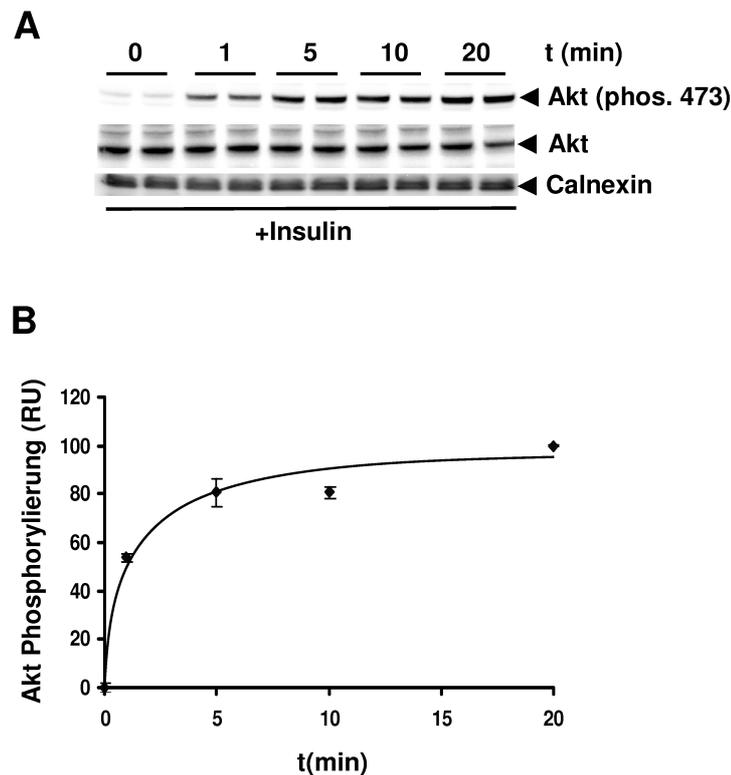
### 3.12 Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf die Aktivierung von Akt

Durch die direkte Interaktion von PTEN mit Membranlipiden wie Phosphatidylserin und Phosphatidylinositolphosphaten und dem Transmembranprotein NEP kann PTEN an die Plasmamembran rekrutiert werden und dort als Lipidphosphatase durch die Dephosphorylierung von  $PI(3,4,5)P_3$  zu  $PI(4,5)P_2$  der Wirkung der Phosphoinositid 3-Kinase direkt entgegen wirken (19, 219, 223, 284, 285). PI3K bindet unter anderem an bestimmte aktivierte Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) wie den Insulin Rezeptor oder IGF-1 Rezeptor und wird dadurch selbst aktiviert. Die daraus resultierende Erhöhung der  $PI(3,4,5)P_3$  Konzentration führt zur Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran und anschließender Phosphorylierung / Aktivierung von Akt (256, 259, 260, 262, 286).

Als PI3K Antagonist führt die NEP vermittelte verstärkte PTEN Rekrutierung an die Plasmamembran zu einer Verringerung der Akt Phosphorylierung / Aktivierung (19).

In einem ersten Schritt wurde zunächst die Phosphorylierung von Akt an Serin 473 nach Insulinbehandlung über die Zeit ermittelt. Dazu wurden HEK293 Zellen mit Insulin behandelt und anschließend die Akt Phosphorylierung mit Hilfe eines spezifischen anti-Akt Phosphoserin 473 Antikörpers nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmt. In Abbildung 3.24 ist zu erkennen, dass bereits eine Minute nach Behandlung mit Insulin 50% der maximalen Akt Phosphorylierung erreicht wurden. Die maximale Phosphorylierung erfolgte nach etwa 5 bis 10 Minuten und bleibt über den getesteten Zeitraum konstant (Abb. 3.24A, B).

Um den Einfluss auf die maximale Akt Aktivierung zu untersuchen, wurde im Folgenden die Phosphorylierung von Akt 20 Minuten nach Insulinbehandlung untersucht.



**Abbildung 3.24: Zeitabhängige Phosphorylierung von Akt nach Behandlung von HEK293 Zellen mit Insulin**

A) HEK293 Zellen wurden für 16 h in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiteinheiten mit 100 nM Insulin behandelt. Die Zellen wurden lysiert, das Gesamtlysate wurde in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Akt Phosphoserin 473, Akt und Calnexin wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern im WB nachgewiesen. B) Densitometrische Quantifizierung des anti-Akt Phosphoserin 473 WB Signals (Mittelwert; Standardabweichung). n = 4; RU = relative Einheiten; t(min) = Zeit in Minuten

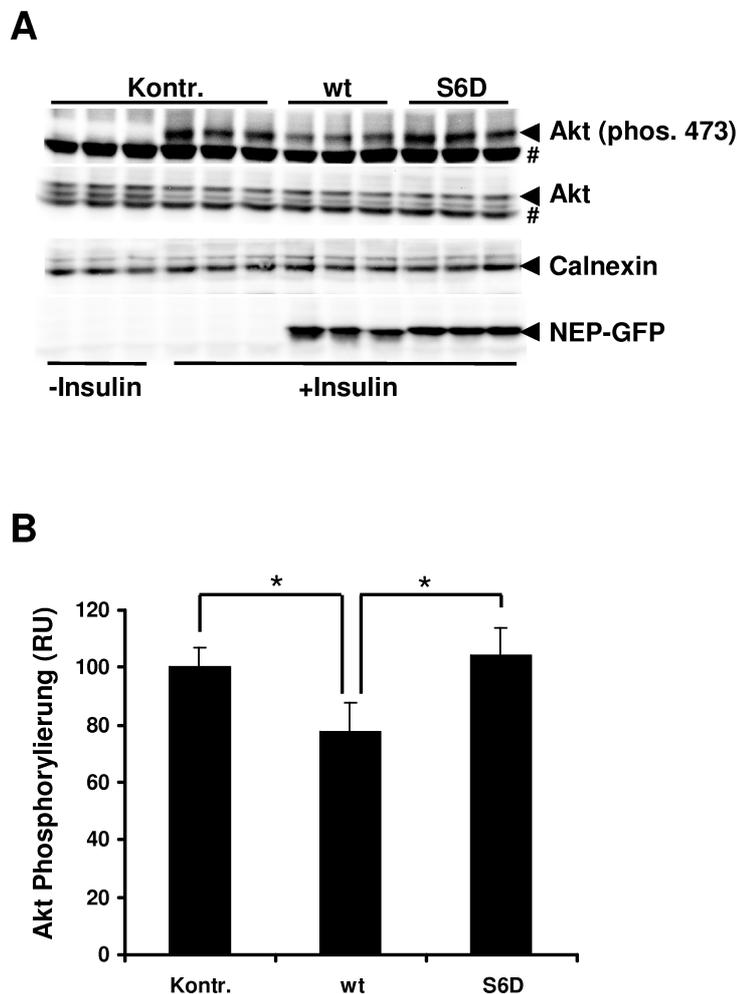
Wie oben beschrieben, konnte eine NEP vermittelte Inhibition der Akt Aktivierung mittels PTEN in früheren Untersuchungen bereits gezeigt werden (19).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von NEP Einfluss auf die NEP vermittelte Inhibition der Aktivierung von Akt hat. Dazu wurden HEK293 Zellen, die NEP-GFP wt bzw. die NEP-GFP S6D stabil exprimieren, mit Insulin behandelt und die Phosphorylierung von Akt an Serin 473 als Maß für dessen Aktivierung bestimmt.

Durch die Behandlung der Zellen mit Insulin konnte eine deutliche Akt Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.25; Spuren 1-6). Die Expression von NEP-GFP wt führt zu einer signifikanten Reduktion der Akt Phosphorylierung um ca. 23% (Abb. 3.25; Spur 7-9). Dahingegen wirkt sich die Expression der NEP-GFP S6D Mutante nicht auf die Akt Phosphorylierung aus (Abb. 3.25; Spur 10-12).

Dies deutet darauf hin, dass nach NEP Phosphorylierung keine NEP vermittelte PTEN Rekrutierung an die Plasmamembran stattfindet. Somit ist dieses Ergebnis in

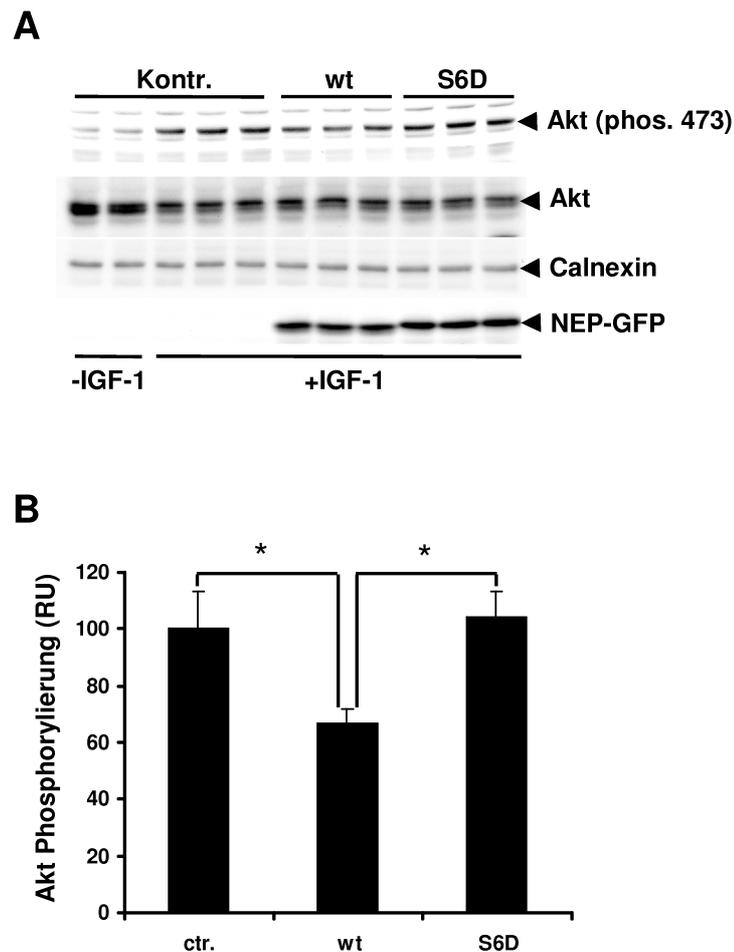
Übereinstimmung mit der in Abbildung 3.22 und 3.23 gezeigten Inhibition der NEP - PTEN Interaktion durch Phosphorylierung von Serin 6 innerhalb der NEP N-terminalen Domäne.



**Abbildung 3.25: Einfluss von NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D auf die Insulin abhängige Akt Phosphorylierung**

A) HEK293 Zellen wurden für 16 h in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit 100 nM Insulin behandelt. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine des Gesamtlysats in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Akt Phosphoserin 473, Akt, Calnexin und NEP-GFP wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern im WB nachgewiesen. B) Densitometrische Quantifizierung des anti-Akt Phosphoserin 473 WB Signals (Mittelwert; Standardabweichung). \* entspricht einem p-Wert < 0,05; n = 3; RU = relative Einheiten.

Um einen allgemeinen Effekt der NEP Phosphorylierung auf die Akt Aktivierung zu bestätigen, wurden auch Versuche mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 durchgeführt. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse wie bei der Akt Aktivierung durch Insulin beobachtet. Auch hier zeigte sich kein Akt-inaktivierender Effekt von NEP-GFP S6D nach IGF-1 Stimulation, während die Expression von NEP-GFP wt zu einer signifikanten Reduktion der Akt Aktivierung um etwa 30% führte.



**Abbildung 3.26: Einfluss von NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D auf die IGF-1 abhängige Akt Phosphorylierung**

A) HEK293 Zellen wurden für 16 h in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit 1 ng/ml IGF-1 behandelt. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine des Gesamtlysats in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Akt Phosphoserin 473, Akt, Calnexin und NEP-GFP wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern im WB nachgewiesen. B) Densitometrische Quantifizierung des anti-Akt Phosphoserin 473 WB Signals (Mittelwert; Standardabweichung). \* entspricht einem p-Wert < 0,05; n = 3; RU = relative Einheiten.

Die in den Abbildungen 3.25 und 3.26 gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Phosphorylierung von NEP, die die Inhibition der NEP – PTEN Interaktion zur Folge hat (siehe Abb. 3.22 und 3.23), zu einer verminderten Inaktivierung von Akt nach Behandlung mit Insulin bzw. IGF-1 führt.

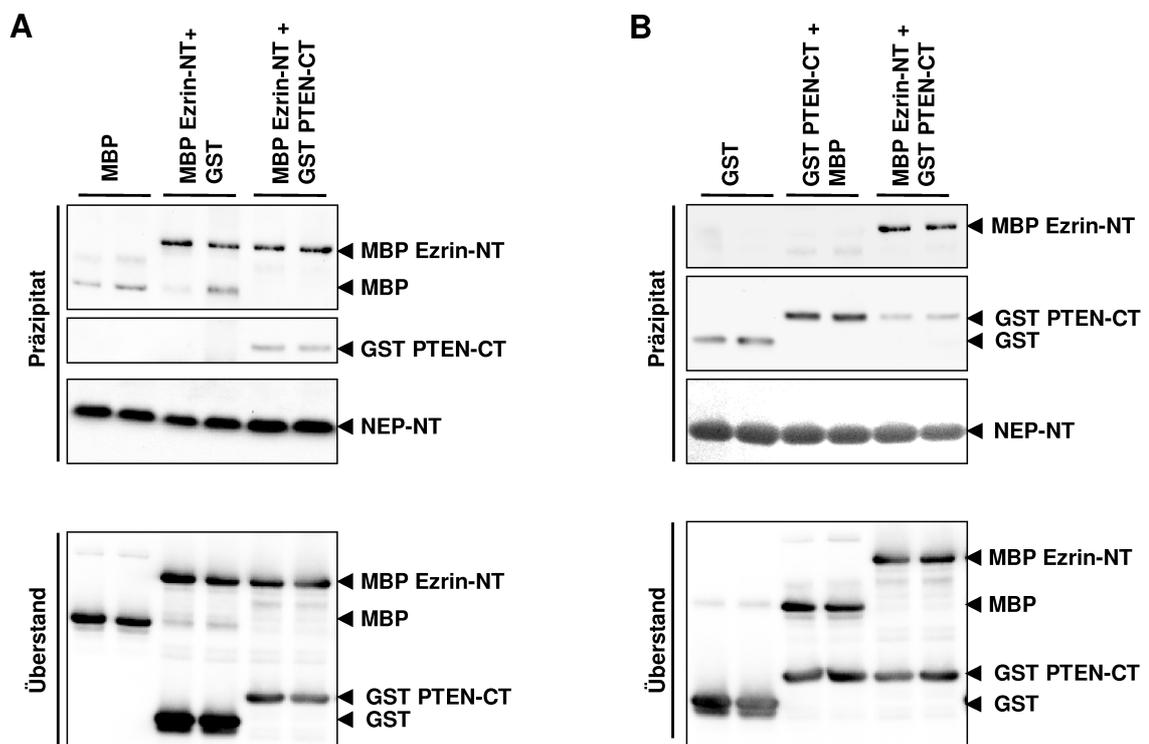
### 3.13 Untersuchung der simultanen Bindung von Ezrin und PTEN an die zytoplasmatische Domäne von NEP

Da bisher unklar ist, ob PTEN und Ezrin gleichzeitig an die zytoplasmatische Domäne von NEP binden können oder ob die Proteine um die NEP Bindung konkurrieren, wurden

Kopräzipitationsversuche mit der C-Terminal biotinylierten zytoplasmatischen Domäne von NEP (NEP-NT) durchgeführt. Dazu wurden auf Basis der ermittelten  $K_D$ -Werte und der zuvor durchgeführten Präzipitationsversuche (Abschnitt 3.15 und 3.16) 2  $\mu$ M PTEN (GST PTEN-CT) und 100 nM Ezrin (MBP Ezrin-NT) zusammen mit NEP-NT inkubiert und die jeweilige Bindung nach SA-Präzipitation analysiert.

