

## Alzheimer-Demenz und Proteolyse

# Regulation des *shedding* von Membranproteinen durch ADAM10

KRISTINA ENDRES

KLINIK FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER UNIVERSITÄT MAINZ

**Balancing proteolysis of membrane proteins is relevant in many processes within the cell as both, the extracellular domain but also intracellular protein fragments can exert distinct functions. To ensure timely and spatially coordinated occurrence of such shedding events, many factors impact activity of the participating proteases. Here, I describe regulation of one such protease (ADAM 10) via different transcription factors due to the respective physiological state of the cell.**

DOI:10.1007/s12268-019-1045-7  
© Springer-Verlag 2019

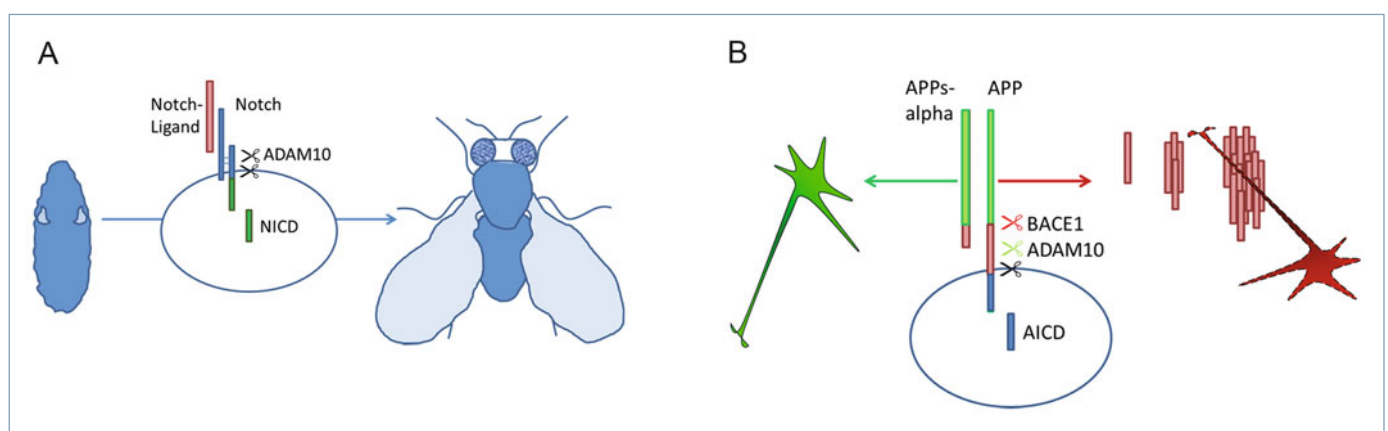
■ Unter dem *ectodomain shedding* eines membranständigen Proteins versteht man die Abspaltung der extrazellulären Domäne. Der Prozess an sich kann notwendig sein, um das Protein nachfolgend abzubauen, er kann jedoch auch den ersten Schritt in einer Signalweiterleitung darstellen.

Ein bekanntes Beispiel für eine solche Prozessierung eines Membranproteins ist der Notch-Signalweg: Der Notch-Rezeptor wird

auf der Oberfläche von Zellen während der Entwicklung präsentiert, wie z. B. bei der Flügelentwicklung der Taufliege *Drosophila* (Abb. 1A). Tritt er in Kontakt mit seinem Liganden (Delta), so wird eine Spaltung des Notch-Rezeptors eingeleitet. Dieser ersten Spaltung folgt eine zweite innerhalb des Transmembranraums, sodass letztlich ein lösliches intrazelluläres Proteinfreisetzt wird, das die Transkription von Ziel-

genen im Kern der Zelle steuert. Der initiale, auslösende Schritt wird von einer Protease der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase*) durchgeführt, von ADAM10. Diese Proteasen gehören zu den Zinkmetalloproteasen, die über eine Glutamatseitenkette und ein eingelagertes Zinkion ein Wassermolekül so ausrichten und polarisieren, dass eine proteolytische Spaltung des Substrats erfolgen kann.

