



Fakultät für Medizin
Lehrstuhl für Neuroproteomik



Untersuchung der biochemischen Eigenschaften und der Substratspaltung der Alzheimer Protease ADAM10

Tobias Klaus Alfons Brummer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Misgeld

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler
2. apl. Prof. Dr. Achim Krüger
3. Prof. Dr. Mikael Simons

Die Dissertation wurde am 05.02.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Morbus Alzheimer	4
1.2. ADAM10 – "A Disintegrin And Metalloprotease 10"	6
1.2.1. ADAM10 – eine therapeutische Zielstruktur?	6
1.2.2. ADAM10 – Biochemie, Struktur, Maturierung und intrazellulärer Transport	7
1.2.3. ADAM10 – Physiologische und pathologische Funktionen im Nervensystem	9
1.3. NrCAM – "Neural-glia related Cell Adhesion Molecule"	11
1.3.1. NrCAM – Struktur und Funktionen	11
1.3.2. NrCAM und Neurodegeneration	12
1.4. Zielsetzungen der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Reagenzien und Zellkulturmedien	14
2.2. Antikörper	16
2.3. Pufferlösungen	16
2.4. Zelllinien, Zellkultur, CRISPR/Cas9	18
2.5. Mauslinien und primäre kortikale Neuronen	18
2.6. Isolation und Behandlung primärer Rattenneuronen	19
2.7. Plasmide und Molekularbiologie (Aufreinigung, Sequenzierung, Transfektion)	20
2.8. (Lenti-)Virusproduktion	21
2.9. qPCR (quantitative real-time PCR)	21
2.10. Herstellung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen	22
2.11. Membranpräparation	22
2.12. Zelloberflächenbiotinylierung	23
2.13. Co-Immunopräzipitation	23
2.14. Zeitverlaufsexperiment	23
2.15. Cycloheximide Verfolgungsexperiment	24

2.16. SDS-PAGE und Western Blot	24
2.17. Neuritenauswachsassay	25
2.18. Zelltoxizitätsassay	25
2.19. ADAM10 Aktivitätsassay	25
2.20. Liquorproben von Alzheimerpatienten	26
2.21. Massenspektrometrie	26
2.22. Statistik	27
3. Zusammenfassung Publikation “T. Brummer et al., The metalloprotease ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) undergoes rapid, postlysis autocatalytic degradation. FASEB J 32, 3560-3573 (2018)”	28
4. Zusammenfassung Publikation “T. Brummer et al., NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease. EMBO MOL MED 10.15252/emmm.201809695“	29
5. Diskussion	30
5.1. NrCAMs proteolytische Prozessierung durch Furin, ADAM10 und die γ -Sekretase ..	30
5.2. ADAM10-Stimulation durch Acitretin in Neuronen und Alzheimer Patienten	31
5.3. NrCAM als Biomarker	35
5.4. Neurobiologische Funktionen der NrCAM-Spaltung	36
5.5. ADAM10s präanalytische Autodegradation	37
5.6. Ausblick	40
6. Zusammenfassung der Arbeit	42
7. Referenzen	43

1. Einleitung

1.1. Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer (AD) ist mit einer Prävalenz von beinahe 40 Millionen Patienten weltweit die häufigste neurodegenerative Demenzerkrankung (1, 2). Symptomatisch ist AD durch progrediente mnestiche Einschränkungen, visuelle Agnosie, visukonstruktive-, aphasische- und apraktische Störungen gekennzeichnet. Meist versterben die Patienten nach langjähriger Pflegebedürftigkeit an einer Aspirationspneumonie im Rahmen der zunehmenden Dysphagie. Die Ätiologie der Erkrankung ist bis heute ungeklärt. Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten mehrere genetische Risikofaktoren und monogen vererbte Formen der AD identifiziert werden konnten, sind die Hauptrisikofaktoren der sporadischen AD (sAD) das biologische Alter, sowie generelle kardiovaskuläre Risikofaktoren (3-8). Schon jetzt sind die Ausgaben für Unterbringung und Pflege der Demenzpatienten immens (geschätzt 1 Billion \$/Jahr (World Alzheimer Report 2018)), sodass ohne eine wirksame Prävention oder Therapie die Belastung der Sozialsysteme im Rahmen der demographischen Entwicklung noch weiter zunehmen wird.

Seit der Erstbeschreibung der Erkrankung durch Alois Alzheimer im Jahre 1907 sind große Fortschritte auf den Gebieten der Molekularpathologie, Pathophysiologie und Diagnostik (v.a. cMRT, PET-CT, Liquor-Biomarker) gemacht worden, jedoch sind bisher alle kausalen Therapieansätze in klinischen Studien gescheitert. Zwar lässt sich durch Acetylcholinesterase-Hemmer (Rivastigmin, Galantamin und Donepezil) und NMDA Rezeptorantagonisten (Memantin) der kognitive Abbau im Sinne einer symptomatischen Therapie kurzzeitig verzögern, aber auf lange Sicht keineswegs aufhalten (9, 10). Pathognomonisch für die AD sind die zuerst von Alois Alzheimer beschriebenen histopathologischen Auffälligkeiten aus interstitiellen Amyloid-Plaques (A β -Aggregate) und intrazellulären Tau-Ablagerungen (11) (Abb. 1). Insbesondere das Auftreten der Amyloid-Plaques begründete die Amyloidhypothese als zentralen pathogenetischen Erklärungsansatz (1, 12-15):

Die Amyloidhypothese geht von einer linearen Kaskade aus, bei der A β -Produktion, -Ablagerung und Tau-Aggregation zu synaptischer Dysfunktion, Neuroinflammation, neuronalem Zelltod und letztlich zur Demenz führen (Abb. 1). Auf molekularer Ebene führt die proteolytische Spaltung des Amyloidvorläuferproteins (APP) durch die Protease BACE1 (" β -site APP cleaving enzyme 1") und die γ -Sekretase zur Bildung der neurotoxischen A β -Peptide, die sich aufgrund ihrer Hydrophobizität zu Oligomeren zusammenlagern und sich letztlich als

histopathologisch sichtbare Amyloidplaques in der Extrazellulärsubstanz des Gehirns ablagern (1, 16, 17).

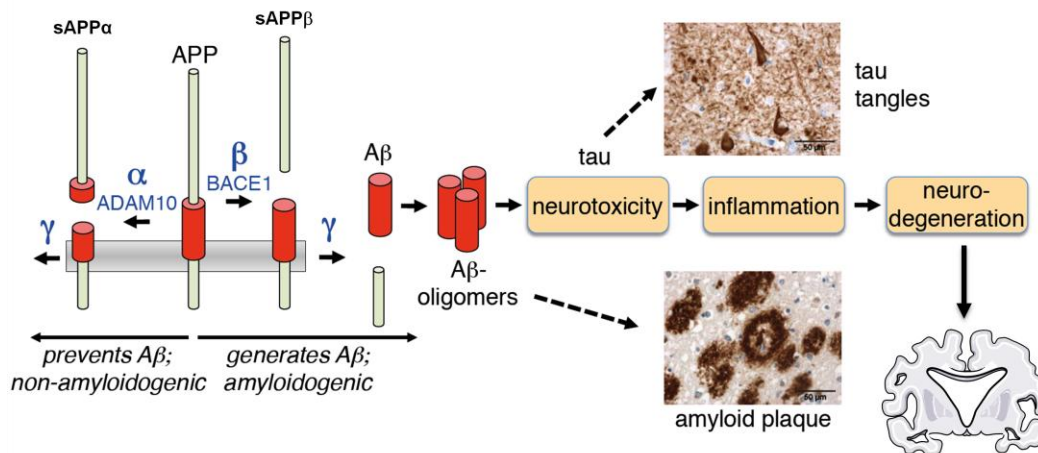


Abb. 1. Amyloidkaskade, sowie neuropathologische Auffälligkeiten der AD: Die proteolytische Spaltung von APP durch BACE1 und die γ -Sekretase markiert mit der Bildung von neurotoxischen A β -Oligomeren den amyloiden APP-Stoffwechselweg, welcher schließlich zu Neuroinflammation und -degeneration führt und histopathologisch durch die pathognomonischen A β -Plaques und Tau-Tangles charakterisiert ist. Dahingegen verhindert die APP-Spaltung innerhalb der A β -Sequenz durch die α -Sekretase ADAM10 nicht nur die Freisetzung von A β , sondern produziert zudem das neuroprotektive sAPP α -Fragment (Abbildung modifiziert nach Lichtenthaler & Saftig 2015 (18)).

Wie im Detail A β mit den ebenso typischen intraneuronalen Tau-Ablagerungen im Zusammenhang steht, ist noch nicht abschließend geklärt. Sowohl die A β -Peptide bzw. Oligomere, als auch die Tau-Ablagerungen wirken neurotoxisch und führen zum Absterben von Neuronen und damit letztlich zur Hirnatrophie. Interessanterweise korreliert die Lokalisation der Tau-Ablagerungen besser mit der Symptomatik der Patienten als die Verteilung der Amyloidablagerungen (19, 20). Allerdings könnte die Neurotoxizität der löslichen A β -Mono- und Oligomere – welche auch weiter entfernte Regionen erreichen könnten – und weniger die autochthonen Ablagerungen, die Diskrepanz zwischen Plaquelokalisation und Symptomatik der Patienten erklären. Viele Daten sprechen dafür, dass A β tatsächlich eine zentrale Rolle in der AD-Pathogenese spielt: So führen einige genetische Veränderungen im APP-Stoffwechsel, welche mit einer vergrößerten A β -Last einhergehen, auch zu einer früher beginnenden hereditären/familiären AD (FAD). Zu nennen sind hier insbesondere Mutationen im Presenilin 1 und 2 Gen (proteolytische Untereinheiten des γ -Sekretase-Komplexes), welche besonders das für die Aggregation relevante Verhältnis von A β_{42} zu A β_{40} (Zahl im Index gibt die Aminosäurezahl des Peptids an) erhöhen (1, 12). Weiterhin ist die Trisomie 21, welche mit einer insgesamt gesteigerten APP-Genexpression einhergeht, mit der Entwicklung einer

AD assoziiert (1, 21). Zudem sind einige andere genetischen Varianten, welche mit dem APP-Stoffwechsel assoziiert sind (APOE4, PICALM, SORL1, BIN1, TREM2), Risikofaktoren für die Entwicklung einer sporadischen AD (16, 22, 23). Andere APP-Mutationen, die mit einer Verminderung der A β -Produktion einhergingen, zeigten hingegen einen protektiven Effekt (24).

Allerdings hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass die Amyloidhypothese möglicherweise ein zu lineares Krankheitsmodell für eine komplexe neuropsychiatrische Erkrankung, wie Morbus Alzheimer darstellt. So scheint die Pathogenese von AD nicht einer linearen Kausalität, sondern vielmehr auf einem komplexen zeitlichen Zusammenspiel von A β -Produktion, Tau-Pathologie, veränderter A β -Clearance, geschädigter neurovaskulärer Einheit und Neuroinflammation zu folgen (16, 25, 26). Hierfür spricht unter anderem, dass eine therapeutische Inhibition von BACE1 und der γ -Sekretase — und somit des amyloidogenen Wegs — bereits in zahlreichen klinischen Studien mit bisher äußerst mäßigem Erfolg und zum Teil schweren Nebenwirkungen versucht worden ist (27-31). Weitere Therapieansätze mit verschiedenen A β -Antikörpern zeichneten sich zwar durch die erfolgreiche Verringerung der Amyloidablagerungen aus, ließen allerdings eine wesentliche Verbesserung der kognitiven Leistung vermissen (32-34). Letztlich bleibt abzuwarten, ob die verbleibenden Studien durch einen deutlich früheren Therapiebeginn (lange vor dem Auftreten klinischer Symptome) von mehr Erfolg gekrönt sein werden. Jedoch sollten angesichts der ernüchternden Ergebnisse neue therapeutische Ansatzpunkte in Betracht gezogen werden.

1.2. ADAM10 — „A Disintegrin and Metalloprotease 10“

1.2.1. ADAM10 — eine therapeutische Zielstruktur?

Neben BACE1 und der γ -Sekretase sind noch einige weitere Proteasen in der Lage APP zu prozessieren. Aus therapeutischer Sicht am vielversprechendsten ist die ubiquitär exprimierte Metalloprotease ADAM10 ("A disintegrin and metalloprotease 10") (35). ADAM10 schneidet als physiologisch relevante, konstitutive α -Sekretase APP in Mitten seiner A β -Sequenz und verhindert damit nicht nur die Bildung der neurotoxischen A β -Peptide, sondern setzt zudem das neuroprotektive sAPP α -Fragment frei (Abb. 1) (35-38). In diesem Sinne verringerte eine 30 %-ige ADAM10 Überexpression in einem Alzheimer-Mausmodell nicht nur die Anzahl an A β -Plaques, sondern steigerte zudem die sAPP α -Freisetzung und verbesserte die kognitiven Defizite der Tiere (39). Auch Alzheimerpatienten, die im Rahmen einer klinischen Phase II Studie eine ADAM10-aktivierende Therapie mit dem Zweitgenerationsretinoid Acitretin er-

hielten, zeigten eine signifikante Zunahme von sAPP α sowie eine mäßige Reduktion von sAPP β im Liquor cerebrospinalis, ohne dass dabei schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten (40). Allerdings war die Power der Studie, mit gerade mal 20 Patienten, zu gering, um wesentliche kognitive Verbesserungen signifikant nachweisen zu können. Im Gegensatz dazu sind einige Mutationen in ADAM10s Prodomäne, welche wohl die „Chaperonaktivität“ dieser Domäne behindern, mit einer spät beginnenden Alzheimer Demenz assoziiert (LOAD = late onset Alzheimer's disease) (41-43). Wurden diese ADAM10-Mutanten im AD-Mausmodell an Stelle von Wildtyp ADAM10 überexprimiert, zeigten die Mäuse histopathologisch eine größere Plaqueszahl, sowie eine reaktive Astroglieose (42). Zudem ließ sich ein frühes AD-Krankheitsstadium im Mausmodell durch eine Interferenz mit der Interaktion von ADAM10 und dessen Transportprotein SAP97 hervorrufen. Hierdurch wurde der intrazelluläre Transport der Metalloprotease an die postsynaptische Membran unterbunden (44-46). Interessanterweise zeigten diese Mäuse vor allem Ablagerungen des Tau-Proteins (46). Eine kürzlich veröffentlichte GWA-Metaanalyse identifizierte zudem einige ADAM10-Polymorphismen als möglichen Risikofaktor für die Entwicklung einer LOAD (47). Desweiteren konnten im Liquor von AD-Patienten im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Probanden geringere ADAM10 Konzentrationen gemessen werden (48).

Im Anbetracht all dieser Daten wäre eine therapeutische ADAM10-Aktivierung als möglicher alternativer Therapieansatz zur Behandlung von M. Alzheimer denkbar. Doch trotz aller ermutigenden Ergebnisse sind die Bedenken hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen einer ADAM10-Stimulation noch immer groß, zumal die physiologischen Funktionen der Protease vergleichsweise schlecht verstanden sind und ADAM10 ein großes Arsenal an Substraten prozessiert und zudem an Entzündungsreaktionen und an der Entstehung maligner Tumoren beteiligt ist (49-55).

1.2.2. ADAM10 — Biochemie, Struktur, Maturierung und intrazellulärer Transport

Wie alle ADAMs besitzt ADAM10 eine N-terminale Prodomäne, welche im Fall von ADAM10 als eine Art Chaperon an der korrekten Faltung des Proteins beteiligt ist und zudem als intrinsischer Proteaseinhibitor fungiert (42, 56-59). Es folgen eine Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-, eine cysteinreiche-, eine Transmembran-, sowie eine kurze cytoplasmatische Domäne (Abb. 2) (60).

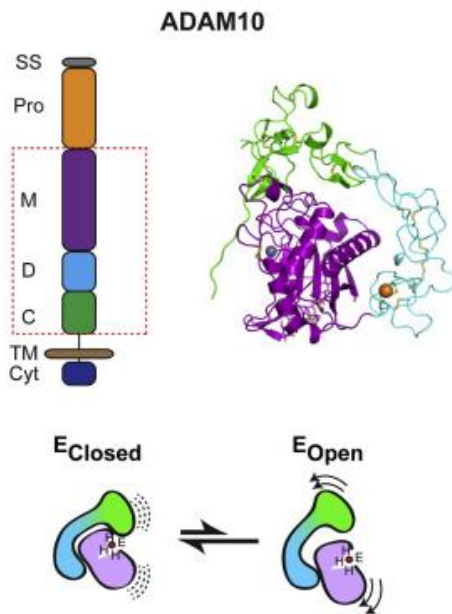


Abb. 2. ADAM10 — Struktur und Konformation: ADAM10 besteht aus einem kurzen Signalpeptid (SS), einer Pro- (Pro), Metalloproteasen- (M), Disintegrin- (D), cysteninreichen- (C), Transmembran- (TM) und einer cytoplasmatischen Domäne (Cyt). Die cysteinreiche Domäne (in grün) verhindert im geschlossenen Zustand (E_{closed}) den Zugang von Substraten in das aktive Zentrum. In geöffnetem Zustand (E_{open}) kann ADAM10 durch Freigabe des katalytischen Zentrums seine Substrate schneiden. Allerdings ist E_{closed} der energieärmere und damit thermodynamisch wahrscheinlichere Konformationszustand der Protease. Abbildung aus Seegar et al, 2017 (61).