In Übereinstimmung mit den vorausgegangenen Untersuchungen (Abb. 3.18) weisen die Ergebnisse in Abbildung 3.27A auf eine direkte Bindung von Ezrin an die N-terminale Domäne von NEP hin (Spur 3,4). Die gleichzeitige Inkubation von Ezrin und PTEN führt zu keiner erkennbaren Reduktion der Ezrin Bindung (Abb. 3.27A; Spur 5,6).

Im Gegensatz dazu wird die direkte Bindung von PTEN an die N-terminale Domäne von NEP durch die gleichzeitige Inkubation von PTEN und Ezrin stark reduziert (Abb. 3.27B; Spur 5,6).



**Abbildung 3.27: Kompetitive Bindung von PTEN und Ezrin an die zytoplasmatische Domäne von NEP**  
 A) Pro Ansatz wurden etwa 0,2 nmol C-Terminal biotinyliertes NEP Peptid (NEP-NT) an SA-Agarose gebunden und für 2 h mit 100 nM MBP (Spur 1, 2), mit 100 nM MBP Ezrin-NT und 2  $\mu$ M GST (Spur 3, 4) und mit 100 nM MBP Ezrin-NT und 2  $\mu$ M GST PTEN-CT (Spur 5, 6) inkubiert. Die präzipitierten Proteine und der verbleibende Überstand wurden in einem 4-12%-igen Bis-Tris Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. MBP und MBP Ezrin-NT wurden im WB durch einen anti-MBP Antikörper nachgewiesen. GST und GST PTEN-CT wurden im WB durch einen anti-GST Antikörper nachgewiesen. NEP-NT wurde mit Streptavidin HRP nachgewiesen. B) Pro Ansatz wurden etwa 0,2 nmol NEP-NT an SA-Agarose gebunden und für 2 h mit 2  $\mu$ M GST (Spur 1, 2), mit 2  $\mu$ M GST PTEN-CT und 100 nM MBP (Spur 3, 4) und mit 100 nM MBP Ezrin-NT und 2  $\mu$ M GST PTEN-CT (Spur 5, 6) inkubiert. Ansonsten wurde wie unter A beschrieben verfahren.

Die Ergebnisse weisen auf eine kompetitive Bindung von Ezrin und PTEN an die zytosolische Domäne von NEP hin, wobei bei den hier gewählten Ezrin und PTEN Konzentrationen PTEN durch Ezrin verdrängt wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass NEP von CK2 an Position Serin 6 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert wird. Dies führt zu einer verstärkten Zelloberflächenlokalisation von NEP, wobei die NEP Stabilität und Maturierung nicht beeinflusst wird.

In Bezug auf zytoplasmatische Bindepartner von NEP konnte hier gezeigt werden, dass Ezrin und PTEN um die Bindung an NEP konkurrieren und dass die Phosphorylierung von NEP selektiv die Interaktion mit PTEN inhibiert. Die Inhibition der NEP – PTEN Bindung führt im Folgenden zu einer verstärkten Akt Aktivierung nach Insulin oder IGF-1 Stimulation der Zellen.

## 4 Diskussion

Die membranständige Zink-Metalloendopeptidase Neprilysin spielt sowohl bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung, als auch bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Die Peptidaseaktivität der extrazellulären/luminalen Domäne von NEP katalysiert neben dem Abbau der physiologisch wichtigen Peptide Substanz P, Enkephaline, Bombesin, Neurotensin, Somatostatin und Endothelin-1 (7, 16, 287, 288) auch die Degradation des amyloide Plaques bildenden A $\beta$  Peptides (191, 192). Somit inhibiert NEP durch die extrazelluläre Proteolyse auf der einen Seite für die Tumorgenese wichtige Signalwege (289-291) und reguliert auf der anderen Seite die Konzentration des mit der Alzheimerschen Krankheit assoziierten A $\beta$  Peptides (21).

Unabhängig von der proteolytischen Aktivität der Ektodomäne dient die zytoplasmatische Domäne von NEP der Lyn Kinase, den F-Aktin bindenden ERM Proteinen und dem Tumorsuppressor PTEN als membranständiger Bindepartner (17-19, 210, 292). PTEN kann durch die NEP vermittelte Rekrutierung an die Plasmamembran als direkter Antagonist der PI3-Kinase wirken und somit die Aktivierung des Akt Signalweges inhibieren (223, 293). Da Akt sowohl proapoptische Proteine inaktiviert, als auch zellproliferationsfördernde Proteine aktiviert, resultiert die PTEN vermittelte Inhibition des Akt Signalweges in einer Hemmung des Zellwachstums und der Zellproliferation (19, 294).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NEP in kultivierten Zellen an Serin 6 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert wird. Während die Phosphorylierung weder Einfluss auf Stabilität und Maturierung, noch auf die Gesamtzymaktivität von NEP zu haben scheint, konnte eine signifikante Erhöhung des zelloberflächenlokalisierten NEP nach Phosphorylierung beobachtet werden, die mit verstärktem Abbau extrazellulärer Substrate von NEP einhergeht.

Die durchgeführten biochemischen und zellbiologischen Interaktionsstudien zeigten, dass die Phosphorylierung von NEP selektiv die Bindung an PTEN reguliert, jedoch keinen erkennbaren Effekt auf die Ezrin Interaktion hat.

In Übereinstimmung dazu führte die ektopische Expression der pseudo-phosphorylierten N-terminalen Domäne von NEP, im Gegensatz zu der wt N-terminalen Domäne, zu keiner signifikanten Reduktion der Aktivierung von Akt nach Insulin oder IGF-1 Behandlung.

#### 4.1 Expression von NEP in verschiedenen Zelltypen und Geweben

Die NEP Expression kann durch unterschiedliche Faktoren reguliert werden. Zum einen wurde postuliert, dass die NEP Transkription durch die APP intrazelluläre Domäne (AICD) verstärkt wird, die eventuell als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Alzheimer relevanter Gene kontrolliert (295, 296). Allerdings wird diese AICD abhängige NEP Expressionskontrolle kontrovers diskutiert, sodass weitere Versuche für endgültige Aussagen nötig sein werden (296-298).

Im Übrigen wird die NEP Transkription durch die Bindung von Östrogen und Androgen an ARR (*Androgen Response Region*) bzw. an ARE (*Androgen Response Element*) innerhalb des NEP Gens verstärkt (299).

In den hier getesteten Zelllinien konnte in LNCaP Zellen, BV2 Zellen, MEF Zellen und in primären kortikalen Mausneuronen NEP Enzymaktivität nachgewiesen werden. Allerdings weisen diese Zelllinien starke Unterschiede in der Enzymaktivität bzw. in der NEP Menge auf. In Maus embryonalen Fibroblasten konnte eine starke NEP Enzymaktivität an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. NEP wurde in Immunfluoreszenzpräparaten auf der Zelloberfläche in größeren punktuellen Ansammlungen gefunden, wie es auch schon für NEP an Ausläufern von primären neuronalen Mauszellen gezeigt wurde (202). Die Ergebnisse stimmen mit bereits erhobenen Daten überein, wonach die NEP Expression sich je nach Gewebe stark unterscheidet. So wurde bei Schweinen im Kortex der Nieren etwa 1,5 µg NEP pro mg Protein detektiert, während im Kleinhirn von Schweinen Konzentrationen von lediglich 0,03 ng NEP pro mg zu finden sind (300).

Da NEP durch die Degradation verschiedener Wachstumsfaktoren und seiner den Akt Signalweg inhibierenden Wirkung mittels PTEN negativen Einfluss auf die Zellproliferation und das Überleben der Zelle hat (19), kann sich eine erhöhte Expression bzw. Zelloberflächenexpression von NEP je nachdem, welche Signalkaskaden für die jeweiligen Gewebe und Zellen essenziell sind, negativ auf die Zellvitalität auswirken. In *Drosophila melanogaster* wurde bereits nachgewiesen, dass die Überexpression von NEP in Neuronen zu axonaler Degeneration und verkürzter Lebensdauer der Fliegen führt (28). Unterstützend konnte hier gezeigt werden, dass die ektopische Expression von NEP in HEK293 Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg zum Tod der Zellen führt.

Dabei scheint die extrazelluläre NEP Domäne das Zellwachstum bzw. das Zellüberleben stärker negativ zu beeinflussen, als die zytoplasmatische Domäne, da es ebenfalls nicht möglich war, stabile Zellklone herzustellen, die die extrazelluläre NEP Peptidasedomäne

(sNEP) überexprimieren. Die stabile Expression von NEP-GFP, dessen extrazelluläre Domäne durch GFP ausgetauscht wurde, war dagegen möglich.

In Bezug auf die Funktionalität von ektopisch exprimiertem NEP, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass transient überexprimiertes NEP in HEK293 Zellen sowohl in maturierter, als auch in unmatuierter Form vorliegt und dass vornehmlich maturiertes NEP an die Zelloberfläche gelangt. Des Weiteren handelt es sich bei zelloberflächenlokalisiertem NEP um katalytisch aktives Enzym, wie die NEP-spezifischen Aktivitätsversuche zeigen. Obwohl die Maturierung der extrazellulären Domäne von NEP den Transport an die Zelloberfläche beeinflusst (9), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch das NEP-GFP Fusionsprotein an die Zelloberfläche gelangt. Somit wird ektopisch exprimiertes NEP und NEP-GFP, wie endogenes NEP auch (9), über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert.

#### **4.2 Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle von NEP**

In der vorliegenden Arbeit konnte in Zellkulturversuchen nachgewiesen werden, dass sowohl die mature, als auch die immature Form von NEP phosphoryliert wird und dass die Dephosphorylierung von NEP wahrscheinlich durch die Protein Phosphatase 1 und / oder Protein Phosphatase 2A erfolgt.

Die Inhibition der Protein Phosphatase 1 und Protein Phosphatase 2A durch Okadasäure führt zu einer massiven Verstärkung der Phosphatinkorporation, was darauf hinweist, dass unter physiologischen Bedingungen (bei normaler Phosphatase Aktivität) nur ein relativ geringer Anteil von NEP in der Zelle phosphoryliert vorliegt.

Die NEP Aminosäuresequenz weist eine Vielzahl von möglichen Phosphorylierungsstellen auf. Die meisten dieser potenziellen Phosphorylierungsstellen sind in der Ektodomäne von NEP zu finden. Zwar wurde Proteinphosphorylierung auch vielfach extrazellulär nachgewiesen (301-303), doch handelt es sich bei allen bisher bekannten Proteinkinasen um zytosolische Proteine, die – wenn überhaupt – nur zu einem sehr geringen Teil extrazellulär / luminal vorgefunden werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Augenmerk auf die Phosphorylierung der zytosolischen Domäne von NEP gelegt.

Mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (304) wurden – auf Grund der Aminosäuresequenz und der Struktur der zytoplasmatischen Domäne von NEP – Serin 6 und Threonin 15 als wahrscheinliche Phosphorylierungsstellen innerhalb der zytosolischen Domäne vorhergesagt. Bei Serin 6 handelt es sich um einen hoch konservierten Aminosäurerest, was auf eine wichtige Funktion dieser Aminosäure

hindeutet. Dahingegen ist Threonin 15 in den NEP Varianten der Maus, des Huhns und der Ratte durch Alanin substituiert.

Die Ergebnisse der *in vivo* Phosphorylierung verschiedener NEP Phosphorylierungsmutanten zeigen, dass es sich bei Serin 6 vermutlich um die Hauptphosphorylierungsstelle von NEP handelt. Unterstützend dazu konnte vor kurzem in Phosphatase-Inhibitor behandelten humanen Zellen Serin 6 als einzige zytoplasmatische NEP Phosphorylierungsstelle durch massenspektroskopische Untersuchungen bestätigt werden (305).

Die Tatsache, dass Serin 6 wie oben beschrieben in NEP aller Spezies konserviert vorliegt, weist darauf hin, dass die Phosphorylierung dieses Aminosäurerestes eine wichtige Funktion erfüllt.

Auf Grund der CK2 Konsensussequenz (S-X-X-E/D) innerhalb derer sich Serin 6 befindet, der hier präsentierten Daten in Bezug auf die NEP Phosphorylierung durch CK2 und der bereits gezeigten *in vitro* Phosphorylierung durch CK2 (18), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei NEP um ein CK2 Substrat handelt.