Für bestimmte Membranproteine gibt es mehrere solche Proteasen, die am *shedding* beteiligt sein können. Ein prominentes Beispiel ist die Entstehung des neurotoxischen Peptids, das eine zentrale Rolle bei der Alzheimer-Demenz spielt (A $\beta$ ). Hier konkurrieren zwei Enzyme um die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP, Abb. 1B). Spaltet die  $\beta$ -Sekretase BACE 1 (*beta-site cleaving enzyme 1*) APP, so kommt es bei nachfolgender Spaltung in der Membran zur Freisetzung des toxischen Peptids. Wird APP jedoch von der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 gespalten, wird dies nicht nur verhindert, sondern es entsteht zudem ein Wachstumsfaktor für Neurone (APPs-alpha).



▲ **Abb. 1:** Beispiele für ADAM10-vermitteltes *ectodomain shedding*. **A**, Signalweiterleitung durch den Notch-Rezeptor in der Entwicklung von *Drosophila*. Der Rezeptor und sein Ligand werden auf der Zelloberfläche benachbarter Zellen der Flügelimaginalscheiben der Larve (links) exprimiert. Bei Bindung erfolgt zunächst die Spaltung von Notch durch ADAM10, dann die Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD, *Notch intracellular domain*), die als Transkriptionsfaktor wirkt. **B**, Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP). Die Proteasen ADAM10 und BACE1 konkurrieren bei der Spaltung um das Substrat APP: Spaltet BACE1, so entsteht das neurotoxische A $\beta$ -Peptid (rot), das sich zunächst in Oligomeren, später in senilen Plaques im Gehirn betroffener Patienten (Alzheimer-Demenz) abgelagert. Nachfolgend kommt es zum Absterben von Neuronen. Spaltet ADAM10, wird dies verhindert und ein Neuronenwachstumsfaktor wird freigesetzt (APPs-alpha). In beiden Fällen entsteht zusätzlich eine lösliche intrazelluläre Domäne (AICD, *APP intracellular domain*), die eigene Funktionen innehat.

## Methoden

Zur Erforschung der Regulation von APP-prozessierenden Proteasen ist für unser Labor die PCR eine grundlegende Methode. Zum Beispiel wurde mittels einer Fusions-PCR aus zwei überlappenden Amplikons das 26 Nukleotide umfassende Intron aus der XBP1 (*X-box binding protein 1*)-codierenden Sequenz entfernt, sodass eine konstitutiv aktive Variante vorlag [1]. Die Wirkung der in Reporter-Gen-Assays identifizierten regulatorischen Transkriptionsfaktoren werden nachfolgend mittels qPCR an der endogenen Protease-mRNA neuronaler Zellen überprüft, um falsch-positive Befunde auszuschließen. Zur Herstellung von Deletionsvarianten der Promotoren (z. B. zur Identifizierung von Transkriptionsfaktorbindestellen [2]) dienen *small-scale*-PCRs mit gegenläufigen Gradienten von Magnesiumchlorid und Betain zur Optimierung der Amplikonausbeute.