Die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur der ADAM10-Ektodomäne offenbarte, dass die Protease in Natura eine in sich geschlossene Konformation einnimmt, bei der die cysteinreiche Domäne so mit dem aktiven Zentrum der Metalloproteasendomäne interagiert, dass der Zugang von Substraten zum aktiven Zentrum verhindert wird. Folglich bedarf ADAM10 wohl zunächst einer "strukturellen Aktivierung", um letztendlich katalytisch aktiv werden zu können (61).

Nach Abspaltung des Signalpeptides im Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird die katalytisch inaktive Pro-Form (proADAM10) im Trans-Golgi-Netzwerk durch Abspaltung der Prodomäne durch Proproteinkonvertasen wie Furin und PC7 in die katalytisch aktive, mature Form überführt (mADAM10) (56-58). Allerdings ist bisher nicht abschließend geklärt, ob mADAM10 seine Substrate an der Zelloberfläche und im Bereich des sekretorischen Zellkompartiments prozessiert, oder ob mADAM10 ausschließlich an der Zelloberfläche aktiv ist.

Da das Verhältnis von mADAM10 zu proADAM10 in verschiedenen Veröffentlichungen stark variiert, ist zudem unklar ob sich die ADAM10-Maturierung von Gewebe zu Gewebe unterscheidet, oder ob diese Varianz möglicherweise analytisch bzw. präanalytisch bedingt ist. Gerade die Detektion von mADAM10 in Immunoblots hat sich als sehr schwierig und äußerst variabel erwiesen. Während in einigen Publikationen mehr katalytisch inaktives proADAM10 als mADAM10 zu detektieren war, zeigten andere Veröffentlichungen ein dazu inverses Verhältnis (38, 62, 63). Tatsächlich kann ADAM10 durch die Interaktion mit bestimmten Transportproteinen wie den Tetraspaninen oder SAP97 in seiner Maturierung, bzw. intrazellulären Lokalisation beeinflusst werden (45, 64-66). So bindet ADAM10 in unter-

schiedlichen Zelltypen an verschiedene Mitglieder der Tetraspanin C8 Superfamilie (TspanC8), welche nicht nur die Maturierung, sondern auch dessen Substratspezifität beeinflussen (64, 66, 67). Durch die variable Expression verschiedener Tspans in bestimmten Zelltypen wäre daher eine von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedliche Maturierung möglich. Andererseits zeigte zum Beispiel die mature Form der eng mit ADAM10 verwandten Metalloprotease ADAM17 eine autokatalytische Degradation im Rahmen der Präanalytik, was durch Zugabe des Metalloproteaseinhibitors 1,10-Phenanthrolin zum Zellysepuffer verhindert werden konnte (68). Somit sind im Fall von ADAM17 die Unterschiede im Verhältnis von Pro-Form zu maturer Form durch ein präanalytisches Artefakt und nicht durch einen zellbiologischen Hintergrund bedingt. Die enge Verwandtschaft zu ADAM17 lässt dies somit auch für ADAM10 als möglich erscheinen. Dies wäre besonders dann von Interesse, wenn analytisch eine genaue Bestimmung der ADAM10-Abundanz bzw. deren Änderung – z.B. bei der Entwicklung neuer zielgerichteter ADAM10-Therapeutika – von Nöten ist. Weiterhin spielt diese Frage für die künftige Erforschung von ADAM10s Biochemie, bzw. zu dessen Maturierung in unterschiedlichen Geweben eine große Rolle (siehe oben).

1.2.3. ADAM10 – Physiologische und pathologische Funktionen im Nervensystem

Funktionell ist ADAM10 unter anderem über sein Substrat Notch in die Embryonalentwicklung des kardiovaskulären- und des zentralen Nervensystems involviert (18, 69). Daher führte ein knock out (KO) der Protease im Mausmodell bereits im frühen Embryonalstadium zum Abort (E 9,5) (70). Um eine genauere funktionelle Charakterisierung der Protease zu ermöglichen, waren daher die Herstellung von konditionalen KO-Mausmodellen, sowie spezifischer Inhibitoren (wie das Hydroxamat-basierte GI254023x) erforderlich (37, 62, 71, 72). Hiermit konnte gezeigt werden, dass ADAM10 im Nervensystem unter anderem an embryonaler Neurogenese und -Migration, axonaler Ziel- und Wegfindung, Neuritenwachstum, Aufbau und Aufrechterhaltung synaptischer Kontakte und der Myelinisierung peripherer Nerven beteiligt ist (Abb. 3) (18, 37, 53, 62, 73-79). Aus pathologischer Sicht wurde ADAM10, bzw. ein Großteil seiner Substrate mit neuropsychiatrischen Erkrankungen aus dem Autismusspektrum (ASD), Schizophrenien, Bipolaren Störungen sowie malignen Hirntumoren in Verbindung gebracht (Abb. 3) (49, 80-82). Trotz all dieser Erkenntnisse sind ADAM10s physiologische Funktionen und besonders seine Bedeutung im Rahmen pathologischer Prozesse noch immer schlecht verstanden. So blieb z.B. bislang ungeklärt, ob ADAM10 bei Prionenerkrankungen durch die Spaltung des Prionproteins eine protektive Rolle zukommt, oder zur weiteren Ausbreitung der Erkrankung beiträgt (18, 83-85). Dahingegen scheint ADAM10 in der Pathoge-

nese von Morbus Huntington durch die Spaltung von N-Cadherin einen negativen Einfluss auf die synaptische Funktion zu haben. Folglich wäre hier eher eine ADAM10 Inhibition von Vorteil (86).

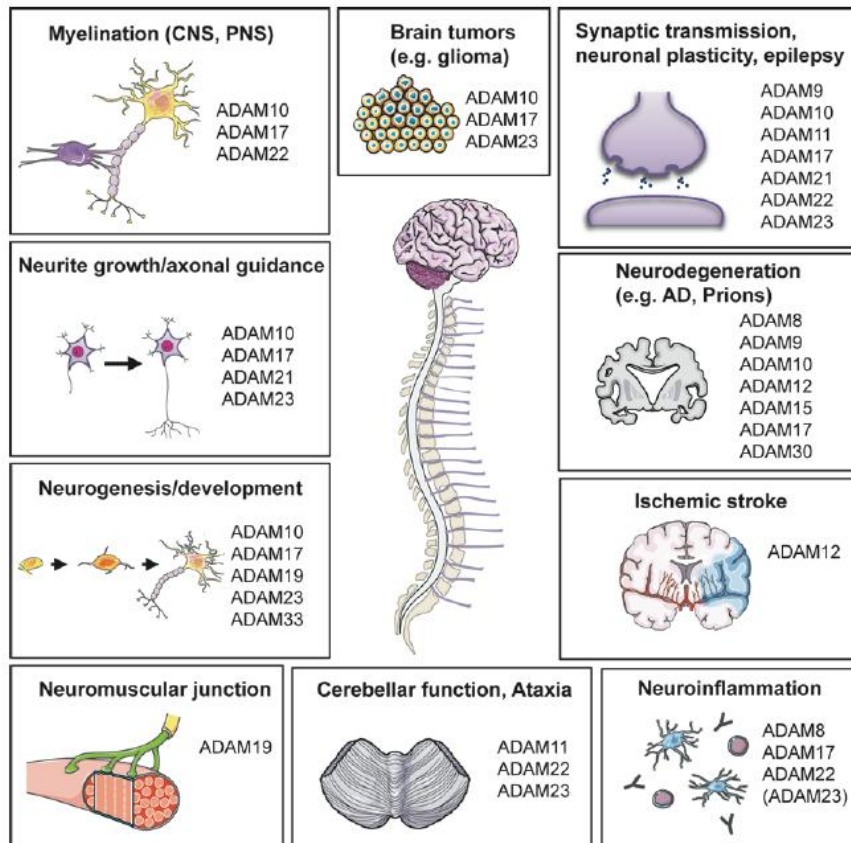


Abb. 3. Funktionen verschiedener ADAMs im Nervensystem: ADAM10 ist im zentralen und peripheren Nervensystem unter anderem an synaptischer Transmission, embryonaler Neurogenese und Entwicklung, Neuritenwachstum, axonaler Ziel- und Wegfindung, Myelinisierung, Hirntumoren und neurodegenerativen Prozessen beteiligt. Abbildung aus Hsia et al, 2019 (79).

Trotz allem muss gesagt werden, dass angesichts möglicher Nebenwirkungen eine milde ADAM10 Stimulation wahrscheinlich eher möglich sein wird als dessen Inhibition. So geht der vollständige Funktionsverlust der Protease im Rahmen eines KO mit einem Abort im Embryonalstadium einher (37), während eine leichte Überexpression zu keinen wesentlichen Nebenwirkungen führte (39).

Um eine genauere funktionelle Charakterisierung der Protease zu ermöglichen und somit potentielle Nebenwirkungen einer ADAM10-basierten Therapie vorhersagen zu können, wurden 2016 von Kuhn et al, mit Hilfe einer proteomischen Analyse über 90 verschiedene ADAM10 Substratkandidaten in primären ADAM10 KO Neuronen identifiziert. Da die jeweiligen KO Mäuse einen ähnlichen Phänotyp aufwiesen, war eines der funktionell interessantesten neu identifizierten ADAM10 Substrate das neuronale Zelladhäsionsmolekül NrCAM ("Neural glial related cell adhesion molecule") (87). Beide Mauslinien zeigten axonale Ziel-/Wegfindungsstörungen im Bulbus olfactorius, was in der Zusammenschau am ehesten auf eine Interaktion beider Proteine auf Neuritenebene hinweist (53, 88). Folglich könnten bei

einer ADAM10-Therapie mögliche Nebenwirkungen durch eine Alteration der NrCAM-Spaltung entstehen. Andererseits könnte NrCAM zusammen mit anderen ADAM10-Substraten als möglicher Biomarker zur Überwachung der Therapieeffizienz eingesetzt werden.

1.3. NrCAM – „Neural-glial related Cell Adhesion Molecule“

1.3.1. NrCAM – Struktur und Funktionen

NrCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Immunoglobulin Superfamilie, das zusammen mit L1, CHL1 und Nf186 zur Subgruppe der LICAMs gezählt wird (87, 89, 90). NrCAM ist ein Typ I Transmembranprotein, das besonders im Nervensystem in großer Menge exprimiert wird. Strukturell besteht NrCAM von N- nach C-terminal aus 6 Immunoglobulin-like C2-Domänen, 5 Fibronectin (FN) III-Domänen, einer Transmembran und einer intrazellulären Domäne (Abb. 4) (87).



Abb. 4. NrCAMs Struktur: Die N-terminalen Bögen stellen die 6 Immunoglobulin (Ig)-like C2-Domänen da, welche in sich mit Disulfidbrücken verbunden sind. Die Rechtecke zeigen die 5 Fibronectin (FN) III-Domänen, es folgen die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne mit einer Phosphorylierungsstelle (P). Die Pfeile und weißen Boxen zeigen mögliche mRNA-Splicevarianten an. Abbildung aus Grumet et al, 1991 (87).

NrCAMs Funktionen sind besonders im Rahmen der embryonalen und postnatalen Entwicklung gut untersucht. Hier ist das Zelladhäsionsmolekül unter anderem in Neuritenwachstum, axonaler Ziel- und Wegfindung, sowie in die Elimination überzähliger synaptischer Kontakte ("synaptic pruning") involviert (91-96). Außerdem fungiert NrCAM im peripheren Nervensystem als Strukturprotein der Ranvier'schen Schnürringe und ist hier am molekularen Aufbau der Nodien beteiligt (97-101). Aus pathologischer Sicht wurde NrCAM – wie auch ADAM10 – nicht nur mit einigen neuropsychiatrischen Krankheitsbildern, wie Autismus-spektrumerkrankungen und Schizophrenien, sondern auch mit diversen Tumorentitäten wie Schilddrüsenkarzinomen, malignen Melanomen und Gliomen in Verbindung gebracht (52, 81, 90, 102-105).

1.3.2. NrCAM und Neurodegeneration

Interessanterweise war die NrCAM-Abundanz in verschiedenen proteomischen Liquoranalysen bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen verringert. Folglich könnte NrCAM

als möglicher Liquor-Biomarker für das Fortschreiten neurodegenerativer Demenzerkrankungen dienen. Allerdings eignete sich NrCAM nicht als differentialdiagnostisches Werkzeug, um zwischen den einzelnen Erkrankungen unterscheiden zu können (106-109). Weiterhin wurde NrCAM in drei verschiedenen Studien als alternatives Splice-Ziel des FUS (fused in sarcoma)-Proteins identifiziert, welches sowohl mit ALS (Amyotropher Lateralsklerose), als auch FTD (frontotemporaler Demenz) in Verbindung gebracht wird (110-112).

1.4. Zielsetzungen der Arbeit

Als konstitutive α -Sekretase spaltet ADAM10 das Amyloidvorläuferprotein (APP) inmitten seiner A β -Sequenz und verhindert hierdurch die Produktion der neurotoxischen A β -Fragmente durch die β - und γ -Sekretase. Aus diesem Grund wird ADAM10 als eine mögliche pharmakologische Zielstruktur zur Behandlung von Morbus Alzheimer gehandelt. Jedoch schneidet ADAM10 — außer APP — ein breites Spektrum unterschiedlicher Substrate. Daher war bislang die Sorge um mögliche Nebenwirkungen einer therapeutischen ADAM10-Stimulation groß.

Besonders in der biochemischen Grundlagenforschung ist eine verlässliche und reproduzierbare Bestimmung der ADAM10-Abundanz in Immunoblots von großem Interesse. So können auch kleine Änderungen der ADAM10 Konzentration aufgrund unterschiedlicher therapeutischer Stimuli nachvollzogen werden. In einem ersten Projekt sollte daher untersucht werden weshalb sich die Detektion von ADAM10 bislang als äußerst variabel erwiesen hat und ob diese Variabilität — ähnlich wie bei ADAM17 — durch einen präanalytischen Degradationsprozess der Protease bedingt sein könnte. Weiterhin sollte untersucht werden, ob und wie sich ein solcher Prozess unterbinden ließe. Zusammenfassend sollte in diesem Projekt die biochemische Analytik für ADAM10 verbessert werden, um damit neue mechanistisch und therapeutisch orientierte ADAM10-Studien zu ermöglichen.

In einem zweiten Projekt sollte — mit Hilfe der verbesserten Analytik — die funktionelle Konsequenz der Spaltung des Membranproteins NrCAM durch ADAM10 und seine Eignung als Biomarker für Änderungen der ADAM10-Aktivität *in vivo* untersucht werden. Hierfür sollte zunächst NrCAMs proteolytische Prozessierung aufgeklärt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob auch andere Proteasen NrCAM spalten/ freisetzen können und damit NrCAM als spezifischen ADAM10-Biomarker unbrauchbar machen könnten. Die Eignung von NrCAM als Biomarker für ADAM10-Aktivität sollte anschließend in primären murinen Neuronen, sowie in Liquorproben von Alzheimerpatienten untersucht werden, welche jeweils

mit dem ADAM10-Stimulator Acitretin behandelt worden waren. Weiterhin sollte geklärt werden, welche Auswirkungen eine ADAM10-Aktivierung mit Acitretin auf andere bislang identifizierte ADAM10 Substrate — außer APP oder NrCAM — hat. Die Prozessierung anderer Substrate, außer APP, könnte im Rahmen einer ADAM10-Stimulation zu Therapie-assoziierten Nebenwirkungen führen. Da sowohl ADAM10 als auch NrCAM KO Mäuse eine ähnlich defizitäre axonale Ziel- und Wegfindung zeigten (53, 88), scheinen NrCAM und ADAM10 funktionell auf Neuritenebene miteinander zu interagieren. Daher sollte abschließend die funktionelle Konsequenz der der ADAM10-abhängigen NrCAM-Spaltung auf das Neuritenwachstum untersucht werden.