Die eigenen Peptid – Protein Interaktionsversuche zeigen eine direkte Bindung von CK2 an die nicht-phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von NEP. Jedoch konnten in Immunfluoreszenzuntersuchungen kaum Bereiche detektiert werden, in denen NEP und CK2 kolokalisiert vorliegen. Eine Erklärung dafür könnten wiederum die NEP – CK2 Interaktionsversuche geben, bei denen gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung des Serin 6 Restes zu einer starken Reduktion der NEP – CK2 Interaktion führt. Somit könnte die Phosphorylierung von NEP durch CK2 zur Aufhebung der Interaktion führen. Dies würde bedeuten, dass eine schnelle Abfolge von Bindung und Phosphorylierung in einer transienten Interaktion von NEP und CK2 resultieren würde, was die begrenzte Kolokalisation der beiden Proteine in der Zelle erklären würde.

Zudem binden, wie oben beschrieben, an die N-terminale Domäne von NEP weitere zytosolische Proteine (17-19, 30), sodass die CK2 Bindung unter Umständen durch andere NEP Bindepartner sterisch gehemmt wird.

Ob die Phosphorylierung von NEP in irgendeiner Art reguliert wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings ist eine Regulation der NEP Phosphorylierung über die Maskierung oder sterische Inhibition der NEP Phosphorylierungsstelle durch NEP Bindepartner (PTEN, ERM, Lyn Kinase), über die Aktivität und subzellulären Lokalisation von CK2 (227, 252, 253, 306, 307) (siehe Abschnitt 1.3 und 4.3) und über die entsprechende(n) Phosphatase(n) möglich.

### 4.3 Auswirkung der Phosphorylierung von NEP auf die Maturierung, Stabilität und subzelluläre Lokalisation

Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass Proteinphosphorylierung einen Einfluss auf die Proteininstabilität haben kann (281, 282, 308).

Allerdings weisen die hier gezeigten *Pulse Chase* Experimente mit ektopisch exprimiertem NEP wt und der pseudo-phosphorylierten NEP S6D Mutante bzw. mit den jeweiligen NEP-GFP Varianten nicht auf Unterschiede in der Stabilität von pseudo-phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem NEP hin. Zudem zeigen Experimente mit Cycloheximid, dass sich die Maturierung von NEP wt und der NEP S6D Mutante nicht unterscheiden und wie bereits beschreiben innerhalb von zwei Stunden vollständig erfolgt (277).

Jedoch konnte eine signifikante Erhöhung der Zelloberflächenexpression und in Übereinstimmung dazu der Zelloberflächenaktivität der NEP S6D Mutante ermittelt werden. Die Feststellung, dass die Gesamtexpression und Gesamtaktivität der NEP S6D Mutante im Vergleich zu NEP wt nicht variiert, lässt darauf schließen, dass die Phosphorylierung von Serin 6 keinen Einfluss auf die Peptidaseaktivität der extrazellulären Domäne hat, sondern ausschließlich die Zelloberflächenlokalisierung von NEP beeinflusst. Die Tatsache, dass die Maturierung der NEP S6D Mutante im Vergleich zu NEP wt nicht verändert ist, weist darauf hin, dass die verstärkte Zelloberflächenlokalisierung der NEP S6D Mutante auf Prozesse zwischen ER und Plasmamembran zurückzuführen ist. Durch Inhibition des Vesikeltransports vom ER zum Golgi-Apparat mittels Brefeldin A, könnte untersucht werden, ob ein verstärkter Transport von NEP S6D an die Plasmamembran oder eine längere Verweildauer von NEP S6D an der Zelloberfläche die Ursache für den beobachteten Effekt ist (309).

Eine entscheidende Rolle bei der veränderten subzellulären Lokalisation von NEP S6D könnte die wahrscheinliche Strukturänderung der zytoplasmatischen Domäne von NEP spielen, die durch die Einführung einer negativen Ladung in Form einer Phosphatgruppe bzw. eines Aspartatrestes hervorgerufen wird.

Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen, wie sie schon für die zytoplasmatische Domäne von NEP im Komplex mit der FERM Domäne von Radixin durchgeführt wurden, könnte der Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf seine Struktur bestimmt werden (210).

Dass die subzelluläre Lokalisation über die zytosolische Domäne bestimmt werden kann, konnte bereits bei den mit NEP eng verwandten ECE-1 Proteinen gezeigt werden. Die ECE-1 Isoformen a-d unterscheiden sich lediglich in der Aminosäuresequenz ihrer

zytoplasmatischen Domäne, was zu einer heterogenen subzellulären Verteilung der ECE-1 Isoformen führt. So ist ECE-1a fast ausschließlich an der Zelloberfläche, ECE-1c und d sowohl in intrazellulären Kompartimenten, als auch an der Zelloberfläche und ECE-1b nur in Golgi-ähnlichen Strukturen innerhalb der Zelle lokalisiert (161, 310, 311). Des Weiteren ist bekannt, dass der Verbleib der Zink-Metalloprotease ACE an der Zelloberfläche ebenfalls durch die CK2 vermittelte Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne kontrolliert wird (312). Analog dazu und im Hinblick auf die hier gezeigten Ergebnisse, könnte die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne die Zelloberflächenlokalisation von NEP regulieren.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Somatostatin als Modulator der subzellulären Lokalisation von NEP identifiziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Neurone Somatostatin defizienter Mäuse im Vergleich zu Neuronen von wt Mäusen eine Veränderung der subzellulären NEP Verteilung aufweisen. Dabei liegt NEP verstärkt in ER und Golgi Kompartimenten und weniger an der synaptischen Membran vor (202). Die Somatostatinbehandlung hat somit denselben Effekt auf die Lokalisation von NEP, wie die Phosphorylierung von Serin 6 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von NEP.

Bis auf die Tatsache, dass Somatostatin über Pertussis Toxin sensitive G<sub>i</sub>-Protein gekoppelte Rezeptoren Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von NEP nimmt, ist der zu Grunde liegende Mechanismus bisher nicht bekannt (202). Hier wird vor allem von Interesse sein, ob Somatostatin die CK2 Aktivität oder Expression erhöhen kann. Für die Aktivierung des ebenfalls G<sub>i</sub>-Protein gekoppelten wnt Rezeptors wurde eine deutliche Erhöhung der CK2 Aktivität um etwa 40% bereits gezeigt (253).

Zudem kann die Aktivität von CK2 durch verschiedene Wachstumsfaktoren erhöht werden. So wurde in Zellen, die mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF oder dem neuronalen Wachstumsfaktor NGF behandelt wurden, eine bis zu 110%-ige Stimulation der CK2 Aktivität nachgewiesen (227, 252). Obgleich gezeigt wurde, dass diese CK2 Aktivierung nicht über den PI3-Kinase / Akt Signalweg geschieht, ist nicht bekannt, über welchen alternativen Signalweg CK2 aktiviert wird (252).

Prinzipiell sollte auf Grund der hier gezeigten Daten jeder Signalweg, der die CK2 Aktivität erhöht auch zu einer verstärkten NEP Zelloberflächenlokalisation führen, sofern die CK2 Aktivierung über einen längern Zeitraum Bestand hat und zu einer effektiven NEP Phosphorylierung führt.

Die Somatostatinbehandlung neuronaler Zellen resultiert erst nach 24 Stunden in einer maximalen NEP Zelloberflächenaktivität (202). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt,

führt die Behandlung von MEF Zellen mit dem spezifischen CK2 Inhibitor DMAT über einen Zeitraum von 24 Stunden zu einer Reduktion der endogenen NEP Zelloberflächenaktivität um etwa 20%, ohne dass die Gesamtexpression von NEP oder die Zellvitalität beeinträchtigt wird. Im Falle einer Beteiligung von CK2 am beobachteten Effekt der Somatostatinbehandlung auf die NEP Zelloberflächenlokalisation, würde dies bedeuten, dass eine länger währende CK2 Aktivierung für einen maximalen Effekt auf die Zelloberflächenlokalisation von NEP benötigt würde. In Bezug auf den hier beobachteten Einfluss der CK2 Inhibition auf die NEP Zelloberflächenaktivität, muss auf die Vielzahl von CK2 Substraten hingewiesen werden (313). Dies bedeutet, dass der Effekt der CK2 Inhibition auf NEP auch auf indirekte Prozesse zurückzuführen sein könnte.

#### **4.4 Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf den Abbau von A $\beta$**

Die simultane ektopische Expression von NEP und APPsw führt zu einer drastischen Reduktion des in das Kulturmedium sezernierten A $\beta$ , wobei kein Unterschied zwischen NEP wt und der NEP S6D Mutante zu erkennen war. Im Gegensatz dazu führt die ektopische Expression von NEP und APPsw in zwei getrennten Populationen von HEK293 Zellen und anschließender Kokultivierung der beiden Populationen, weder durch NEP wt noch durch die NEP S6D Mutante zu einem signifikanten Rückgang der A $\beta$  Konzentration im Kulturmedium.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass NEP in diesem Zellkulturmodell bei der gleichzeitigen Überexpression von NEP und APPsw das im sekretorischen Transportweg bzw. an der Zelloberfläche produzierte A $\beta$  sehr effizient abbaut. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die schwedische APP Mutation zu einer verbesserten Substraterkennung durch die  $\beta$ -Sekretase führt wodurch A $\beta$  bereits verstärkt im sekretorischen Transportweg gebildet wird, wo es zusammen mit NEP an die Zelloberfläche gelangt (201, 314-316). Unter diesen Bedingungen könnte NEP bereits in sekretorischen Vesikeln A $\beta$  abbauen was zu einer reduzierten Sekretion von A $\beta$  führen würde (187).

Dahingegen wird von APPsw exprimierenden HEK293 Zellen bereits in das Medium abgegebenes A $\beta$  nur sehr langsam durch NEP abgebaut. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Verhältnis von Zellkulturmediumvolumen zur Zelloberfläche, an der NEP gebunden vorliegt, sehr groß ist, was in geringeren effektiven Substrat – Enzym Interaktionen resultiert. Im Gegensatz zu NEP werden andere A $\beta$ -abbauende Proteasen und Peptidasen wie z.B. IDE in das Medium sezerniert und können so – anders als

membrangebundenes NEP – wesentlich effizienter mit löslichen Substratpeptiden wie A $\beta$  interagieren (175, 177).

Da unter diesen Bedingungen der A $\beta$  Abbau durch NEP vernachlässigbar klein ist, eignet sich dieses Modell nicht um weitere Untersuchungen über den NEP-spezifischen A $\beta$  Abbau durchzuführen. Dadurch war es auch nicht möglich, eventuelle Unterschiede im Abbau extrazellulären A $\beta$  durch NEP wt und NEP S6D zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MEF Zellen eine im Vergleich zu anderen Zellen relativ starke endogene NEP Zelloberflächenaktivität aufweisen. Die spezifische Inhibition von NEP durch Thiorphan hatte jedoch keinen Einfluss auf den extrazellulären A $\beta$  Abbau. Dies weist zusätzlich darauf hin, dass NEP in dem hier verwendeten Zellkulturmodell nicht maßgeblich an dem Abbau von extrazellulärem A $\beta$  beteiligt ist.

Die hier gezeigten Ergebnisse stehen nicht zwingend im Widerspruch zu bisherigen Untersuchungen, wonach NEP im Gehirn das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für den extrazellulären A $\beta$  Abbau ist (21, 164, 189), da im Gehirn eine sehr große Gesamtzelloberfläche einem relativ kleinen Extrazellularraum gegenübersteht, was die effektive Interaktion von NEP mit extrazellulärem A $\beta$  an der Zelloberfläche erhöht. Gleichzeitig ist NEP vornehmlich entlang der Axone und an den Synapsen lokalisiert, die A $\beta$  sensible Bereiche der Neurone darstellen (189). Eine vergleichende Zelloberflächenlokalisationsstudie von NEP wt und NEP S6D an den oben genannten Bereichen der Neurone könnte Aufschluss darüber geben, ob die phosphorylierte Form von NEP den Neuronen potenziell einen höheren Schutz vor A $\beta$  Mono- und Oligomeren bieten könnte.

Um aussagekräftig den extrazellulären A $\beta$  Abbau durch NEP wt und NEP S6D vergleichen zu können, müsste also ein entsprechendes System gewählt werden, in dem NEP die geschwindigkeitsbestimmende A $\beta$ -abbauende Peptidase darstellt.

Ähnlich den hier vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der mit NEP eng verwandten ECE-1 Protease in Zellkulturzellen zu einer signifikanten Erhöhung der A $\beta$  Produktion führt, die fast ausschließlich auf die Inhibition des intrazellulären A $\beta$  Abbaus zurückzuführen ist, wobei der extrazelluläre A $\beta$  Abbau kaum durch die ECE-1 Inhibition beeinflusst wird (165).

Die Verwendung von transgenen *Drosophila*- oder Mausmodellen könnte bei der Untersuchung des extrazellulären A $\beta$  Abbaus durch NEP hilfreich sein, da der

extrazelluläre NEP-spezifische A $\beta$  Abbau durch ektopisch überexprimiertes NEP wt dort bereits nachgewiesen wurde (28, 183).

Der Einsatz des nicht-membrangängigen, spezifischen NEP Substrats Succinyl-Alanin-Alanin-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin stellt für das hier verwendete Zellkulturmodell einen alternativen Weg dar, spezifisch die Zelloberflächenaktivität von NEP wt und der NEP S6D Mutante zu vergleichen (296).

Allerdings spiegelt die Überexpression der NEP Varianten nicht die physiologischen Bedingungen wider, da sie zu unnatürlich hohen Konzentrationen dieser Proteine in der Zelle führt. Die Etablierung eines *knock in* Zellkultursystems oder Tiermodells unter Verwendung geeigneter Promotoren wäre demnach vermutlich am besten für weitere Untersuchungen und Vergleiche der NEP Varianten untereinander geeignet.

#### **4.5 Selektive Regulation der Ezrin und PTEN Bindung durch die Phosphorylierung von NEP**

Die Typ 1 Membranproteine CD44, CD43 und ICAM können durch Bindung ihrer zytoplasmatischen Domänen an ERM Proteine mit dem Aktinzytoskelett verknüpft werden (317, 318). Für das Typ 2 Transmembranprotein NEP konnte eine gleichartige Bindung an ERM Proteine nachgewiesen werden (17). Zunächst wurden die drei Lysinreste <sup>19</sup>KKK<sup>21</sup> nahe der Transmembrandomäne als möglicher Bereich innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von NEP postuliert, der die Interaktion mit den ERM Proteinen vermittelt (17). Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die ERM Bindung über die Aminosäurereste <sup>8</sup>MDITDIN<sup>14</sup> an die ERM Subdomäne C erfolgt und sich prinzipiell nicht von der CD44, CD43 und ICAM Bindung an die ERM Proteine unterscheidet. Dies hat zur Folge, dass CD44, CD43, ICAM und NEP um die Bindung an die ERM Proteine konkurrieren (210) (Abb. 4.1).