## Regulation der Protease-Aktivität

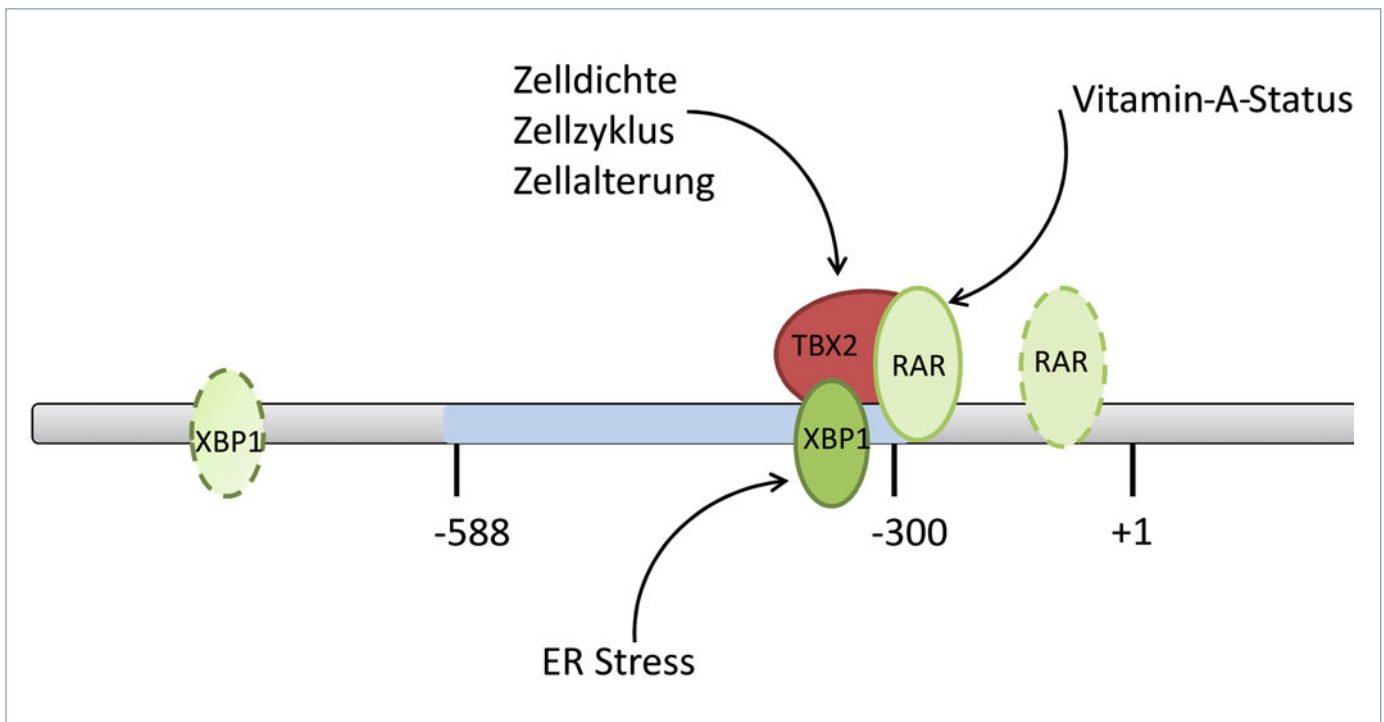
ADAM10 scheint auf den ersten Blick nicht sehr wählerisch in Bezug auf seine Substrate zu sein. Zumindest in Zellkultur sind neben dem Notch-Rezeptor und APP viele weitere Proteine identifiziert worden, die das Enzym spalten kann (für eine Übersicht sie-

he [3]). Dafür spricht, dass keine sehr großen Ansprüche an die Spaltsequenz vorliegen, wie anhand von *in vitro*-Experimenten belegt wurde. Auch die Topologie der Substrate scheint keine besondere Rolle zu spielen: Sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Transmembranproteine, aber auch Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-verankerte Proteine wurden bereits als potenzielle Substrate beschrieben. Dies mag zunächst wenig plausibel erscheinen: eine Protease, die in relevante physiologische Prozesse der Zelle eingreift, aber unspezifisch agiert. Die Spezifität ergibt sich erst im zeitlichen und räumlichen Kontext. Hierbei spielen zahlreiche Faktoren eine Rolle, wie die Transkriptionsaktivität des Gens, die Steuerung der Translation durch z. B. Mikro-RNAs (miRNAs), Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Lipid-Interaktionen und potenzielle pharmakologische Interventionen. Im Nachfolgenden werden drei Beispiele für eine transkriptionelle Regulation von ADAM10 mit (patho)physiologischer Bedeutung genannt.