Diese Arbeit ist eine Kumulation der Publikationen "The metalloprotease ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) undergoes rapid, postlysis autocatalytic degradation" (113) und "NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease" (114):

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien und Zellkulturmedien

<i>Reagenz/Medium</i>	<i>Quelle/Referenz</i>
DMEM GlutaMax	Gibco
DMEM F12	Lonza
Neurobasal (- Glutamin)	Gibco
HBSS (- CaCl ₂ , – MgCl ₂)	Gibco
OptiMEM	Gibco
B27 Supplement	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
L-Glutamin 50 mM	Gibco (200 mM)
FBS (Fetales Kälberserum)	Sigma Aldrich
NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	Gibco
Trypsin EDTA	Gibco
PBS 1x	Gibco
DMSO	Carl Roth
TAPI-1 (Endkonzentration: 50 µM)	Merck/Calbiochem
GI254023x (Endkonzentration: 5 µM)	Sigma Aldrich
LT4 (Endkonzentration: 5 µM)	A. Rossello (115)
MN8 (Endkonzentration: 5 µM)	A. Rossello (115)
NMDA (Endkonzentration: 50 µM)	Abcam
1, 10 Phenanthroline (Endkonzentration: 100 mM)	Sigma Aldrich
D-APV (Endkonzentration: 100 µM)	Abcam
PMA (Endkonzentration: 1 µM)	Merck/Calbiochem
Acitretin (Endkonzentration: 2 bzw. 4 µM)	LGC Promochem.
DAPT (Endkonzentration: 1 µM)	Sigma Aldrich
Cycloheximide (Endkonzentration: 100 µg/ml)	Sigma Aldrich
dec-CMK (Endkonzentration: 50 µM)	Bachem
TCA	Sigma Aldrich
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Lipofectamine RNAmix	Invitrogen

Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich
BCA-Assay	Uptima Interchim
Protein Standard Lösung	Uptima Interchim
SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker	BioRad
Acrylamid-Lösung (40%)	Serva
TEMED	Carl Roth
10% APS	Carl Roth
Magermilchpulver	Sigma Aldrich
Protease inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
ConA-Sepharose Kügelchen	Sigma Aldrich
Protein A-Sepharose Kügelchen	GE Healthcare
Protein G-Sepharose Kügelchen	GE Healthcare
Heparin-Sepharose Kügelchen	GE Healthcare
ADAM10 Aktivitätsassay	AnaSpec
Tween	Merck
Rekombinantes LysC	Promega
Iodoacetamid	Sigma Aldrich
Dithiothreitol	Biozol
ECL prime	GE Healthcare
Sulfo-NHS-Biotin	Sigma Aldrich
Streptavidin Kügelchen	Sigma Aldrich
DNA/RNA-Aufreinigungs Kit	Macherey Nagel
Kompetente Bakterien	Invitrogen
ECL Prime	GE Healthcare
Cell counting kit 8	Thermo Fischer
BSA (bovines Serumalbumin)	Thermo Fischer
Natriumazid	
Papain	Sigma Aldrich
T4 Ligase	New England BioLabs

2.2. Antikörper

<i>Name des Antikörpers (Verdünnung)</i>	<i>Quelle/Referenz</i>
NrCAM N-terminal (1:1000)	Abcam (ab24344)
NrCAM C-terminal (1:1000)	Cell-Signaling (55284)
hNrCAM (1:500)	R&D (MAB20341)
ADAM10 C-terminal (1:1000)	Abcam (ab124695)
hADAM10 N-terminal (1:1000)	R&D (MAB1427)
β-actin (1:1000)	Sigma Aldrich (A5316)
Calnexin (1:2000)	Enzo/Stressgen (ADI-SPA-860)
sAPPα (14D6) (1:10)	(116)
sAPPα (5G11) (1:10)	(116)
APP (22C11) (1:1000)	Millipore (MAB384)
APP (2C11) (1:1000)	(117)
hSA (humanes Serumalbumin) (1:1000)	Sigma Aldrich (A6684)
Flag-M2 (1:1000)	Sigma Aldrich (F1804)
VSV-G (1:1000)	Santa Cruz (sc-365019)
ADAM17 C-terminal (1:1000)	(68)
GluR6/7 (1:1000)	Abcam (ab124702)
HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (1:10000)	DAKO

2.3. Pufferlösungen

<i>Name des Puffers</i>	<i>Zusammensetzung</i>
PBS 1x	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
STET-Lysepuffer	50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton
STEN-Lysepuffer	50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40
Hypotonischer Puffer	10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Transferpuffer	25 mM Tris, 240 mM Glycin
Kathodenpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS

Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9
PBS-Tween	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, 0,05% Tween
Blockierungslösung	Magermilchpulver 5% in PBS-Tween 1x
Niederer Tris Puffer	0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4% SDS
Hoher Tris Puffer	1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4% SDS
Laemmli Puffer 4x (Nicht-/reduzierend)	8% SDS, 40% Glycerol, ca. 0.025% Bromphenolblau, (10% β-Mercaptoethanol), 125 mM Tris, pH 6.8
Schägger Gel Puffer	3 M Tris, pH 8,45, 0,3% SDS
Schägger Acrylamidlösung	49,5% Total-AA, enthält 3% Crosslinker
DNA-Probenpuffer	30% Glycerol, 10 mM EDTA, 05% Orange G (Sigma), in 50 ml H ₂ O
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
LB-Medium/Agarplatten	10 g BactoTryptone, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 11 H ₂ O Für Agarplatten: 7,5 g BactoAgar per 500 ml
CoIP-Puffer	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 2 mM EDTA, 10% Glycerol
SDS-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% SDS
RIPA-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton, 0,1% Na-Deoxycholate, 0,1% SDS
Quenching Puffer	50 mM NH ₄ Cl, 1% BSA in PBS
Biotin Laemmli Puffer	3% Biotin (100mM) in 1x Laemmli Puffer
Neutralisationspuffer	0.5 M Tris, pH 6.8

Alle Reagenzien und Materialien, welche nicht in den Tabellen angeführt wurden sind in der Beschreibung der jeweiligen Experimente (siehe unten) angegeben (dies gilt ebenso für Dosis-/Konzentrationsangaben).

2.4. Zelllinien, Zellkultur, CRISPR/Cas9

<i>Name der Zelllinie</i>	<i>Quelle/Referenz</i>
HEK293 T/E	ATCC
HEK293 ADAM10 KO	(113)
SH-SY5Y	ATCC

Die HEK293 Zellen wurden in DMEM GlutaMax, mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die SH-SY5Y Zellen wurden in DMEM F12, mit 10% FBS, 10% NEAA und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle Zellen wurden bis zur Behandlung mit den jeweiligen Substanzen (siehe unten) bis nahe der Konfluenz kultiviert. Die ADAM10 KO HEK293 Zellen wurden mit Hilfe von CRISPR/Cas9 erzeugt: Hierzu wurden kurze guide-RNA Sequenzen erzeugt, welche gegen das Exon 2 von humanem ADAM10 gerichtet waren:

- 5'-CACCGCGTCTAGATTTCATGCGCA-3'
- 5'-AAACTGGGCATGGAAATCTAGACGC-3'

Die Primer wurden zusammengefügt und in, mit BbsI verdaute, pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)-Vektoren kloniert (118). Das entsprechende ADAM10 CRISPR/Cas9-Konstrukt wurde in HEK293T-Zellen transfiziert und die das Konstrukt tragenden Zellen mit 2,5 µg/ml Puromycin selektioniert (64). Einzelzellklone wurden mittels limitierter Verdünnung erzeugt und der ADAM10 KO durch Durchflusszytometrie und Western Blot bestätigt.

2.5. Mauslinien und primäre kortikale Neuronen

<i>Name der Mauslinie</i>	<i>Quelle/Referenz</i>
C57BL/6N ^{Cr}	Charles River
ADAM10 Fl/Fl	(62)
ADAM17 Fl/Fl	(119)

Alle Mäuse hatten einen C57BL/6N Hintergrund und wurden bei einem 12h/12h Tag-Nachtzyklus, mit Nahrung und Wasser ad libitum gehalten. Die Mäuse wurden mittels CO₂ und nachfolgender zervikaler Dislokation getötet. Alle Experimente wurden in Übereinstim-

mung mit der "European Communities Council Directive (2010/63/EU)", sowie der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt. Zur Präparation der primären Neuronen wurden Embryonen am Embryonaltag 15/16 (E15/16) verwendet, die zuvor aus schwangeren C57BL/6N Müttern entnommen worden waren. Die Präparation wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Kuhn et al. 2010).

In Kürze: Die Maushirne wurden aus den Embryonen entnommen und in HBSS gesammelt, die Meningen entfernt und der Kortex vom restlichen Hirngewebe getrennt. Die Kortizes wurden in Verdauungsmedium (38) inkubiert, durch vorsichtiges Auf- und Abpipetieren dissoziiert und anschließend bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen gezählt und auf PDL-beschichteten Lochplatten ausplattiert und in Neurobasalmedium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin (50mM) und 2% B27 kultiviert. Nach 5 Tagen *in vitro* (DIV) wurde das Medium gewechselt und die Neuronen mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Nach 48 h Inkubationszeit (7 DIV) wurden die Überstände gesammelt und die Zellen lysiert. Zur Behandlung mit NMDA wurden die Neuronen auf Sechslöchplatten ausplattiert ($7,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch) und bis zum 10. Tag *in vitro* belassen. Ein Drittel des Mediums wurde hier jeden Tag ausgewechselt (120). An Tag 10 wurden die Zellen für 30 Minuten mit NMDA stimuliert. Zur Behandlung mit Acitretin wurden die Neuronen wie zuvor beschrieben behandelt (63). Die ADAM10 Fl/Fl und ADAM17 Fl/Fl Neuronen wurden am 3. Tag *in vitro* mit iCre Lentivirus, oder GFP-Kontrollvirus transduziert. An Tag 5 wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen bis DIV7 inkubiert.

2.6. Isolation und Behandlung primärer Rattenneuronen

Primäre kortikale Rattenneuronen wurden wie zuvor beschrieben präpariert (121).

In Kürze: Die Kortizes wurden von E18 Embryonen aus Wistar Ratten entnommen und in HBSS mit 0,125% Trypsin und 5 U/ml DNase I (Life Technologies, Darmstadt, Germany) bei 37 °C für 15 Minuten dissoziiert. Nach Zugabe von DMEM mit 10% FBS, 2 mM l-Glutamin, und 50 U/ml Penicillin/50 µg/ml Streptomycin wurden die Zellen durch ein Zellsieb (100 µm, BD Falcon, Heidelberg, Germany) pipettiert und bei 200 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in DMEM resuspendiert und auf mit Poly-L-Ornithin beschichteten Platten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml ausplattiert. Nach einem Tag *in vitro* wurde das Medium ausgewechselt (Neurobasalmedium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin (50mM) und 2% B27). Die Neuronen wurden bei 37°C, 5%

CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. An Tag 19 (DIV19) wurden die Zellen mit Acitretin (2 µM) für 3 Tage behandelt (121).

2.7. Plasmide und Molekularbiologie (Aufreinigung, Sequenzierung, Transfektion)

<i>Plasmidname</i>	<i>Vektor</i>	<i>Quelle/Referenz</i>
hNrCAM-VSV	pCINeo	(52)
hADAM10-sh7/9RNAi	Peak12	(38)
E384A ADAM10	Peak12	(113)
hADAM10 ectodomain	pcDNA3.1	(113)
hADAM10 ΔCyto	pcDNA3.1	(113)
FLAG-human Tspan15	pEF6A	(64)

Zur Herstellung der E384A Mutante wurde das Peak12/hADAM10-sh7/9RNAi Konstrukt als Vorlage benutzt. Die Punktmutation wurde durch folgende Primer erzeugt:

- *E384A A4006C rev*: 5'-TGTCCAACCTGCGTGAGCAAAAGTAATGTG-3'
- *E384A A4006C for*: 5'-TTGCTCACGCAGTTGGACATAACTTTGGATCC-3'

Das pcDNA 3.1 Zeo (+)-CD5 signalpeptid-ADAM10 Δcyto Konstrukt (Aminosäuren 1-693), sowie das pcDNA 3.1 Zeo (+)-CD5 signalpeptid-ADAM10 ecto Konstrukt (Aminosäuren 1-672) wurden bei ProteoGenix bestellt. Zur Herstellung der Konstrukte wurde die humane ADAM10-Sequenz benutzt. Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden kompetente Ecoli Bakterien mit den jeweiligen Plasmiden (jeweils mit Ampicillinresistenz) transformiert und über Nacht bei 37°C unter Zugabe von Ampicillin in LB (Luria-Bertani)-Medium inkubiert. Die Plasmide wurden schließlich gemäß den Herstellerangaben (Macherey Nagel DNA-Aufreinigungs Kit) aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Die Plasmide wurden zur Sequenzierung zu GATC geschickt und die Sequenzen mit Hilfe der „CLC Main Workbench 7“ Software überprüft. Die Transfektion der Plasmide wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Thermo Fischer).

In Kürze: 10⁶ HEK293-Zellen wurden auf 6 Lochplatten ausplattiert, in OptiMEM (50 µl/Loch) mit den jeweiligen Vektoren (Konzentration 200-600 ng), mit Hilfe von Lipofectamin 2000 (1,5 µl/Loch) transfiziert und für 48h Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen entweder lysiert, oder mit entsprechenden Substanzen behandelt.

2.8. (Lenti-)Virusproduktion

Die iCre und GFP-Viren, sowie die NrCAM shRNA und scr. shRNA Viren wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (38, 53).

In Kürze: Der pKO2mod-EGFP-WPRE- Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen MLUI und XMAI in NEB4 mit BSA als Puffer für 2h bei 37°C verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA mittels Macherey Nagel Extraktionskit aufgereinigt. Die shRNA Oligos wurden durch Aufheizen auf 95°C für 10 Minuten und anschließendes Herunterkühlen für 20 Minuten bei Raumtemperatur verknüpft. Folgende NrCAM shRNA Sequenzen wurden hierzu verwendet (es ist jeweils die die Sequenz des Vorwärtsstrangs (fw) angegeben):

- *shRNA1*: 5'-CGCGTCCGGGGACACCCGTGAGGACTATATCT
CGAGATATAGTCCTCACGGGTGTCTTTTTGGAAA-3'
- *shRNA2*: 5'-CGCGTCCGGATAGATGGCGATAACCATTATACTC
GAGTATAATGGTATCGCCATCTATTTTTTGGAAA-3'

Anschließend wurden die zusammengesetzten Oligos mit dem jeweiligen Vektor durch Zugabe von MLUI/XMAI T4-Ligase und Ligasepuffer ligiert (Inkubation bei Raumtemperatur für 2h). Anschließend wurden kompetente Ecoli-Bakterien mit den Vektoren transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden ausgewählt, vervielfältigt und die Plasmide wie bereits oben beschrieben extrahiert und sequenziert. Die jeweiligen Vektoren (virale Vektoren: psPAX2, pCMV-VSV-G + shRNA Konstrukte) wurden dann in HEK293T Zellen transfiziert (siehe oben). Am nächsten Tag wurde das Medium (OptiMEM + 10% FBS), gegen „Verpackungsmedium“ (DMEM High Glucose, Pyruvat, NEAA und 10 % FBS) ausgetauscht. Am 2. Tag nach der Transfektion wurden die Zellüberstände gesammelt, bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand gefiltert (0,45 Micron Filter, Millipore). Die Proben wurden dann bei 22 000 rpm für 2h bei 4°C ultrazentrifugiert, 250 µl TBS-5 Puffer zum Pellet hinzugefügt und für 4h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Pellets resuspendiert und für 2 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert, die Pellets verworfen und der Überstand als fertig aufgereinigter Virus behalten.

2.9. qPCR (quantitative real-time PCR)

NrCAM und ADAM10 primer wurden bei BioRad gekauft (PrimePCR SYBR Green Assay: Adam10, Mouse; PrimePCR SYBR Green Assay: Nrcam, Mouse). Die gesamte RNA wurde

mittels „RNeasy Mini Kit (Qiagen)“ nach der Anleitung des Herstellers aus primären Neuronen extrahiert. Die RNA-Konzentration wurde photospektrometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Mittels „high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems/ABI)“ wurde die RNA in cDNA transkribiert. Die Real-time PCR wurde auf einer „7500 Fast Real-Time PCR Machine (ABI)“ mit Hilfe des „POWER SYBR Green PCR Master Mixes (ABI)“ durchgeführt. Die einzelnen Reaktionen wurden in Duplikaten auf einer 96 Lochplatte durchgeführt. Die mRNA-Levels von ADAM10 und NrCAM wurden auf ein „housekeeping“ Gen (β -Aktin) normalisiert.

2.10. Herstellung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen

Zunächst wurden die Zellüberstände gesammelt, bei 16 000 rcf und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände für die weitere Analyse behalten.

Die Überstände nach NMDA-, PMA- und Acitretin-Stimulation wurden mit TCA (Trichloressigsäure) gemischt (50 μ l TCA/ml Überstand) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände bei 16 000 rcf und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die übriggebliebenen Pellets wurden in 1x Laemmli Puffer gelöst.

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Lysepuffer (STET, CoIP-Puffer mit Proteaseinhibitor (1:500) und/oder GI254023x (5 μ M), MN8 (5 μ M), LT4 (5 μ M), TAPI (50 μ M), oder Phenanthrolin (100 mM)) lysiert. Die Proben wurden dann bei 16 000 rcf und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, die Pellets verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand mittels BCA-Assay (Uptima Interchim, UP95425) gemessen. 15-20 μ g Gesamtprotein wurden anschließend für die SDS-Gelelektrophorese benutzt.

2.11. Membranpräparation

HEK293 Zellen wurden auf 6 Lochplatten ausplattiert und bis zum Erreichen der Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen in PBS resuspendiert und mittels eines Zellkratzers von der Oberfläche gelöst. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 1300 g und 4°C, wurden die Zellpellets in hypotonem Puffer (mit Proteaseinhibitorcocktail) gelöst und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann 15-mal durch eine 23G-Kanüle gedrückt und bei 3800 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden verworfen und der Überstand bei 21 000 g und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets in reduzierendem Laemmli Puffer, STET Puffer mit oder ohne Triton X-100 (1%), jeweils mit oder ohne GI254023x (5 μ M) resuspendiert und 30

Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde Laemmli Puffer zu den Proben, die noch keinen Laemmli Puffer enthielten, hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend bei 95°C für 5 Minuten gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.12. Zelloberflächenbiotinylierung

Die Oberflächenbiotinylierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (122).