Trotz der unmittelbaren Nähe der Phosphorylierungsstelle Serin 6 zu der oben genannten ERM Bindestelle weisen die in dieser Arbeit ermittelten Daten auf keinen Effekt der NEP Phosphorylierung auf die Interaktion mit den ERM Proteinen hin.

Die für die ERM Bindung an NEP gemessenen Dissoziationskonstanten (NEP  $K_D \sim 5,8$  nM; phosphoNEP  $K_D \sim 5,9$  nM) entsprechen in der Größenordnung in etwa derjenigen für die Interaktion von ERM an den Hyaluronanrezeptor CD44 ( $K_D \sim 9,3$  nM) (319).

CD44 wird innerhalb der zytoplasmatischen Domäne in der Nähe der ERM Bindestelle durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert, was zu einer deutlichen Abschwächung der CD44 – ERM Bindung um etwa 70% führt (317, 320). Obwohl die hier gezeigte NEP

Phosphorylierungsstelle analog zu der Phosphorylierungsstelle von CD44 in unmittelbarer Nähe zu dem ERM Bindemotiv liegt, hat die Phosphorylierung von NEP keine Auswirkung auf die ERM Bindung.

Da CD44 und NEP direkt um die Bindung an die ERM Proteine konkurrieren (17, 210), könnte eine verminderte CD44 – ERM Interaktion nach CD44 Phosphorylierung zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der NEP – ERM Interaktion führen.

Somit kann die NEP – ERM Bindung über die Konkurrenz von NEP mit CD44, CD43 und ICAM um die Bindung der ERM Proteinen reguliert werden (210, 317). Darüber hinaus wird die Verfügbarkeit von aktivierten ERM Proteinen an der Plasmamembran reguliert, wo die ERM Proteine Rho-Signalweg abhängig aktiviert werden (211, 319, 321).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, kann der Tumorsuppressor PTEN über direkte Protein-Lipid Interaktionen an die Plasmamembran binden. Dies geschieht vornehmlich über die N-terminale und die C2 Domäne von PTEN an negativ geladene Membranlipide wie Phosphatidylserin und Phosphatidylinositolphosphate (220, 221, 235). Daneben kann PTEN auch über sein C-terminal gelegenes PDZ bindendes Motiv an verschiedene Proteine, die eine PDZ Domäne besitzen, binden (322, 323).

NEP wurde als bisher einziges Protein identifiziert, das mit seinem basischen Bereich nahe der Transmembrandomäne ( $^{19}\text{KKK}^{21}$ ) an die PTEN Hauptphosphorylierungsstelle (Aminosäuren 380-385) der C-terminalen Domäne binden kann und dadurch PTEN an die Plasmamembran rekrutiert (19). Somit interagiert PTEN – im Gegensatz zu den ERM Proteinen – gleichzeitig mit mehreren membranlokalisierten Bindepartnern.

Auf Grund der basischen Aminosäuregruppe  $^{19}\text{KKK}^{21}$  in der zytosolischen Domäne von NEP und *in vitro* Daten wurde postuliert, dass die Phosphorylierung von PTEN an Serin 380, Threonin 382, Threonin 383 und Serin 385 zu einer Verstärkung der NEP – PTEN Interaktion führt (19). *In vivo* ist NEP jedoch weitaus stärker mit unphosphoryliertem PTEN assoziiert (19). Dies legen auch Untersuchungen nahe, in denen gezeigt wurde, dass die phosphorylierte C-terminale Domäne von PTEN mit den basischen Aminosäureresten der membranbindenden C2 Domäne von PTEN interagiert (234). Dadurch wird sowohl die direkte Interaktion mit negativ geladenen Lipiden der Plasmamembran, als auch die Bindung an NEP inhibiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine direkte Bindung der unphosphorylierten C-terminalen Domäne von PTEN an die unphosphorylierte zytoplasmatische Domäne von NEP ( $K_D \sim 0,71 \mu\text{M}$ ). Durch die Phosphorylierung des Serin 6 Restes von NEP wird diese Interaktion fast vollständig aufgehoben. Diese Befunde konnten durch

Immunfluoreszenzuntersuchungen unterstützt werden, die eine Kolokalisation von NEP-GFP wt und PTEN an der Plasmamembran und in Golgi-ähnlichen Kompartimenten innerhalb der Zelle ergaben, wohingegen die NEP-GFP S6D Mutante keinerlei Kolokalisation mit endogenem PTEN aufwies.

Da die NEP Phosphorylierungsstelle außerhalb der Bindedomäne für PTEN liegt, induziert die Phosphorylierung von Serin 6 vermutlich eine strukturelle Veränderung des zytoplasmatischen Teils von NEP, wodurch die NEP – PTEN Interaktion unterbunden wird. Dafür spricht auch das unterschiedliche Migrationsverhalten von nicht-phosphorylierter und phosphorylierter N-terminaler Domäne von NEP (NEP-NT, pNEP-NT) im SDS-Polyacrylamidgel. Dies konnte in gleicher Weise auch für NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D beobachtet werden. Gerade das untereinander veränderte Migrationsverhalten der etwa 35 kDa großen NEP-GFP Varianten im 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigel kann nicht durch den Masseunterschied von Serin und Aspartat erklärt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine veränderte Struktur der zytoplasmatischen Domäne durch die Einführung der negativen Ladung hin. Bei früheren Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 12-15 der N-terminalen Domäne von NEP eine Haarnadelstruktur ausbilden (210). Da die Aminosäuren, die diese Haarnadelstruktur bilden, zwischen der Phosphorylierungsstelle Serin 6 und der PTEN bindenden basischen Domäne (<sup>19</sup>KKK<sup>21</sup>) liegen, könnte eine elektrostatische Interaktion des Phosphatrestes und den positiv geladenen Lysinresten erfolgen. In diesem Fall wäre die Bindestelle für PTEN durch die intramolekulare Interaktion mit dem phosphorylierten Serinrest 6 blockiert. Dabei weisen Strukturanalysen darauf hin, dass die ERM Bindedomäne innerhalb der zytoplasmatischen NEP Domäne von der veränderten Struktur nicht beeinflusst werden würde (210). Dies steht im Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen, wonach die NEP – ERM Bindung nicht durch die Phosphorylierung von NEP verändert wird.

In weiteren Bindungsstudien wird nun von Interesse sein, ob an den Aminosäureresten S380, T382, T383 und S385 phosphoryliertes PTEN an phosphoryliertes NEP binden kann. Die Zellkulturdaten der vorliegenden Arbeit weisen nicht auf eine Interaktion von phosphoryliertem NEP mit phosphoryliertem PTEN hin, da die Überexpression der pseudo-phosphorylierten NEP-GFP S6D Mutante keinerlei Effekt auf die intrazelluläre PTEN Verteilung im Vergleich zu untransfizierten Zellen hatte. Im Falle einer Interaktion der beiden phosphorylierten Proteine sollte eine Kolokalisation von NEP-GFP S6D und PTEN

zu beobachten sein, da der Großteil der C-terminalen Domäne von PTEN in phosphorylierter Form vorliegt (230).

Nach Bindung von PTEN an Membranlipide der Plasmamembran kann PTEN die Dephosphorylierung von  $PI(3,4,5)P_3$  zu  $PI(4,5)P_2$  katalysieren (223, 324), was zur Reduktion der Akt Aktivierung führt (293). Wie bereits gezeigt wurde, führt die Rekrutierung von PTEN über NEP an die Plasmamembran zu einem deutlichen Rückgang der Akt Phosphorylierung (19). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine NEP-spezifische Reduktion der Akt Phosphorylierung nach Aktivierung des Insulin Signalweges und des IGF-1 Signalweges nachgewiesen werden. In Übereinstimmung zu den hier gezeigten Bindungsdaten, die eine eindeutige Inhibition der NEP – PTEN Interaktion durch die NEP Phosphorylierung zeigen, konnte keine Reduktion der Akt Phosphorylierung durch die Überexpression der pseudo-phosphorylierten NEP S6D Mutante beobachtet werden. Diese Daten unterstützen zudem die Annahme, dass C-terminal an den Aminosäureresten S380, T382, T383 und S385 phosphoryliertes PTEN entweder generell nicht an der  $PI(3,4,5)P_3$  Dephosphorylierung beteiligt ist oder – wie nicht-phosphoryliertes PTEN – nicht an phosphoryliertes NEP binden kann und somit den Akt Signalweg nicht beeinflusst.

Die PTEN vermittelte Reduktion der Aktivierung von Akt durch NEP beeinflusst sowohl das Zellwachstum, als auch die Zellvitalität negativ. So wurde für aktiviertes Akt eine ganze Reihe von Zielproteinen identifiziert, die im Zusammenhang mit Apoptose und Zellproliferation stehen. Dazu gehören unter anderem GSK3 $\beta$ , BAD, Caspase-9 und eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (325-328). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die länger wählende Kultivierung von NEP-GFP wt und NEP-GFP S6D exprimierenden HEK293 Zellen zu einer graduellen Reduktion der NEP-GFP wt Expression führt, während die NEP-GFP S6D Expression stabil bleibt. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine hohe NEP-GFP wt Konzentration auf Grund der Akt inhibierenden Wirkung einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellvitalität hat und somit stark NEP-GFP wt exprimierende Zellen nicht überleben. Da NEP-GFP S6D keinen Einfluss auf die Stimulation von Akt hat, könnten somit höhere NEP-GFP S6D Konzentrationen von den Zellen toleriert werden.

#### **4.6 Mögliche Auswirkung der selektiven Inhibition der PTEN Bindung auf die Zelloberflächenlokalisation von NEP**

Die durchgeführten Bindungsversuche deuten darauf hin, dass PTEN und Ezrin nicht gleichzeitig an die zytoplasmatische Domäne von NEP binden können und somit um die

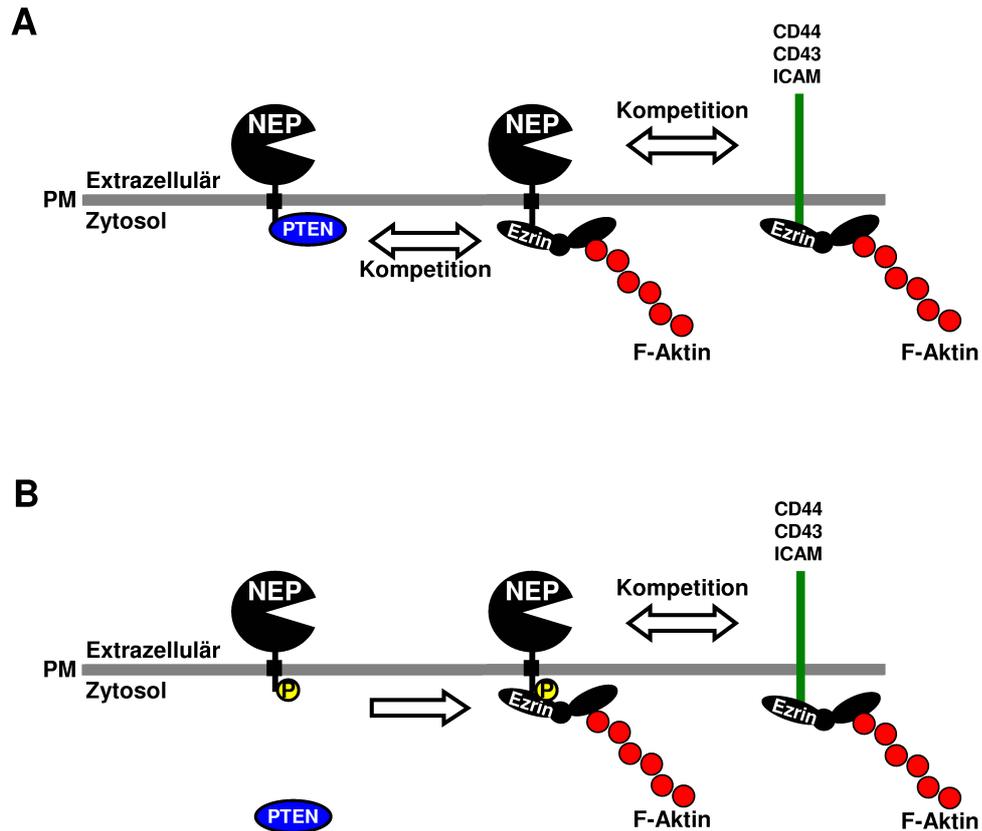
Bindung konkurrieren. Auf Grund der, im Vergleich zu PTEN, höheren Affinität von Ezrin an die N-terminale Domäne von NEP, wurde PTEN unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen von Ezrin verdrängt.

Ein wichtiger Faktor bei der Beurteilung der Frage, ob *in vivo* die NEP – Ezrin oder die NEP – PTEN Bindung überwiegt, ist die Konzentration der jeweiligen Bindepartner. Dabei sind die effektiven, für die NEP Bindung zur Verfügung stehenden Konzentrationen von PTEN und Ezrin in der Zelle relevant: Ezrin wird erst durch Phosphorylierung in einen bindungsfähigen Zustand überführt, während ein Großteil des PTEN-Pools in einem phosphorylierten, nicht-aktiven Zustand in der Zelle vorliegt, der nur vermindert in der Lage ist an NEP zu binden (19, 211, 233, 234).

Im Falle eines starken Überschusses von PTEN im Vergleich zu aktiviertem Ezrin könnte PTEN die Ezrin Bindung an NEP kompetitiv hemmen.

Da die Phosphorylierung von NEP die PTEN Bindung ausschließt, aber keinen Einfluss auf die Ezrin Bindung nimmt, könnte sie eine verstärkte Ezrin – NEP Bindung zur Folge haben (Abb. 4.1). Da die ERM Proteine fast ausschließlich an der Plasmamembran in einem aktiven, bindungsfähigen Zustand vorliegen und dort NEP mit dem Aktinzytoskelett verbinden, könnte dies zu einer Stabilisierung Plasmamembran lokalisierten NEP führen (17, 319, 329). Dies würde die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Zelloberflächenlokalisation der NEP S6D Mutante erklären.