## Transkriptionelle Regulation des ADAM10-Gens durch Retinoide

Aus der Literatur gab es bereits seit längerer Zeit Hinweise darauf, dass der aktive Meta-

bolit des Vitamins A – *all-trans*-Retinsäure – eine protektive Wirkung in Bezug auf die Alzheimer-Demenz haben könnte [4]. Hierzu zählte die Beobachtung, dass eine Vitamin-A-Defizienz zu arteriellen Plaques in Ratten führt [5], sowie die Tatsache, dass Metaanalysen einen verminderten Plasmalevel an Vitamin A in Alzheimer-Patienten bestätigen [6]. Durch die Charakterisierung des Promotors des humanen *ADAM10*-Gens [7] konnten in der Kernsequenz zwei potenzielle Bindestellen für Retinsäurerezeptoren (RAR, *retinoic acid receptor*) identifiziert werden (**Abb. 2**). Eine der beiden Sequenzen konnte im EMSA (*electronic mobility shift assay*) als Bindestelle für Proteine aus Kernextrakten definiert werden. Nachfolgende Untersuchungen zeigten sowohl an sekundären als auch an primären Zelllinien, dass Retinsäure die Transkription des humanen und des murinen *ADAM10*-Gen-Promotors aktiviert [8, 9]. Untersuchungen an Alzheimer-Modellmäusen als auch an Patienten mit milder bis moderater Alzheimer-Demenz ergaben, dass der Einsatz eines synthetischen Retinoids die Menge an ADAM10 im Gehirn steigert und sich positiv auf die Krankheitsentwicklung auswirkt [8, 10].



▲ **Abb. 2:** Transkriptionelle Regulation von *ADAM10*. Das menschliche *ADAM10*-Gen findet sich auf Chromosom 15. Der Kernbereich des Promotors (blau) umfasst die Sequenz von -588 bis -300 Basenpaare in Relation zum Startcodon. Am Beginn dieser Kernregion finden sich unter anderem Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren RAR (*retinoic acid receptor*), XBP1 (*X-box binding protein 1*) und TBX2 (*T-box binding protein 2*). Weitere Bindestellen für RAR und XBP1 liegen stromauf- oder -abwärts.

## **Einfluss von zellulärem Stress auf die Expression von ADAM10**

In einem Screening für Transkriptionsfaktoren, die die Expression von *ADAM10* steigern, konnten neue Aktivatoren bzw. Inhibitoren der *ADAM10*-Expression identifiziert werden [1] (siehe auch nachfolgender Abschnitt). Einer der Transkriptionsfaktoren, der sich induzierend auf die Promotoraktivität von *ADAM10* auswirkt, ist XBP1. XBP1 ist ein durch unkonventionelles Spleißen regulierter Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in der *unfolded protein response* (UPR) einnimmt: Stresssignale aus dem endoplasmatischen Retikulum führen zu einem verkürzten *XBP1*-Transkript (sXBP1), das durch eine Verschiebung im Leserahmen (*frameshift*) für ein größeres, aktives XBP1 codiert. In Alzheimer-Modellmäusen korrelierte die früh zu beobachtende Induktion der UPR im Gehirn mit einer erhöhten Menge an sXBP1 und auch *ADAM10*. In Alzheimer-Patienten mit manifester Erkrankung findet sich hingegen eine verminderte Expression an sXBP1 im temporalen Cortex und eine verminderte *ADAM10*-Expression. Damit könnte *ADAM10* eine protektive Rolle in der frühen Stressantwort von Neuronen besitzen.

## **Supprimierende Wirkung des Entwicklungsfaktors TBX2 auf ADAM10**

Neben Transkriptionsfaktoren, die eine steigernde Wirkung auf die *ADAM10*-Transkription ausüben, sind relativ wenige inhibitorische Faktoren bekannt. Ein Beispiel ist TBX2 (*T-box binding protein 2*), das an der Kontrolle des Zellzyklus, aber auch der Entwicklung z. B. des Gehirns beteiligt ist. Der *ADAM10*-Promotor weist eine sogenannte *T-site* als Bindestelle für TBX2 auf [2]. Erhöht man in neuronalen Zellen oder primären Fibroblasten durch Überexpression oder Einleitung von Kontaktinhibition die Menge an TBX2, so steigt die *ADAM10*-Promotoraktivität bzw. die Menge an *ADAM10*-mRNA an. Im frontalen Cortex von Alzheimer-Patienten findet sich parallel eine vermehrte Expression von *TBX2* als auch eine verminderte *ADAM10*-mRNA-Menge.