In Kürze: Primäre Neuronen wurden wie oben beschrieben extrahiert und kultiviert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen 3-mal mit eiskaltem PBS (pH 8) gewaschen und anschließend mit Biotinlösung (1mg/ml sulfo-NHS-Biotin in PBS) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut 3-mal mit PBS (pH 8) gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Quenching-Lösung inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit SDS-Lysepuffer (mit Proteaseinhibitor und GI254023x) lysiert. Nach 10 Minuten wurden die Proben mit RIPA-Puffer gemixt und sonifiziert, um die enthaltene DNA zu lösen. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt. Die biotinylierten Oberflächenproteine wurden mit Hilfe von Streptavidin-Kügelchen (80-100 µg Gesamtprotein/30 µl Streptavidin-Kügelchen) über Nacht bei 4°C präzipitiert. Die Kügelchen wurden mit RIPA-Puffer gewaschen, mit Biotin-Laemmli Puffer bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht und der Überstand anschließend in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.13. Co-Immunopräzipitation

HEK293 Zellen wurden wie oben beschrieben mit NrCAM-VSV, oder leerem Vektor transfiziert. Die transfizierten HEK293 Zellen wurden 24h nach der Transfektion mit CoIP Puffer (mit Proteaseinhibitor) lysiert. Die Proben wurden anschließend mittels einstündiger Inkubation mit Protein G-Sepharose Kügelchen bei 4°C vorgereinigt (50 µl Kügelchen/500 µl Lysat). Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C mit einem VSV-G (1:100) oder N-terminalen NrCAM Antikörper (1:100) präzipitiert. Die Proben wurden dann bei 1500 rcf und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Kügelchen 2-mal mit CoIP Puffer und mit PBS gewaschen und schließlich in Laemmli Puffer resuspendiert. Die NrCAM Detektion wurde in der Folge mit dem jeweils entgegengesetzten Antikörper durchgeführt (VSV-G- oder N-terminalem NrCAM-Antikörper).

2.14. Zeitverlaufsexperiment

HEK293 Zellen wurden auf 6 Lochplatten ausplattiert und bis zum Erreichen der Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewa-

schen und mit STET-Lysepuffer mit GI254023x (5 μ M) und Proteaseinhibitor, oder nur Proteaseinhibitor lysiert. GI254023x (5 μ M) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 5, 10, 30 oder 60 Minuten) zu den Proben gegeben, die noch kein GI254023x enthielten. Die Proben wurden während des gesamten Experiments auf Eis belassen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA wurden die Proben mit Laemmli-Puffer gemischt, bei 95°C für 5 Minuten gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.15. Cycloheximide Verfolgungsexperiment

3×10^6 HEK293 Zellen wurden auf 6 cm Platten ausplattiert und bis zur Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die HEK293 Zellen wurden dann mit Cycloheximid (100 μ g/ml) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 6, 12, 18 und 24h) mit STET-Lysepuffer (mit Proteaseinhibitor und GI254023x) lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA wurden die Proben mit Laemmli-Puffer gemischt, bei 95°C für 5 Minuten gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.16. SDS-PAGE und Western Blot

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mittels BCA-Assay bestimmt und für jede Probe wurden gleiche Proteinmengen auf die SDS-Gele aufgetragen. Somit wurde die Probenmenge pro Linie auf die Gesamtproteinkonzentration jeder Probe normalisiert. 15-20 μ g Gesamtprotein wurden anschließend für die SDS-Gelelektrophorese benutzt. Um durch eine weitere Ladekontrolle zu gewährleisten, dass die initiale Normalisierung korrekt war, wurde zudem ein "housekeeping" Gen, wie Actin oder Calnexin mittels Western Blot kontrolliert. Die Proben wurden in reduzierendem oder nicht-reduzierendem Laemmli Puffer bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht und anschließend auf den SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf PVDF-Membranen transferiert, für 1h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung inkubiert und danach mit PBST gewaschen. Die Membranen wurden dann für 1h oder über Nacht bei 4°C mit der primären Antikörperlösung inkubiert, mit PBST gewaschen und für 45 Minuten mit der sekundären Antikörperlösung inkubiert. Die Western Blot Membranen wurden mit ECL prime (GE Healthcare, RPN2232V1) entwickelt. Die Blots wurden anschließend mit der Multi Gauge Software (Version 3.0) quantifiziert. Die Bandenintensität wurde in jedem Experiment auf die jeweiligen Kontrollen normalisiert.

2.17. Neuritenauswachsassay

Primäre Neuronen wurden wie oben beschrieben extrahiert. 10^5 Neuronen wurden gemäß den Herstellerangaben in „XONA-Microfluidic-Chambers“, welche auf PDL-beschichtete Glasplättchen platziert worden waren, kultiviert. 4h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mit den jeweiligen Viren transduziert (scr. shRNA-EGFP control, oder NrCAM shRNA-EGFP, 1:1000). Die Neuronen wurden bis zum 3. Tag *in vitro* bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, dann wurden die ersten Bilder des kompletten Mikrokanal-Bereichs mit einem Leica DM6000 Mikroskop gemacht (Zeitpunkt 0h). Die durch die Software (Leica LASX) zusammengeführten Bilder beinhalteten den kompletten Mikrokanal-Bereich. Die Zellen wurden danach mit GI254023x (5 µM), oder DMSO behandelt und weitere 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am 4. Tag *in vitro* wurden die 2. Bilder desselben Areals gemacht (Zeitpunkt 24h) und die Neuriten auf deren Länge hin mittels LASX-Software verglichen (Länge 24h – Länge 0h). Nur Neuriten, die bereits am Zeitpunkt 0h in die Kanäle hineingewachsen waren und diese noch nicht verlassen hatten, wurden zur Analyse herangezogen. Wenn sich die Nervenfortsätze nach dem Verlassen des Kanals aufteilten, wurde jeweils der längste Fortsatz quantifiziert.

2.18. Zelltoxizitätsassay

Primäre Neuronen wurden wie oben beschrieben extrahiert und 2×10^4 Zellen auf einer 96 Lochplatte ausplattiert. 4h nach der Zellaussaat wurden die Neuronen entweder mit einem Lentivirus (scr. shRNA-EGFP control, oder NrCAM shRNA-EGFP, 1:1000) infiziert, oder nicht. Am 3. Tag *in vitro* wurden die Neuronen der Negativkontrolle (Zelltod) mit NaOH behandelt. Das Zellüberleben wurde am darauffolgenden Tag mittels „Cell counting kit 8“ (Sigma) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Absorptionswerte des eingesetzten Reagenzes (proportional zur Anzahl überlebender Zellen) wurde photometrisch mithilfe eines „Microplate reader“ bei 450 nm Wellenlänge bestimmt. Die Messung wurde in einstündigen Intervallen wiederholt (insgesamt 3h). Die Messwerte der initialen Messung wurden als Ausgangswert benutzt und die folgenden Messungen auf den Ausgangswert normalisiert.

2.19. ADAM10 Aktivitätsassay

Der Assay wurde nach den Herstellerangaben (AnaSpec) durchgeführt. In Kürze: Rekombinantes ADAM10 wurde mit seinem FRET-Substrat in einer 96 Lochplatte inkubiert (jeweils in identischer Konzentration 40 µl Substratlösung mit 10 µl Enzymlösung). Weiterhin wurden verschiedene ADAM10-Inhibitorkonzentrationen verwendet (jeweils 0,0; 0,001; 0,01; 0,1; und 1,0 µM für GI254023x, TAPI-1, MN8 und LT4). Die relative Fluoreszenzintensität

(RFU) wurde alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 150 Minuten bei Ex/Em 490/520 nm gemessen und anschließend graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung dieser Kurve (RATE = Fluoreszenz/5 Minuten) im linearen Bereich der Kurve (zwischen 10 und 40 Minuten) wurde mittels linearer Regression bestimmt (GraphPad Prism7). Die K_i -Werte der einzelnen Inhibitoren wurden bestimmt, indem die Inhibitorkonzentration gegen die jeweilige RATE aufgetragen und die Werte in die Bieth-Gleichung (REF) eingesetzt wurden.

Bieth-Gleichung: $Y = 100 - \left(\frac{100(E+X+K - \sqrt{(E+X+K)^2 - 4(E)(X)})^{0.5}}{2(E)} \right)$

E: Enzymkonzentration ($4 \cdot 10^9$ molar; wurde mit einem Molekulargewicht von 50 kDa für ADAM10 berechnet), X: Inhibitorkonzentration (molar), Y: RATEs, K: K_i -Wert. Das Molekulargewicht des rekombinanten ADAM10 wurde mittels Western Blot bestimmt.

2.20. Liquorproben von Alzheimerpatienten

Die Liquorproben der mit Acitretin, bzw. Placebo behandelten Alzheimerpatienten wurden freundlicherweise von Kristina Endres zur Verfügung gestellt (40). 5 μ l wurden zur massenspektrometrischen Analyse (siehe unten), die restlichen 20 μ l zur Analyse mittels Immunoblot verwendet.

2.21. Massenspektrometrie

5 μ l Liquor cerebrospinalis pro Patientenprobe wurde in Ammoniumbicarbonat (50 mM) mit 0,1% Natriumdesoxycholat proteolytisch verdaut. Die Disulfidbrücken wurden mit Dithiothreitol reduziert und Sulfhydrylreste mit Iodoacetamid alkyliert. Dann wurden die Proteine mittels 0,1 μ g LysC und 0,1 μ g Trypsin verdaut. Das Deoxycholat wurde durch Ansäuern gefällt und mittels Zentrifugation bei 16 000 rcf und 4°C für 10 Minuten entfernt. Die Peptide wurden anschließend mit „Stop and Go Extraktion“ (STAGE) mit C18 Spitzen entsalzt, mit Vakuumzentrifugation getrocknet und schließlich in 20 μ l 0,1% Ameisensäure gelöst. Die Proben wurden auf einem nanoLC System (EASY-nLC 1000, Proxeon; PRSO-V1 column oven: Sonation) mit Hilfe einer C18 Säule (30 cm x 75 μ m ID, ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 μ m, Dr. Maisch GmbH) mit einem Binären Wasser- und Acetonitrilgradienten mit 0.1% Ameisensäure bei 50°C Säulentemperatur und einem Fluss von 250 nl/min aufgetrennt. Die nanoLC war mittels einer nanoSpray Flex Ionenquelle (Proxeon) an ein Q-Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific) gekoppelt. Die Massenspektren wurden mit einer Auflösung von 70 000 aufgezeichnet. Die 10 intensivsten Ionen, die eine Intensität von $1,5 \cdot 10^4$ überschritten, wurden für die kollisionsinduzierte Dissoziation ausgewählt und die Spektren mit

einer Auflösung von 17 500 aufgezeichnet. Der dynamische Ausschluss für die Peptidfragmentierung wurde auf 120s gesetzt. Die Daten wurden mittels der MaxQuant Software (maxquant.org, Max-Planck Institute Munich, Version 1.5.3.12) analysiert. Die MS-Daten wurden mit einer kanonischen FASTA Datenbank für *Homo sapiens* von UniProt (einschließlich Isoformen, Download: 09. Januar 2017, 42120 Einträge) verglichen. Trypsin wurde als Protease definiert und 2 verpasste Schnitte für die Datenbanksuche akzeptiert. Eine Cystein-Carbaminomethylierung wurde als statische Modifikation definiert. Eine Acetylierung des N-Terminus, sowie eine Methionin-Oxidation wurde als variable Modifikation definiert. Die „false discovery rate“ für Peptide und Proteine wurde mittels „target and decoy approach“ auf weniger als 1% angepasst. „Razor“ und einzigartige Peptide wurden für die Quantifizierung herangezogen. Die „Label-free quantification“ (LFQ) benötigte wenigstens 2 Zählungen von „Razor“ oder einzigartigen Peptiden.

2.22. Statistik

Alle statistischen Tests wurden auf der Grundlage eines exploratorischen 2-seitigem 5% Signifikanzniveaus durchgeführt. Die p-Werte der Western Blots wurden mit relativen Zahlenwerten, mittels eines 2-seitigen Students t-Test, mit Welch's Korrektion oder one-way ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest für multiple Hypothesentestung durchgeführt. Für multiple Hypothesentestung nach Students t-Test wurde eine Bonferroni Korrektion angewendet. Als Software wurde GraphPad Prism 7 verwendet. Es wurde jeweils von einer Normalverteilung ausgegangen. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Protein LFQ-Intensitäten nach Behandlung mit Acitretin durch die Ausgangswerte jedes individuellen Patienten geteilt. Die LFQ-Quotienten wurden log₂ transformiert und die statistische Signifikanz mittels 2-seitigen Students t-Test für jedes identifizierte Protein überprüft. Die Liquorproben wurden verbildet analysiert.

3. Zusammenfassung der Publikation T. Brummer *et al.*, The metalloprotease ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) undergoes rapid, postlysis autocatalytic degradation. *FASEB J* 32, 3560-3573 (2018) (113):

Die Metalloprotease ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease 10) ist an wichtigen physiologischen Prozessen inner- und außerhalb des zentralen Nervensystems beteiligt. Während des Transports durch das sekretorische Zellkompartiment wird katalytisch inaktives, immatures ADAM10 (proADAM10) in seine proteolytisch aktive, mature Form (mADAM10) überführt. Eine Hemmung bzw. Stimulation von mADAM10s Expression/Aktivität wird als möglicher Therapieansatz zur Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder einiger Tumorentitäten, angesehen. Während proADAM10 in Immunoblots leicht nachzuweisen ist, hat sich dagegen die biochemische Detektion und Charakterisierung von mADAM10 als schwierig erwiesen. Dies führte zu der Ansicht, dass mADAM10 nur einen Bruchteil der zellulären ADAM10-Gesamtmenge ausmacht und ADAM10 folglich ineffektiv maturiert. Diese Arbeit zeigt jedoch in verschiedenen Zelllinien und primären Neuronen, dass mADAM10 während der biochemischen Zellyse einer schnellen, autokatalytischen Degradation anheimfällt, welche die Detektion von mADAM10 in Immunoblots entscheidend beeinträchtigt. Weiterhin war dieser Prozess auf ADAM10s katalytische Aktivität angewiesen und ließ sich durch Zugabe von kompetitiven ADAM10-Inhibitoren zum Zellysepuffer unterbinden. Dahingegen blieb proADAM10 von dieser Degradation verschont, was auf einen intramolekularen, autoproteolytischen Prozess schließen lässt. Eine Hemmung der autoproteolytischen Degradation mithilfe spezifischer ADAM10-Inhibitoren offenbarte schließlich, dass ADAM10 tatsächlich — entgegen früherer Ansichten — effektiv maturiert. Zudem konnte durch ein Cycloheximid-Experiment gezeigt werden, dass mADAM10 mit einer Halbwertszeit von ca. 12 h ein — im Verhältnis zu seinen Substraten — vergleichsweise langlebiges Protein ist. Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass eine autoproteolytische Degradation von mADAM10 — durch Zugabe spezifischer Inhibitoren bei der biochemischen Zellyse — verhindert werden muss, um eine verlässliche und reproduzierbare mADAM10-Detektion zu gewährleisten.

Die Experimente wurden von Tobias Brummer, Stefan F. Lichtenthaler, Carl P. Blobel und Martina Pigoni geplant. Alle Experimente sowie die Analyse der Daten wurde von Tobias Brummer durchgeführt. Das Manuskript wurde von Tobias Brummer und Stefan F. Lichtenthaler geschrieben. Die ADAM10-Inhibitoren MN8 und LT4 wurden von Armando Rossello zur Verfügung gestellt. Die ADAM10 KO HEK293 Zellen und das Tspan15 Plasmid wurden

von Peter J. Noy und Michael G. Tomlinson hergestellt. Das wtADAM10 und das E384A Plasmid wurden von Huanhuan Wang hergestellt.

4. Zusammenfassung der Publikation T. Brummer *et al.*, NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 10.15252/emmm.201809695 (114):

Die Metalloprotease ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease 10) ist eine mögliche therapeutische Zielstruktur bei der Behandlung von Morbus Alzheimer, da sie unter anderem durch proteolytische Spaltung von APP die Produktion von neurotoxischem A β -Peptiden verhindern kann. Jedoch schneidet ADAM10 eine große Anzahl unterschiedlicher Substrate, was im Rahmen einer therapeutischen ADAM10-Aktivierung zu entsprechenden, Therapie limitierenden Nebenwirkungen führen könnte. Auf der anderen Seite könnten diese Substrate — zusammen mit APP — als mögliche Biomarker genutzt werden, um die ADAM10-Aktivität in klinischen Studien zu beobachten und neue selektive ADAM10-Aktivatoren zu entwickeln. Diese Arbeit zeigt, dass das neuronale Zelladhäsionsmolekül NrCAM als ein solches Substrat — und somit Biomarker — in Frage kommt. Desweiteren zeigt diese Arbeit, dass ADAM10 NrCAM-abhängig das Auswachsen von Neuriten reguliert, indem die Protease NrCAMs neuronale Zelloberflächenexpression kontrolliert. In primären murinen Neuronen ließ sich die NrCAM-Spaltung interessanterweise — im Gegensatz zu APP — nicht durch den generellen ADAM10-Aktivator Acitretin stimulieren. Folglich scheint eine Substrat-spezifische ADAM10-Aktivierung entgegen bisheriger Erwartungen möglich zu sein. Diese Beobachtungen konnten in der Folge auch in einer proteomischen Analyse von Patientenliquorproben einer klinischen Phase II-Studie bestätigt werden. Zudem konnte hierbei gezeigt werden, dass nicht nur NrCAM, sondern auch die meisten anderen bisher identifizierten ADAM10-Substrate durch die Acitretinbehandlung unbeeinträchtigt blieben. Folglich zeigt diese Studie erstmals, dass ADAM10 eine NrCAM-abhängige Funktion beim Neuritenwachstum zukommt und eine substratspezifische therapeutische ADAM10-Aktivierung möglich ist, welche mit der NrCAM-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis überwacht werden könnte.