Die sehr komplexen Mechanismen zur Regulation der Interaktion von NEP mit PTEN und ERM Proteinen, deuten auf äußerst wichtige physiologische bzw. pathophysiologische Funktionen dieser Interaktion hin. Inwieweit diese Mechanismen an der Regulation der phosphorylierungsabhängigen Lokalisation von NEP beteiligt sind, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.



**Abbildung 4.1: Einfluss der Phosphorylierung von NEP auf die kompetitive Bindung von PTEN und Ezrin an NEP**

A) PTEN und Ezrin konkurrieren um die Bindung an NEP. B) Die Phosphorylierung von NEP inhibiert die PTEN Bindung und verschiebt das Gleichgewicht zu Gunsten der NEP – Ezrin Bindung. Die Konkurrenz von NEP, ICAM, CD44 und CD43 um die Ezrin Bindung bleibt von der NEP Phosphorylierung unbeeinflusst. Modifiziert nach Terawaki *et al.* 2007 (210).

#### 4.7 Mögliche Rolle der Phosphorylierung von NEP bei intrazellulären Signalwegen und der Alzheimerschen Erkrankung

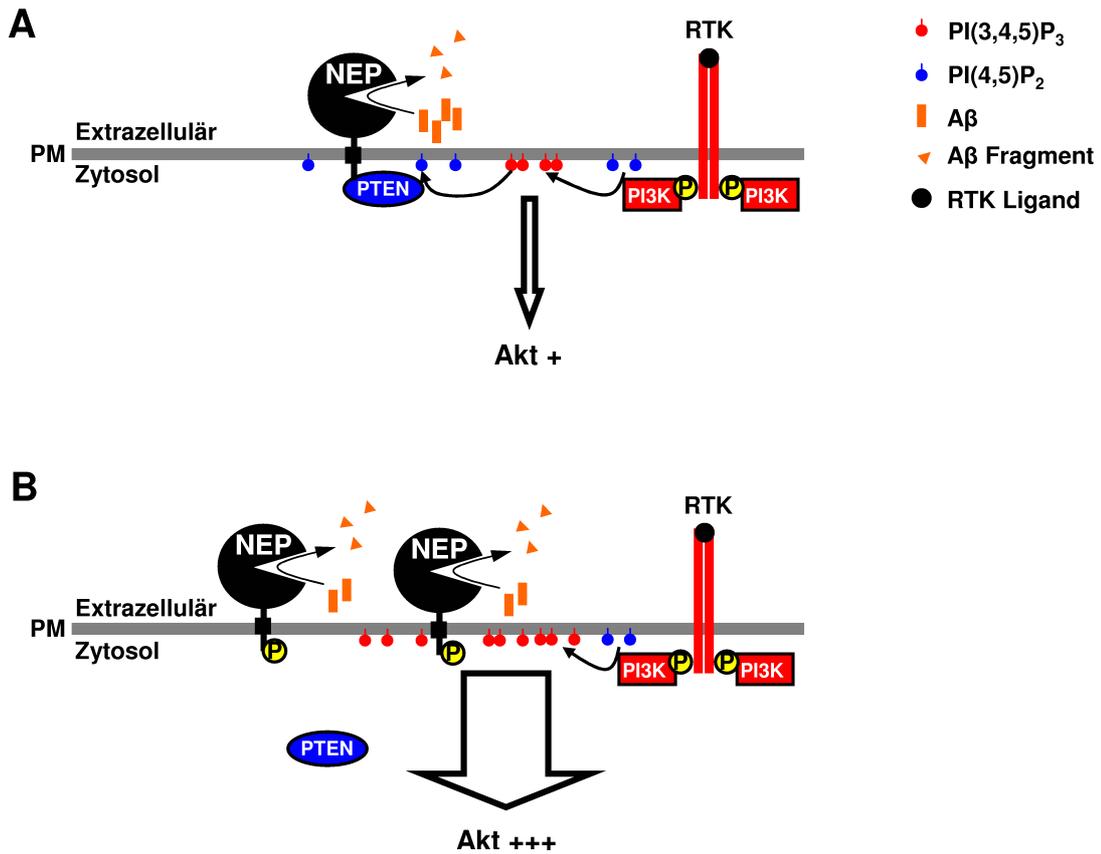
CK2 phosphoryliert neben NEP auch die C-terminale Domäne von PTEN und überführt PTEN dadurch in einen inaktiven Zustand, der durch eine starke Reduktion der PTEN Bindung an die Plasmamembran gekennzeichnet ist (230, 234). Somit hemmt CK2 möglicherweise auf zwei Wegen die Rekrutierung von PTEN an die Plasmamembran, indem es erstens durch die NEP Phosphorylierung die NEP – PTEN Interaktion und zweitens durch die PTEN Phosphorylierung die PTEN – Membranlipid Bindung inhibiert (230, 234).

Da PTEN jedoch, um als direkter PI3K Antagonist wirken zu können, an die Plasmamembran binden muss (223, 293), führt die CK2 vermittelte Phosphorylierung von PTEN und / oder von NEP zu einer Stabilisierung des PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Pools und einer daraus resultierenden Verstärkung Akt aktivierender Signalwege.

In Übereinstimmung mit einer Fülle von bereits erhobenen Daten, wonach die Expression oder Aktivität von CK2 in fast allen Tumoren erhöht ist und das Zellwachstum und Zellüberleben fördert (236, 330-332), konnte in dieser Arbeit mit NEP ein weiteres CK2 Substrat nachgewiesen werden, dessen Phosphorylierung indirekt über den Akt Signalweg eine verstärkte Zellproliferation auslösen und bestimmte apoptotische Faktoren hemmen könnte.

In Bezug auf die Alzheimersche Erkrankung wurde schon mehrfach beschrieben, dass A $\beta$  Zellwachstum und bestimmte Signalwege inhibiert und apoptotische Prozesse fördert (53, 333, 334). Gerade auch die Inaktivierung des PI3K/Akt Signalwegs und die daraus resultierende erhöhte GSK3 $\beta$  Aktivität wurde im Zusammenhang mit neuronalem Zelltod und Tau Phosphorylierung gebracht (44, 268, 335-338).

NEP könnte somit bei der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit eine ambivalente Rolle spielen. Auf der einen Seite schützt der Abbau von A $\beta$  vor dessen toxischen Eigenschaften (20, 21), auf der anderen Seite inhibiert die PTEN Bindung an NEP den für das Überleben der Zelle wichtigen Akt Signalweg (19). Dabei ist interessant, dass die Inhibition der Akt Aktivierung zu einer Stabilisierung der GSK3 $\beta$  Aktivität führt was die Bildung von gepaarten helikalen Filamenten durch GSK3 $\beta$  vermittelte Tau Phosphorylierung unterstützen könnte (44, 54, 270, 335, 339). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass die CK2 abhängige NEP Phosphorylierung zu einer verstärkten Zelloberflächenlokalisation von NEP führt und dadurch den NEP vermittelten A $\beta$  Abbau wahrscheinlich verstärkt. Zusätzlich würde durch die Inhibition der NEP – PTEN Bindung anti-apoptotische, Proliferation und Energiemetabolismus fördernde Akt Signalwege (z.B. Insulin; IGF-1) nicht weiter NEP abhängig gedrosselt. Somit könnte sich die NEP Phosphorylierung auf die intrazelluläre Aggregation von Tau, auf die Bildung extrazellulärer amyloider Plaques und auf zelluläre Grundfunktionen positiv auswirken. Das von Sumitomo *et al.* vorgeschlagene Modell, wonach die gleichzeitige Expression von NEP und PTEN grundsätzlich zu einer stark verminderten Akt Aktivierung führt (19), kann nach den hier gezeigten Ergebnissen um den Einfluss von CK2 auf die NEP – PTEN Bindung erweitert werden. In Abbildung 4.2 ist der mögliche Effekt der NEP Phosphorylierung auf den A $\beta$  Abbau und den Akt Signalweg schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.2: Mögliche Auswirkung der CK2 abhängigen Phosphorylierung von NEP auf den Aβ Abbau und den Akt Signalweg**

A) Die Aktivierung von Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) führt zur Aktivierung der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) und Erhöhung der PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Second Messenger Konzentration. Durch die NEP vermittelte PTEN Rekrutierung an die Plasmamembran wird PI(3,4,5)P<sub>3</sub> zu PI(4,5)P<sub>2</sub> dephosphoryliert, was in einer Reduktion des Akt Signalweges resultiert. B) Nach Phosphorylierung von NEP kommt es zu einer erhöhten NEP Konzentration an der Plasmamembran, die wahrscheinlich zu einem verstärkten Aβ Abbau führt. Gleichzeitig wird die PTEN Bindung durch die NEP Phosphorylierung inhibiert, was eine Verstärkung der Akt Aktivität zur Folge hat. Modifiziert nach Sumitomo *et al.* 2004 (19).

CK2 kommt in allen Geweben vor, wobei in Mäusen gezeigt wurde, dass CK2 im Gehirn sehr stark exprimiert wird (286). Dies wirft die Frage auf, ob sich der Phosphorylierungszustand von NEP in verschiedenen Zellen und Geweben unterscheidet und ob sich die CK2 Expression im Gehirn mit dem Alter ändert. Bei 24 Monaten alten Ratten konnte bereits im Gehirn eine verringerte CK2 Aktivität im Vergleich zu jungen Ratten nachgewiesen werden (340). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass während des Alterns nicht nur generell die NEP Expression im Gehirn abnimmt (196-198, 340), sondern auch auf Grund der verringerten CK2 Aktivität die Phosphorylierung von NEP abnimmt, was die oben genannten Folgen auf Aβ Abbau und die Zellvitalität haben könnte.

## 4.8 Ausblick

Bisher ist noch weit gehend unklar, wie die beiden Hauptmerkmale der Alzheimerschen Krankheit, die neurofibrillären Bündel und die amyloiden Plaques, miteinander in Verbindung stehen und wie A $\beta$  zum Verlust neuronaler Zellen beiträgt. Ein interessanter Ansatzpunkt, der eine Verbindung der A $\beta$  Produktion mit der Hyperphosphorylierung von Tau aufzeigen könnte, ist der Insulin Signalweg und andere Akt aktivierende bzw. GSK3 $\beta$  inhibierende Signalwege. Es konnte schon mehrfach nachgewiesen werden, dass A $\beta$  sowohl extrazellulär, als auch intrazellulär den Akt Signalweg, der einen zentralen Punkt bei der Signalweiterleitung diverser Signalmoleküle wie Insulin, IGF-1, EGF und PDGF darstellt, negativ beeinflusst (56, 268, 269). Dabei kommt es unter anderem zu einer abgeschwächten GSK3 $\beta$  Inaktivierung, was z.B. die Hyperphosphorylierung des Tau Proteins zur Folge haben könnte und zu den oben erwähnten neurofibrillären Bündeln führen könnte. Somit würde A $\beta$  indirekt zur Entstehung der neurofibrillären Bündel beitragen.

Daneben spielt der Akt Signalweg bei der Zellproliferation und der Inaktivierung apoptotischer Faktoren eine große Rolle. Gerade in Bezug auf den Insulin und IGF-1 Signalweg konnte gezeigt werden, dass diese den Energiemetabolismus, die Zellvitalität und das Überleben der Neurone über den PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  Weg unterstützen (267, 341). Bezogen auf den Insulin Signalweg spielen die als maßgeblich am A $\beta$  Abbau beteiligten Enzyme IDE und NEP eine inhibierende Rolle, da IDE Insulin abbaut und NEP wie oben beschrieben den Akt Signalweg mittels PTEN supprimiert (19, 176).

Im Folgenden wird z.B. durch den Einsatz von phospho-spezifischen Antikörpern zu untersuchen sein, wie hoch der Anteil von phosphoryliertem NEP zu nicht-phosphoryliertem NEP ist, ob dieses Verhältnis einer Regulation unterworfen ist und ob es sich im Alter ändert.

Mit Hilfe von APP/Presenilin-1 transgenen Mäusen, die wt NEP bzw. pseudo-phosphoryliertes NEP S6D exprimieren, könnte zukünftig untersucht werden, ob die NEP Phosphorylierung wie in dieser Arbeit postuliert, zum verstärkten A $\beta$  Abbau im Gehirn führt. Des Weiteren ist die Aktivität der Akt Kinase in diesen Mäusen von Interesse, da nach den hier gezeigten Daten die Inhibition der PTEN Bindung an die NEP S6D Mutante zu einer Erhöhung der PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration führen müsste. Dies könnte wiederum zu einer erhöhten Überlebensrate der Zellen führen und die GSK3 $\beta$  abhängige Tau Phosphorylierung reduzieren.

In Bezug auf die Tumorgenese wird eine zentrale tumorsupprimierende Eigenschaft von NEP, die sich hinsichtlich der Alzheimerschen Erkrankung negativ auf das Überleben der Neurone auswirkt, durch dessen Phosphorylierung aufgehoben und wahrscheinlich die Tumorgenese unterstützen. Somit wäre eine vermehrte Tumorbildung der NEP S6D exprimierenden Mäuse zu erwarten.

Inwieweit die in allen Tumoren gefundene erhöhte CK2 Aktivität bzw. Konzentration Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von NEP hat muss in entsprechenden Tumoren untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Zink-Metalloendopeptidase Neprilysin (NEP) handelt es sich um ein Typ 2 Membranprotein, das für die Degradation von extrazellulären Peptiden und Peptidhormonen zuständig ist. Darüber hinaus kann NEP sowohl im sekretorischen Transportweg, als auch an der Zelloberfläche das mit der Alzheimerschen Erkrankung assoziierte  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) Peptid degradieren.