## **Fazit**

Anhand der drei Beispiele von RAR, XBP1 und TBX2 zeigt sich, dass die Expression der Metalloprotease *ADAM10* eine delikate Balance darstellt, die sowohl vom Ernährungsstatus als auch von zellulärem Stress

und einem möglichen Wiedereintritt differenzierter Zellen in den Zellzyklus beeinflusst wird. Dies erklärt auch, warum trotz der zahlreichen möglichen Substrate eine Selektivität von *ADAM10* in zeitlicher und räumlicher Hinsicht erreicht werden kann. So führt die Behandlung von Alzheimer-Patienten mit dem synthetischen Retinoid Acitretin nicht zu einem unkontrollierten *shedding* aller möglichen neuronalen Substratproteine, sondern scheint sehr gezielt nur wenige Proteine wie APP oder NG2 zu betreffen [11]. Dies gibt Hoffnung auf eine gezielte therapeutische Manipulation von *ADAM10* im Kontext der Alzheimer-Demenz aber auch anderer Erkrankungen, bei denen das Enzym eine Rolle spielt (z. B. Brustkrebs). ■

## **Literatur**

- [1] Reinhardt S, Schuck F, Grösgen S et al. (2014) Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates *ADAM10* and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J* 28:978–997
- [2] Reinhardt S, Schuck F, Stoye N et al. (2019) Transcriptional repression of the ectodomain sheddase *ADAM10* by TBX2 and potential implication for Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 76:1005–1025
- [3] Endres K, Deller T (2017) Regulation of alpha-secretase *ADAM10* *in vitro* and *in vivo*: genetic, epigenetic, and protein-based mechanisms. *Front Mol Neurosci* 10:56
- [4] Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2901–2905
- [5] Corcoran JP, So PL, Maden M (2004) Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 20:896–902
- [6] Lopes da Silva S, Vellas B, Elemans S et al. (2014) Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* 10:485–502
- [7] Prinzen C, Muller U, Endres K et al. (2005) Genomic structure and functional characterization of the human *ADAM10* promoter. *FASEB J* 19:1522–1524
- [8] Tippmann F, Hundt J, Schneider A et al. (2009) Up-regulation of the alpha-secretase *ADAM10* by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* 23:1643–1654
- [9] Reinhardt S, Grimm MO, Stahlmann C et al. (2016) Rescue of hypovitaminosis A induces non-amyloidogenic amyloid precursor protein (APP) processing. *Curr Alzheimer Res* 13:1277–1289
- [10] Endres K, Fahrenholz F, Lotz J et al. (2014) Increased CSF APPs-alpha levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology* 83:1930–1935
- [11] Brummer T, Müller SA, Pan-Montojo F et al. (2019) NrCAM is a marker for substrate-selective activation of *ADAM10* in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 11, doi: 10.15252/emmm.201809695

## **Korrespondenzadresse:**

PD Dr. Kristina Endres  
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz  
Untere Zahlbacher Straße 8  
D-55131 Mainz  
Tel.: 06131-172133  
Kristina.endres@unimedizin-mainz.de

## **AUTORIN**



### **Kristina Endres**

1996–2001 Biologiestudium an der Universität Mainz; dort bis 2005 Promotion im Bereich der Alzheimer-Forschung unter Anleitung von Prof. Dr. F. Fahrenholz. 2005–2009 Postdoc am Institut für Biochemie der Universität Mainz. Seit 2009

Arbeitsgruppenleiterin an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin der Universität Mainz.