Die Experimente wurden von Tobias Brummer, Stefan A. Müller und Stefan F. Lichtenthaler geplant. Die Planung und Analyse der Daten des Neuritenauswachsexperiments wurde von Tobias Brummer und Francisco Pan-Montojo, das Experiment selbst von Tobias Brummer durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse der Liquorproben wurde von Stefan A. Müller durchgeführt. Die Experimente mit den Rattenneuronen wurden von Taisuke Tomita und Fumiaki Yoshida übernommen. Alle übrigen Experimente, sowie die Analyse der Daten

wurde von Tobias Brummer durchgeführt. Das Manuskript wurde von Tobias Brummer und Stefan F. Lichtenthaler verfasst. Die Liquorproben wurden freundlicherweise von Kristina Endres und Andreas Fellgiebel zur Verfügung gestellt (40). Das NrCAM-VSV Plasmid wurde von Avri Ben'Zev zur Verfügung gestellt (52).

5. Diskussion

5.1. NrCAMs proteolytische Prozessierung durch Furin, ADAM10 und die γ -Sekretase (114)

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war, dass NrCAM einer sequentiellen, limitierten Proteolyse durch Furin, ADAM10 und die γ -Sekretase unterzogen wird, wobei ADAM10 für die Freisetzung der NrCAM-Ektodomäne (sNrCAM) verantwortlich ist (Abb. 5). Sogenanntes „Ectodomain shedding“ ist ein seit langem bekanntes Mittel der zellulären Signalübertragung. Mithilfe von Proteasen wie ADAM10 werden Rezeptoren und andere Proteine von der Zelloberfläche entfernt und lösliche Spaltprodukte als sekundäre Signalmoleküle freigesetzt (123). Die in der Zellmembran verbliebenen Proteinreste werden anschließend durch eine regulierte Intramembranproteolyse (RIP, z.B. durch den γ -Sekretasekomplex) weiterverstoffwechselt (124). Wie auch viele andere Typ-I-Transmembranproteine (z.B. APP) wird auch NrCAM einer solchen sequentiellen limitierten Proteolyse unterzogen (Zusammengefasst in Abb. 5). Im Gegensatz zu APP wird NrCAM allerdings initial von der Proproteinkonvertase Furin prozessiert, bevor seine Ektodomäne (sNrCAM) durch ADAM10 freigesetzt wird (101, 125). Die funktionelle Bedeutung dieses Furinschnitts blieb allerdings bislang ungeklärt. Insbesondere scheint die Furinspaltung keine Voraussetzung für NrCAMs weitere proteolytische Prozessierung zu sein, da ADAM10 auch in der Lage ist, unprozessiertes proNrCAM zu schneiden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch andere Zelladhäsionsmoleküle aus der L1-Familie einer initialen Spaltung durch Proproteinkonvertasen unterzogen werden. So wird L1CAM beispielsweise durch PC5A gespalten (126), während das L1-ähnliche Zelladhäsionsmolekül Tractin (wird nur in Blutegeln exprimiert) — wie auch NrCAM — durch Furin prozessiert wird (127). Im Falle von Tractin ist dieser initiale Furinschnitt essentiell für dessen Funktion als Zelladhäsionsmolekül (127). Ob ähnliches auch auf NrCAM zutrifft, gilt es in weiteren Studien zu untersuchen. Da das C- und N-terminale NrCAM-Fragment (zusammen mNrCAM) miteinander in Kontakt bleiben, ist es gut möglich, dass die so veränderte

Konformation des Proteins dessen Interaktion mit entsprechenden Liganden und folglich dessen Zelladhäsionsfunktion ermöglicht. Ein weiteres bekanntes Beispiel für eine sequentielle limitierte Proteolyse ist das ADAM10/17-Substrat Notch (128, 129). Auch Notch wird im sekretorischen Zellkompartiment von Furin geschnitten und in der Folge durch ADAM10/17 und die γ -Sekretase prozessiert (69, 130, 131). Die hierbei freigesetzte intrazelluläre Domäne kann anschließend im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirken (132, 133). Im Gegensatz zu Notch besitzt NrCAMs intrazelluläre Domäne allerdings keine bekannte NLS („nuclear localization sequence“), somit ist es unwahrscheinlich, dass NrCAM ebenso als Transkriptionsfaktor aktiv wird. Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass sNrCAM weder von Furin, noch von ADAM17 freigesetzt werden kann und somit als ADAM10-spezifischer Biomarker dienen könnte.

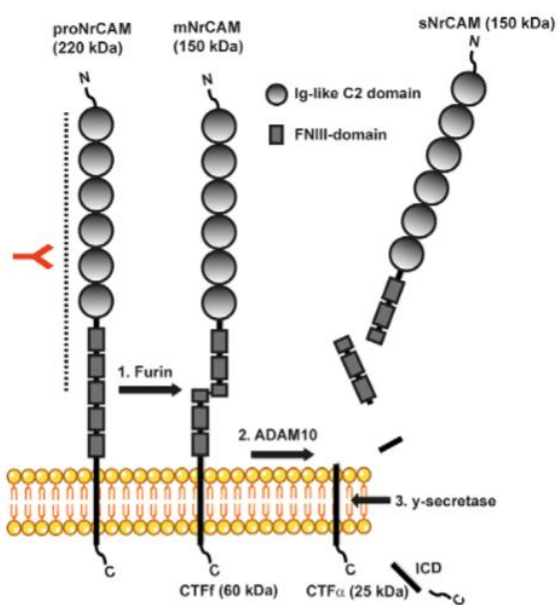


Abb. 5. NrCAMs limitierte Proteolyse: NrCAM wird einer sequenziellen limitierten Proteolyse unterzogen. Zunächst wird proNrCAM im sekretorischen Zellkompartiment von der Proproteinkonvertase Furin in seine mature Form (mNrCAM) umgewandelt. Die jeweiligen Fragmente bleiben in der Folge nicht-kovalent miteinander verbunden. mNrCAM kann nahe der Zellmembran von ADAM10 geschnitten werden, wodurch dessen lösliche Ektodomäne (sNrCAM) freigesetzt wird. Der verbleibende C-terminale Teil (CTF α) kann in der Folge von der γ -Sekretase gespalten werden. Die vertikalen Linien stellen die Bindungsstelle des N-terminalen Antikörpers (in rot) da. Angegeben ist zudem das Molekulargewicht der jeweiligen Spaltprodukte. Abbildung aus Brummer et al, 2019 (114).

5.2. ADAM10-Stimulation durch Acitretin in Neuronen und Alzheimer Patienten (114)

Morbus Alzheimer ist aufgrund der demographischen Entwicklung in den westlichen Industrienationen ein wachsendes medizinisches und gesellschaftspolitisches Problem. Lag das Augenmerk bislang auf der Unterbindung der A β -Produktion mittels BACE1- und γ -Sekretase-Inhibitoren/Modulatoren bzw. der A β -Entfernung aus dem Gehirn durch monoklonale Antikörper (27, 29, 30, 32, 134-136), ist der nicht-amyloidogene, ADAM10-abhängige Weg der APP-Spaltung in klinischen Studien eher vernachlässigt worden (40). Jedoch zeigen die überwiegend ernüchternden Ergebnisse der bislang veröffentlichten Studien die Notwendigkeit, neue Therapieansätze und pharmakologische Zielstrukturen zu finden. So könnte eine

ADAM10-Stimulation durch die Produktion des neuroprotektiven sAPP α -Fragments einen über die Hemmung der A β -Freisetzung hinausgehenden therapeutischen Nutzen haben. Da ADAM10 jedoch ein breites Substratspektrum besitzt, waren die Bedenken hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen bislang groß (53). So scheint z.B. ein „Zuviel“ an ADAM10 Aktivität — und folglich sAPP α -Produktion — einen wesentlichen pathogenetischen Beitrag an der synaptischen Dysfunktion beim fragilen X-Syndrom (FXS) zu leisten (80). Hierzu muss allerdings gesagt werden, dass beim FXS die verstärkte ADAM10-Aktivität in eine kritische Phase der frühkindlichen Entwicklung fällt und somit nicht unbedingt mit einer medikamentösen Alzheimer-Therapie in einem eher geriatrischen Setting verglichen werden kann.

Diese Arbeit zeigt in primären murinen Neuronen und Liquorproben von Alzheimer Patienten, dass — entgegen aller Befürchtungen — eine milde Stimulation der ADAM10-Expression mittels Acitretin nur wenige der bislang identifizierten ADAM10-Substrate beeinflusst. So waren im Liquor cerebrospinalis der behandelten Patienten nur sAPP α (40) und CSPG4/NG2 (76) signifikant erhöht, während drei weitere ADAM10-Substrate (BCAM (137), ST6GAL2 und PTPRS (53)) signifikant erniedrigt waren. Interessanterweise blieben mehr als 50 ebenso identifizierte ADAM10-Substrate — unter anderem NrCAM — unverändert. Folglich scheint es möglich, trotz einer allgemeinen und nicht zielgerichteten ADAM10-Stimulation, eine relativ spezifische Aktivierung des nicht-amyloidogenen Wegs zu erreichen, ohne alle ADAM10-Substrate in gleicher Weise zu beeinflussen. Somit liefert diese Arbeit einen experimentellen Erklärungsansatz, weshalb die ADAM10-Stimulation sowohl im Tierversuch als auch unter klinischen Bedingungen so gut vertragen wurde (39, 40, 121). Dieses Erkenntnis könnte sich zudem auch auf die Therapie weiterer Erkrankungen übertragen lassen. So kann z.B. eine ADAM10-Stimulation die Proliferation von Lebervorläuferzellen unterdrücken und damit das Fortschreiten einer zunehmenden Leberfibrose bei chronischen Hepatitiden verhindern (138-140). Auch im Rahmen von Prionenerkrankungen könnte eine Aktivierung der Prionprotein-Sheddase ADAM10 hilfreich sein. So zeigte sich in ADAM10 KO-Mäusen eine verstärkte Konversion von physiologischem PrP^c in pathologisches PrP^{sc}, wodurch sich die Erkrankung deutlich früher manifestierte (83). Passend dazu war eine Überexpression von ADAM10 mit einem verspäteten Erkrankungsbeginn assoziiert (141). Auf der anderen Seite konnte durch einen ADAM10 KO die zentralnervöse Ausbreitung der Erkrankung durch verminderte PrP^{sc}-Spaltung verlangsamt werden (83), sodass noch nicht abschließend geklärt ist, welche Rolle ADAM10 bei Prionenerkrankungen einnimmt.

Viele der in der proteomischen Analyse signifikant veränderten Proteine waren keine Membranproteine, weshalb diese nicht als direkte ADAM10-Substrate in Frage kommen. ADAM10 ist allerdings auch in verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, mitunter den Notch-Signalweg involviert (131). Folglich könnten diese Proteine auch sekundär über nachgeschaltete Signalwege beeinflusst worden sein. So veränderte beispielsweise eine milde neuronale Überexpression von ADAM10 (30 % Zunahme) im Mausmodell die Expression von mehr als 350 Genen (142). Wie auch in der proteomischen Analyse dieser Studie (CFHR1, B4GALT1, TMSB4X, PDCD6 und DCD) waren hierbei einige inflammatorische Genprodukte in ihrer Expression verändert, welchen Funktionen im Bereich des innate oder adaptiven Immunsystems zugeschrieben werden. Im Falle der Acitretin-Behandlung könnte dies allerdings auch vollkommen unabhängig von der ADAM10-Zunahme sein. Indem Acitretin die intrazelluläre Freisetzung von all-trans Retinsäure (atRA) vom zellulären retinsäurebindenden Protein (CRABP) ermöglicht, reguliert es indirekt die Transkription einer Vielzahl an Genen. AtRA gelangt nach seiner Freisetzung in den Zellkern und kann durch die Bindung an RAR/RXR-Rezeptoren die Transkription verschiedener Gene (darunter auch ADAM10) regulieren (63). Weiterhin sind Retinoide für ihren immunmodulatorischen Effekt bekannt; so kann atRA z.B. therapeutisch bei der Promyelozytenleukämie (AML M3) eingesetzt werden, da es das Ausreifen der immaturen, pathologisch expandierten Zellklone ermöglicht (143, 144). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass Acitretin die zentralnervöse Expression des inflammatorischen Zytokins IL6 erhöht (145). Auch die Zunahme des Retinsäuretransportprotein FABP5 im Patientenliquor lässt sich am ehesten als Konsequenz der indirekten intrazellulären atRA-Konzentrationserhöhung erklären. So kann atRA bekanntermaßen die Genexpression von FABP5 erhöhen (146-148).

Abgesehen von immunologischen Funktionen sind einige der identifizierten Proteine für ihre regenerativen und neuroprotektiven Qualitäten bekannt. Das außer sAPP α durch Acitretin hochregulierte ADAM10-Substrat CSPG4 wird vorrangig in Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) exprimiert (76). Zudem ist es ein wichtiger Regulator von adaptiven Prozessen nach Hirnschädigungen (149), da es unter anderem das Wiedereinsprossen von Neuriten in gliales „Narbengewebe“ vermittelt (150). Dermicidin (DCD) hingegen ist ein antimikrobielles Protein, welches sowohl in Schweißdrüsen, als auch im Nervensystem vorkommt. Sein N-terminales Fragment ist in der Lage, unter oxidativen Stressbedingungen als sogenanntes „survival promoting peptide“ das Überleben von neuronalen Zellen zu ermöglichen (151, 152). Überraschenderweise beeinflusste eine allgemeine Zunahme zellulärer ADAM10-Levels nur einen kleinen Bruchteil der bisher bekannten ADAM10-Substrate

(sAPP α , CSPG4, BCAM, ST6GAL2 und PTPRS). Jedoch liefert diese Arbeit hierfür einen möglichen Erklärungsansatz:

Während sowohl APP (37, 38) als auch NrCAM (53, 113) für ihre konstitutive, nicht stimulierte Spaltung ADAM10 benötigen, kann eine Spaltung jenseits des konstitutiven Levels durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst werden. PMA stimulierte z.B. in primären Neuronen die Freisetzung von sAPP α , während sNrCAM unverändert blieb. Dagegen steigerte eine Überexpression des ADAM10-Bindungspartners Tspan15 (64, 66, 153) in HEK293-Zellen die Freisetzung von sNrCAM, während dies die sAPP α -Produktion sogar reduzierte. Somit zeigte sich trotz ähnlicher mADAM10-Zunahme unter Acitretinbehandlung und Tspan15-Überexpression ein komplett unterschiedliches Ergebnis hinsichtlich der sNrCAM/sAPP α -Freisetzung. Folglich kann eine Zunahme der ADAM10-Expression nicht unbedingt mit einer gesteigerten Spaltung all seiner Substrate gleichgesetzt werden. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit neuesten Erkenntnissen zu ADAM10s posttranslationaler Regulation durch die Tspans der C8 Subfamilie (Tspans 5, 10, 14, 15, 17 und 33) in Einklang bringen. Kürzlich konnte in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden, dass ADAM10 je nach Bindung an unterschiedliche Tspans ein verändertes Substratspektrum aufweist (64-67, 154). Dies wird unter anderem dadurch ermöglicht, dass die Tetraspanine nicht nur an ADAM10, sondern auch an seine jeweiligen Substrate binden. Somit wird die Prozessierung eines Substrats nicht nur von dessen Interaktion mit ADAM10, sondern zusätzlich von der Bindung beider Proteine an ein spezifisches Tspan bestimmt. Demnach kann ADAM10 als ein Teil von sechs unterschiedlichen Proteinkomplexen angesehen werden, von welchen jeder die Prozessierung jeweils anderer Substrate ermöglicht (65). Während diese Studie zeigt, dass Tspan15 tatsächlich eine unterschiedliche Spaltung von NrCAM und APP ermöglichen kann, ist es unwahrscheinlich, dass die Veränderungen in den mit Acitretin behandelten Patienten durch Tspan15 verursacht wurden, da beide Stimuli unterschiedliche Effekte auf APP und NrCAM nach sich zogen. Jedoch könnte Acitretin durchaus über andere Tspans der C8-Gruppe (Tspans 5, 10, 14, 17 und 33) Einfluss auf ADAM10s Substratspezifität nehmen. Besonders Tspan5 und Tspan14 sind in den meisten Zelltypen des ZNS exprimiert (65). Weiterhin kann Acitretin durch die indirekte Zunahme der intrazellulären atRA-Konzentration Einfluss auf viele Gene außer ADAM10 (155) – möglicherweise auch auf die Tspans – nehmen. Um die Auswirkungen der einzelnen Tspans auf die ADAM10-Substratspezifität genauer untersuchen zu können, werden allerdings in Zukunft entsprechende transgene Tiermodelle notwendig sein, die entweder bestimmte Tspans überexprimieren, oder denen einzelne Tspans

fehlen. Natürlich ist es genauso gut möglich, dass Acitretin seine Effekte auch über andere Proteine als die Tspans vermittelt. So ist z.B. für die Interaktion von ADAM17 mit seinen Transportproteinen iRhom1 und iRhom2 das lösliche FRMD8/iTAP-Protein notwendig, welches die Stabilität und Aktivität des Proteinkomplexes reguliert (156, 157). Solche sekundären Regulatorproteine könnten durchaus auch für die Interaktion von ADAM10 mit den Tspans von Nöten sein und alternative Acitretin-Ziele darstellen.