Unabhängig von der extrazellulären Peptidaseaktivität interagiert die N-terminale zytosolische Domäne von NEP mit den F-Aktin bindenden Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) und den Tumorsuppressor PTEN. Durch NEP vermittelte Rekrutierung von PTEN kommt es zu einer verstärkten Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphat und somit einer Inhibition des Akt Signalwegs. Dies wirkt sich unter anderem negativ auf die Zellvitalität und das Zellwachstum aus. Bisher war unklar, ob die extrazelluläre/luminale NEP Peptidaseaktivität und die Interaktion mit den zytoplasmatischen NEP Bindepartnern posttranslational reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch *in vitro* und Zellkulturmodelle gezeigt werden, dass NEP an Serin 6 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne durch die Casein Kinase 2 (CK2) phosphoryliert wird. Während die Phosphorylierung von NEP keinen Einfluss auf die Maturierung und die Stabilität von NEP nimmt, führt sie zu einer signifikanten Erhöhung der NEP Zelloberflächenlokalisation und damit einhergehender Zelloberflächenaktivität. Dieses ist wahrscheinlich auf einen verstärkten Transport von NEP zur Plasmamembran oder auf eine Stabilisierung von NEP an der Plasmamembran zurückzuführen.

In Bezug auf die zytosolischen NEP Bindepartner konnte gezeigt werden, dass die NEP Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Ezrin Bindung nimmt.

Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung von NEP zu einer fast vollständigen Inhibition der Interaktion von NEP mit dem Tumorsuppressor PTEN. Die daraus resultierende verminderte Rekrutierung von PTEN an die Plasmamembran führt zur Stabilisierung der Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphat Konzentration und daraus folgender verstärkter Aktivierung der Proteinkinase Akt nach Stimulation der Zellen mit Insulin bzw. IGF-1.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung von NEP eine erhöhte NEP-spezifische A $\beta$  Degradation zur Folge haben könnte. Gleichzeitig wird die NEP vermittelte Inhibition des Akt Signalwegs unterbunden, was zur Inhibition apoptotischer Faktoren und reduzierter Tau Phosphorylierung führen könnte.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Brown, G., Hogg, N., and Greaves, M. (1975) Candidate leukaemia-specific antigen in man. *Nature* 258, 454-456
2. Greaves, M. F., Hariri, G., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Ritter, M. A., and Ritz, J. (1983) Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 61, 628-639
3. Cossman, J., Neckers, L. M., Leonard, W. J., and Greene, W. C. (1983) Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *J Exp Med* 157, 1064-1069
4. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J. B., Onizuka, R. J., Quackenbush, E. J., Jongeneel, C. V., and McInnes, R. R. (1988) Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 168, 1247-1253
5. Schwartz, J. C., de la Baume, S., Malfroy, B., Patey, G., Perdrisot, R., Swerts, J. P., Fournie-Zaluski, M. C., Gacel, G., and Roques, B. P. (1980) "Enkephalinase", a newly characterised dipeptidyl carboxypeptidase: properties and possible role in enkephalinergic transmission. *Int J Neurol* 14, 195-204
6. Turner, A. J., Isaac, R. E., and Coates, D. (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23, 261-269
7. Barnes, K., Doherty, S., and Turner, A. J. (1995) Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *J Neurochem* 64, 1826-1832
8. Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F. K., and Dale, G. E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296, 341-349
9. Lafrance, M. H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P., and Lemay, G. (1994) Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* 302 (Pt 2), 451-454
10. Carson, J. A., and Turner, A. J. (2002) Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem* 81, 1-8
11. Miners, J. S., Van Helmond, Z., Chalmers, K., Wilcock, G., Love, S., and Kehoe, P. G. (2006) Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 1012-1021
12. Erdos, E. G., Wagner, B., Harbury, C. B., Painter, R. G., Skidgel, R. A., and Fa, X. G. (1989) Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) in human neutrophils. *J Biol Chem* 264, 14519-14523
13. Erdos, E. G., and Skidgel, R. A. (1988) Human neutral endopeptidase 24.11 (NEP, enkephalinase); function, distribution and release. *Adv Exp Med Biol* 240, 13-21
14. Connelly, J. C., Skidgel, R. A., Schulz, W. W., Johnson, A. R., and Erdos, E. G. (1985) Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8737-8741
15. Turner, A. J., and Tanzawa, K. (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J* 11, 355-364
16. Skidgel, R. A. (1985) Characterization of the metabolism of substance P and neurotensin by human angiotensin I converting enzyme and "enkephalinase". *Prog Clin Biol Res* 192, 371-378
17. Iwase, A., Shen, R., Navarro, D., and Nanus, D. M. (2004) Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of CD44 with ERM proteins. *J Biol Chem* 279, 11898-11905
18. Ganju, R. K., Shpektor, R. G., Brenner, D. G., and Shipp, M. A. (1996) CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src-related kinase. *Blood* 88, 4159-4165
19. Sumitomo, M., Iwase, A., Zheng, R., Navarro, D., Kaminetzky, D., Shen, R., Georgescu, M. M., and Nanus, D. M. (2004) Synergy in tumor suppression by direct interaction of neutral endopeptidase with PTEN. *Cancer Cell* 5, 67-78
20. Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., Iwatsubo, T., and Saido, T. C. (2001) Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem* 276, 21895-21901
21. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J., and Saido, T. C. (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550-1552

22. Marr, R. A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M. S., Hersh, L. B., Gage, F. H., Verma, I. M., and Masliah, E. (2003) Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 23, 1992-1996
23. Marr, R. A., Guan, H., Rockenstein, E., Kindy, M., Gage, F. H., Verma, I., Masliah, E., and Hersh, L. B. (2004) Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels. *J Mol Neurosci* 22, 5-11
24. Wang, D. S., Dickson, D. W., and Malter, J. S. (2006) beta-Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *J Biomed Biotechnol* 2006, 58406
25. Hemming, M. L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O., and Selkoe, D. J. (2007) Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Med* 4, e262
26. Farris, W., Schutz, S. G., Cirrito, J. R., Shankar, G. M., Sun, X., George, A., Leissring, M. A., Walsh, D. M., Qiu, W. Q., Holtzman, D. M., and Selkoe, D. J. (2007) Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol* 171, 241-251
27. Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., and Love, S. (2008) Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18, 240-252
28. Iijima-Ando, K., Hearn, S. A., Granger, L., Shenton, C., Gatt, A., Chiang, H. C., Hakker, I., Zhong, Y., and Iijima, K. (2008) Overexpression of neprilysin reduces alzheimer amyloid-beta42 (Abeta42)-induced neuron loss and intraneuronal Abeta42 deposits but causes a reduction in cAMP-responsive element-binding protein-mediated transcription, age-dependent axon pathology, and premature death in *Drosophila*. *J Biol Chem* 283, 19066-19076
29. Papandreou, C. N., Usmani, B., Geng, Y., Bogenrieder, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C. L., Reuter, V. E., Powell, C. T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H. I., Albino, A. P., and Nanus, D. M. (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4, 50-57
30. Sumitomo, M., Shen, R., Walburg, M., Dai, J., Geng, Y., Navarro, D., Boileau, G., Papandreou, C. N., Giancotti, F. G., Knudsen, B., and Nanus, D. M. (2000) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 106, 1399-1407
31. Sumitomo, M., Shen, R., and Nanus, D. M. (2005) Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta* 1751, 52-59
32. de la Monte, S. M. (2009) Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep* 42, 475-481
33. Le Moual, H., Dion, N., Roques, B. P., Crine, P., and Boileau, G. (1994) Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur J Biochem* 221, 475-480
34. Oefner, C., Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M. C., and Dale, G. E. (2004) Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 392-396
35. Forstl, H., and Kurz, A. (1999) Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249, 288-290
36. Jellinger, K., Danielczyk, W., Fischer, P., and Gabriel, E. (1990) Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly. *J Neurol Sci* 95, 239-258
37. Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., and Arrighi, H. M. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3, 186-191
38. Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., and Murtagh, F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8, 429-431
39. Thorsett, E. D., and Latimer, L. H. (2000) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol* 4, 377-382
40. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., and Wisniewski, H. M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089
41. Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2000) Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta* 1502, 122-132
42. Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270, 7679-7688
43. Chung, S. H. (2009) Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB Rep* 42, 467-474

44. Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., and Imahori, K. (1993) Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 325, 167-172
45. Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6923-6928
46. Li, T., and Paudel, H. K. (2006) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry* 45, 3125-3133
47. 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
48. Bondareff, W., Harrington, C., Wischik, C. M., Hauser, D. L., and Roth, M. (1994) Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 158-164
49. Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994) Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* 61, 765-772
50. Tian, Q., and Wang, J. (2002) Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11, 262-269
51. Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 425-427
52. Armstrong, R. A. (2006) Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 44, 1-11
53. Magdesian, M. H., Carvalho, M. M., Mendes, F. A., Saraiva, L. M., Juliano, M. A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., and Ferreira, S. T. (2008) Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283, 9359-9368
54. Hooper, C., Killick, R., and Lovestone, S. (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104, 1433-1439
55. De Felice, F. G., Vieira, M. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K. L., Zhao, W. Q., Ferreira, S. T., and Klein, W. L. (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1971-1976
56. Lee, H. K., Kumar, P., Fu, Q., Rosen, K. M., and Querfurth, H. W. (2009) The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Mol Biol Cell* 20, 1533-1544
57. Dickson, D. W. (2009) Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders. *Int J Clin Exp Pathol* 3, 1-23
58. Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880
59. Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q., and White, K. (1989) A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2478-2482
60. Luo, L. Q., Martin-Morris, L. E., and White, K. (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10, 3849-3861
61. Daigle, I., and Li, C. (1993) apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 12045-12049
62. Zheng, H., and Koo, E. H. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5
63. Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1993) Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9513-9517
64. Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S., and Beyreuther, K. (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* 24, 3624-3634
65. Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., Stevens, K. A., Slunt, H. H., Sisodia, S. S., Chen, H. Y., and Van der Ploeg, L. H. (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531

66. von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18, 661-669
67. Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfer, D. P., and Muller, U. (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963
68. Kennedy, J. L., Farrer, L. A., Andreasen, N. C., Mayeux, R., and St George-Hyslop, P. (2003) The genetics of adult-onset neuropsychiatric disease: complexities and conundra? *Science* 302, 822-826
69. Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P., and Selkoe, D. J. (1996) Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13170-13175
70. Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212-216
71. Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Smirnov, A., Otto, M., Paul, S., Schmidt, B., Klafki, H. W., Maler, M., Dyrks, T., Bienert, M., Beyermann, M., Ruther, E., and Kornhuber, J. (2002) Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 81, 481-496
72. Barrow, C. J., and Zagorski, M. G. (1991) Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* 253, 179-182
73. Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. (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
74. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B., and 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
75. Haass, C., and Selkoe, D. J. (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039-1042
76. Deuss, M., Reiss, K., and Hartmann, D. (2008) Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 5, 187-201
77. Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F., and Fahrenholz, F. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113, 1456-1464
78. Etcheberrigaray, R., Tan, M., Dewachter, I., Kuiperi, C., Van der Auwera, I., Wera, S., Qiao, L., Bank, B., Nelson, T. J., Kozikowski, A. P., Van Leuven, F., and Alkon, D. L. (2004) Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11141-11146
79. Seals, D. F., and Courtneidge, S. A. (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17, 7-30
80. Primakoff, P., and Myles, D. G. (2000) The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16, 83-87
81. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741
82. Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., and John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540
83. Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., and Christie, G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427

84. Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., and Vassar, R. (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* 275, 37712-37717
85. Charlwood, J., Dingwall, C., Matico, R., Hussain, I., Johanson, K., Moore, S., Powell, D. J., Skehel, J. M., Ratcliffe, S., Clarke, B., Trill, J., Sweitzer, S., and Camilleri, P. (2001) Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta -secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. *J Biol Chem* 276, 16739-16748
86. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 33729-33737
87. Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 30849-30854
88. Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276, 14634-14641
89. Li, Q., and Sudhof, T. C. (2004) Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem* 279, 10542-10550
90. Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278, 48713-48719
91. Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Kotani, N., Ogawa, K., Suzuki, M., Dohmae, N., Takio, K., Saido, T. C., and Hashimoto, Y. (2003) Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1). *J Biol Chem* 278, 14865-14871
92. Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S., and McConlogue, L. (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10, 1317-1324
93. Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4, 231-232
94. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234
95. Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I. E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A. J., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saftig, P., and De Strooper, B. (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem* 280, 30797-30806
96. Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666
97. Sankaranarayanan, S., Price, E. A., Wu, G., Crouthamel, M. C., Shi, X. P., Tugusheva, K., Tyler, K. X., Kahana, J., Ellis, J., Jin, L., Steele, T., Stachel, S., Coburn, C., and Simon, A. J. (2008) In vivo beta-secretase 1 inhibition leads to brain Abeta lowering and increased alpha-secretase processing of amyloid precursor protein without effect on neuregulin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 957-969
98. Ghosh, A. K., Gemma, S., and Tang, J. (2008) beta-Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5, 399-408
99. Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., and Walter, J. (2002) A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J Neurochem* 81, 1011-1020
100. Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000) BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9712-9717
101. Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem* 275, 20647-20651

102. Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024
103. Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., and et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760
104. Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H. (2002) Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8666-8671
105. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 277, 39062-39065
106. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J. S., and Curtis, D. (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
107. Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., and Annaert, W. (2006) Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* 281, 26569-26577
108. Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2000) The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275, 3173-3178
109. Wolfe, M. S., De Los Angeles, J., Miller, D. D., Xia, W., and Selkoe, D. J. (1999) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38, 11223-11230
110. Ratovitski, T., Slunt, H. H., Thinakaran, G., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Borchelt, D. R. (1997) Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem* 272, 24536-24541
111. Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005) Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447
112. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., and St George-Hyslop, P. (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54
113. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-441
114. Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G., and Xu, H. (2003) PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 278, 7850-7854
115. Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2006) Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* 3, 275-283
116. Dries, D. R., and Yu, G. (2008) Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5, 132-146
117. Sato, T., Diehl, T. S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M. S. (2007) Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* 282, 33985-33993
118. Chen, F., Hasegawa, H., Schmitt-Ulms, G., Kawarai, T., Bohm, C., Katayama, T., Gu, Y., Sanjo, N., Glista, M., Rogaeva, E., Wakutani, Y., Pardossi-Piquard, R., Ruan, X., Tandon, A., Checler, F., Marambaud, P., Hansen, K., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Fraser, P. (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* 440, 1208-1212
119. Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., Wasco, W., and Selkoe, D. J. (2003) gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* 42, 6664-6673
120. Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., and Robakis, N. K. (2002) A presenilin-