5.3. NrCAM als Biomarker (114)

Um eine ADAM10-aktivierende Therapie in (prä)klinischen Studien untersuchen zu können, werden zweifelsohne spezifische Biomarker benötigt, mit welchen sich der Therapieerfolg überwachen lässt. Bisher wurde eine ADAM10-Stimulation durch eine Zunahme der sAPP α - bzw. eine Abnahme der A β -Konzentration überprüft (40). Jedoch blieb bislang unklar, inwieweit auch andere ADAM10 Substrate hierdurch beeinflusst werden. Idealerweise sollten natürlich Veränderungen aller bekannten ADAM10-Substrate überwacht werden, allerdings ist dies in der klinischen Praxis unrealistisch. Da sNrCAM im Gegensatz zu sAPP α unter Acitretin-Behandlung unverändert blieb, könnte sich sNrCAM als möglicher Zusatzmarker für klinische Studien eignen. So könnte durch die Bestimmung von sNrCAM und sAPP α zwischen gewünschter und unerwünschter ADAM10-Aktivierung unterschieden werden. Ähnliche Überlegungen wurden für BACE1- und γ -Sekretase Inhibitoren/Modulatoren formuliert. Klinische Studien zu γ -Sekretase-Inhibitoren sind aufgrund von schwerwiegenden Nebenwirkungen durch die Blockade der Spaltung vieler γ -Sekretasen Substrate — darunter Notch — abgebrochen worden (29). Folglich könnte z.B. Notch als Biomarker genutzt werden, um unter den neuen γ -Sekretasen Inhibitoren die Substanzen zu identifizieren, welche die APP-Spaltung blockieren, jedoch Notch unbeeinträchtigt lassen (29). Ähnliches könnte sich auch auf ADAM10 und NrCAM anwenden lassen. Da NrCAM bereits in der Vergangenheit als möglicher Biomarker für das Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert wurde, existieren zudem bereits klinisch erprobte ELISA-Kits für die sNrCAM-Detektion im Liquor cerebrospinalis (107-109). Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die lösliche NrCAM-Ektodomäne (sNrCAM) nur durch ADAM10 und nicht andere Proteasen (z.B. Furin oder ADAM17) freigesetzt wird. Somit könnte sNrCAM neben sAPP α als ADAM10-spezifischer Biomarker genutzt werden.

5.4. Neurobiologische Funktionen der NrCAM-Spaltung (114)

Da Acitretin sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* die sNrCAM-Freisetzung nicht beeinträchtigte, ist es unwahrscheinlich, dass eine derartige ADAM10-Stimulation zu NrCAM-abhängigen Nebenwirkungen führen könnte. Jedoch zeigt diese Arbeit, dass andere ADAM10-beeinflussende Stimuli sehr wohl die NrCAM-Spaltung und damit das Auswachsen von Neuriten beeinträchtigen können. Während eine ADAM10-Inhibition *in vitro* die neuronale Oberflächenexpression von mNrCAM und in der Folge das Auswachsen von Neuriten steigerte, konnte dies durch einen NrCAM-knock-down (KD) verhindert werden. Somit kann ADAM10 NrCAMs Funktion als neuronales Rezeptormolekül beeinflussen. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit früheren Antikörper-Blockierungsexperimenten vereinbaren. Hierbei wurde durch eine Blockade der Interaktion von NrCAM mit seinen jeweiligen Liganden auf der neuronalen oder glialen Zelloberfläche nicht nur das Auswachsen von Neuriten, sondern auch die axonale Ziel- und Wegfindung beeinträchtigt (91, 96, 158, 159). Auch für ADAM10 konnte gezeigt werden, dass die Protease durch die Spaltung unterschiedlicher neuronaler Zelladhäsionsmoleküle (z.B. L1CAM, IgLONs), in verschiedenen anatomischen Lokalisationen und Entwicklungsstadien das Neuritenwachstum und die axonale Wegfindung auf unterschiedliche Art und Weise regulieren kann (18, 160, 161). Während eine ADAM10-Hemmung in Spinalganglien- und retinalen Ganglienzellen das Neuritenwachstum beeinträchtigte (75, 161, 162), vergrößerte sich dagegen die Anzahl neuronaler Fortsätze in SH-SY5Y Zellen (163). Zudem veränderte eine Inhibition der ADAM10-abhängigen L1CAM-Spaltung in zerebellären Mikroexplantaten nur dann das Neuritenwachstum, wenn diese auf einem mit L1-beschichtetem Untergrund kultiviert wurden (160).

Da Neuritenwachstum und axonale Ziel- und Wegfindung in komplexer Art und Weise von der spatiotemporalen Expression spezifischer Rezeptoren und Liganden abhängig sind, ist es nicht verwunderlich, dass ADAM10 je nach Expression unterschiedlicher Substrate zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung einen gegensätzlichen Einfluss auf diese Prozesse haben kann (89, 164). Pathophysiologisch könnte die Regulation des Neuritenwachstums durch NrCAM-Spaltung unter anderem bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen, bei welchen die neuronale Konnektivität durch eine gestörte neuronale Vernetzung beeinträchtigt sein kann, eine Rolle spielen. In diesem Sinne konnte NrCAM in verschiedenen Studien mit Autismusspektrumerkrankungen (ASD) und Schizophrenien in Verbindung gebracht werden (81, 105, 165).

Eine ADAM10-abhängige Kontrolle von NrCAMs Rezeptorfunktion wird weiterhin durch bestimmte Phänotypen der jeweiligen KO-Mauslinien gestützt. Während ADAM10-KO-Mäuse eine geringere Anzahl dendritischer Dornen aufwiesen (62), zeigten NrCAM-KO-Mäuse einen hierzu entgegengesetzten Phänotyp (93, 94). Zusammen mit Neuropilin-2 und PlexinA3 bildet NrCAM einen Teil des Semaphorin-3F (Sema3F) Rezeptorkomplexes, welcher Sema3F-abhängig die Retraktion dendritischer Dornen vermittelt (93, 94). Somit könnte eine vergrößerte NrCAM-Oberflächenexpression zu einer Dichteabnahme dendritischer Dornen in ADAM10-KO-Mäusen beitragen. Unter physiologischen Bedingungen könnten Veränderungen der ADAM10-Aktivität — und damit der NrCAM-Oberflächenexpression — dazu beitragen, dass, im Sinne der synaptischen Plastizität, hoch-aktive synaptische Kontakte gestärkt werden, indem diese durch NrCAM-Spaltung weniger anfällig für Sema3F-induzierte Dornenretraktion werden. Im Umkehrschluss würde eine verringerte ADAM10-Aktivität zu einer verringerten Dichte dendritischer Dornen beitragen. Synaptische Plastizität und Langzeitpotenzierung synaptischer Kontakte sind eng mit der Öffnung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren und dem damit einhergehenden Na^+ und Ca^{2+} -Einstrom an der postsynaptischen Membran verbunden (166). Passenderweise führte eine NMDA-Behandlung von primären Neuronen zu einer ADAM10-abhängigen Zunahme der NrCAM-Spaltung.

Neben der Rezeptorfunktion des gesamten NrCAM-Moleküls könnten auch dessen Spaltprodukte (sNrCAM und das C-terminale Fragment) eine funktionelle Bedeutung haben. So zeigten sowohl ADAM10-, als auch NrCAM-KO-Mäuse ähnliche axonale Ziel- und Wegfindungseinschränkungen innerhalb ihres Bulbus olfactorius (53, 88). In beiden Fällen wiesen afferente olfaktorische Nervenfasern ähnliche Fehlprojektionen im Bereich der Glomeruli olfactorii auf. Da NrCAM in NrCAM-KO-Mäusen vollkommen fehlt und dagegen in ADAM10-KO-Mäusen angereichert ist, kann dieser Phänotyp nur durch NrCAMs Spaltprodukte bedingt sein, da diese in beiden Mauslinien vermindert vorhanden sind.

5.5. ADAM10s präanalytische Autodegradation (113)

Obwohl in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse über ADAM10s Funktionen inner- und außerhalb des zentralen Nervensystems gewonnen wurden, waren mechanistische und biochemische Studien noch immer durch die schwierige Detektion von mADAM10 limitiert. In verschiedenen Publikationen zeigte sich das Verhältnis von proADAM10/mADAM10 sehr heterogen (37, 53, 62, 80, 167). Dies führte zu der Ansicht, dass aufgrund einer ineffektiven Maturation nur wenig mADAM10 in der Zelle vorhanden ist. Diese Arbeit zeigt jedoch unter anderem, dass endogenes ADAM10 tatsächlich effizient maturiert

(proADAM10/mADAM10-Verhältnis ca. 1/2) und die variablen Ergebnisse hinsichtlich der mADAM10-Detektion eher durch eine präanalytische Autodegradation der Protease während der Zellyse bedingt sind, welche sich effektiv durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors (GI254023x oder MN8) verhindern lässt (Zusammenfassung in Abb. 6):

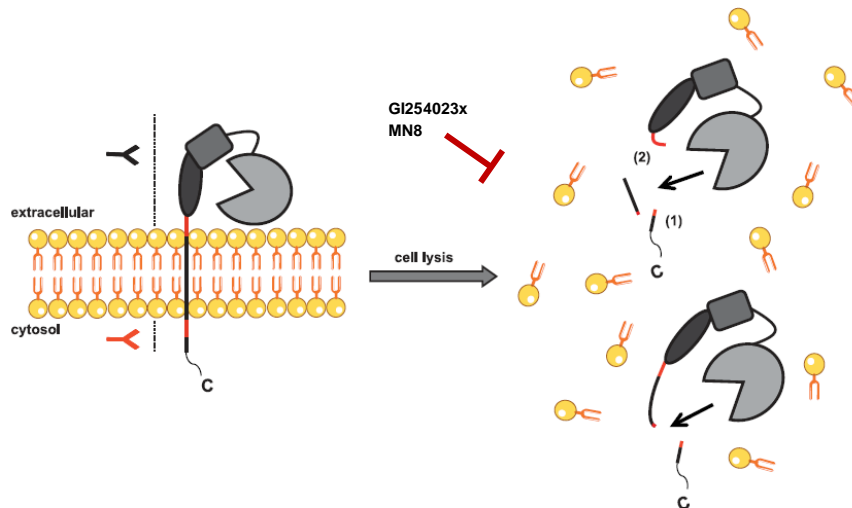


Abb. 6. Autokatalytische Degradation von mADAM10: Sobald ADAM10 bei der biochemischen Zellyse aus der Zellmembran freigesetzt wird, werden mögliche Schnittstellen (in rot markiert) im Bereich der Juxtamembran- und der intrazellulären Domäne für das aktive Zentrum zugänglich. Dies führt zu einer limitierten, vermutlich intramolekularen Proteolyse, welche mindestens 2 Fragmente unterschiedlicher Größe erzeugt, die entweder die Ektodomäne (kleineres Fragment) oder die Ekto-, Transmembran- und einen kleinen Teil der cytosolischen Domäne enthalten. Das kleinere Fragment entsteht durch einen initialen Schnitt im Bereich des C-terminalen Endes der Protease (1), gefolgt von einem 2. Schnitt im Bereich der Juxtamembrandomäne (2). Diese sequenzielle Proteolyse kann durch die Hydroxamat-basierten ADAM10-Inhibitoren GI254023x und MN8 verhindert werden. Die Vertikalen Linien stellen die Bindungsstellen für die jeweiligen ADAM10-Antikörper da (schwarz: N-terminaler Antikörper; rot: C-terminaler Antikörper). Abbildung modifiziert aus Brummer et al, 2018 (113).

Da ADAM10 nicht nur in der Neurodegeneration eine große Rolle spielt, sondern auch an Entzündungsreaktionen, Autoimmunität und Tumoren beteiligt ist und auch hier eine mögliche medikamentöse Zielstruktur darstellt (49, 53, 54, 168-172), ist für die Grundlagenforschung eine verlässliche und reproduzierbare Detektion von Veränderungen der mADAM10-Levels, in Abhängigkeit verschiedener Stimuli, essentiell. Beispielsweise war der Acitretin-Effekt auf mADAM10 in primären Neuronen nur unter GI254023x-Zugabe zum Zellysepuffer sichtbar (114). Dies verdeutlicht die Relevanz der präanalytischen Autoproteolyse für die Detektion relativ kleiner Änderungen der mADAM10-Abundanz. Dementsprechend liefert diese Arbeit ein einfaches analytisches Werkzeug, welches nicht nur für die Entwicklung neuer ADAM10-aktivierender/inhibierender Therapien, sondern auch für die Bestimmung der Kristallstruktur der gesamten Protease und möglicherweise auch deren Komplex mit Interak-

tionpartnern, wie den Tetraspaninen oder SAP97 (45, 64, 67), genutzt werden kann. Weiterhin könnte hiermit auch die Identifikation neuer ADAM10-Interaktionspartner gelingen.

Auch für die Aufreinigung von ADAM10 — z.B. für *in vitro* Proteaseassays — hat die autokatalytische Degradation der Protease eine große Bedeutung. So verkauft R&D Systems beispielsweise eine rekombinante ADAM10-Ektodomäne mit einem C-terminalen His-tag. Laut Datenblatt fehlt allerdings dem größten Teil des rekombinanten Enzyms der entsprechende His-tag. Eine autoproteolytische Abspaltung wäre eine mögliche Erklärung für das Fehlen der C-terminalen Aminosäuren. Tatsächlich wird das Autoproteolysemodell auch durch die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur der ADAM10-Ektodomäne gestützt. Hier zeigte sich, dass ADAM10 in natura eine kompakte Faltung annimmt, bei der sich das aktive Zentrum der Protease nahe an seiner Juxtamembrandomäne — und damit einer möglichen Schnittstelle — befindet (Abb. 2) (61). An sich ist die Lokalisation einer Metalloproteasen-Schnittstelle im Bereich der Juxtamembranregion nicht weiter verwunderlich, da auch ADAM9 und ADAM15 ADAM10 in dieser Region schneiden und für eine Freisetzung der ADAM10-Ektodomäne sorgen können (173). Letztlich liefert die Kristallstruktur den Beweis, dass das aktive Zentrum von ADAM10 in unmittelbarer Nähe der Zellmembran lokalisiert ist, wo die Protease nicht nur zahlreiche Membranproteine, sondern auch sich selbst schneiden kann, sobald durch Zerstörung der Membran die entsprechenden Schnittstellen freigegeben wurden (zusammengefasst in Abb.6). Interessanterweise erwies sich ADAM10s Kristallstruktur als ein Tetramer, bei dem die C-terminalen Aminosäuren des einen mADAM10 Moleküls im aktiven Zentrum des benachbarten mADAM10-Moleküls gebunden waren (61). Somit wäre theoretisch auch eine intermolekulare Autoproteolyse möglich. Jedoch scheint ADAM10 in der intakten Zelle zum einen mit seinen Transportproteinen, den Tspans C8 assoziiert zu sein, welche an ADAM10s Juxtamembran- und Transmembrandomäne binden und somit einer möglichen intermolekularen Proteolyse entgegen wirken würden (64); zum anderen stellt die intakte Zellmembran ein sterisches Hindernis dar, welche die jeweiligen Schnittstellen vor ADAM10s aktivem Zentrum abschirmt.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war, dass mADAM10, im Vergleich zu seinen Substraten (APP (HWZ: 30-60 Minuten) (174)), eine vergleichsweise lange Halbwertszeit besitzt (ca. 12h) (113), wodurch auch eine relativ milde Erhöhung der zellulären ADAM10-Levels — z.B. durch Acitretin — einen nachhaltigen Einfluss auf die APP-Prozessierung haben könnte. Folglich könnte auch eine Inhibition der Protease mit einem fest an das aktive Zentrum gebundenen kompetitiven Inhibitor einen langanhaltenden Effekt haben. Dies könnte z.B. zur

Behandlung von Autoimmunerkrankungen (170-172), oder als zielgerichtete Therapie bei bestimmten Tumorerkrankungen sinnvoll sein (49, 168, 169). Da jedoch ADAM10 in verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Bindungspartnern, wie etwa den Tetraspaninen oder SAP97 (45, 64, 67) interagiert, ist es durchaus möglich, dass ADAM10 je nach Bindungspartner/Zelltyp andere Halbwertszeiten aufweist.