- 1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* 21, 1948-1956
121. May, P., Reddy, Y. K., and Herz, J. (2002) Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem* 277, 18736-18743
  122. Saxena, M. T., Schroeter, E. H., Mumm, J. S., and Kopan, R. (2001) Murine notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 276, 40268-40273
  123. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522
  124. Prager, K., Wang-Eckhardt, L., Fluhrer, R., Killick, R., Barth, E., Hampel, H., Haass, C., and Walter, J. (2007) A structural switch of presenilin 1 by glycogen synthase kinase 3beta-mediated phosphorylation regulates the interaction with beta-catenin and its nuclear signaling. *J Biol Chem* 282, 14083-14093
  125. Kang, D. E., Soriano, S., Xia, X., Eberhart, C. G., De Strooper, B., Zheng, H., and Koo, E. H. (2002) Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* 110, 751-762
  126. Tamboli, I. Y., Prager, K., Thal, D. R., Thelen, K. M., Dewachter, I., Pietrzik, C. U., St George-Hyslop, P., Sisodia, S. S., De Strooper, B., Heneka, M. T., Filippov, M. A., Muller, U., van Leuven, F., Lutjohann, D., and Walter, J. (2008) Loss of gamma-secretase function impairs endocytosis of lipoprotein particles and membrane cholesterol homeostasis. *J Neurosci* 28, 12097-12106
  127. Mattson, M. P., Guo, Q., Furukawa, K., and Pedersen, W. A. (1998) Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 70, 1-14
  128. Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S. F., Hao, Y. H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006) Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981-993
  129. Ott, A., Breteler, M. M., van Harskamp, F., Claus, J. J., van der Cammen, T. J., Grobbee, D. E., and Hofman, A. (1995) Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *Bmj* 310, 970-973
  130. Selkoe, D. J. (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271, 18295-18298
  131. Bu, G. (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 10, 333-344
  132. Kim, J., Basak, J. M., and Holtzman, D. M. (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303
  133. Cedazo-Minguez, A. (2007) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med* 11, 1227-1238
  134. Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766
  135. Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706
  136. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674
  137. Cai, X. D., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514-516
  138. Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G., and Sisodia, S. S. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005-1013
  139. Betts, V., Leissring, M. A., Dolios, G., Wang, R., Selkoe, D. J., and Walsh, D. M. (2008) Aggregation and catabolism of disease-associated intra-Abeta mutations: reduced proteolysis of AbetaA21G by neprilysin. *Neurobiol Dis* 31, 442-450
  140. Stockley, J. H., and O'Neill, C. (2007) The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochem Soc Trans* 35, 574-576
  141. Kern, A., Roempp, B., Prager, K., Walter, J., and Behl, C. (2006) Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging. *J Biol Chem* 281, 2405-2413

142. Tyler, S. J., Dawbarn, D., Wilcock, G. K., and Allen, S. J. (2002) alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 373-376
143. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D. M., Miller, C. A., Strickland, D. K., Ghiso, J., and Zlokovic, B. V. (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106, 1489-1499
144. Lue, L. F., Walker, D. G., Brachova, L., Beach, T. G., Rogers, J., Schmidt, A. M., Stern, D. M., and Yan, S. D. (2001) Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol* 171, 29-45
145. Deane, R., Sagare, A., and Zlokovic, B. V. (2008) The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 14, 1601-1605
146. Deane, R., Bell, R. D., Sagare, A., and Zlokovic, B. V. (2009) Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 16-30
147. Kuhnke, D., Jedlitschky, G., Grube, M., Krohn, M., Jucker, M., Mosyagin, I., Cascorbi, I., Walker, L. C., Kroemer, H. K., Warzok, R. W., and Vogelgesang, S. (2007) MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol* 17, 347-353
148. Lam, F. C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A. B., Renoir, J. M., Sharom, F. J., and Reiner, P. B. (2001) beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 76, 1121-1128
149. Paresce, D. M., Chung, H., and Maxfield, F. R. (1997) Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem* 272, 29390-29397
150. Savage, M. J., Trusko, S. P., Howland, D. S., Pinsky, L. R., Mistretta, S., Reaume, A. G., Greenberg, B. D., Siman, R., and Scott, R. W. (1998) Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J Neurosci* 18, 1743-1752
151. Cirrito, J. R., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, J. W., Parsadanian, M., Cramer, J. W., Audia, J. E., Nissen, J. S., Bales, K. R., Paul, S. M., DeMattos, R. B., and Holtzman, D. M. (2003) In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* 23, 8844-8853
152. LaFerla, F. M., Green, K. N., and Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499-509
153. Gouras, G. K., Almeida, C. G., and Takahashi, R. H. (2005) Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26, 1235-1244
154. Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lammich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., and Haass, C. (2003) Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation. *J Biol Chem* 278, 5531-5538
155. Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442
156. Strickland, S., Gualandris, A., Rogove, A. D., and Tsirka, S. E. (1996) Extracellular proteases in neuronal function and degeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61, 739-745
157. Kingston, I. B., Castro, M. J., and Anderson, S. (1995) In vitro stimulation of tissue-type plasminogen activator by Alzheimer amyloid beta-peptide analogues. *Nat Med* 1, 138-142
158. Tucker, H. M., Simpson, J., Kihiko-Ehmann, M., Younkin, L. H., McGillis, J. P., Younkin, S. G., Degen, J. L., and Estus, S. (2004) Plasmin deficiency does not alter endogenous murine amyloid beta levels in mice. *Neurosci Lett* 368, 285-289
159. Lu, Y., Wang, M., Liu, Z., Wang, F., Da, Y., and Jia, J. (2009) No association between the promoter polymorphisms of PAI-1 gene and sporadic Alzheimer's disease in Chinese Han population. *Neurosci Lett* 455, 97-100
160. Davenport, A. P., and Kuc, R. E. (2000) Cellular expression of isoforms of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1c, ECE-1b and ECE-1a) and endothelin-converting enzyme-2. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, S12-14
161. Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelbock, P., Deuschle, U., Dumas Milne Edwards, J. B., Stumpf, J. G., and Löffler, B. M. (1997) Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 328 ( Pt 3), 871-877
162. Azarani, A., Boileau, G., and Crine, P. (1998) Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J* 333 ( Pt 2), 439-448
163. Fahnoe, D. C., Knapp, J., Johnson, G. D., and Ahn, K. (2000) Inhibitor potencies and substrate preference for endothelin-converting enzyme-1 are dramatically affected by pH. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, S22-25

164. Takaki, Y., Iwata, N., Tsubuki, S., Taniguchi, S., Toyoshima, S., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Lee, H. J., Shirotani, K., and Saido, T. C. (2000) Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J Biochem* 128, 897-902
165. Eckman, E. A., Reed, D. K., and Eckman, C. B. (2001) Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 276, 24540-24548
166. Eckman, E. A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K., and Eckman, C. B. (2003) Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 278, 2081-2084
167. Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., and Clauser, E. (1991) The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem* 266, 9002-9008
168. Saavedra, J. M., and Chevillard, C. (1982) Angiotensin-converting enzyme is present in the subfornical organ and other circumventricular organs of the rat. *Neurosci Lett* 29, 123-127
169. Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., and Soubrier, F. (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86, 1343-1346
170. Kehoe, P. G., Russ, C., McIlroy, S., Williams, H., Holmans, P., Holmes, C., Liolitsa, D., Vahidassr, D., Powell, J., McGleenon, B., Liddell, M., Plomin, R., Dynan, K., Williams, N., Neal, J., Cairns, N. J., Wilcock, G., Passmore, P., Lovestone, S., Williams, J., and Owen, M. J. (1999) Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet* 21, 71-72
171. Eckman, E. A., Adams, S. K., Troendle, F. J., Stodola, B. A., Kahn, M. A., Fauq, A. H., Xiao, H. D., Bernstein, K. E., and Eckman, C. B. (2006) Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 281, 30471-30478
172. Barnes, N. M., Cheng, C. H., Costall, B., Naylor, R. J., Williams, T. J., and Wischik, C. M. (1991) Angiotensin converting enzyme density is increased in temporal cortex from patients with Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 200, 289-292
173. Zhao, J., Li, L., and Leissring, M. A. (2009) Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener* 4, 4
174. Duckworth, W. C., Bennett, R. G., and Hamel, F. G. (1998) Insulin acts intracellularly on proteasomes through insulin-degrading enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 390-394
175. Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B., and Selkoe, D. J. (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273, 32730-32738
176. Seta, K. A., and Roth, R. A. (1997) Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 167-171
177. Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M. R., and Selkoe, D. J. (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* 20, 1657-1665
178. Leissring, M. A., Farris, W., Wu, X., Christodoulou, D. C., Haigis, M. C., Guarente, L., and Selkoe, D. J. (2004) Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J* 383, 439-446
179. Duckworth, W. C., Bennett, R. G., and Hamel, F. G. (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19, 608-624
180. Selkoe, D. J. (2001) Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32, 177-180
181. Qiu, W. Q., Ye, Z., Kholodenko, D., Seubert, P., and Selkoe, D. J. (1997) Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem* 272, 6641-6646
182. Sudoh, S., Frosch, M. P., and Wolf, B. A. (2002) Differential effects of proteases involved in intracellular degradation of amyloid beta-protein between detergent-soluble and -insoluble pools in CHO-695 cells. *Biochemistry* 41, 1091-1099
183. Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P., and Selkoe, D. J. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087-1093
184. Farris, W., Mansourian, S., Leissring, M. A., Eckman, E. A., Bertram, L., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., and Selkoe, D. J. (2004) Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* 164, 1425-1434
185. Cook, D. G., Leverenz, J. B., McMillan, P. J., Kulstad, J. J., Ericksen, S., Roth, R. A., Schellenberg, G. D., Jin, L. W., Kovacina, K. S., and Craft, S. (2003) Reduced hippocampal

- insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 162, 313-319
186. Kanemitsu, H., Tomiyama, T., and Mori, H. (2003) Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett* 350, 113-116
187. Huang, S. M., Mouri, A., Kokubo, H., Nakajima, R., Suemoto, T., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Noda, Y., Yamaguchi, H., Nabeshima, T., Saido, T. C., and Iwata, N. (2006) Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem* 281, 17941-17951
188. Skidgel, R. A., and Erdos, E. G. (2004) Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides* 25, 521-525
189. Fukami, S., Watanabe, K., Iwata, N., Haraoka, J., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Fraser, P., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Saido, T. C. (2002) Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci Res* 43, 39-56
190. Barnes, K., Turner, A. J., and Kenny, A. J. (1992) Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurochem* 58, 2088-2096
191. Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P. (1995) Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 16, 647-652
192. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T. C. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6, 143-150
193. Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297, 97-100
194. Braak, H., and Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259
195. Mohajeri, M. H., Kuehnle, K., Li, H., Poirier, R., Tracy, J., and Nitsch, R. M. (2004) Anti-amyloid activity of neprilysin in plaque-bearing mouse models of Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 562, 16-21
196. Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M. C., Akbari, Y., and LaFerla, F. M. (2005) Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging* 26, 645-654
197. Apelt, J., Ach, K., and Schliebs, R. (2003) Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci Lett* 339, 183-186
198. Iwata, N., Takaki, Y., Fukami, S., Tsubuki, S., and Saido, T. C. (2002) Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70, 493-500
199. Wang, D. S., Iwata, N., Hama, E., Saido, T. C., and Dickson, D. W. (2003) Oxidized neprilysin in aging and Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 236-241
200. Yasojima, K., McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (2001) Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 919, 115-121
201. Hama, E., Shirotani, K., Iwata, N., and Saido, T. C. (2004) Effects of neprilysin chimeric proteins targeted to subcellular compartments on amyloid beta peptide clearance in primary neurons. *J Biol Chem* 279, 30259-30264
202. Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S. M., Suemoto, T., Higuchi, M., and Saido, T. C. (2005) Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11, 434-439
203. Petanceska, S. S., Nagy, V., Frail, D., and Gandy, S. (2000) Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. *Exp Gerontol* 35, 1317-1325
204. Huang, J., Guan, H., Booze, R. M., Eckman, C. B., and Hersh, L. B. (2004) Estrogen regulates neprilysin activity in rat brain. *Neurosci Lett* 367, 85-87
205. Gandy, S. (1999) Neurohormonal Signaling Pathways and the Regulation of Alzheimer beta-Amyloid Precursor Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 10, 273-279

206. Tang, M. X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., and Mayeux, R. (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429-432
207. Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Hairston, I. S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V. M., Hersh, L. B., Sapolsky, R. M., Mirnic, K., and Sisodia, S. S. (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120, 701-713
208. Rozengurt, E. (1998) Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol* 177, 507-517
209. Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A., and Elias, L. (1998) Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* 273, 7594-7603
210. Terawaki, S., Kitano, K., and Hakoshima, T. (2007) Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex. *J Biol Chem* 282, 19854-19862
211. Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140, 647-657
212. Herrlich, P., Morrison, H., Sleeman, J., Orian-Rousseau, V., Konig, H., Weg-Remers, S., and Ponta, H. (2000) CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci* 910, 106-118; discussion 118-120
213. Isacke, C. M., and Yarwood, H. (2002) The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 718-721
214. Tokunaga, E., Oki, E., Egashira, A., Sadanaga, N., Morita, M., Kakeji, Y., and Maehara, Y. (2008) Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 27-36
215. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliarsis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947
216. Li, D. M., and Sun, H. (1997) TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 57, 2124-2129
217. Downes, C. P., Perera, N., Ross, S., and Leslie, N. R. (2007) Substrate specificity and acute regulation of the tumour suppressor phosphatase, PTEN. *Biochem Soc Symp*, 69-80
218. McConnachie, G., Pass, I., Walker, S. M., and Downes, C. P. (2003) Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem J* 371, 947-955
219. Engelman, J. A., Luo, J., and Cantley, L. C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619
220. Leslie, N. R., Batty, I. H., Maccario, H., Davidson, L., and Downes, C. P. (2008) Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene* 27, 5464-5476
221. Gericke, A., Munson, M., and Ross, A. H. (2006) Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* 374, 1-9
222. Lindsay, Y., McCoull, D., Davidson, L., Leslie, N. R., Fairservice, A., Gray, A., Lucocq, J., and Downes, C. P. (2006) Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. *J Cell Sci* 119, 5160-5168
223. Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., and Pavletich, N. P. (1999) Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323-334
224. Georgescu, M. M., Kirsch, K. H., Kaloudis, P., Yang, H., Pavletich, N. P., and Hanafusa, H. (2000) Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 60, 7033-7038
225. Maccario, H., Perera, N. M., Davidson, L., Downes, C. P., and Leslie, N. R. (2007) PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J* 405, 439-444
226. Al-Khouri, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S., and Mustelin, T. (2005) Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* 280, 35195-35202
227. Arevalo, M. A., and Rodriguez-Tebar, A. (2006) Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3beta and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell* 17, 3369-3377

228. Miller, S. J., Lou, D. Y., Seldin, D. C., Lane, W. S., and Neel, B. G. (2002) Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett* 528, 145-153
229. Torres, J., and Pulido, R. (2001) The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276, 993-998
230. Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N., and Sellers, W. R. (2000) Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20, 5010-5018
231. Das, S., Dixon, J. E., and Cho, W. (2003) Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7491-7496
232. Vazquez, F., Matsuoka, S., Sellers, W. R., Yanagida, T., Ueda, M., and Devreotes, P. N. (2006) Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3633-3638
233. Vazquez, F., Grossman, S. R., Takahashi, Y., Rokas, M. V., Nakamura, N., and Sellers, W. R. (2001) Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* 276, 48627-48630
234. Rahdar, M., Inoue, T., Meyer, T., Zhang, J., Vazquez, F., and Devreotes, P. N. (2009) A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 480-485
235. Vazquez, F., and Devreotes, P. (2006) Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle* 5, 1523-1527
236. Ahmad, K. A., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., and Ahmed, K. (2008) Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* 48, 179-187
237. Guerra, B., and Issinger, O. G. (1999) Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* 20, 391-408
238. Graham, K. C., and Litchfield, D. W. (2000) The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *J Biol Chem* 275, 5003-5010
239. Marin, O., Meggio, F., and Pinna, L. A. (1994) Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 898-905
240. Ahmed, K., Davis, A. T., Wang, H., Faust, R. A., Yu, S., and Tawfic, S. (2000) Significance of protein kinase CK2 nuclear signaling in neoplasia. *J Cell Biochem Suppl* 35, 130-135
241. Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A., and Ahmed, K. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol* 16, 573-582
242. Pinna, L. A., and Meggio, F. (1997) Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* 3, 77-97
243. Pinna, L. A. (1990) Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* 1054, 267-284
244. Meek, D. W., Simon, S., Kikkawa, U., and Eckhart, W. (1990) The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *Embo J* 9, 3253-3260
245. Meggio, F., Marin, O., and Pinna, L. A. (1994) Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40, 401-409
246. Cochet, C., and Chambaz, E. M. (1983) Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments. *J Biol Chem* 258, 1403-1406
247. Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N., and Chambaz, E. M. (1991) Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* 30, 11133-11140
248. Leroy, D., Heriche, J. K., Filhol, O., Chambaz, E. M., and Cochet, C. (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J Biol Chem* 272, 20820-20827
249. Zhang, C., Vilc, G., Canton, D. A., and Litchfield, D. W. (2002) Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit. *Oncogene* 21, 3754-3764
250. Laramas, M., Pasquier, D., Filhol, O., Ringeisen, F., Descotes, J. L., and Cochet, C. (2007) Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur J Cancer* 43, 928-934
251. Faust, R. A., Niehans, G., Gapany, M., Hoistad, D., Knapp, D., Cherwitz, D., Davis, A., Adams, G. L., and Ahmed, K. (1999) Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in normal and carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 941-949
252. Kleijn, M., Welsh, G. I., Scheper, G. C., Voorma, H. O., Proud, C. G., and Thomas, A. A. (1998) Nerve and epidermal growth factor induce protein synthesis and eIF2B activation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273, 5536-5541

253. Gao, Y., and Wang, H. Y. (2006) Casein kinase 2 Is activated and essential for Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 281, 18394-18400
254. Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30, 193-204
255. Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365
256. Nicholson, K. M., and Anderson, N. G. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395
257. Pawson, T., and Nash, P. (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 14, 1027-1047
258. Hunter, T. (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127
259. Panayotou, G., Bax, B., Gout, I., Federwisch, M., Wroblowski, B., Dhand, R., Fry, M. J., Blundell, T. L., Wollmer, A., and Waterfield, M. D. (1992) Interaction of the p85 subunit of PI 3-kinase and its N-terminal SH2 domain with a PDGF receptor phosphorylation site: structural features and analysis of conformational changes. *Embo J* 11, 4261-4272
260. Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., and Bownes, M. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-789
261. Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 15, 6541-6551
262. Hresko, R. C., and Mueckler, M. (2005) mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280, 40406-40416
263. Meier, R., and Hemmings, B. A. (1999) Regulation of protein kinase B. *J Recept Signal Transduct Res* 19, 121-128
264. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274
265. Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., and O'Neill, C. (2008) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging*
266. de la Monte, S. M., Tong, M., Lester-Coll, N., Plater, M., Jr., and Wands, J. R. (2006) Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 10, 89-109
267. Hoyer, S. (2004) Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 541, 135-152
268. Liao, F. F., and Xu, H. (2009) Insulin signaling in sporadic Alzheimer's disease. *Sci Signal* 2, pe36
269. Townsend, M., Mehta, T., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282, 33305-33312
270. Jolivalt, C. G., Lee, C. A., Beiswenger, K. K., Smith, J. L., Orlov, M., Torrance, M. A., and Masliah, E. (2008) Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res* 86, 3265-3274
271. Uemura, K., Kuzuya, A., Shimozone, Y., Aoyagi, N., Ando, K., Shimohama, S., and Kinoshita, A. (2007) GSK3beta activity modifies the localization and function of presenilin 1. *J Biol Chem* 282, 15823-15832
272. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245-4249
273. Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
274. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
275. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85
276. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
277. Jalal, F., Lemay, G., Zollinger, M., Berteloot, A., Boileau, G., and Crine, P. (1991) Neutral endopeptidase, a major brush border protein of the kidney proximal nephron, is directly targeted to the apical domain when expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 266, 19826-19832

278. Daniels, G. M., and Amara, S. G. (1998) Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface. *Methods Enzymol* 296, 307-318
279. Pinna, L. A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* 115, 3873-3878
280. McKendrick, L., Milne, D., and Meek, D. (1999) Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable. *Mol Cell Biochem* 191, 187-199
281. Hershko, A., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (2000) Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 6, 1073-1081
282. Singh, S., Darnay, B. G., and Aggarwal, B. B. (1996) Site-specific tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  negatively regulates its inducible phosphorylation and degradation. *J Biol Chem* 271, 31049-31054
283. Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., and Tsukita, S. (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126, 391-401
284. Gimm, O., Perren, A., Weng, L. P., Marsh, D. J., Yeh, J. J., Ziebold, U., Gil, E., Hinze, R., Delbridge, L., Lees, J. A., Mutter, G. L., Robinson, B. G., Komminoth, P., Dralle, H., and Eng, C. (2000) Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 156, 1693-1700
285. Lobo, G. P., Waite, K. A., Planchon, S. M., Romigh, T., Houghton, J. A., and Eng, C. (2008) ATP modulates PTEN subcellular localization in multiple cancer cell lines. *Hum Mol Genet* 17, 2877-2885
286. Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B., and Issinger, O. G. (1999) Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 $\beta$  subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 $\alpha$  subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett* 462, 353-357
287. Kenny, J. (1993) Endopeptidase-24.11: putative substrates and possible roles. *Biochem Soc Trans* 21 ( Pt 3), 663-668
288. Shipp, M. A., Tarr, G. E., Chen, C. Y., Switzer, S. N., Hersh, L. B., Stein, H., Sunday, M. E., and Reinherz, E. L. (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10662-10666
289. Hansson, J., and Abrahamsson, P. A. (2001) Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostate. *Ann Oncol* 12 Suppl 2, S145-152
290. Nelson, J. B., and Carducci, M. A. (2000) Small bioactive peptides and cell surface peptidases in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Invest* 18, 87-96
291. Nelson, J. B., and Carducci, M. A. (2000) The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in prostate cancer. *BJU Int* 85 Suppl 2, 45-48
292. Angelisova, P., Drbal, K., Horejsi, V., and Cerny, J. (1999) Association of CD10/neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Lyn kinase. *Blood* 93, 1437-1439
293. Cantley, L. C., and Neel, B. G. (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245
294. Hill, M. M., and Hemmings, B. A. (2002) Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 93, 243-251
295. Muller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85, 393-406
296. Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Muller, U., St George Hyslop, P., and Checler, F. (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the A $\beta$ -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-554
297. Pardossi-Piquard, R., Dunys, J., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Sevalle, J., Pimplikar, S., St George-Hyslop, P., and Checler, F. (2007) Response to correspondence: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-dependent transcriptional control of the A $\beta$ -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP." *Neuron* 46, 541-554. *Neuron* 53, 483-486
298. Chen, A. C., and Selkoe, D. J. (2007) Response to: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the A $\beta$ -Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of betaAPP and APLP." *Neuron* 46, 541-554. *Neuron* 53, 479-483
299. Xiao, Z. M., Sun, L., Liu, Y. M., Zhang, J. J., and Huang, J. (2009) Estrogen Regulation of the Neprilysin Gene Through A Hormone-Responsive Element. *J Mol Neurosci*

300. Howell, S., Murray, H., Scott, C. S., Turner, A. J., and Kenny, A. J. (1991) A highly sensitive E.L.I.S.A. for endopeptidase-24.11, the common acute-lymphoblastic-leukaemia antigen (CALLA, CD-10), applicable to material of porcine and human origin. *Biochem J* 278 ( Pt 2), 417-421
301. Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B., and Haass, C. (2000) Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem* 275, 23523-23529
302. Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997) Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 272, 1896-1903
303. Nguyen, H. T., Dalmaso, G., Yan, Y., Obertone, T. S., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2008) Ecto-phosphorylation of CD98 regulates cell-cell interactions. *PLoS ONE* 3, e3895
304. Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362
305. Thingholm, T. E., Larsen, M. R., Ingrell, C. R., Kassem, M., and Jensen, O. N. (2008) TiO(2)-based phosphoproteomic analysis of the plasma membrane and the effects of phosphatase inhibitor treatment. *J Proteome Res* 7, 3304-3313
306. Filhol, O., and Cochet, C. (2009) Cellular functions of Protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cell Mol Life Sci*
307. Faust, M., and Montenarh, M. (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* 301, 329-340
308. Bengoechea-Alonso, M. T., and Ericsson, J. (2009) A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1. *J Biol Chem* 284, 5885-5895
309. Tamura, G., Ando, K., Suzuki, S., Takatsuki, A., and Arima, K. (1968) Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *J Antibiot (Tokyo)* 21, 160-161
310. Valdenaire, O., Rohrbacher, E., and Mattei, M. G. (1995) Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 270, 29794-29798
311. Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A., Barret, A., Vranckx, R., Tougard, C., and Michel, J. B. (1999) A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 264, 341-349
312. Kohlstedt, K., Shoghi, F., Muller-Esterl, W., Busse, R., and Fleming, I. (2002) CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane. *Circ Res* 91, 749-756
313. Meggio, F., and Pinna, L. A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* 17, 349-368
314. Citron, M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995) Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-670
315. Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., and Hyman, B. T. (2003) Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci* 116, 3339-3346
316. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1, 1291-1296
317. Mori, T., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Fukami, Y., and Hakoshima, T. (2008) Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *J Biol Chem* 283, 29602-29612
318. Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140, 885-895
319. Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135, 37-51
320. Legg, J. W., Lewis, C. A., Parsons, M., Ng, T., and Isacke, C. M. (2002) A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* 4, 399-407
321. Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1999) Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9, 1259-1262
322. Wu, X., Hepner, K., Castelino-Prabhu, S., Do, D., Kaye, M. B., Yuan, X. J., Wood, J., Ross, C., Sawyers, C. L., and Whang, Y. E. (2000) Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor

- by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4233-4238
323. Takahashi, Y., Morales, F. C., Kreimann, E. L., and Georgescu, M. M. (2006) PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. *Embo J* 25, 910-920
324. Maehama, T., and Dixon, J. E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378
325. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789
326. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321
327. Biggs, W. H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K., and Arden, K. C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7421-7426
328. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868
329. Gary, R., and Bretscher, A. (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6, 1061-1075
330. Piazza, F. A., Ruzzene, M., Gurrieri, C., Montini, B., Bonanni, L., Chioetto, G., Di Maira, G., Barbon, F., Cabrelle, A., Zambello, R., Adami, F., Trentin, L., Pinna, L. A., and Semenzato, G. (2006) Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. *Blood* 108, 1698-1707
331. Scaglioni, P. P., Yung, T. M., Cai, L. F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A. J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., and Pandolfi, P. P. (2006) A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-283
332. Wang, G., Ahmad, K. A., Unger, G., Slaton, J. W., and Ahmed, K. (2006) CK2 signaling in androgen-dependent and -independent prostate cancer. *J Cell Biochem* 99, 382-391
333. Martin, D., Salinas, M., Lopez-Valdaliso, R., Serrano, E., Recuero, M., and Cuadrado, A. (2001) Effect of the Alzheimer amyloid fragment A $\beta$ (25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. *J Neurochem* 78, 1000-1008
334. He, P., and Shen, Y. (2009) Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29, 6545-6557
335. Baum, L., Hansen, L., Masliah, E., and Saitoh, T. (1996) Glycogen synthase kinase 3 alteration in Alzheimer disease is related to neurofibrillary tangle formation. *Mol Chem Neuropathol* 29, 253-261
336. Ma, R., Xiong, N., Huang, C., Tang, Q., Hu, B., Xiang, J., and Li, G. (2009) Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology* 56, 1027-1034
337. Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R., and Robakis, N. K. (2004) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *Embo J* 23, 2586-2596
338. Baki, L., Neve, R. L., Shao, Z., Shioi, J., Georgakopoulos, A., and Robakis, N. K. (2008) Wild-type but not FAD mutant presenilin-1 prevents neuronal degeneration by promoting phosphatidylinositol 3-kinase neuroprotective signaling. *J Neurosci* 28, 483-490
339. Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galldik, N., Kustermann, E., Arndt, S., Jacobs, A. H., Krone, W., Kahn, C. R., and Bruning, J. C. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3100-3105
340. Reikhardt, B. A., Kulikova, O. G., Borisova, G., Aleksandrova, I., and Saponov, N. S. (2002) [State of the "protein kinase CK2-HMG14" system in age-dependent amnesia in rats]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 88, 612-618
341. Bondy, C. A., and Cheng, C. M. (2004) Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol* 490, 25-31