ADAM10 ist nicht die Einzige Protease, welche einer autokatalytischen Spaltung unterzogen wird. Limitierte Autoproteolyse ist seit langem als Aktivierungsmechanismus von Verdauungsenzymen wie z.B. Trypsin bekannt (166). Unter pathologischen Bedingungen spielt dieser Prozess eine große Rolle bei der Pathogenese der Pankreatitis. Hier führt die Freisetzung von Pankreasenzymen (wie Trypsin) und deren konsekutive intrapankreatische Autoaktivierung zu einer Autodigestion des Pankreasgewebes (143). Auch Proteasen aus der ADAM-Familie benötigen eine autokatalytische Aktivierung. ADAM8 entfernt z.B. in einer intermolekularen Reaktion seine eigene Prodomäne (175). Auch die eng mit ADAM10 verwandte Protease ADAM17 fällt im Rahmen der Präanalytik einer autoproteolytische Degradation zum Opfer (68). Im Falle von ADAM17 lässt sich dieser Prozess durch Zugabe des Metalloproteaseinhibitors 1,10-Phenanthrolin verhindern. Im Anbetracht all dieser Daten ist es durchaus möglich, dass auch andere ADAMs autokatalytisch gespalten werden, was auch hier die Zugabe spezifischer Inhibitoren im Rahmen der Präanalytik notwendig machen könnte.

5.6 Ausblick

Obwohl die Firma Biogen noch im März 2019 ihre beiden Phase III Studien ENGAGE und EMERGE zum A β -Antikörper Aducanumab aufgrund fehlender Wirksamkeit eingestellt hatte (176), führte eine erneute Auswertung nun vorliegender Daten (Stand Oktober 2019) zu einer überraschenden Kehrtwende (177): Während die EMERGE-Studie demnach ihren primären Endpunkt erreichte und die Patienten eine signifikante Verlangsamung der kognitiven Beeinträchtigung zeigten, konnte die ENGAGE-Studie immerhin nachweisen, dass die Patienten, welche hohe Dosen des Antikörpers erhalten hatten, tatsächlich von der Therapie profitierten (Verbesserung der Kognition, des Gedächtnisses, der Orientierung und der Sprachfunktion).

Auch wenn bei dieser Entwicklung mit Sicherheit finanzielle Interessen eine große Rolle gespielt haben, könnte diese Nachricht nichtsdestotrotz ein Wegbereiter für andere Therapieansätze sein. Insbesondere wird hierdurch die Amyloidhypothese als kausaler therapeutischer Angriffspunkt gestärkt. Folglich könnten nun auch BACE1-Inhibitoren, γ -Sekretase-Modulatoren oder ADAM10-basierte Therapien wieder in den Fokus der Pharmaindustrie

rücken. Hierbei könnte -auch im Anbetracht der Daten dieser Studie - eine ADAM10-Therapie besonders interessant werden. Denn während BACE1-Inhibitoren mitunter viele neuropsychiatrische Nebenwirkungen verursachten (30) und γ -Sekretaseinhibitoren sich als relativ toxisch erwiesen (27, 29, 134), wurde eine ADAM10-Stimulation unter klinischen Bedingungen vergleichsweise am besten vertragen (40, 114). Allerdings muss hierbei erwähnt werden, dass die Beobachtungszeit der mit Acitretin behandelten Patienten bislang äußerst kurz war (28 Tage). Daher lassen sich natürlich keine verlässlichen Aussagen zu möglichen Langzeitfolgen machen. Jedoch war Acitretin bereits jahrzehntelang in der Dermatologie im Einsatz, ohne dass bisher schwerwiegende zentralnervöse Nebenwirkungen beschrieben wurden. Nichtsdestotrotz wird eine Studie mit deutlich längerer Laufzeit und entsprechenden follow-ups notwendig sein, um Acitretins Wirkungen auf die Kognition von Alzheimerpatienten überprüfen zu können. Mögliche Biomarker, um den Therapieerfolg währenddessen zu beobachten (sAPP α , NrCAM, etc.) stehen nun auch dank dieser Studie zur Verfügung (114). Weiterhin wäre eine Fall-Kontroll-Studie mit Psoriasispatienten, welche längere Zeit mit Acitretin behandelt wurden äußerst interessant. Bei diesen Patienten wäre insbesondere die Inzidenz und Prävalenz von Alzheimererkrankungen von großem Interesse. Dies würde allerdings einen sehr langen Beobachtungszeitraum, sowie relativ lange Therapiedauern voraussetzen.

Während Acitretin zu einer eher kruden ADAM10-Stimulation führt (142), bleibt in Zukunft die Entwicklung ADAM10-spezifischerer Substanzen abzuwarten. Hierfür liefert diese Arbeit mit der Entdeckung von ADAM10s präanalytischer Autodegradation (113), sowie deren Prävention, ein einfaches analytisches Werkzeug, um auch kleine Änderungen von ADAM10s Abundanz zu detektieren und hiermit mögliche Kandidatensubstanzen zu selektieren.

Diese Studie hat nicht nur einige Fragen zu ADAM10 und NrCAM beantwortet, sondern natürlich auch neue Fragen für weitere interessante Forschungsprojekte aufgeworfen: Welche Funktionen haben NrCAM und ADAM10 im adulten Nervensystem? Welchen Einfluss spielt die NrCAM-Spaltung hierbei? Welche Rolle spielen diese beiden Proteine bei neuropsychiatrischen Krankheitsbildern, wie Schizophrenien oder Impulskontrollstörungen? Unterscheiden sich die Substrate von ADAM10 im adulten vom heranwachsenden Nervensystem? Welche Konsequenz hat die Furin Spaltung für die Funktion von NrCAM? Welche Rolle spielen die Tetraspanine bei der Acitretinwirkung? Steckt dahinter ein anderer bislang komplett unbekannter Mechanismus?

Um diese Fragen zu beantworten werden neue biochemische Techniken, Mausmodelle und klinische Studien benötigt werden. Abschließend hoffe ich mit dieser Arbeit nicht nur ein wenig Pionierarbeit geleistet, sondern auch in paar Werkzeuge für die Beantwortung einiger dieser Fragen bereitgestellt zu haben.

6. Zusammenfassung der Arbeit

Die Metalloprotease ADAM10 (**A Disintegrin And Metalloprotease 10**) ist an wichtigen physiologischen Prozessen inner- und außerhalb des zentralen Nervensystems beteiligt. Da sie unter anderem durch proteolytische Spaltung des Amyloidvorläuferproteins (APP) die Produktion von neurotoxischem A β -Peptiden verhindern kann, ist ADAM10 eine mögliche therapeutische Zielstruktur bei der Behandlung von Morbus Alzheimer. Während des Transports durch das sekretorische Zellkompartiment wird katalytisch inaktives, immatures ADAM10 (proADAM10) in seine proteolytisch aktive, mature Form (mADAM10) überführt. Während proADAM10 in Immunoblots leicht nachzuweisen ist, hat sich dagegen die biochemische Detektion und Charakterisierung von mADAM10 als schwierig erwiesen. Dies führte zu der Ansicht, dass mADAM10 nur einen Bruchteil der zellulären ADAM10-Gesamtmenge ausmacht und ADAM10 folglich ineffektiv maturiert. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass mADAM10 während der biochemischen Zellyse einer schnellen, autokatalytischen Degradation anheimfällt, welche die Detektion von mADAM10 in Immunoblots entscheidend beeinträchtigt. Dieser Prozess war auf ADAM10s katalytische Aktivität angewiesen und ließ sich durch Zugabe von kompetitiven ADAM10-Inhibitoren zum Zellysepuffer unterbinden. Diese Arbeit zeigt, dass eine autoproteolytische Degradation von mADAM10 — durch Zugabe spezifischer Inhibitoren bei der biochemischen Zellyse — verhindert werden muss, um eine verlässliche und reproduzierbare mADAM10-Detektion zu gewährleisten. Hiermit soll die biochemische Analytik für ADAM10 verbessert werden, um damit neue mechanistisch und therapeutisch orientierte ADAM10-Studien zu ermöglichen. In einem zweiten Teil sollte — mit Hilfe dieser verbesserten Analytik — die funktionelle Konsequenz der Spaltung des Membranproteins NrCAM durch ADAM10 und seine Eignung als Biomarker für Änderungen der ADAM10-Aktivität in vivo untersucht werden. ADAM10 schneidet eine große Anzahl unterschiedlicher Substrate, was im Rahmen einer therapeutischen ADAM10-Aktivierung zu entsprechenden, Therapie limitierenden Nebenwirkungen führen könnte. Jedoch könnten diese Substrate — zusammen mit APP — als mögliche Biomarker genutzt werden, um die ADAM10-Aktivität in klinischen Studien zu überwachen und neue selektive ADAM10-Aktivatoren zu entwickeln. Diese Arbeit zeigt, dass das neuronale Zelladhäsionsmolekül

NrCAM als ein solches Substrat — und somit Biomarker — in Frage kommt. Desweiteren zeigt diese Arbeit, dass ADAM10 NrCAM-abhängig das Auswachsen von Neuriten reguliert, indem die Protease NrCAMs neuronale Zelloberflächenexpression kontrolliert. In primären murinen Neuronen ließ sich die NrCAM-Spaltung interessanterweise — im Gegensatz zu APP — nicht durch den generellen ADAM10-Aktivator Acitretin stimulieren. Folglich scheint eine Substrat-spezifische ADAM10-Aktivierung entgegen bisheriger Erwartungen möglich zu sein. Diese Beobachtungen konnten in der Folge auch in einer proteomischen Analyse von Patientenliquorproben einer klinischen Phase II-Studie bestätigt werden. Zudem konnte hierbei gezeigt werden, dass nicht nur NrCAM, sondern auch die meisten anderen bisher identifizierten ADAM10-Substrate durch die Acitretinbehandlung unbeeinträchtigt blieben.

7. Referenzen

1. D. J. Selkoe, J. Hardy, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**, 595-608 (2016).
2. P. Scheltens *et al.*, Alzheimer's disease. *The Lancet* **388**, 505-517 (2016).
3. R. Guerreiro, J. Hardy, Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **11**, 732-737 (2014).
4. J. Nyberg *et al.*, Cardiovascular and cognitive fitness at age 18 and risk of early-onset dementia. *Brain* **137**, 1514-1523 (2014).
5. R. F. Gottesman *et al.*, Midlife hypertension and 20-year cognitive change: the atherosclerosis risk in communities neurocognitive study. *JAMA Neurol* **71**, 1218-1227 (2014).
6. A. M. Rawlings *et al.*, Diabetes in midlife and cognitive change over 20 years: a cohort study. *Ann Intern Med* **161**, 785-793 (2014).
7. L. G. Exalto *et al.*, Risk score for prediction of 10 year dementia risk in individuals with type 2 diabetes: a cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **1**, 183-190 (2013).
8. S. Norton, F. E. Matthews, D. E. Barnes, K. Yaffe, C. Brayne, Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol* **13**, 788-794 (2014).

9. R. Howard *et al.*, Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **366**, 893-903 (2012).
10. K. L. Lanctot *et al.*, Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ* **169**, 557-564 (2003).
11. A. Alzheimer, H. Forstl, R. Levy, On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry* **2**, 71-101 (1991).
12. J. Hardy, D. J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356 (2002).
13. K. Beyreuther, C. L. Masters, Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. *Brain Pathol* **1**, 241-251 (1991).
14. J. Hardy, D. Allsop, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 383-388 (1991).
15. D. J. Selkoe, Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am* **265**, 68-71, 74-66, 78 (1991).
16. B. De Strooper, E. Karran, The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* **164**, 603-615 (2016).
17. J. Tüshaus, T. Brummer, S. A. Müller, S. F. Lichtenthaler, Proteasen in der Alzheimer-Forschung – Freund oder Feind? *BIOspektrum* **23**, 391-393 (2017).
18. P. Saftig, S. F. Lichtenthaler, The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol* **135**, 1-20 (2015).
19. H. Braak, E. Braak, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259 (1991).
20. J. Brettschneider, K. Del Tredici, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* **16**, 109-120 (2015).
21. M. B. Podlisny, G. Lee, D. J. Selkoe, Gene dosage of the amyloid beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Science* **238**, 669-671 (1987).
22. E. H. Corder *et al.*, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923 (1993).
23. T. Jonsson *et al.*, Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **368**, 107-116 (2013).
24. T. Jonsson *et al.*, A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96-99 (2012).

25. S. A. Small, K. Duff, Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* **60**, 534-542 (2008).
26. P. A. Boyle *et al.*, Much of late life cognitive decline is not due to common neurodegenerative pathologies. *Ann Neurol* **74**, 478-489 (2013).
27. R. S. Doody *et al.*, A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **369**, 341-350 (2013).
28. V. Coric *et al.*, Safety and tolerability of the gamma-secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol* **69**, 1430-1440 (2012).
29. T. E. Golde, E. H. Koo, K. M. Felsenstein, B. A. Osborne, L. Miele, gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 2898-2907 (2013).
30. M. F. Egan *et al.*, Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **378**, 1691-1703 (2018).
31. M. F. Egan *et al.*, Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **380**, 1408-1420 (2019).
32. R. S. Doody *et al.*, Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **370**, 311-321 (2014).
33. S. Salloway *et al.*, Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **370**, 322-333 (2014).
34. K. R. Patel, Biogen's aducanumab raises hope that Alzheimer's can be treated at its source. *Manag Care* **24**, 19 (2015).
35. S. Lammich *et al.*, Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3922-3927 (1999).
36. M. P. Mattson *et al.*, Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* **10**, 243-254 (1993).
37. E. Jorissen *et al.*, The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* **30**, 4833-4844 (2010).
38. P. H. Kuhn *et al.*, ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* **29**, 3020-3032 (2010).

39. R. Postina *et al.*, A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **113**, 1456-1464 (2004).
40. K. Endres *et al.*, Increased CSF APPs- α levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology* **83**, 1930-1935 (2014).
41. M. Kim *et al.*, Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate α -secretase activity. *Hum Mol Genet* **18**, 3987-3996 (2009).
42. J. Suh *et al.*, ADAM10 missense mutations potentiate beta-amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron* **80**, 385-401 (2013).
43. R. Vassar, ADAM10 prodomain mutations cause late-onset Alzheimer's disease: not just the latest FAD. *Neuron* **80**, 250-253 (2013).
44. M. Malinverno *et al.*, Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J Neurosci* **30**, 16343-16355 (2010).
45. E. Marcello *et al.*, Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci* **27**, 1682-1691 (2007).
46. R. Epis *et al.*, Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain* **133**, 3323-3335 (2010).
47. B. W. Kunkle *et al.*, Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates Abeta, tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet* **51**, 414-430 (2019).
48. A. Sogorb-Esteve *et al.*, Levels of ADAM10 are reduced in Alzheimer's disease CSF. *J Neuroinflammation* **15**, 213 (2018).
49. H. S. Venkatesh *et al.*, Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature* **549**, 533-537 (2017).
50. M. Qu, B. O. Qiu, W. Xiong, D. Chen, A. Wu, Expression of α -disintegrin and metalloproteinase 10 correlates with grade of malignancy in human glioma. *Oncol Lett* **9**, 2157-2162 (2015).
51. S. B. Lee *et al.*, PAX2 regulates ADAM10 expression and mediates anchorage-independent cell growth of melanoma cells. *PLoS One* **6**, e22312 (2011).
52. M. Conacci-Sorrell *et al.*, The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res* **65**, 11605-11612 (2005).

53. P. H. Kuhn *et al.*, Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. *Elife* **5** (2016).
54. S. R. Damle *et al.*, ADAM10 and Notch1 on murine dendritic cells control the development of type 2 immunity and IgE production. *Allergy* **73**, 125-136 (2018).
55. B. N. Lambrecht, M. Vanderkerken, H. Hammad, The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol* **18**, 745-758 (2018).
56. A. Anders, S. Gilbert, W. Garten, R. Postina, F. Fahrenholz, Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* **15**, 1837-1839 (2001).
57. E. Wong, T. Maretzky, Y. Peleg, C. P. Blobel, I. Sagi, The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *J Biol Chem* **290**, 12135-12146 (2015).
58. F. Fahrenholz, S. Gilbert, E. Kojro, S. Lammich, R. Postina, Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann N Y Acad Sci* **920**, 215-222 (2000).
59. M. L. Moss *et al.*, The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* **282**, 35712-35721 (2007).
60. J. Schlondorff, C. P. Blobel, Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* **112 (Pt 21)**, 3603-3617 (1999).
61. T. C. M. Seegar *et al.*, Structural Basis for Regulated Proteolysis by the alpha-Secretase ADAM10. *Cell* **171**, 1638-1648 e1637 (2017).
62. J. Prox *et al.*, Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J Neurosci* **33**, 12915-12928, 12928a (2013).
63. F. Tippmann, J. Hundt, A. Schneider, K. Endres, F. Fahrenholz, Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* **23**, 1643-1654 (2009).
64. P. J. Noy *et al.*, TspanC8 Tetraspanins and A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Interact via Their Extracellular Regions: EVIDENCE FOR DISTINCT BINDING MECHANISMS FOR DIFFERENT TspanC8 PROTEINS. *J Biol Chem* **291**, 3145-3157 (2016).

65. A. L. Matthews, J. Szyroka, R. Collier, P. J. Noy, M. G. Tomlinson, Scissor sisters: regulation of ADAM10 by the TspanC8 tetraspanins. *Biochem Soc Trans* **45**, 719-730 (2017).
66. E. J. Haining *et al.*, The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. *J Biol Chem* **287**, 39753-39765 (2012).
67. S. Jouannet *et al.*, TspanC8 tetraspanins differentially regulate the cleavage of ADAM10 substrates, Notch activation and ADAM10 membrane compartmentalization. *Cell Mol Life Sci* **73**, 1895-1915 (2016).
68. J. Schlondorff, J. D. Becherer, C. P. Blobel, Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* **347 Pt 1**, 131-138 (2000).
69. K. Reiss, P. Saftig, The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 126-137 (2009).
70. D. Hartmann *et al.*, The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* **11**, 2615-2624 (2002).
71. C. Hundhausen *et al.*, The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**, 1186-1195 (2003).
72. A. Ludwig *et al.*, Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**, 161-171 (2005).
73. Z. Yang *et al.*, ADAM10-Initiated Release of Notch Intracellular Domain Regulates Microtubule Stability and Radial Migration of Cortical Neurons. *Cereb Cortex* **27**, 919-932 (2017).
74. A. Colombo *et al.*, Non-cell-autonomous function of DR6 in Schwann cell proliferation. *EMBO J* **37** (2018).
75. G. Meyer zu Horste *et al.*, Neuronal ADAM10 Promotes Outgrowth of Small-Caliber Myelinated Axons in the Peripheral Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* **74**, 1077-1085 (2015).

76. D. Sakry *et al.*, Oligodendrocyte precursor cells modulate the neuronal network by activity-dependent ectodomain cleavage of glial NG2. *PLoS Biol* **12**, e1001993 (2014).
77. K. Suzuki *et al.*, Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* **76**, 410-422 (2012).
78. E. Romi *et al.*, ADAM metalloproteases promote a developmental switch in responsiveness to the axonal repellent Sema3A. *Nat Commun* **5**, 4058 (2014).
79. H. E. Hsia *et al.*, Functions of 'A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)' in the mammalian nervous system. *Cell Mol Life Sci* **76**, 3055-3081 (2019).
80. E. Pasciuto *et al.*, Dysregulated ADAM10-Mediated Processing of APP during a Critical Time Window Leads to Synaptic Deficits in Fragile X Syndrome. *Neuron* **87**, 382-398 (2015).
81. M. Ayalew *et al.*, Convergent functional genomics of schizophrenia: from comprehensive understanding to genetic risk prediction. *Molecular Psychiatry* **17**, 887-905 (2012).
82. Z. A. Kohutek, C. G. diPierro, G. T. Redpath, I. M. Hussaini, ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci* **29**, 4605-4615 (2009).
83. H. C. Altmepfen *et al.*, The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *Elife* **4** (2015).
84. H. C. Altmepfen *et al.*, Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener* **6**, 36 (2011).
85. B. Vincent *et al.*, The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem* **276**, 37743-37746 (2001).
86. E. Vezzoli *et al.*, Inhibiting pathologically active ADAM10 rescues synaptic and cognitive decline in Huntington's disease. *J Clin Invest* **130** (2019).
87. M. Grumet, V. Mauro, M. P. Burgoon, G. M. Edelman, B. A. Cunningham, Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **113**, 1399-1412 (1991).
88. A. Heyden, F. Angenstein, M. Sallaz, C. Seidenbecher, D. Montag, Abnormal axonal guidance and brain anatomy in mouse mutants for the cell recognition molecules close

- homolog of L1 and NgCAM-related cell adhesion molecule. *Neuroscience* **155**, 221-233 (2008).
89. P. F. Maness, M. Schachner, Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* **10**, 19-26 (2007).
 90. T. Sakurai, The role of NrCAM in neural development and disorders--beyond a simple glue in the brain. *Mol Cell Neurosci* **49**, 351-363 (2012).
 91. G. Morales *et al.*, Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* **11**, 1113-1122 (1993).
 92. T. Kuwajima *et al.*, Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. *Neuron* **74**, 676-690 (2012).
 93. G. P. Demyanenko *et al.*, Neural cell adhesion molecule NrCAM regulates Semaphorin 3F-induced dendritic spine remodeling. *J Neurosci* **34**, 11274-11287 (2014).
 94. V. Mohan *et al.*, Temporal Regulation of Dendritic Spines Through NrCAM-Semaphorin3F Receptor Signaling in Developing Cortical Pyramidal Neurons. *Cereb Cortex* 10.1093/cercor/bhy004 (2018).
 95. T. Kuwajima, C. A. Soares, A. A. Sitko, V. Lefebvre, C. Mason, SoxC Transcription Factors Promote Contralateral Retinal Ganglion Cell Differentiation and Axon Guidance in the Mouse Visual System. *Neuron* **93**, 1110-1125 e1115 (2017).
 96. E. T. Stoekli, L. T. Landmesser, Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* **14**, 1165-1179 (1995).
 97. K. Feinberg *et al.*, A glial signal consisting of gliomedin and NrCAM clusters axonal Na⁺ channels during the formation of nodes of Ranvier. *Neuron* **65**, 490-502 (2010).
 98. V. Amor *et al.*, Long-term maintenance of Na⁺ channels at nodes of Ranvier depends on glial contact mediated by gliomedin and NrCAM. *J Neurosci* **34**, 5089-5098 (2014).
 99. A. W. Custer *et al.*, The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation. *J Neurosci* **23**, 10032-10039 (2003).

100. J. Falk, C. Bonnon, J. A. Girault, C. Faivre-Sarrailh, F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol Cell* **94**, 327-334 (2002).
101. K. Susuki *et al.*, Three mechanisms assemble central nervous system nodes of Ranvier. *Neuron* **78**, 469-482 (2013).
102. A. Sehgal *et al.*, Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. *Int J Cancer* **76**, 451-458 (1998).
103. Y. Zhang *et al.*, Positive Feedback Loops Between NrCAM and Major Signaling Pathways Contribute to Thyroid Tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **102**, 613-624 (2017).
104. B. Gorka *et al.*, NrCAM, a neuronal system cell-adhesion molecule, is induced in papillary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* **97**, 531-538 (2007).
105. T. Marui *et al.*, Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**, 1-10 (2009).
106. R. J. Perrin *et al.*, Identification and validation of novel cerebrospinal fluid biomarkers for staging early Alzheimer's disease. *PLoS One* **6**, e16032 (2011).
107. M. Muller, J. A. Claassen, H. B. Kuiperij, M. M. Verbeek, Cerebrospinal Fluid NrCAM is not a Suitable Biomarker to Discriminate between Dementia Disorders--A Pilot Study. *J Alzheimers Dis* **46**, 605-609 (2015).
108. W. T. Hu *et al.*, Novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol* **119**, 669-678 (2010).
109. K. R. Wildsmith *et al.*, Identification of longitudinally dynamic biomarkers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid by targeted proteomics. *Mol Neurodegener* **9**, 22 (2014).
110. T. Nakaya, P. Alexiou, M. Maragkakis, A. Chang, Z. Mourelatos, FUS regulates genes coding for RNA-binding proteins in neurons by binding to their highly conserved introns. *RNA* **19**, 498-509 (2013).
111. C. Lagier-Tourenne *et al.*, Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci* **15**, 1488-1497 (2012).
112. B. Rogelj *et al.*, Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain. *Sci Rep* **2**, 603 (2012).
113. T. Brummer *et al.*, The metalloprotease ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) undergoes rapid, postlysis autocatalytic degradation. *FASEB J* **32**, 3560-3573 (2018).

114. T. Brummer *et al.*, NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 10.15252/emmm.201809695 (2019).
115. M. R. Zocchi *et al.*, ADAM10 new selective inhibitors reduce NKG2D ligand release sensitizing Hodgkin lymphoma cells to NKG2D-mediated killing. *Oncoimmunology* **5**, e1123367 (2016).
116. A. Colombo *et al.*, Constitutive alpha- and beta-secretase cleavages of the amyloid precursor protein are partially coupled in neurons, but not in frequently used cell lines. *Neurobiol Dis* **49**, 137-147 (2013).
117. P. H. Kuhn *et al.*, Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J* **31**, 3157-3168 (2012).
118. F. A. Ran *et al.*, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281-2308 (2013).
119. K. Horiuchi *et al.*, Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol* **179**, 2686-2689 (2007).
120. X. Z. Wan *et al.*, Activation of NMDA receptors upregulates a disintegrin and metalloproteinase 10 via a Wnt/MAPK signaling pathway. *J Neurosci* **32**, 3910-3916 (2012).
121. S. Reinhardt *et al.*, Rescue of Hypovitaminosis A Induces Non-Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein (APP) Processing. *Curr Alzheimer Res* **13**, 1277-1289 (2016).
122. M. Pignoni *et al.*, Seizure protein 6 and its homolog seizure 6-like protein are physiological substrates of BACE1 in neurons. *Mol Neurodegener* **11**, 67 (2016).
123. S. F. Lichtenthaler, M. K. Lemberg, R. Fluhner, Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals--hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J* 10.15252/emj.201899456 (2018).
124. S. F. Lichtenthaler, C. Haass, H. Steiner, Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem* **117**, 779-796 (2011).
125. J. F. Kayyem, J. M. Roman, E. J. de la Rosa, U. Schwarz, W. J. Dreyer, Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure. *J Cell Biol* **118**, 1259-1270 (1992).
126. I. Kalus, B. Schnegelsberg, N. G. Seidah, R. Kleene, M. Schachner, The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* **278**, 10381-10388 (2003).

127. Y. Z. Xu *et al.*, Proteolytic cleavage of the ectodomain of the L1 CAM family member Tractin. *J Biol Chem* **278**, 4322-4330 (2003).
128. G. van Tetering *et al.*, Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem* **284**, 31018-31027 (2009).
129. E. C. Bozkulak, G. Weinmaster, Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol* **29**, 5679-5695 (2009).
130. C. Sanchez-Irizarry *et al.*, Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol Cell Biol* **24**, 9265-9273 (2004).
131. D. Pan, G. M. Rubin, Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**, 271-280 (1997).
132. R. Kopan, M. X. Ilagan, The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216-233 (2009).
133. E. R. Andersson, R. Sandberg, U. Lendahl, Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* **138**, 3593-3612 (2011).
134. V. Coric *et al.*, Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* **72**, 1324-1333 (2015).
135. S. Ostrowitzki *et al.*, Correction to: A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **10**, 99 (2018).
136. L. S. Honig *et al.*, Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **378**, 321-330 (2018).
137. Z. Cai *et al.*, Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration. *Cell Res* **26**, 886-900 (2016).
138. S. L. Friedman, Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655-1669 (2008).
139. K. Chalupsky *et al.*, ADAM10/17-dependent release of soluble c-Met correlates with hepatocellular damage. *Folia Biol (Praha)* **59**, 76-86 (2013).
140. M. Muller *et al.*, A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) is a central regulator of murine liver tissue homeostasis. *Oncotarget* **7**, 17431-17441 (2016).
141. K. Endres, G. Mitteregger, E. Kojro, H. Kretzschmar, F. Fahrenholz, Influence of ADAM10 on prion protein processing and scrapie infectivity in vivo. *Neurobiol Dis* **36**, 233-241 (2009).

142. C. Prinzen *et al.*, Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC Genomics* **10**, 66 (2009).
143. H. Blum, E. , D. Müller-Wieland, *Klinische Pathophysiologie* (Thieme, 2018), vol. 10, pp. 1284.
144. G. Herold, *Innere Medizin* (2015), pp. 1002.
145. M. Dos Santos Guilherme *et al.*, The Synthetic Retinoid Acitretin Increases IL-6 in the Central Nervous System of Alzheimer Disease Model Mice and Human Patients. *Front Aging Neurosci* **11**, 182 (2019).
146. S. Yu, L. Levi, R. Siegel, N. Noy, Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RARs) and peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta). *J Biol Chem* **287**, 42195-42205 (2012).
147. C. Hohoff, T. Borchers, B. Rustow, F. Spener, H. van Tilbeurgh, Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. *Biochemistry* **38**, 12229-12239 (1999).
148. R. L. Smathers, D. R. Petersen, The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics* **5**, 170-191 (2011).
149. M. K. E. Schafer, I. Tegeder, NG2/CSPG4 and progranulin in the posttraumatic glial scar. *Matrix Biol* **68-69**, 571-588 (2018).
150. S. Vadivelu *et al.*, NG2+ progenitors derived from embryonic stem cells penetrate glial scar and promote axonal outgrowth into white matter after spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med* **4**, 401-411 (2015).
151. S. Dash-Wagh *et al.*, The survival promoting peptide Y-P30 promotes cellular migration. *Mol Cell Neurosci* **48**, 195-204 (2011).
152. M. Burian, B. Schitteck, The secrets of dermcidin action. *Int J Med Microbiol* **305**, 283-286 (2015).
153. J. Prox *et al.*, Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci* **69**, 2919-2932 (2012).
154. L. Seipold *et al.*, In vivo regulation of the A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) by the tetraspanin 15. *Cell Mol Life Sci* 10.1007/s00018-018-2791-2 (2018).
155. M. A. Lane, S. J. Bailey, Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* **75**, 275-293 (2005).
156. U. Kunzel *et al.*, FRMD8 promotes inflammatory and growth factor signalling by stabilising the iRhom/ADAM17 sheddase complex. *Elife* **7** (2018).

157. I. Oikonomidi *et al.*, iTAP, a novel iRhom interactor, controls TNF secretion by policing the stability of iRhom/TACE. *Elife* **7** (2018).
158. T. Sakurai *et al.*, Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. *J Cell Biol* **136**, 907-918 (1997).
159. E. T. Stoeckli, P. Sonderegger, G. E. Pollerberg, L. T. Landmesser, Interference with axonin-1 and NrCAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* **18**, 209-221 (1997).
160. T. Maretzky *et al.*, L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* **25**, 9040-9053 (2005).
161. R. L. Sanz, G. B. Ferraro, M. P. Girouard, A. E. Fournier, Ectodomain shedding of Limbic System-Associated Membrane Protein (LSAMP) by ADAM Metallopeptidases promotes neurite outgrowth in DRG neurons. *Sci Rep* **7**, 7961 (2017).
162. S. Paudel *et al.*, ADAM10 mediates N-cadherin ectodomain shedding during retinal ganglion cell differentiation in primary cultured retinal cells from the developing chick retina. *J Cell Biochem* **114**, 942-954 (2013).
163. F. Martins, J. B. Serrano, T. Muller, E. S. O. A. B. da Cruz, S. Rebelo, BRI2 Processing and Its Neuritogenic Role Are Modulated by Protein Phosphatase 1 Complexing. *J Cell Biochem* **118**, 2752-2763 (2017).
164. D. Kiryushko, V. Berezin, E. Bock, Regulators of Neurite Outgrowth: Role of Cell Adhesion Molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1014**, 140-154 (2004).
165. S. S. Moy, R. J. Nonneman, N. B. Young, G. P. Demyanenko, P. F. Maness, Impaired sociability and cognitive function in Nrcam-null mice. *Behav Brain Res* **205**, 123-131 (2009).
166. R. Klinke, H. C. Pape, A. Kurtz, S. Silbernagl, *Physiologie* (Thieme, 2009), vol. 6, pp. 944.
167. A. C. Chen *et al.*, Physical and functional interaction between the alpha- and gamma-secretases: A new model of regulated intramembrane proteolysis. *J Cell Biol* **211**, 1157-1176 (2015).

168. K. Goto, J. Arai, A. Stephanou, N. Kato, Novel therapeutic features of disulfiram against hepatocellular carcinoma cells with inhibitory effects on a disintegrin and metalloproteinase 10. *Oncotarget* **9**, 18821-18831 (2018).
169. S. Wetzel, L. Seipold, P. Saftig, The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1864**, 2071-2081 (2017).
170. J. C. Lownik, J. L. Wimberly, D. H. Conrad, R. K. Martin, B Cell ADAM10 Controls Murine Lupus Progression through Regulation of the ICOS:ICOS Ligand Axis. *J Immunol* **202**, 664-674 (2019).
171. D. Lagares *et al.*, Corrigendum: ADAM10-mediated ephrin-B2 shedding promotes myofibroblast activation and organ fibrosis. *Nat Med* **23**, 1499 (2017).
172. C. R. Smulski *et al.*, BAFF- and TACI-Dependent Processing of BAFFR by ADAM Proteases Regulates the Survival of B Cells. *Cell Rep* **18**, 2189-2202 (2017).
173. T. Tousseyn *et al.*, ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* **284**, 11738-11747 (2009).
174. E. Storey, M. Katz, Y. Brickman, K. Beyreuther, C. L. Masters, Amyloid precursor protein of Alzheimer's disease: evidence for a stable, full-length, trans-membrane pool in primary neuronal cultures. *Eur J Neurosci* **11**, 1779-1788 (1999).
175. U. Schlomann *et al.*, The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* **277**, 48210-48219 (2002).
176. Biogen (2019) <http://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-and-eisai-discontinue-phase-3-engage-and-emerge-trials>.
177. Biogen (2019) <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-plans-regulatory-filing-aducanumab-alzheimers-disease>.